AVANCES

EN CIENCIAS E INGENIERIAS

JUNIO 2010
Vol. 2 - Nº 2
http:www.usfq.edu.ec/avances

PUBLICACION PERIODICA DE
LA UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO DE QUITO
www.usfq.edu.ec
ISSN 1390-5384

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
ARTÍCULO/ARTICLE SECCIÓN/SECTION A

Estudio computacional cuanto-mecánico de la interacción del hidrógeno molecular [H_2] con el ZnO_4(1,4-bencenodicarboxilato)$_3$ [MOF-5]

F. Javier Torres[1*], Matteo Ferrabone[2], Francesco Napoli[2], Bartolomeo Civalleri[2]

[1] *Colegio de Ciencias e Ingeniería - El Politécnico, Universidad San Francisco de Quito. Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador*
[2] *Dipartimento di Chimica IFM and NIS Centre of Excellence, Università di Torino, Via P. Giuria 7, 10125 Torino, Italy*
[*] *Autor principal/Corresponding author, e-mail: jtorres@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: C. Zambrano, Ph.D.
Recibido/Received: 01/09/2010. Aceptado/Accepted: 01/19/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 05/21/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

The potential of ZnO_4(1,4-bencenodicarboxilato)$_3$ [MOF-5] as media for adsorptive hydrogen storage is studied by means of quantum-mechanical calculations of the binding energy of H_2 molecules adsorbed on different sites of the MOF-5 crystalline structure. In a first stage of the study, the binding energy is computed in periodic models with the B3LYP functional as level of theory, together with a localized Gaussian type basis set for the wavefunction expansion. Subsequently, the computed binding energies are refined by including the contribution of the dispersive forces, which are estimated at the MP2 level in molecular models cut off from the periodic structure as established within the P-ONIOM approach.

Keywords. *Ab Initio* calculations, periodic models, H_2 storage, dispersive forces.

Resumen

El potencial del ZnO_4(1,4-bencenodicarboxilato)$_3$ [MOF-5] para almacenar hidrógeno vía adsorción es evaluado a través de cálculos cuanto-mecánicos de la energía de interacción entre moléculas de H_2 y diferentes sitios de la estructura cristalina de este material. En una primera fase del estudio, la energía de interacción es calculada en modelos periódicos usando el funcional B3LYP como nivel de teoría junto con un set de funciones base localizadas de tipo Gaussiano que es usado para expandir la función de onda del sistema. Posteriormente, con el objetivo de obtener resultados que describan mejor el proceso, se incluye a los valores calculados la contribución de las fuerzas de dispersión mediante el método P-ONIOM usando cálculos MP2 en modelos moleculares extraídos de la estructura cristalina.

Palabras Clave. Cálculos *Ab Initio*, modelos periódicos, almacenamiento de H_2, fuerzas de dispersión.

Introducción

Es inminente el hecho de que en un futuro cercano la humanidad enfrentará una crisis energética mundial debido a dos factores: (i) el constante incremento de la demanda global de energía, el cual hoy en día alcanza los 5.08×10^{17} BTU y que se cree incrementará aproximadamente en un 33.5 % en los siguientes 20 años [1] y (ii) la constante disminución de las reservas de petróleo y gas natural, las mismas que se estima durarán 43 y 61 años, respectivamente, si estos recursos se siguen consumiendo al ritmo actual [1]. Por esta razón, resulta indispensable el desarrollo de las que se denominan Energías Alternativas [2], las cuales tendrían como objetivo reemplazar el uso de los combustibles fósiles en las actividades cotidianas e industriales de la humanidad. Una de las propuestas que se cree que podría ser aplicable es la de basar la economía mundial en el uso del H_2 como vector energético [3]. Sin embargo, la implementación efectiva de esta idea esta siendo frenada, principalmente, por los retos tecnológicos que implica el almacenamiento de hidrógeno, el cual en condiciones estándar de presión y temperatura es un gas muy poco comprimible [4]. Debido a esto, la búsqueda de métodos eficientes para almacenar hidrógeno se ha convertido en un tema de gran interés científico en los últimos años [5]. De los diferentes métodos que se han propuesto [6], se piensa que la adsorción de moléculas de H_2 en materiales microporosos podría ser la solución, pero

ISSN 1390-5384

hasta el momento no se han podido encontrar materiales que permitan adsorber y liberar cantidades significativas de H_2 en tiempos cortos y en condiciones de operación adecuadas (i.e., presión y temperatura) para la maquinaria y los vehículos que se usan en la actualidad. Con respecto a esto, se ha estimado que la energía de interacción que debe existir entre el H_2 y un material debe ser mayor a 15 kJ/mol a presión y temperatura estándar para lograr condiciones óptimas de almacenamiento [7].

En el presente artículo, se presenta el estudio teórico cuanto-mecánico de la interacción de moléculas de hidrógeno con los diferentes sitios de adsorción de la estructura cristalina del ZnO_4(1,4-bencenodicarboxilato)$_3$, mejor conocido como MOF-5, con el objetivo de evaluar el potencial de este material para almacenar H_2.

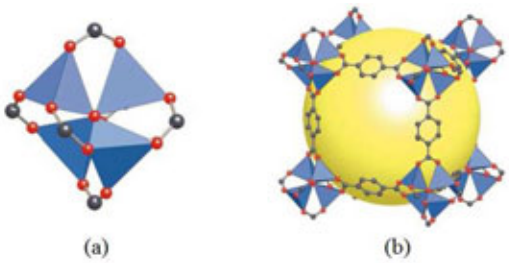


Figura 1: Unidad inorgánica $Zn_4O(CO_2)_6$ del MOF-5 (a) y su estructura tridimensional (b) que resulta de la unión de de ocho unidades $Zn_4O(CO_2)_6$ mediante ligandos dicarboxilato. Las esferas de color rojo y negro representan átomos de oxígeno y carbono, respectivamente. Las formas de color azul representan poliedros formados por Zn y O.

Metodología

Modelos y Métodos

MOF-5 es uno de los compuestos más representativos de una nueva clase de materiales sintéticos denominados *Metal Organic Frameworks* (i.e., MOFs) [8], los cuales están formados por unidades inorgánicas que se unen por medio de ligandos orgánicos para dar paso a una estructura tridimensional con cavidades bien definidas. En el caso específico del MOF-5, las unidades inorgánicas son *clusters* formados por cuatro tetraedros ZnO_4 que comparten un mismo átomo de oxígeno como vértice y que están unidos por medio de seis grupos CO_2 (ver Figura 1a). Las unidades $Zn_4O(CO_2)_6$ resultantes están enlazadas en las tres direcciones espaciales a través de moléculas de benceno para producir una celda cúbica con un gran espacio disponible en su interior como se observa en la Figura 1b.

El modelo del cristal MOF-5 para los cálculos periódicos fue construido en base a datos de difracción de neutrones de este material obtenidos a 3.5 K [9]. Según los datos de difracción, el MOF-5 cristaliza en una estructura que contiene dos unidades ZnO_4(1,4-bencenodicarboxilato)$_3$ y que pertenece al grupo espacial $Fm\bar{3}m$ [10]. Debido a la alta simetría del grupo espacial la celda unitaria del MOF-5 se describe completamente definiendo un solo parámetro de celda (i.e., *a*) y la posición relativa a los vectores de celda de siete átomos irreducibles (i.e., 1 átomo de zinc, 3 átomos de carbono, 2 átomos de oxígeno y 1 átomo de hidrógeno). Producto de la aplicación de los 48 operadores de simetría del grupo $Fm\bar{3}m$ los siete átomos irreducibles generan un total de 106 átomos confinados en la celda unitaria.

Como paso inicial de los cálculos se realizó la optimización de la geometría del MOF-5 con respecto a las coordenadas fraccionarias de los átomos irreducibles y del parámetro de celda. Los cálculos de optimización del cristal, así como los cálculos posteriores de energía, fueron realizados con el programa CRYSTAL06 [11] usando el funcional B3LYP [12] como nivel de teoría DFT (i.e., teoría del funcional de la densidad). Las funciones base adoptadas para generar la función de onda del sistema fueron de tipo Gaussiano con las siguientes contracciones: 8-4111-41G(f), 8-411G(d), 6-31G(d) y 31G(p) para los átomos de Zn, O, C e H, respectivamente. Condiciones de cálculo más severas que las definidas por defecto en CRYSTAL06 fueron empleadas para los cálculos del MOF-5 con el fin de obtener una descripción muy precisa de la función de onda del sistema. Por ejemplo, la condición para la convergencia del *Self Consistent Field*, (i.e., SCF) fue modificada a 10^{-10} Hartree y la red para integración numérica de los términos de intercambio-correlación del Hamiltoniano fue definida con 75 puntos radiales y 434 puntos angulares. Además, la red de puntos **k** en el espacio recíproco fue generada con un factor de shrinking [11] igual a 3, el que resulta en un total de 4 puntos **k** en la primera zona de Brillouin.

Para el estudio de la interacción del H_2 con el MOF-5, tres posibles sitios de absorción en el cristal previamente optimizado fueron considerados [13]: dos en la parte inorgánica denominados α y β, y uno en el ligando orgánico denominado δ (ver Figura 2). α, β y δ fueron estudiados por separado, añadiendo moléculas de H_2 con dos posibles orientaciones: perpendicular o paralela con respecto al plano que forman los átomos de cada sitio. Para cada caso se consideró la concentración máxima de hidrógeno, es decir que para α y β fueron añadidas un total de ocho moléculas de H_2 por celda unitaria debido a que existen cuatro de estos sitios en cada uno de los dos *clusters* inorgánicos que forman la estructura del MOF-5. Por otra parte, doce moléculas de H_2 fueron añadidas al estudiar el sitio de absorción δ, una sobre cada cara de los seis anillos bencénicos de la celda del MOF-5. Es importante mencionar que la estructura del sistema H_2/MOF-5 no fue optimizada nuevamente debido a que la ubicación de los átomos de hidrógeno en estos complejos provoca que se reduzca considerablemente la simetría del sistema, hecho que resulta en un notable incremento del costo de cálculo de la energía y su gradiente con respecto a la posición de los átomos, las mismas que son necesarias para el proceso de opti-

mización [14]. Por esta razón, la distancia optima entre las moléculas de H_2 y los sitios de adsorción (d_{S-H_2}) fue determinada mediante el cálculo de la energía de interacción (*EI*) a diferentes valores de d_{S-H_2}, la misma que fue variada entre 2.50 Å y 4.00 Å. Con respecto al parámetro d_{S-H_2}, es importante indicar que su definición depende del sitio de adsorción y de la orientación de la molécula de H_2 adsorbida. Para los sitios α y β los puntos de referencia son el átomo de oxígeno central y el átomo de zinc tetracoordinado, respectivamente (ver Figura 2.), mientras que para el sitio δ el punto de referencia corresponde al centro de masas del anillo bencénico. d_{S-H_2} se mide desde estos puntos de referencia hasta el átomo de H más cercano en el caso en el que la molécula se adsorbe con orientación perpendicular; y hasta el centro de masas de la molécula de H_2 en el caso en el que la orientación de adsorción es paralela.

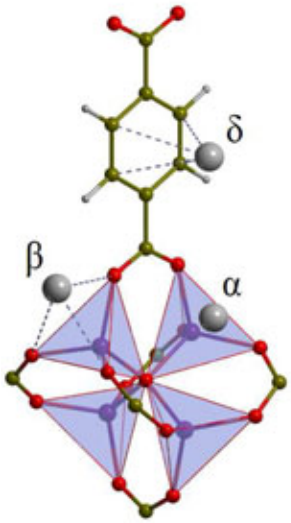


Figura 2: Sitios de adsorción del MOF-5. α se localiza sobre las caras de la unidad inorgánica en una posición equidistante de los tres grupos carboxílicos. β se localiza sobre una de las caras del tetraedro ZnO_4 y δ se localiza sobre el centro de masas del anillo bencénico.

Los valores de *EI* a diferentes distancias d_{S-H_2} fueron calculados de acuerdo a la siguiente expresión [15]:

$$EI = xE_{H_2} + E_{MOF-5} + E_{xH_2/MOF-5} \qquad (1)$$

donde los dos primeros términos corresponden a la energía de la molécula de H_2 y del cristal MOF-5, respectivamente; el tercer término es la energía del sistema H_2/MOF-5 que depende únicamente de d_{S-H_2} y *x* es el número de moléculas adsorbidas. La *EI* obtenida con la Ecn. 1 fue corregida posteriormente restando al valor de $E_{xH_2/MOF-5}$ resultante el error debido a la superposición de funciones base (ESFB) [16], para lo cual se usó el método Boys-Bernardi [17]. La energía de interacción corregida será referida como EI^c, en lo posterior.

Se sabe que al nivel DFT no se pueden describir de forma adecuada las fuerzas de dispersión [18], las cuales son importantes en complejos débilmente enlazados como en el presente caso. Por esta razón, los valores de la EI^c para cada caso fueron refinados usando el método P-ONIOM [19, 20], el mismo que ha dado excelentes resultados en estudios teóricos de la interacción del H_2 con la zeolita chabazita [21, 22, 23, 24]. En el método P-ONIOM el sistema H_2/MOF-5 es dividido en dos subsistemas que son tratados a diferentes niveles de teoría (i.e., *ALTO y BAJO*). Los subsistemas se denominan: (i) *sistema real* el cual es la estructura periódica y (ii) *sistema modelo* que es una porción del *sistema real*, la cual contiene la parte del cristal que es relevante para el estudio de la interacción. Los *sistemas modelo* empleados para el presente estudio se pueden observan en la Figura 3, en donde se aprecia que los modelos moleculares fueron saturados con átomos de hidrógeno terminales que sustituyen a los enlaces covalentes que fueron cortados. La definición de la energía de interacción P-ONIOM (EI^{ONIOM}) es:

$$\begin{aligned} EI^{ONIOM} &= EI^c_{[BAJO,REAL]} + EI^c_{[ALTO,MODELO]} \\ &\quad - EI^c_{[BAJO,MODELO]} \end{aligned} \qquad (2)$$

donde $EI^c_{[ALTO,MODELO]}$, $EI^c_{[BAJO,REAL]}$ y $EI^c_{[BAJO,MODELO]}$ corresponden a las energías de interacción calculadas con la Ecn. 1 en el sistema modelo con el nivel *ALTO* de teoría y en ambos sistemas real y modelo con el nivel de teoría *BAJO*. El superíndice *c* indica que las energías corresponden a valores corregidos con respecto al ESFB. En el presente estudio teórico el nivel *BAJO* de teoría corresponde al funcional B3LYP junto con las funciones base descritas al inicio de esta Sección, mientras que el nivel *ALTO* de teoría corresponde al método Moller-Plesset truncado al segundo orden (MP2) [25, 26, 27] junto con las funciones base aug-cc-pVDZ para los átomos de carbono, oxígeno e hidrógeno y las funciones base VDZp para el átomo de zinc. Es importante mencionar que la combinación del método MP2 con funciones base de gran flexibilidad permite una buena descripción de la correlación dinámica de los electrones causante de las fuerzas de dispersión en los sistemas multielectrónicos [26]. Los cálculos en el sistema modelo con los niveles de teoría *ALTO y BAJO* fueron realizados con el programa MOLPRO [28], el cual permite realizar cálculos MP2 exactos y de forma eficiente en modelos moleculares.

Resultados y Discusión

Resultados estructurales

Los principales parámetros estructurales obtenidos después de la optimización del MOF-5 a nivel B3LYP son reportados en la Tabla 1 junto con datos experimentales para su comparación. Como se puede observar el acuerdo entre los datos experimentales y calculados es excelente. Las diferencias más notables se observan en las longitudes de enlace, las cuales en el cálculo computacional resultan sobrestimadas, lo que a su vez causa

Parametro	Calc.	Exp.	% Δ
Celda			
a	26.088	25.909	0.7
V	17.76×10^3	17.39×10^3	2.1
ρ	0.571	0.577	-1.0
Enlaces			
O1-Zn	1.972	1.968	0.2
Zn-O2	1.961	1.947	0.7
O2-C1	1.270	1.254	1.3
C1-C2	1.499	1.515	-1.1
C2-C3	1.402	1.381	1.5
C3-C4	1.392	1.381	0.8
C3-H	1.084	1.108	-2.2
Ángulos			
Zn-O2-C1	131.7	130.7	0.8
O2-C1-O2	125.2	127.2	-1.6
O2-C1-C2	117.4	116.4	0.9
C1-C2-C3	120.1	120.l	0.0
C2-C3-H	119.2	119.5	-0.3

Tabla 1: Datos geométricos calculados y experimentales del MOF-5. El parámetro de celda (*a*) y la distancia de los enlaces están expresados en Å, la densidad (ρ) en g/cm^3, el volumen (V) en Å^3 y los ángulos en grados. Vea la Figura 4 para identificar los átomos referidos en la Tabla. a Datos experimentales tomados de Ref. [9]

que el parámetro de celda (*a*) obtenido en el cálculo sea ligeramente mayor al experimental.

Un análisis más detenido de los datos reportados en la Tabla 1 permite observar que el enlace Zn-O1 es mayor que el enlace Zn-O2 tanto en la estructura calculada como en la experimental (ver la Figura 4 para identificar estos átomos). Esta diferencia puede ser explicada considerando que los dos átomos de oxígeno están rodeados por un entorno químico diferente. El átomo O1 se encuentra interactuando con cuatro átomos de zinc a diferencia del átomo O2 el cual pertenece a los grupos carboxílicos del ligando orgánico. Debido a esto se puede sugerir que el primero de estos dos átomos se comporta de forma similar a los átomos de oxígeno en la fase Wurtzita del óxido de zinc puro (ZnO), en el cual los enlaces Zn-O tienen una longitud aproximada de 1.99 [29], muy cercana a los valores teórico y experimental del enlace Zn-O1 en el MOF-5 (ver Tabla 1). Evidencia más clara de la similitud entre el O1 del MOF-5 y los átomos de oxígeno del ZnO proviene de una reciente publicación [30] en la cual se comparan los mapas de deformación de densidad de carga de ambos materiales. En ese estudio se observó que la coordinación del oxígeno central de la unidad inorgánica del MOF-5 es igual a aquella de los átomos de oxígeno en el ZnO. Adicionalmente, el análisis de las cargas efectivas de Born en ese mismo trabajo [30] ha confirmado que O1 (-1.85 u.a.) es más negativo que O2 (-1.40 u.a.) pero es comparable a los átomos de oxígeno (-2.08 u.a.) en los polimorfos del ZnO.

Con respecto a la unidad orgánica, se observó que la longitud de los enlaces y los ángulos entre ellos se encuentran en el rango de los valores típicos del ligando bencenodicarboxilato.

$d_{\mathbf{S-H_2}}$	$EI^{\mathbf{c}}$	$d_{\mathbf{S-H_2}}$	$EI^{\mathbf{c}}$
2.50	-26.3	3.30	-8.0
2.60	-24.5	3.40	-6.4
2.70	-20.3	3.50	-5.6
2.80	-16.3	3.60	-5.1
2.90	-14.1	3.70	-5.0
3.00	-12.8	3.80	-4.2
3.10	-10.1	3.90	-3.5
3.20	-9.1	4.00	-2.9

Tabla 2: Energías de interacción obtenidas a nivel B3LYP a diferentes distancias $d_{\mathbf{S-H_2}}$ de la molécula de $\mathbf{H_2}$ adsorbida con orientación paralela en el sitio a del MOF-5. Los datos de la energía de interacción corresponden a valores libres del ESFB. Las distancias están expresadas en Å y las energías en kJ/mol.

Interacción del H_2 con los sitios α y β

Como ya se había comentado el proceso de adsorción del H_2 en los sitios α y β fue estudiado mediante el cálculo de la energía de interacción en diferentes geometrías del sistema H_2/MOF-5 que se obtenienen variando únicamente el parámetro d_{S-H_2} (i.e., distancia entre la molécula de H_2 y el sitio de adsorción, ver la Sección Modelos y Métodos) mientras que los otros grados de libertad se mantienen fijos. Esta simplificación en el análisis se justifica considerando que la formación de los complejos obedece a una interacción débil la cual no produce cambios estructurales en el adsorbente ni en el adsorbato. Se debe también mencionar que la validez de esta simplificación se ha demostrado en el estudio teórico de la interacción del H_2 con los centros polarizantes de la zeolita chabazita intercambiada con metales [21, 22, 23] en donde se ha observado que los cambios en la distancia H-H de las moléculas adsorbidas es alrededor de 3 milésimas de Å. Debido a las características semi-iónicas del cluster inorgánico que forma el MOF-5, se espera que esta unidad posea importantes fuerzas electroestáticas. Por esta razón se consideró razonable asumir que la interacción del H_2 con los sitios α y β se pueda describir de forma adecuada con métodos DFT. No obstante, las energías de interacción EI^c obtenidas al nivel B3LYP en los modelos periódicos resultaron ser negativas para todos los valores considerados del parámetro d_{S-H_2}, lo cual indica que la interacción es siempre repulsiva. Esto se observa en la Tabla 2, en la cual los datos calculados para las moléculas de H_2 adsorbidas en el sitio a son reportados. Estos resultados no concuerdan con las observaciones experimentales de Spencer et. al., [31] quien determinó mediante espectroscopía de dispersión inelástica de neutrones que el sitio más fuerte de adsorción de H_2 en el MOF-5 es justamente el sitio α, lo cual indica que la naturaleza real de la interacción entre el hidrógeno molecular y el MOF-5 no obedece a efectos electroestáticos como ha sido sugerido por varios autores [32, 33, 34] al proponer que los fenómenos de adsorción en este material ocurren principalmente vía fuerzas de van der Waals. Como ya se ha indicado, este tipo de fuerzas no se pueden describir correctamente con los funcionales DFT actuales, por lo que las EI^c obtenidas a nivel B3LYP debieron ser refinadas al nivel MP2 (usando el método P-ONIOM) para

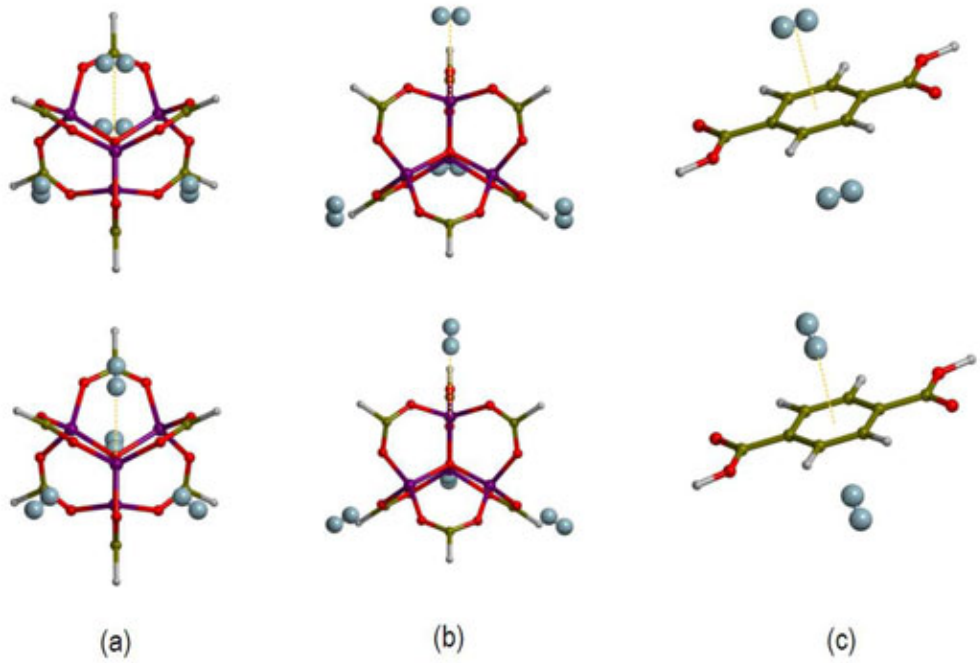


Figura 3: *Sistemas modelo* usados para los cálculos P-ONIOM de la molécula de H_2 adsorbida con orientación paralela (arriba) y perpendicular (abajo) sobre los sitios α (a), β (b) y δ (c) del MOF-5. Los átomos de zinc, carbono y oxígeno son representados con esferas de color magenta, café y rojo, respectivamente. Los átomos de la molécula de hidrógeno se representan con esferas de color celeste.

obtener valores más exactos. Los valores de EI^{ONIOM} calculados usando los sistemas modelo de las Figura 3 mostraron un notable incremento en las energías de interacción del H_2 con el sitio a pero no con el sitio β, lo que indica que el sitio principal de adsorción de la unidad inorgánica del MOF-5 es α en buen acuerdo con los resultados experimentales de Spencer et. al. [31] Como es reportado en la Tabla 3 valor EI^{ONIOM} para la interacción del H_2 con el sitio a es de 3.8 kJ/mol y 2.1 kJ/mol para las orientaciones de adsorción paralela y perpendicular, respectivamente. Mientras que la distancia d_{S-H_2} a la cual se obtienen estos valores de interacción es de 3.8 Å para ambas orientaciones. El hecho de que la interacción más fuerte se obtenga en el complejo de orientación paralela se debe probablemente a la naturaleza cuadrupolar de la molécula de hidrógeno la cual produce que esta se oriente de tal forma que sus lóbulos negativos queden expuestos hacia el potencial positivo de la copa molecular correspondiente al sitio α. A diferencia del sitio α, los datos en la Tabla 3 muestran que en el caso de la adsorción de H_2 en el sitio β la formación de complejos con orientación perpendicular es preferida aunque con una pequeña diferencia de energía (i.e., 0.9 kJ/mol contra 0.4 kJ/mol). Despreciando el hecho de que una diferencia de energías de 0.5 kJ/mol se encuentra dentro del error de los métodos DFT, se puede mencionar que la preferencia por la formación de complejos con orientación perpendicular en el sitio β está asociada a las características estructurales de esta zona de la unidad inorgánica del MOF-5. El sitio de adsorción β esta rodeado por tres ligandos orgánicos dispuestos de tal forma que sus átomos de hidrógeno del anillo aromático apuntan en dirección del átomo de zinc central del tetraedro (ver Figura 2), lo que provoca que la molécula de H_2 pueda acceder a este sitio solamente si se encuentra orientada de forma perpendicular con respecto al plano de los átomos de oxígeno enlazados al zinc. Es importante mencionar que estos efectos estéricos no se encuentran presentes en el sistema modelo del sitio β empleado para el método P-ONIOM (ver Figura 3), lo que puede ser una fuente de errores en el cálculo de las energías de interacción ONIOM de este sitio.

Sitio de Adsorción	**Orientación**	d_{S-H_2}	EI^c	EI^{ONI}
α	$\parallel$	3.8	-4.2	3.8
	$\perp$	3.9	-4.1	2.1
β	$\parallel$	3.7	-2.7	0.4
	$\perp$	3.7	-1.1	0.9
δ	$\parallel$	3.1	-4.1	3.2
	$\perp$	2.8	-2.2	4.2

Tabla 3: Energías de interacción B3LYP libres del ESFB (EI^c) y ONIOM (EI^{ONIOM}) para la molécula de H_2 adsorbida a una distancia d_{S-H_2} sobre los sitios α, β y δ del MOF-5. Las distancias están expresadas en Å y las energías en kJ/mol.

Interacción del H_2 con el sitio δ

La interacción del H_2 con el sitio δ que está ubicado sobre el anillo aromático de los ligandos orgánicos fue estudiada siguiendo el mismo procedimiento empleado para los sitios α y β; es decir que la energía de interacción EI^c fue calculada considerando diferentes valores del parámetro d_{S-H_2}. Las principales fuerzas presentes en el ligando orgánico del MOF-5 son las de dispersión por lo que se espera de antemano que a nivel B3LYP la descripción de la adsorción del H_2 en el sitio

δ sea pobre. Una mejor descripción del proceso se llevó a cabo usando el método P-ONIOM para el cual se emplearon los modelos moleculares ilustrados en la Figura 3 como *sistemas modelo*. Como se encuentra reportado en la Tabla 3, las energías de interacción ONIOM calculadas en los complejos de orientación paralela y perpendicular son 3.2. y 4.2 kJ/mol, respectivamente, mientras que las distancias d_{S-H_2} a las cuales se obtienen estos valores son cercanas a $\sim$3 Å en buen acuerdo con estudios computacionales anteriores de la interacción del H_2 con el ácido bencenodicarboxílico [33, 34, 35] y otros ligandos aromáticos [36, 37] empleados para el diseño de MOFs.

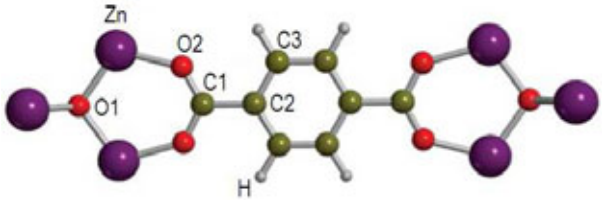


Figura 4: Fragmento de la estructura del MOF-5 con las etiquetas de los átomos de las unidades inorgánicas y orgánicas a los que se refieren los datos de la Tabla 1.

Los resultados presentes indican que la adsorción del H_2 en las unidades orgánicas del MOF-5 es ligeramente más fuerte que en las unidades inorgánicas; lo cual es un hecho que discrepa con observaciones experimentales [31]. Este desacuerdo entre teoría y experimento podría ser explicado en base al tamaño del *sistema modelo* empleado para los cálculos ONIOM. A este respecto, se espera que la inclusión de los *clusters* Zn_4O_{13} en el sistema modelo cause una redistribución de cargas desde los orbitales sp^2 de los átomos de carbono del ligando orgánico hacia las unidades inorgánicas, lo cual causaría una reducción de la densidad electrónica en los anillos bencénicos y por ende un debilitamiento de su poder de adsorción. Es importante mencionar que este fenómeno ya ha sido observado por Sagara y colaboradores [33, 34] quienes han reportado en sus estudios teóricos que la capacidad de adsorción del anillo aromático del ion bencenodicarboxilato depende de los contraiones empleados para balancear su carga, siendo esta mayor en el ácido bencenodicarboxílico y menor en la sal de litio.

Conclusiones

En el presente artículo se presentó el estudio de la interacción del H_2 con diferentes sitios de la estructura cristalina del MOF-5 (i.e., α, β y δ) mediante cálculos cuanto-mecánicos DFT, con el fin de analizar el potencial de este material para almacenar hidrógeno por adsorción. En un paso preliminar, la comparación de la estructura del MOF-5 que se obtuvo mediante los cálculos y de la estructura obtenida experimentalmente por difracción de neutrones mostró un excelente acuerdo entre las dos, lo cual es una indicación de la exactitud con la que se puede describir al MOF-5 con los métodos de simulación cuanto-mecánica empleados. Con respecto al cálculo de la energía de interacción entre la molécula de H_2 y los sitios de absorción α, β y δ se observó que los resultados obtenidos a nivel MP2 dentro del esquema P-ONIOM indican que el sitio de adsorción δ ubicado sobre los anillos bencénicos de las unidades orgánicas del MOF-5 es el más fuerte de los considerados con una energía de interacción favorable de 4.2 kJ/mol, valor que a su vez no es suficiente como para considerar al MOF-5 como un buen candidato para almacenar cantidades de hidrógeno significativas. Adicionalmente se puede comentar que en el presente trabajo se ha indicado que la susceptibilidad del método P-ONIOM con respecto a la elección de los *sistemas modelo* puede ser una fuente potencial de errores en la descripción de procesos de adsorción. Los resultados presentados sugieren que es necesaria futura investigación en el sistema H_2/MOF-5 empleando *sistemas modelo* de mayor dimensión, es decir que contengan una mayor cantidad de átomos de la zona cercana a los sitios de adsorción con el objetivo de confirmar o corregir los datos de este trabajo preliminar.

Agradecimientos

FJT agradece al grupo de Química Teórica de la *Università degli Studi di Torino* por la donación del programa CRYSTAL06, al grupo de Química Computacional y Teórica de la USFQ y en particular a los profesores C. Pisani y P. Ugliengo por sus valiosos comentarios al presente trabajo.

Referencias

[1] Conti, J. J., Holtberg, P. D., Beamon, J. A., Sweetnam, A. M., and Kydes, G. E. 2009. “Annual Energy Outlook 2009. In: Energy Information Administration” Available on EIA web site at: www.eia.doe.gov/oiaf/aeo/

[2] Turner, J. A. 2001. “A relizable renewable energy future.” *Science*. 414, 332–337.

[3] Crabtree, G. W., Dresselhaus, M. . S., and Buchanan, M. V. 2004. “The hydrogen eonomy.” *Phys. Today*. 57, 39–44.

[4] Schlapbach, L. 2009. “Technology: Hydrogen-fuelled vehicles.” *Nature*. 460:, 809–811.

[5] Zhou, L. 2005. “Progress and problems in hydrogen storage methods.” *Renew. Sust. Energ. Rev.* 9, 395–408.

[6] Zuttel, A. 2004. “Hydrogen storage methods.” *Naturwissenschaften*. 414, 345–352.

[7] Bhatia, S. K. and Myers, A. L. 2006. “Optimum conditions for adsorptive storage.” *Langmuir*. 22, 1688–1700.

[8] Li, H., Eddaoudi, M., O’Keeffe, M., and Yaghi, O. M. 1999. “Design and synthesis of an exceptionally stable and highly porous metal-organic framework.” *Nature*. 402, 276–279.

[9] Yildirim, T. and Hartman, M. R. 2005. “Direct observation of hydrogen adsorption sites and nanocague formation in metal-organic frameworks.” *Phys. Rev. Lett*. 95, 215504.

[10] Bilbao crystallographic server – the crystallographic site at the condensed matter physics department of the University of Basque country. Available at: http://www.cryst.ehu.es

[11] Dovesi, R., Saunders, V. R., Roetti, C., Orlando, R., amdN. M. Harrison, C. M. Z.-W., Doll, K., Civalleri, B., Bush, I. J., D'Arco, P., and Llunell, M. "CRYSTAL06 user's manual" *Università degli Studi di Torino*. Torino, Italy.

[12] Becke, A. D. 1993. "Density-functional thermochemistry. III. the role of exact exchange." *J. Chem. Phys*. 98, 5648–5652.

[13] Rowsell, J. L. C., Eckert, J., and Yaghi, O. M. 2005. "Characterization of H_2 binding sites in prototypical metal-organic framework by inelastic neutron scattering." *J. Am. Chem. Soc*. 127, 14904–14910.

[14] Creamer, C. J. 2004. "Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models", Wiley. New York, NY.

[15] Wormer, P. E. S. and van derAvoird, A. 2005 "Forty years of ab initio calculations on intermolecular forces." In C. E. Dykstra, G. Frenking, K. Kim, and G. E. Scuseria, (ed.), "Theory and Applications of Computational Chemistry The First Forty Years", 1047–1091 Elsevier.

[16] Kestner, N. R. 1968. "He–He interaction in the SCFMO approximation." *J. Chem. Phys*. 48, 252–257.

[17] Boys, F. S. and Bernardi, F. 1970. "The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. some procedures with reduced errors." *Mol. Phys.*. 19, 553–566.

[18] Kutzelnigg, W. 1976. "Quantum chemical calculation of intermolecular potentials, mainly of van der Waals type." *Farady Disc*. 62, 185–196.

[19] Roggero, I., Civalleri, B., and Ugliengo, P. 2001. "Modeling physisorption with the ONIOM method: the case of NH_3 at the isolated hydroxil group of the silica surface." *Chem. Phys. Lett*. 341, 625–632.

[20] Ugliengo, P. and Damin, A. 2002. "Are dispersive forces relevant for CO adsorption on the MgO(001) surface?." *Chem. Phys. Lett*. 366, 683–690.

[21] Civalleri, B., Torres, F. J., Demichelis, R., Terentyev, A., and Ugliengo, P. 2009. "Ab initio investigation of the interaction of H_2 with lithium exchanged low-silica chabazites." *J. Ph. Conf. Series*. 117, 012012.

[22] Torres, F. J., Civalleri, B., Terentyev, A., Ugliengo, P., and Pisani, C. 2007. "Theoretical study of molecular hydrogen adsorption in Mg-exchanged chabazite." *J. Chem. Phys. C*. 111, 1871–1873.

[23] Torres, F. J., Vitillo, J. G., Civalleri, B., Ricchiardi, G., and Zecchina, A. 2007. "Interaction of H_2 with alkali-metal-exchanged zeolites: a quantum mechanical study." *J. Chem. Phys. C*. 111, 2505–2513.

[24] Torres, F. J., Civalleri, B., Pisani, C., and Ugliengo, P. 2006. "An ab initio periodic study of acidic chabazite as a candidate for dihydrogen storage." *J. Chem. Phys. B*. 110, 10467–10474.

[25] Pisani, C., Busso, M., Capecchi, G., Casassa, S., Dovesi, R., Maschio, L., Zicovich-Wilson, C. M., and Schütz, M. 2005. "Local-MP2 electron correlation method for nonconducting crystals." *J. Chem. Phys*. 122, 094113.

[26] Suhai, S. and Ladik, J. 1982. "Perturbation theoretical calculation of the correlation energy in an infinite metallic hydrogen chain." *J. Phys. Chem*. 15, 4327–4337.

[27] Sun, J.-Q. and Bartlett, R. J. 1996. "Second-order many-body perturbation-theory calculations in extended systems." *J. Chem. Phys*. 104, 8553–8565.

[28] Werner, H. J., Knowles, P. J., Lindh, R., Manby, F. R., Schütz, M., Celani, P., Korona, T., Rauhut, G., Amos, R. D., Bernhardsson, A., Berning, A., Cooper, D. L., Deegan, M. J. O., Dobbyn, A. J., Eckert, F., Hampel, C., Hetzer, G., Lloyd, A. W., McNicholas, S. J., Meyer, W., Mura, M. E., Nicklass, A., Palmieri, P., Pitzer, R., Schumann, U., Stoll, H., Stone, A. J., Tarroni, R., and Thorsteinsson, T. 2006 "Molpro, version 2006.1, a package of ab initio programs." Available at: http://www.molpro.net

[29] Fan, W. J., Abiyasa, A. P., Tan, S. T., Yu, S. F., Sun, X. W., Xia, J. B., Yeo, Y. C., Li, M. F., and Chong, T. C. 2006. "Electronic structures of wurtzite ZnO and ZnO/MgZnO quantum well." *J. Cryst. Growth*. 287, 28–33.

[30] Civalleri, B., Napoli, F., Noël, Y., Roetti, C., and Dovesi, R. 2006. "Ab-initio prediction of materials properties with crystal: MOF-5 as a case study." *Crys. Eng. Comm*. 8, 364–371.

[31] Spencer, E. C., Howard, J. A. K., McIntyre, G. J., Rowsell, J. L. C., and Yaghi, O. M. 2006. "Determination of the hydrogen adsorption sites in Zn_4O(1,4-benzenedicarboxylate) by single crystal neutron diffraction." *Chem. Comm*. 278–280.

[32] Mulder, F. M., Dingemans, T. J., Wagemaker, M., and Kearley, G. J. 2005. "Modelling of hydrogen adsorption in the metal organic framework MOF-5." *Chem. Phys*. 317, 113–118.

[33] Sagara, T., Klassen, J., and Ganz, E. 2004. "Computational study of hydrogen binding by metal-organic framework-5." *J. Chem. Phys*. 121, 12543–12547.

[34] Sagara, T., Klassen, J., Ortony, J., and Ganz, E. 2005. "Binding energies of hydrogen molecules to isoreticular metal-organic framework materials." *J. Chem. Phys*. 123, 014701.

[35] Mueller, T. and Ceder, G. 2005. "A density functional theory study of hydrogen adsorption in MOF-5." *J. Phys. Chem. B*. 109, 17974–17983.

[36] Hübner, O., Glöss, A., Fichtner, M., and Klopper, W. 2004. "On the interaction of dihydrogen with aromatic systems." *J. Phys. Chem. A*. 108, 3019–3023.

[37] Negri, F. and Saending, N. 2007. "Tuning the physisorption of molecular hydrogen: Binding to aromatic, heteroaromatic and metal-organic frameworks materials." *Theor. Chem. Acc*. 118, 149–163.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
ARTÍCULO/ARTICLE SECCIÓN/SECTION A

Determinación de la persistencia de compuestos perfluorinados en plantas de tratamiento de aguas residuales municipales mediante LC-MS/MS

Valeria Ochoa-Herrera[1*], Jim A. Field[2], Reyes Sierra-Alvarez[2]

[1] *Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
[2] *Chemical and Environmental Engineering, University of Arizona, Tucson, AZ 85721, USA*
Tucson, AZ 85721, USA
[*] *Autor principal/Corresponding author, e-mail: vochoa@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: C. Zambrano, Ph.D.
Recibido/Received: 01/26/2010. Aceptado/Accepted: 01/30/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 05/21/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

Perfluorinated chemicals (PFCs) are emerging pollutants that have been used for half a century in a wide variety of industrial processes and consumer-based products. PFCs have received a lot of attention in the last ten years due to their detection in environmental and biological matrices as well as concerns regarding their persistence and toxicity. Recent studies indicate that municipal wastewater treatment plants are point sources of PFCs. The significance of PFCs discharges from wastewater treatment plants in Arizona was investigated in this research.
A quantitative method consisting of acid wash-solvent extraction of the PFCs followed by solid phase extraction (SPE) clean-up and concentration was successfully developed to assess the presence of PFCs in environmental solid matrices. LC-MS/MS was employed to detect and quantify PFCs in sludge samples. Selected ion monitoring (SIM) analysis was used to improve detection limits for the perfluorinated compounds. The detection limits of the PFCs evaluated in this study were 50 μg L^{-1} for perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorodecano sulfonate (PFDS) and perfluorodecanoic acid (PFDA), and 200 μg L^{-1} for perfluorohexane sulfonate (PFHXs) and perfluorooctanoic acid (PFOA). PFOS (77 $\pm$ 5 ng g^{-1} sludge dry weight) was the only perfluorinated compound detected in municipal sewage sludge samples from Tucson, Arizona.

Keywords. PFCs, PFOS, PFOA, adsorption, sewage sludge, LC-MS/MS, SPE.

Resumen

Los compuestos perfluorinados (Perfluorinated Chemicals, PFCs) son contaminantes emergentes que han sido utilizados por más de 50 años en una variedad de procesos industriales y en la producción de artículos de consumo humano. Los PFCs han recibido mucha atención en los últimos diez años debido a su presencia en matrices bióticas y ambientales; así como también, a reportes relacionados con su persistencia y toxicidad. Las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTARs) municipales han sido identificadas como fuentes puntuales de PFCs según estudios recientes. En este estudio se investigó la presencia de PFCs en las descargas de plantas de tratamiento de aguas residuales en Arizona.
Un método cuantitativo basado en limpieza con ácido-extracción con solvente seguido de una limpieza-extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction, SPE) fue exitosamente desarrollado para determinar la presencia de PFCs en matrices ambientales sólidas. Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem (Liquid Chromatography copuled to Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) fue utilizada para detectar y cuantificar PFCs en lodos provenientes de las PTARs. Análisis por monitoreo de iones seleccionados (Selected Ion Monitoring, SIM) se empleó para mejorar los límites de detección de los compuestos perfluorinados. Los límites de detección de los PFCs evaluados en este estudio fueron de 50 μg L^{-1} para sulfonato de perfluorooctano (Perfluorooctane sulfonate, PFOS), sulfonato de perfluorodecano (Perfluorodecane sulfonate, PFDS) y ácido perfluorodecanoico (Perfluorodecanoic acid, PFDA), y 200 μg L^{-1} de sulfonato de perfluorohexano (Perfluorohexane sulfonate, PFHXs) y ácido perfluorooctanoico (Perfluorooctanoic acid, PFOA). PFOS (77 $\pm$ 5 ng g^{-1} lodo peso seco) fue el único compuesto perfluorinado detectado en los lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales en Tucson, Arizona.

Palabras Clave. PFCs, PFOS, PFOA, adsorción, lodos de aguas residuales, LC-MS/MS, SPE.

ISSN 1390-5384

Introducción

Los compuestos perfluorinados (PFCs, Perfluorinated Compounds) son contaminantes emergentes que han sido usados por décadas en la producción de artículos que repelen aceite, grasa y agua [1, 2]. Dentro de estos compuestos, sulfonato de perfluorooctano (Perfluorooctane sulfonate, PFOS) y ácido perfluorooctanoico (Perfluorooctanoic acid, PFOA) son sujetos de continua investigación debido a reportes recientes relacionados con su detección en matrices biológicas y ambientales, así como también a repotes relacionados con su persistencia y toxicidad [3, 4, 5, 6, 7, 8]. PFOS y PFOA son los productos finales de la degradación de un gran número de PFCs con aplicaciones comerciales [9, 10].

Muy poco se conoce acerca de las fuentes ambientales y de las rutas de exposición de los compuestos perfluorinados. Las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTARs) han sido identificadas como fuentes puntuales de los PFCs en el medio ambiente [11, 12, 13]. Sin embargo, la presencia de los compuestos perfluorinados en aguas residuales no está bien entendida. Es muy probable que estos químicos hayan sido introducidos en las PTARs a través de descargas domésticas e industriales generadas durante la producción, el uso y la disposición de los productos de consumo humano e industrial tales como extintores de incendios, protectores de superficies, etc. [14, 15].

La principal fuente de PFOS, PFOA y compuestos relacionados en las PTARs municipales son los lodos, ya que se espera que estos compuestos se adhieran en dichos biosólidos [12, 15]. De hecho, la bioadsorción de sulfonato de perfluorooctano en varios lodos provenientes de plantas de tratamientos de aguas residuales ha sido documentada [16]. Estudios recientes han demostrado que PFOS y compuestos relacionados en concentraciones de ng g^{-1} han sido detectados en los lodos de varias plantas de tratamiento en diferentes países. En USA, un estudio realizado por 3M en el 2001, reveló que las concentraciones de PFOS en los lodos provenientes de los sistemas públicos de tratamientos de aguas en Alabama, Tennessee, Georgia y Florida estuvieron en el rango de 58 a 3120 ng g^{-1} [17]. Higgins y colaboradores [12] determinaron concentraciones de PFCs en los lodos y los sedimentos afectados por las descargas de las alcantarillas en California. El estudio estableció que las concentraciones totales de PFCs estuvieron dentro de 5 y 3370 ng g^{-1} en lodos domésticos incluidos perfluorosulfonatos, perfluorooctanosulfonamidas y perfluorocarboxilatos. Sinclair [18] reportó la presencia de perfluoroosulfonatos y perfluorocarboxilatos en concentraciones de 10 a 241 ng g^{-1} en muestras de lodos de descarga de seis PTARs en el estado de Nueva York. Loganathan y colaboradores [19] reportaron concentraciones de PFOS y PFOA en rangos de 2.5 – 990 ng g^{-1} en muestras de lodos obtenidas de PTARs municipales en Kentucky y Georgia. En Alemania, PFOS y PFOA fueron cuantificados en muestras de lodos en concentraciones que varían desde 5 a 120 ng g^{-1} [20]. Guo *et al.* [21] cuantificaron PFOS y PFOA en lodos de descargas en China con concentraciones en el rango de 278 a 5383 ng g^{-1}. Un estudio reciente realizado por Bossi *et al.* [22] demostró la presencia de compuestos perfluorinados en PTARs en Dinamarca en niveles similares a aquellos reportados en otros países, 0.4 – 74.1 ng g^{-1}.

Concentraciones elevadas de PFOS han sido determinadas en aguas residuales provenientes de plantas que producen PFCs y de otras actividades que utilizan dichos compuestos [23, 24, 25, 26, 27]. PFOS en concentraciones tan elevadas como 1650 mg L^{-1} fue detectado en efluentes de la industria de semiconductores [28]. Los PFCs se emplean ampliamente en la creciente industria de los semiconductores en Arizona, en operaciones forestales (extintores de incendios) y en una amplia gama de aplicaciones comerciales, industriales y de consumo humano. Adicionalmente, datos sobre la presencia de PFCs en los lodos de aguas residuales son de gran importancia ya que los biosólidos son empleados en la agricultura.

El objetivo de este trabajo de investigación es determinar la presencia de PFCs en las descargas de plantas de tratamiento de aguas residuales municipales. Los compuestos fluorinados serán detectados y cuantificados mediante métodos analíticos basados en LC-MS/MS. Las estructuras químicas de los compuestos evaluados en este estudio están representadas en la Figura 1.

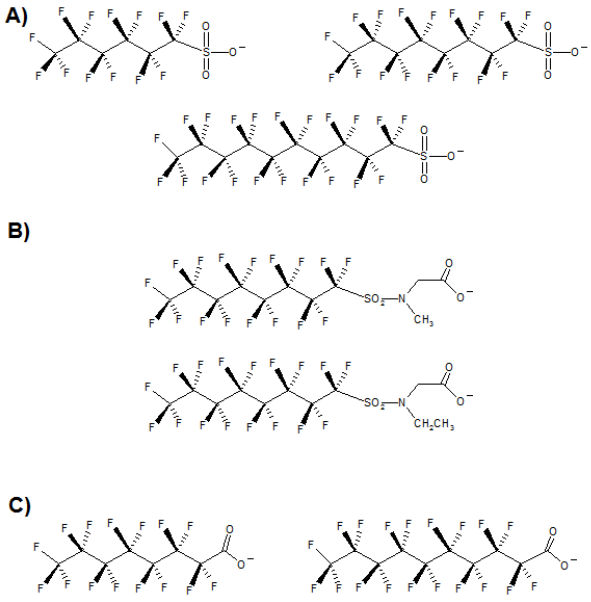


Figura 1: Estructuras químicas de los compuestos perfluorinados evaluados en este estudio. A) Perfluorosulfonatos: sulfonato de perfluorohexano (PFHXs), sulfonato de perfluorooctano (PFOS) y sulfonato de perfluorodecano (PFDS). B) Perfluorosulfonamidas: acetato de 2-(N-metilperfluorooctanosulfonamida) (N-MeFOSAA) y acetato de 2-(N-etilperfluorooctanosulfonamida) (N-EtFOSAA). C) Perfluorocarboxilatos: ácido perfluorooctanoico (PFOA) y ácido perfluorodecanoico (PFDA).

Metodología

Reactivos

Perfluorooctano sulfonato de potasio, PFOS (98 % pureza), se obtuvo en SynQuest Laboratories (Alachua, FL). Perfluorohexano sulfonato de sodio, PFHXs (98 %), perfluorodecano sulfonato de sodio, PFDS (98 %) y ácido perfluorodecanoico, PFDA (98 %) fueron adquiridos en Wellington Laboratories (Ontario, Canada). Acido perfluorooctanoico, PFOA (96 %) y fluoruro de sodio (99 %) se obtuvieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Cartuchos de extracción en fase sólida (SPE), 3 mL, 500 mg ODS-C_{18} fueron adquiridos de Agilent Technologies (New Castle, DE). Metanol (grado HPLC) se obtuvo de Burdikc & Jackson (Muskegon, MI). Acido acético glacial (grado ACS) se adquirió en EMD chemicals (Gibbstown, NJ).

Extracciones de los lodos

Las extracciones de los lodos se realizaron de acuerdo al método descrito por Higgins y colaboradores [12]. Los lodos digeridos anaeróbicamente (Anaerobically Digested Sludge, ADS) obtenidos de dos PTARs en Tucson, Arizona, "Ina Road Wastewater Treatment Plant, Ina Road WWTP" y "Roger Road Wastewater Treatment Plant, Roger Road WWTP", fueron evaluados en este estudio. Las muestras del lodo se secaron en un horno durante la noche a 70 ^{o}C, posteriormente se mantuvieron a temperatura ambiente por 1 día. Las muestras fueron molidas y homogenizadas usando un mortero. 100 mg del lodo homogenizado se transfirió a una botella de Nalgene, en donde se añadió 7.5 mL de una solución de 1 % de ácido acético. La muestra fue agitada durante 10 minutos en el vórtex y sonicada por 30 minutos a 60 ^{o}C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas (10000 rpm, 25 min) y el lavado fue decantado en un segunda botella de Nalgene. La extracción de PFCs se llevó a cabo, añadiendo 1.7 mL de una solución de metanol / 1 % ácido acético (90:10 v/v) al vial inicial. Las muestras fueron nuevamente agitadas en el vórtex durante 10 minutos, sonicadas por 30 minutos a 60^{o}C, y finalmente centrifugadas. El extracto fue decantado en una tercera botella de Nalgene. Este procedimiento fue realizado dos veces más y todos los lavados y los extractos fueron combinados separadamente al final del proceso de extracción. Una segunda extracción de PFCs de los lodos de "Ina Road WWTP" se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito previamente con pequeñas modificaciones. Brevemente, 75 mL de una solución de 1 % de ácido acético fueron añadidos a una muestra homogenizada de 6000 mg de lodo, posteriormente se añadieron 20 mL de la mezcla de extracción compuesta de metanol / 1 % ácido acético (90:10, v/v). Todos los lavados y los extractos fueron centrifugados (10000 rpm, 25 min) para evitar taponamientos de las columnas de extracción en fase sólida (SPE). Cada muestra del lodo fue extraída y analizada por triplicado.

Limpieza de los lavados y extractos

Las extracciones en fase sólida (SPE) se realizaron para pre-concentrar y limpiar los lavados y los extractos obtenidos de los lodos de descarga. Cartuchos de SPE (3 mL, 500 mg ODS-C_{18}, Agilent Technologies, DE) colocados en un manifold de vacío fueron condicionados con 6 mL de metanol, seguido de 6 mL de una solución de 1 % ácido acético. Los volúmenes deseados de lavado y extracto fueron cargados separadamente a una velocidad de 1 mL min^{-1}. Las columnas de SPE fueron lavadas con 4 mL de agua desionizada y posteriormente centrifugadas (4000 rpm, 25 min). Los compuestos de interés fueron eluídos con 4 mL de metanol y colectados en frascos limpios de Nalgene. El eluente fue concentrado por un factor de 8 en presencia de nitrógeno. En la segunda extracción en la que se emplearon cantidades considerables del lodo de "Ina Road WWTP", la muestra fue cargada en 3 columnas diferentes, y cada columna fue lavada con 20 mL de agua desionizada. Los eluentes fueron combinados y finalmente concentrados por un factor de 10 – 30 en presencia de nitrógeno. Los extractos se almacenaron a 4 ^{o}C para ser analizados por LC-MS/MS. Previamente al análisis, las muestras fueron diluidas 1:10 para reducir las posibles interferencias presentes en las matrices ambientales y también para asegurarse de que la concentración de la muestra esté dentro del rango de análisis de LC-MS/MS.

LC-MS/MS

El análisis de PFCs con cromatografía liquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) fue desarrollado en base a un método descrito por Higgins *et al.* [12]. Los análisis de LC-MS/MS fueron realizados en un instrumento Magic 2002 (Michrom Biosciences, Inc.) ThermoFisher (Finnigan) LCQ Classic HPLC-MS. La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna MagicMS C_{18} (5 μm, 200 Å, 1 x 150 mm). La fase móvil empleada estaba compuesta de una buffer de acetato de amonio (A) (10 mM) y metanol (B). Los compuestos fueron eluídos empleando un gradiente de 5 % B hasta 90 % B en 35 minutos con un flujo de 500 μL min^{-1}, 40^{o}C de temperatura, y un volumen de inyección de 25 μL. Los compuestos fluorinados sulfonatos y carboxilatos fueron detectados empleando ionización en modo negativo (Electrospray Ionization, ESI). El análisis por monitoreo de iones seleccionados (Selected Ion Monitoring, SIM) se empleó para mejorar los limites de detección de los compuestos perfluorinados. Las soluciones estándares se analizaron en primer lugar para determinar la intensidad de los picos para los iones seleccionados (m/z 399, 413, 499, 513, y 599). Una ventana de m/z de +/- 3 alrededor del valor seleccionado de m/z se utilizó en los experimentos de análisis SIM. Los análisis de espectrometría de masas en tándem (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS) se realizaron con el objetivo de obtener información estructural de los iones seleccionados (por

ejemplo., m/z de 499, PFOS, $CF_3(CF_2)_7SO_3^-$). Helio se usó como gas de colisión en los experimentos de MS/MS con una energía relativa de colisión de 35 %. Los espectros de MS/MS se adquirieron dentro un rango de masa de (m/z) de 75 a 1000 empleando un tiempo de escaneo de 0.2 s. Soluciones blancos se corrieron cada tres muestras de los lodos.

Cuantificación

El método SIM se empleó para incrementar la sensibilidad del análisis durante la cuantificación. Paralelamente, estándares de compuestos fluorinados se corrieron para validar el análisis. Estándares internos se emplearon para corregir los posibles errores generados durante el proceso de ionización. PFDS se empleó como estándar interno en el análisis de PFOS ya que los dos compuestos pertenecen a la misma familia perfluorinada y químicamente son muy similares.

Las muestras fueron fortificadas con una concentración conocida de estándar interno, la cual fue de 0.5 mg L^{-1}de PFDS. Los picos se promediaron y las áreas de los mismos se calcularon multiplicando la altura por el ancho del pico a la mitad de la altura del pico. La cuantificación se llevó a cabo relacionando el área del pico de PFOS con el área del pico del estándar interno. La relación de áreas entre PFOS y PFDS en una solución equimolar estándar de PFOS y PFDS se empleó para corregir la diferencia en los factores de respuesta de los diferentes compuestos. La precisión del método se determinó analizando las muestras de los lodos por triplicado y calculando las desviaciones estándares.

Resultados y Discusión

Aplicación de LC-MS/MS en la detección y cuantificación de PFOS y compuestos relacionados

Un método analítico basado en cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa con ionización de electrospray ión negativo espectrometría de masas en tándem (Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) descrito por Higgins *et al.* [12] se empleó para detectar PFCs en matrices ambientales sólidas. La Figura 2 muestra un cromatograma de una solución mixta estándar en metanol de 5 mg L^{-1} de PFHXs, PFOA, PFOS, PFDA y PFDS; así como también, cromatogramas de soluciones estándares de cada compuesto analizado individualmente (5 mg L^{-1}). Los espectros de MS/MS para la misma solución mixta estándar descrita previamente están representados en la Figura 3.

Los compuestos perfluorinados fueron separados en base al tamaño de la cadena perfluoroalquilada, como se espera para una columna C_{18} de fase reversa. En la solución mixta estándar de compuestos perfluorinados se puede observar diferentes picos (Figura 2). PFHXs (C_6, 399.10 g/mol) eluye primero, seguido de PFOA (C_8, 413 g/mol), PFOS (C_8 499.12 g/mol), PFDA (C_{10}, 514.09 g/mol), y al final PFDS (C_{10} 599.13 g/mol). Los tiempos de retención para los diferentes compuestos son 15.8, 19.2, 22.5 (21.4 y 23.4), 25.1 y 27 min, respectivamente.

PFOS técnico es una mezcla de isómeros estructurales lineales y ramificados. La sal de PFOS empleada es este estudio contiene 75.4 % del isómero lineal [29]. En el cromatograma de LC-MS de PFOS (Figura 2), el pico detectado a 22.5 min corresponde al isómero lineal de PFOS y los dos picos detectados antes y después, a 21.4 y 23.4 min, respectivamente, corresponden a los isómeros ramificados.

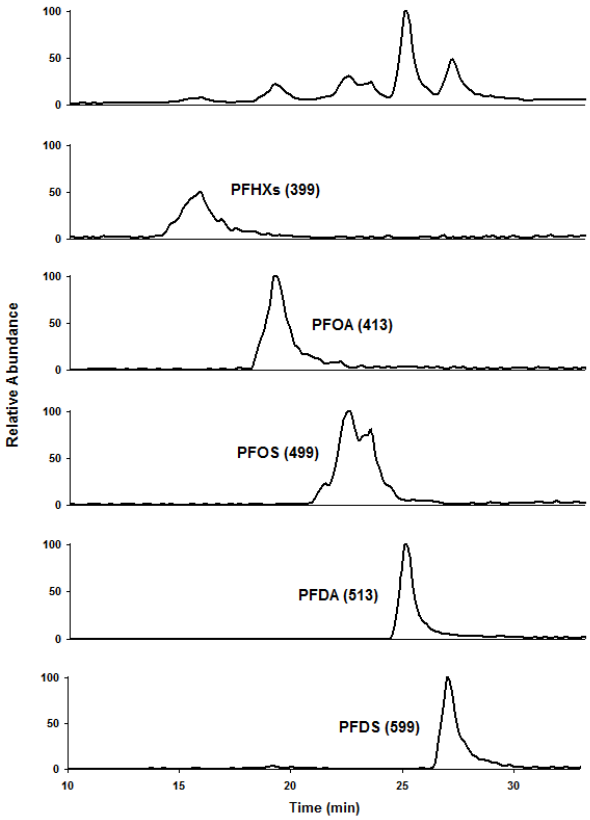


Figura 2: Cromatogramas de LC/MS de 5 mg L^{-1} de PFHXs, PFOA, PFOS, PFDA y PFDS en una solución mixta estándar (arriba) y estándares individuales.

El factor de respuesta de los diferentes PFCs evaluados en este estudio fue calculado dividiendo el área del pico para la concentración del analito. El factor de respuesta de PFHXs, PFOA, PFOS, PFDA y PFDS fue de 15, 21, 32, 14 y 14, respectivamente. Los factores de respuesta de los compuestos perfluorinados sulfonatos y carboxilatos con un tamaño de cadena de 6 a 10 carbonos fueron muy similares (15 y 14). Sin embargo, en el caso de PFOA y PFOS (cadena de 8-carbonos), estos valores fueron mucho más altos y significativamente diferentes, y más aún no están relacionados con el tamaño de la cadena perfluorinada. Adicionalmente, los factores de respuesta de estos dos compuestos son diferentes de aquellos de sus homólogos perfluorosulfonatos y perfluorocarboxilatos.

Los límites de detección de los PFCs estudiados en esta investigación varían entre compuestos. Los límites de detección determinados en base a una relación de señal/ruido de 3 fueron de 50 μg L^{-1} para PFOS, PFDA y PFDS, mientras que para PFHXs y PFOA fueron de 200 μg L^{-1}. Estudios reportados en la literatura referentes a la cuantificación de PFCs en matrices ambientales mediante LC-MS/MS registran límites de detección en el orden de ng a μg L^{-1} [30, 31]. En la mayoría de casos, los detectores de espectrometría de masas tales como tiempo-de-vuelo (Time-of-Flight, TOF-MS) y cuádruple-tiempo-de-vuelo (Quadruple-Time-of-Flight, Q-TOF-MS) son empleados en los análisis de muestras ambientales. Estos detectores han demostrado una capacidad de resolución elevada y se han vuelto comerciales en los últimos 6 años [32].

El hecho de que los límites de detección obtenidos en este estudio no sean muy buenos (valores elevados) puede ser atribuido primordialmente a las limitaciones del instrumento. El espectrómetro LC-MS/MS empleado en nuestra investigación fue adquirido algunos años atrás y la sensitividad proporcionada no es muy buena, como se lo ha demostrado previamente. Con el objeto de superar estas limitaciones, se realizaron preconcentraciones mediante procedimientos de SPE, empleando volúmenes significativos de muestras, lo cual fue necesario para obtener resultados confiables.

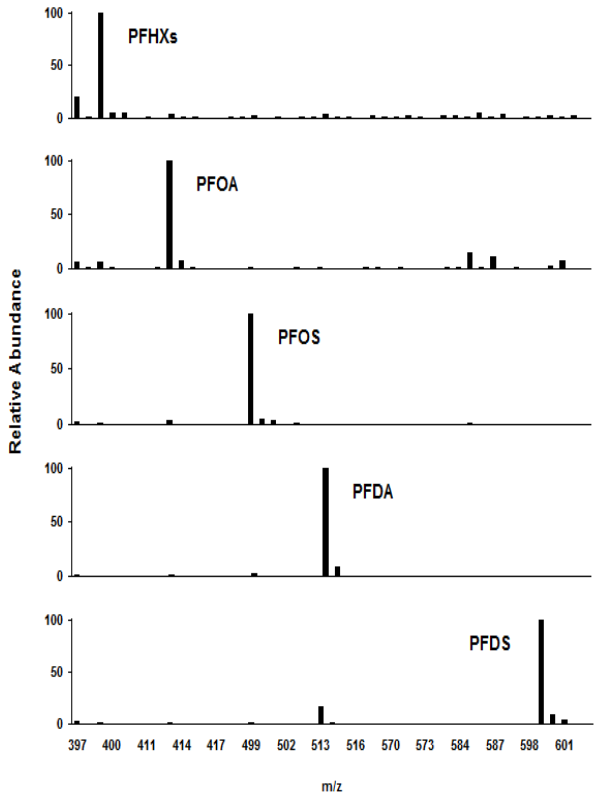


Figura 3: Espectro ESI/MS en modo negativo de una solución mixta estándar de 5 mg L^{-1} de PFHXs, PFOA, PFOS, PFDA y PFDS obtenida durante el análisis SIM.

Determinación de la concentración de PFC en los lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales

La presencia de compuestos perfluorinados en las muestras de los lodos digeridos anaeróbicamente provenientes de dos diferentes plantas de tratamiento de aguas residuales de Tucson, Arizona, fue evaluada en este estudio. La cuantificación de PFCs en los lodos de descarga mediante LC-MS/MS fue realizada de acuerdo al protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Brevemente, un ciclo de extracciones con limpieza de ácido – extracción con solvente seguido de una limpieza-extracción en fase sólida (SPE) se llevó a cabo para determinar la concentración de PFCs en los lodos municipales. Se realizaron dos extracciones, la primera empleando 100 mg y una segunda utilizando 6000 mg de lodo seco. En los dos casos, se analizó el lavado y el extracto. En la primera extracción, no se detectaron PFCs, tanto en el lavado como en el extracto, sugiriendo que los compuestos no estuvieron presentes o que sus concentraciones estuvieron por debajo de los límites de detección. En la segunda extracción en la que se empleo 6000 mg del lodo digerido anaeróbicamente de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ina Road, PFOS fue el único compuesto detectado en el extracto, y ningún PFC fue detectado en el lavado. Los resultados analíticos obtenidos en la segunda extracción serán presentados a continuación en mayor detalle.

Estudios recientes han reportado la presencia de compuestos relacionados a PFOS y PFOA; así como también, perfluorooctanosulfonamidas en muestras de lodos de PTARs [12, 15, 17]. Por ejemplo, Higgins y colaboradores [12] reportaron que la concentración de perfluorosulfonamida usualmente excede la concentración de PFOS en muestras de los lodos municipales. *N*-MeFOSAA and *N*-EtFOSAA fueron detectados en las descargas de PTARs en la Bahía de San Francisco en concentraciones en el rango de 6 a 544 ng g^{-1}. En base a estos estudios, el análisis en modo SIM fue empleado en este trabajo para detectar la presencia de tres clases de PFCs en los extractos provenientes de los lodos municipales. Los compuestos evaluados en esta investigación incluyen: perfluorosulfonatos: PFHXs, PFOS, PFDS, perfluorooctanosulfonamidas: *N*-MeFOSAA, y *N*-EtFOSSA y perfluroorocarboxilatos, PFOA y PFDA (Figura 1).

La Figura 4 muestra un cromatograma de LC-MS y un espectro MS/MS obtenido bajo el análisis SIM de una muestra de extracto fortificada con 500 μg PFDS L^{-1} como estándar interno. El tiempo de retención de PFDS fue de 27 minuntos. PFOS fue el único compuesto perfluorinado detectado bajo las condiciones experimentales evaluadas en este estudio. La concentración de PFOS en los lodos digeridos anaeróbicamente fue de 77 $\pm$ 5 ng g^{-1} lodo en peso seco. Los niveles de PFOS determinados en esta investigación están dentro de los rangos encontrados en estudios relacionados a lo largo de

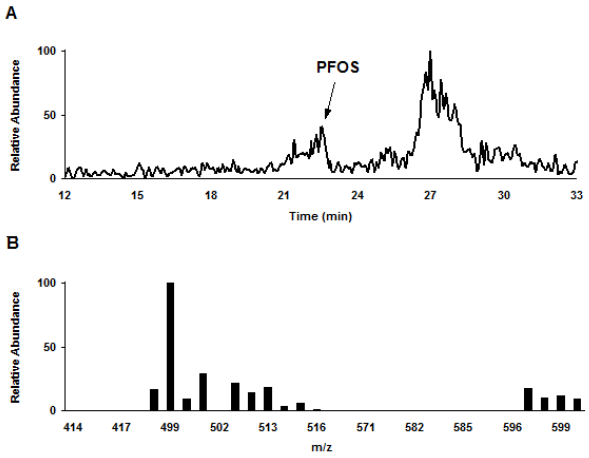


Figura 4: Análisis SIM de una muestra del lodo de "Ina Road WWTP" de Tucson, Arizona. A) Cromatograma LC-MS y, B) espectro MS/MS del extracto de una muestra de lodo fortificada con 0.5 mg PFDS L^{-1}.

USA [12, 17, 18, 19]. PFOS parece ser el compuesto perfluorinado dominante en las muestras de los lodos provenientes de las PTARs. Datos colectados por 3M en 2001 demostraron que la concentración de PFOS en lodos municipales de Alabama, Tennessee, Georgia y Florida excedieron la concentración de PFOA y FOSA (perfluorooctanosulfonamida) por un orden de magnitud [17]. En las muestras de los lodos de Kentucky, la concentración de PFOS fue de 2 a 5-veces más alta que aquella de PFOA [19]. Estos resultados son consistes con estudios previos sobre la presencia de compuestos perfluorinados en el medio ambiente. En muestras bióticas colectadas alrededor del mundo, PFOS fue el único compuesto detectado [3, 33, 34]. PFOS fue el PFC más abundante encontrado en peces y pájaros en el estado de New York [35]. Adicionalmente, PFOS es el compuesto perfluorinado predominante encontrado en la sangre humana. Las niveles de PFOS en muestras de sangre de personas de diferentes países fue por lo menos 2-veces más grande comparado con los niveles de PFOA, los mismos que fueron un orden de magnitud más elevados que los niveles de PFHXs [4, 5, 36, 37, 38].

El hecho de que PFOS fue el único compuesto perfluorinado detectado en los lodos municipales analizados en este estudio puede ser atribuido a varias razones. Rendimientos ineficientes del proceso de extracción de PFCs de los lodos, tiempos de retención o tiempos de elusión inadecuados durante el proceso de limpieza y concentración de SPE, limitaciones del instrumento y probablemente interferencias en la matriz debido a la presencia de otros compuestos lo cual causa supresión de la señal del analito de interés [39]. En la ionización electrospray (ESI) en espectrometría de masas en tándem, la intensidad de la señal del analito de interés depende de la concentración del analito y de la concentración total de iones presentes en solución. En matrices heterogéneas tales como los lodos de PTARs, la composición y cantidad de materia orgánica presente puede suprimir la señal del analito [30, 39]. De hecho, en la extracción de PFCs con 6000 mg de lodo, los sulfonatos de aquilbenceno lineales (linear alkylbenzene sulfonates, LAS) coeluyeron en concentraciones significativas con los compuestos perfluorinados de elevados pesos moleculares (*N*-MeFOSAA, *N*-EtFOSAA y PFDS) (Figura 4). Por lo tanto, es posible que los compuestos perfluorinados objetos de este estudio estén presentes en los lodos de descargas; sin embargo, no se los pudo detectar debido a interferencias existentes en la matriz.

Los problemas de interferencias en matrices propios de ESI pueden ser abordados empleando técnicas de ionización en las cuales el proceso de ionización se lleva a cabo en la fase gaseosa. Takino y colaboradores [40] desarrollaron un método para determinar los compuestos fluorinados en matrices ambientales basado en cromatografía liquida con espectrometría de masas utilizando fotoionización a presión atmosférica (Atmospheric Presssure Photoionization Tandem Mass Spectrometry, AAPI/MS/MS). La ventaja de utilizar esta técnica de ionización en fase gaseosa comparada con ESI es la ausencia de interferencias en la matriz. Sin embargo, los límites de detección de AAPI no son tan buenos como aquellos obtenidos con LC con ESI MS/MS. Investigaciones adicionales deberían ser realizadas para establecer si otros compuestos perfluorinados además de PFOS, están presentes en los lodos municipales en Arizona. AAPI/MS/MS representa una excelente alternativa para realizar los análisis de muestras ambientales mediante cromatografía liquida.

Conclusiones

La presencia de compuestos perfluorinados en los lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales fue determinada mediante la aplicación de un método cuantitativo de extracción con solvente seguido de extracción en fase sólida (SPE) para limpiar-preconcentrar las muestras y finalmente el análisis por medio de LC-MS/MS. Esta técnica demostró ser muy valiosa para el análisis de PFCs en matrices ambientales acuosas y sólidas. Sin embargo, la sensitividad moderada del método, los efectos de supresión de la señal del analito de interés y las interferencias presentes en la matriz tales como coelución de otros compuestos, son limitaciones del método desarrollado y pueden afectar el análisis cuantitativo de PFCs en muestras ambientales.

De todos los compuestos evaluados en este estudio, perfluorosulfonatos, perfluorosulfonamidas y perfluorocarboxilatos, PFOS fue el único compuesto perfluorinado detectado en los lodos de descarga en Tucson, Arizona. Estos resultados son significativos ya que aportan ideas para el entendimiento de las fuentes ambientales y de la exposición de los PFCs. Para nuestro conocimiento, este es el primer reporte de la presencia de compuestos perfluorinados en lodos de plantas de tratamiento de aguas residuales en Arizona.

Agradecimientos

Este estudio fue realizado con el apoyo económico de "National Institutes for Water Resources (NIWR) – U.S. Geological Survey (USGS) (State Water Resources Research Institute Program, grant # 2006AZ132B)". Estamos muy agradecidos con el Dr. Arpad Somogyi, Supervisor del Centro de Espectroscopía de Masas del Departamento de Química, Universidad de Arizona, por su apoyo incondicional y recomendaciones muy valiosas con respecto a los análisis de LC-MS/MS.

Referencias

[1] Schultz, M. M., Barofsky, D. F., and Field, J. A. 2003. "Fluorinated alkyl surfactants." *Environmental Engineering Science*. 20, 487–501.

[2] 3M 2003. "Environmental and health assesment of perfluorooctane sulfonate and its salts." U.S. Evironmental Protection Agency Public Docket AR226-1486: Washington, DC.

[3] Giesy, J. P. and Kannan, K. 2001. "Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife." *Environ. Sci. Technology.* 35, 1339–1342.

[4] Hansen, K. J., Clemen, L. A., Ellefson, M. E., and Johnson, H. O. 2001. "Compound-specific, quantitative characterization of organic: Fluorochemicals in biological matrices." *Environmental Science & Technology*. 35, 766–770.

[5] Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Fillmann, G., Kumar, K. S., Loganathan, B. G., Mohd, M. A., Olivero, J., Van Wouwe, N., Yang, J. H., and Aldous, K. M. 2004. "Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries." *Environmental Science & Technology*. 38, 4489–4495.

[6] Houde, M., Martin, J. W., Letcher, R. J., Solomon, K. R., and Muir, D. C. G. 2006. "Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review." *Environmental Science & Technology*. 40, 3463–3473.

[7] Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., and Seed, J. 2007. "Perfluoroalkyl acids: A review of monitoring and toxicological findings." *Toxicological Sciences*. 99, 366–394.

[8] Conder, J. M., Hoke, R. A., De Wolf, W., Russell, M. H., and Buck, R. C. 2008. "Are PFCAS bioaccumulative? a critical review and comparison with regulatory lipophilic compounds." *Environmental Science & Technology*. 42, 995–1003.

[9] Ellis, D. A., Mabury, S. A., Martin, J. W., and Muir, D. C. G. 2001. "Thermolysis of fluoropolymers as a potential source of halogenated organic acids in the environment." *Nature*. 412, 321–324.

[10] Dinglasan, M. J. A., Ye, Y., Edwards, E. A., and Mabury, S. A. 2004. "Fluorotelomer alcohol biodegradation yields poly- and perfluorinated acids." *Environmental Science & Technology*. 38, 2857–2864.

[11] Boulanger, B., Peck, A. M., Schnoor, J. L., and Hornbuckle, K. C. 2005. "Mass budget of perfluorooctane surfactant in lake ontario." *Environmental Science & Technology*. 39, 74–79.

[12] Higgins, C. P., Field, J. A., Criddle, C. S., and Luthy, R. G. 2005. "Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge." *Environmental Science & Technology*. 39, 3946–3956.

[13] Schultz, M. M., Barofsky, D. F., and Field, J. A. 2006. "Quantitative determination of fluorinated alkyl substances by large-volume-injection liquid chromatography tandem mass spectrometry - characterization of municipal wastewaters." *Environmental Science & Technology*. 40, 289–295.

[14] Prevedouros, K., Cousins, I. T., Buck, R. C., and Korzeniowski, S. H. 2006. "Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates." *Environmental Science & Technology*. 40, 32–44.

[15] Boulanger, B., Vargo, J. D., Schnoor, J. L., and Hornbuckle, K. C. 2005. "Evaluation of perfluorooctane surfactants in a wastewater treatment system and in a commercial surface protection product." *Environmental Science & Technology*. 39, 5524–5530.

[16] Ochoa-Herrera, V. and Sierra-Alvarez, R. 2008. "Removal of prefluorinated surfactants by sorption onto granular activated carbon, zeolite and sludge." *Chemosphere*. 72, 1588 – 1593.

[17] 3M 2001. "Executive summary: Environmental monitoring - multi-city study. water, sludge, sediments, potw effluent and landfill leachate samples." EPA–226-1030a, U.S. Environmental Protection Agency.

[18] Sinclair, E. and Kannan, K. 2006. "Mass loading and fate of perfluoroalkyl surfactants in wastewater treatment plants." *Environmental Science & Technology*. 40, 1408–1414.

[19] Loganathan, B. G., Sajwan, K. S., Sinclair, E., Kumar, K. S., and Kannan, K. 2007. "Perfluoroalkyl sulfonates and perfluorocarboxylates in two wastewater treatment facilities in kentucky and georgia." *Water Research*. 41, 4611–4620.

[20] Becker, A. M., Gerstmann, S., and Frank, H. 2008. "Perfluorooctane surfactants in waste waters, the major source of river pollution." *Chemosphere*. 72, 115–121.

[21] Guo, R., Zhou, Q. F., Cai, Y. Q., and Jiang, G. B. 2008. "Determination of perfluorooctanesulfonate and perfluorooctanoic acid in sewage sludge samples using liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry." *Talanta*. 75, 1394–1399.

[22] Bossi, R., Strand, J., Sortkjaer, O., and Larsen, M. M. 2008. "Perfluoroalkyl compounds in danish wastewater treatment plants and aquatic environments." *Environment International*. 34, 443–450.

[23] Moody, C. A., Hebert, G. N., Strauss, S. H., and Field, J. A. 2003. "Occurrence and persistence of perfluorooctanesulfonate and other perfluorinated surfactants in groundwater at a fire-training area at wurtsmith air force base, michigan, usa." *Journal of Environmental Monitoring*. 5, 341–345.

[24] Skutlarek, D., Exner, M., and Farber, H. 2006. "Perfluorinated surfactants in surface and drinking water." *Environmental Science and Pollution Research*. 13, 299–307.

[25] Richardson, S. D. 2007. "Water analysis: Emerging contaminants and current issues." *Analytical Chemistry*. 79, 4295–4323.

[26] Poulsen, P. B., Jensen, A. A., and Wallstrom, E. 2005. "More environmentally friendly alternatives to PFOS-compounds and PFOA." Danish EPA: 1–162.

[27] Ju, X. D., Jin, Y. H., Sasaki, K., and Saito, N. 2008. "Perfluorinated surfactants in surface, subsurface water and microlayer from dalian coastal waters in China." *Environmental Science & Technology*. 42, 3538–3542.

[28] Tang, C. Y. Y., Fu, Q. S., Robertson, A. P., Criddle, C. S., and Leckie, J. O. 2006. "Use of reverse osmosis membranes to remove perfluorooctane sulfonate (PFOS) from semiconductor wastewater." *Environmental Science & Technology*. 40, 7343–7349.

[29] Ochoa-Herrera, V., Sierra-Alvarez, R., Somogyi, A., Jacobsen, N. E., Wysocki, V. H., and Field, J. A. 2008. "Reductive defluorination of perfluorooctane sulfonate." *Environmental Science & Technology*. 42, 3260–3264.

[30] Villagrasa, M., deAlda, M. L., and Barcelo, D. 2006. "Environmental analysis of fluorinated alkyl substances by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry: A review." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 386, 953–972.

[31] deVoogt, P. and Saez, M. 2006. "Analytical chemistry of perfluoroalkylated substances." *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 25, 326–342.

[32] Richardson, S. D. 2008. "Environmental mass spectrometry: Emerging contaminants and current issues." *Analytical Chemistry*. 80, 4373–4402.

[33] 3M 2002. "Technical data bulletin. environmental health, safety and regulatory (EHSR) profile of perfluorobutane sulfonate (PFBS)." 3M, St Paul, MN.

[34] Martin, J. W., Smithwick, M. M., Braune, B. M., Hoekstra, P. F., Muir, D. C. G., and Mabury, S. A. 2004. "Identification of long-chain perfluorinated acids in biota from the canadian arctic." *Environmental Science & Technology*. 38, 373–380.

[35] Sinclair, E., Mayack, D. T., Roblee, K., Yamashita, N., and Kannan, K. 2006. "Occurrence of perfluoroalkyl surfactants in water, fish, and birds from new york state." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 50, 398–410.

[36] Harada, K., Koizumi, A., Saito, N., Inoue, K., Yoshinaga, T., Date, C., Fujii, S., Hachiya, N., Hirosawa, I., Koda, S., Kusaka, Y., Murata, K., Omae, K., Shimbo, S., Takenaka, K., Takeshita, T., Todoriki, H., Wada, Y., Watanabe, T., and Ikeda, M. 2007. "Historical and geographical aspects of the increasing perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonate contamination in human serum in japan." *Chemosphere*. 66, 293–301.

[37] Butenhoff, J. L., Olsen, G. W., and Pfahles-Hutchens, A. 2006. "The applicability of biomonitoring data for perfluorooctanesulfonate to the environmental public health continuum." *Environmental Health Perspectives*. 114, 1776–1782.

[38] Yeung, L. W. Y., So, M. K., Jiang, G. B., Taniyasu, S., Yamashita, N., Song, M. Y., Wu, Y. N., Li, J. G., Giesy, J. P., Guruge, K. S., and Lam, P. K. S. 2006. "Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood samples from China." *Environmental Science & Technology*. 40, 715–720.

[39] Ferguson, P. L., Iden, C. R., and Brownawell, B. J. 2000. "Analysis of alkylphenol ethoxylate metabolites in the aquatic environment using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry." *Analytical Chemistry*. 72, 4322–4330.

[40] Takino, M., Daishima, S., and Nakahara, T. 2003. "Determination of perfluorooctane sulfonate in river water by liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization mass spectrometry by automated on-line extraction using turbulent flow chromatography." *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 17, 383–390.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
ARTÍCULO/ARTICLE SECCIÓN/SECTION A

Aluminosilicatos mesoporosos obtenidos utilizando tritón X. - Síntesis, caracterización textural y esquema de formación sobre micelas de diferentes tamaños -

E. Alexis Hidrobo[1*], Jaime Retuert[2], Paulo Araya[2]

[1]*Colegio de Ciencias e Ingeniería - El Politécnico, Universidad San Francisco de Quito*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
[2]*Centro para la Investigación Multidisciplinaria Avanzada en Ciencia de los Materiales (CIMAT) y*
Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile
Beaucheff 861, Santiago, Chile
[*]*Autor principal/Corresponding author, e-mail: ahidrobo@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: C. Zambrano, Ph.D.
Recibido/Received: 02/15/2010. Aceptado/Accepted: 03/20/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 05/21/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

This work presents the preparation of mesoporous aluminum silicates from condensation of xerogel obtained from Tetraethyl orthosilicate (TEOS) and other aluminum precursos from various sources. The reagents used were aluminum nitrate (NAN) as inorganic source and the inorganic-alkoxide, Aluminun tris-secbutilate (TBA) as organometallic source. The length of the alkyl chain was evaluated in regards to its influence upon the surface area and in the generation of mesopores in the materials. Additionally, the former parameters were studied to determine their effect on the hydrothermal stability of the aluminosilicates.

Keywords. Aluminosilcates, mesoporous, surfactant, hydrothermal stability.

Resumen

Este trabajo presenta la obtención de aluminosilicatos mesoporosos generados mediante condensación de xerogel a partir de alcóxido de silicio (TEOS) y precursores de aluminio de diversas fuentes. Se usaron nitrato de aluminio (NAN), como fuente inorgánica y el alcoxido, tris-sec-butilato de aluminio (TBA) como fuente órgano-metálica. Se analizó la importancia del tamaño de cadena de alquilo en el surfactante (Tritón-X) en el proceso de condensación de la red, y su posterior influencia sobre el área superficial y en la obtención de mesoporos en los materiales. Adicionalmente se estudió la influencia de las variables mencionadas sobre la estabilidad hidrotermal de los aluminosilicatos.

Palabras Clave. Aluminosilicatos, mesoporos, surfactante, estabilidad hidrotermal.

Introducción

A partir de 1992, año en que Beck y colaboradores [1, 2] desarrollaron la síntesis del MCM-41 (silicato mesoporoso ordenado), varios grupos de investigación han trabajado con este y otros materiales con el fin de sintetizar aluminosilicatos con propiedades ácidas sin la restricción de tamaño de poro que presentan las zeolitas. Entre estos materiales se encuentran los aluminosilicatos mesoporosos (Al-MMS) obtenidos usando aminas primarias como molde [3, 4, 5] y aquellos que se han sintetizado utilizando surfactantes tipo poli-oxietileno (TN-101) y copolimeros en bloque [6]. En este último caso se encuentra el SBA-15 (Santa Barbara Amorphous type material), sintetizado por el grupo de Stucky y colaboradores [7, 8, 9]. Este material se obtiene mediante una síntesis que involucra el uso de copolímeros en bloque (polietileno-polipropileno) como agentes de dirección estructural. Sobre la base de los resultados obtenidos en trabajos anteriores efectuados con redes de sílice [10], y a diferencia de los trabajos reportados, se plantea la síntesis de aluminosilicatos mesoporosos utilizando surfactantes con cadenas laterales de carbono de diferentes tamaños (Tritón X-100 y X-114), que actúan como agentes modeladores. Además se estudiará la influencia de los precursores de alúmina y del tratamiento hidrotermal sobre las propiedades de los materiales obtenidos.

Metodología

Para el estudio de la influencia del precursor de Al sobre las propiedades texturales de los materiales se sintetizaron aluminosilicatos utilizando TEOS como fuente

ISSN 1390-5384

Muestra	Surfactante	Área Superficial m^2/g	Tamaño de Poro Å	Volumen de Poro cm^3/g
SAO1	TX-100	389	100	1.02
SAO1-TH	TX-100	247	150	1.08
SAI1	TX-100	358	80	0.70
SAI1-TH	TX-100	254	84	0.72
SAO2	TX-114	1005	27	1.01
SAO2-TH	TX-114	415	107	1.75
SAI2	TX-114	893	24	0.42
SAI2-TH	TX-114	455	55	0.81

Tabla 1: Propiedades texturales para aluminosilicatos mesoporosos. SAO y SAI se refieren a aluminosilicatos obtenidos utilizando TBA y NAN como precursores de aluminio respectivamente. Como Precursor de silicio se usa TEOS. TH es el tratamiento hidrotermal durante 24 h a 150 °C.

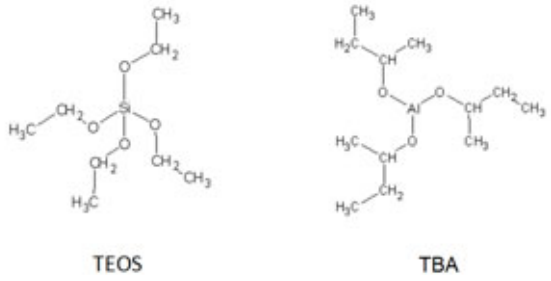


Figura 1: Estructura química de los alcóxidos TEOS y TBA usados como precursores de Si y Al en la síntesis de aluminosilicatos mesoporosos.

de Si y nitrato de aluminio nonahidrato ($AlNO_3 \cdot 9H_2O$ - NAN -) o tri-sec-butilato de aluminio (TBA) como fuente de Al (Figura 1). Como agente director estructural se utilizaron los surfactantes del tipo oxido de polietileno, Tritón X-100 o Tritón X-114. Estos surfactantes se han usado en otros estudios para obtener sílice con un área superficial sobre los 1000 m^2/g [11]. Como efecto del surfactante utilizado, en el presente trabajo se obtuvieron micelas de diferente tamaño, en cuya superficie ocurrieron las reacciones de hidrólisis/condensación, lo que permitió sintetizar materiales que poseen diferentes tamaños de poro. Además se incorporó el tratamiento hidrotermal con el fin de controlar el tamaño de poro y como prueba de estabilidad. Durante los procesos de tratamiento hidrotermal la estructura inicial de los sólidos se transforma mediante un proceso parcial de redisolución, a partir del cual se realizan nuevas reacciones de hidrólisis – condensación que reestructuran la red inorgánica y modifican las propiedades de los materiales. De esta forma es posible obtener mesoporos grandes, en el rango de 100 - 200 Å, a partir de sólidos que inicialmente presentan mesoporos en el límite inferior de tamaño (20 - 40 Å) [12].

Síntesis con nitrato de aluminio nonahidrato como precursor de alúmina

En un vaso de precipitado se disolvió 3 g de nitrato de aluminio en 30 ml de agua. A continuación se agregaron 4.5 g de Tritón X (100 o 114). La emulsión formada se agitó violentamente (1000 rpm) durante una hora hasta la obtención de una espuma fina de color blanco. El pH se reguló mediante la adición de hidróxido de amonio hasta llegar a 9. La agitación se continuó durante 2 horas, para luego añadir gota a gota 13.6 g de tetraetilortosilicato (TEOS). Una vez realizada la adición, el sistema se mantuvo bajo agitación violenta hasta la formación de un gel blanco de aspecto cremoso. El gel obtenido se lavó con agua y etanol con el fin de eliminar el nitrato y los reactivos que no reaccionaron. Posteriormente la muestra se dividió en dos, una parte se sometió a tratamiento hidrotermal durante 24 horas bajo presión autogenerada a 150 °C, la otra se secó a temperatura ambiente. Por último, todas las muestras se calcinaron lentamente (2 °C / min) hasta 550 °C durante 12 horas en presencia de aire.

Síntesis con alcóxido de aluminio como precursor de alúmina

22.9 g de TEOS, añadidos gota a gota, se dejaron hidrolizar sobre la espuma formada por la mezcla de 9 g del surfactante (Tritón X-100 o 114) y 60 ml de agua. El pH se reguló a 1 mediante la adición de gotas de ácido nítrico. Una vez añadido todo el TEOS, el sistema se agitó a 800 rpm durante una hora. Cuando el sistema presentó espuma voluminosa, se añadió gota a gota NH_4OH aumentando paulatinamente la agitación hasta 1000 rpm. La adición se realizó hasta lograr un pH 9 y en este punto se añadió 3.63 g tri-sec-butilato de aluminio (TBA). La solución formada se dejó en agitación durante 20 horas con el fin de formar un gel fino de color blanco. Al igual que en los casos anteriores la muestra se dividió en dos partes, una de las cuales se sometió a calcinación directa mientras que la otra se separó para el tratamiento hidrotermal y posterior calcinación. Luego todas las muestras se calcinaron en iguales condiciones que la síntesis anterior.

Caracterización

Las isotermas de adsorción/desorción de nitrógeno se obtienen a -196 °C en un equipo Micromeritics ASAP 2010. El área superficial se determinó a partir de la parte lineal de la ecuación BET (P/P_0 = 0.05 - 0.15). La distribución promedio de tamaño de poro se calculó desde la curva de desorción de la isoterma y mediante la fórmula BJH. El volumen de poro, V_{BJH}, se obtuvo a partir de la

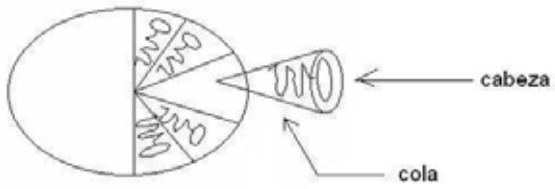


Figura 2: Parámetro de empaquetamiento critico.

curva de distribución de tamaño de poro. Los difractogramas de rayos X de las muestras en polvo se obtienen con un difractómetro Siemens D5000, usando radiación CuKα (40 KV, 30 mA) provisto de un monocromador de grafito de 1.542 Å a 298 K.

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos al variar el tipo de precursor de Al y el tipo de surfactante. Se observa que, a diferencia de lo reportado para la sílice mesoporosa [11], el cambio en el tipo surfactante tiene una notoria influencia sobre las propiedades físicas de los aluminosilicatos. Esta diferencia probablemente se debe dos factores que actúan simultáneamente sobre el sistema aluminosilicato en formación: (i) La diferencia de tamaño de las micelas formadas a partir de los surfactantes y (ii) los puntos lábiles que contiene la red.

El tamaño de las micelas se explica debido a que los surfactantes al ser moléculas anfifílicas (contienen grupos hidrofóbicos e hidrofilicos), presentan un comportamiento que está determinado por interacciones del tipo puente de hidrógeno y por fuerzas intermoleculares de Van der Waals. Estas corresponden a interacciones hidrofóbicas entre los grupos de la cola, e interacciones dipolo-dipolo entre los grupos de la cabeza que conforman los grupos hidrofílicos respectivamente.

Un modo simple para describir esta clase de interacciones se visualiza a través del parámetro de empaquetamiento crítico (R), que define la forma y el tamaño de las micelas. Este parámetro tiene relación directa con variables como el volumen, área y largo de las cadenas hidrocarbonadas:

$$R = \frac{v}{a_0 l_c} \qquad (1)$$

Donde v es el volumen de la cadena de hidrocarburo, a_0 es el área óptima de la superficie que contiene las cabezas, y l_c es la longitud crítica de la cadena [13], como se observa en la Figura 2. Según lo anterior, y observando la molécula del surfactante mostrada en la Figura 3, se puede inferir que las moléculas del Tritón X-100, que presentan un grupo hidrofóbico de mayor longitud (20 átomos de carbono) que el del Tritón X-114 (16 átomos de carbono), producirían un valor más grande para a_0 que modifica el parámetro de empaquetamiento crítico.

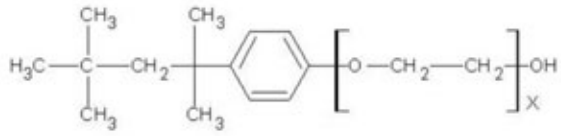


Figura 3: Estructura química de los surfactantes usados como agentes modeladores de estructura.

Esto haría que el tamaño de las micelas conformadas por Tritón X-100 sea superior al tamaño de las micelas obtenidas con Tritón X-114.

Como se puede observar en el esquema propuesto en la Figura 4, la micela (B) formada por el Tritón X-100 es de mayor tamaño que la micela (A) formada por Tritón X-114. Considerando que en el paso 1 existe la misma cantidad de aluminosilicato que puede condensar sobre las micelas, es lógico suponer que la capa de aluminosilicato condensado sobre (B), que tiene mayor área, es más delgada que la que se obtiene sobre la micela más pequeña (A). En el paso 2, y asumiendo simetría hexagonal tal como sucede en MCM-41 [1, 2], las micelas se ordenan en forma espontanea. Finalmente, para obtener el aluminosilicato mesoporoso, en el paso 3 el material se somete a un lento proceso de calcinado con la consecuente extracción del surfactante.

En este punto toma partido el segundo factor que afecta al material en formación. Es conocido que la capa de condensado presenta puntos lábiles, que se forman debido a la sustitución isomórfica de Al por Si durante la formación de la red mediante las reacciones de hidrólisis y condensación típicas del proceso sol-gel. Esto ocurre

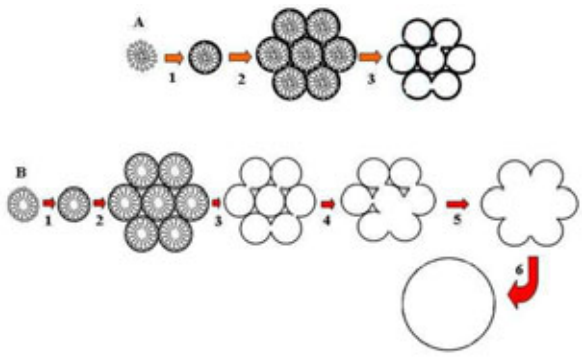


Figura 4: Esquema de formación de aluminosilicatos sobre micelas de diferentes tamaños. Las micelas se ordenan siguiendo una simetría hexagonal. A) micela generada por Tritón X-114 y B) micela obtenida con Tritón X-100. En la figura, los números 1, 2 y 3 se refieren a los procesos de condensación del aluminosilicato, organización micelar en estructura hexagonal y calcinación respectivamente. Los pasos 4, 5 y 6 se relacionan con el progresivo colapso de la estructura ordenada, que se produce como resultado de la ruptura de paredes de poro delgadas que presentan sitios lábiles.

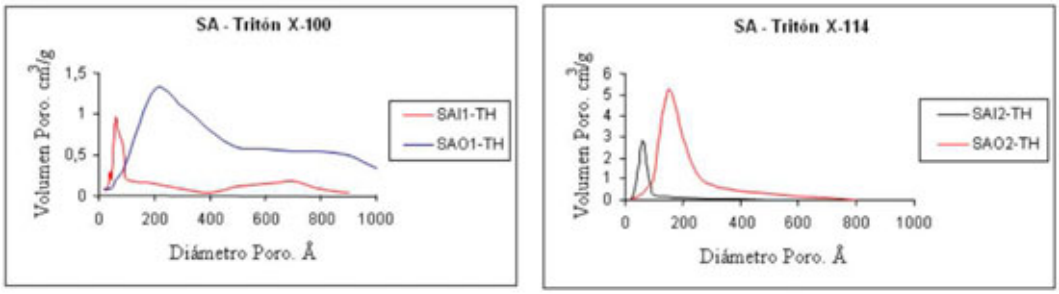


Figura 5: Distribuciones de tamaño de poro para aluminosilicatos mesoporosos obtenidos utilizando Tritón como director estructural.

porque la presencia de elementos diferentes al Si produce distorsiones que modifican las propiedades de la red, lo que finalmente se manifiesta como inestabilidad termal o hidrotermal [14, 15, 16]. De esta manera los poros formados a partir de las micelas (B), generadas con Tritón X-100, exhiben paredes de poro de menor espesor, las cuales debido al efecto de inestabilidad que provocan los sitios de Al en el material presentan mayor susceptibilidad a ruptura como consecuencia de procesos posteriores como la calcinación, para extraer el surfactante, o el tratamiento hidrotermal usado para aumentar el tamaño promedio de poro. Así, en los poros de mayor tamaño, con paredes más delgadas, el efecto de los sitios lábiles provocados por la presencia del aluminio altera en gran medida el arreglo de los poros, provocando un colapso de la estructura. Esto finalmente se refleja en materiales que exhiben mayor diámetro promedio de poro, y consecuentemente tienen menor área superficial (Figura 4B) En cambio, en el caso de las micelas (A), más pequeñas, el proceso de calcinación produce cierto grado de ruptura en el arreglo de poros, pero debido a que sus paredes son de mayor espesor la estructura parcialmente ordenada en general se mantiene, aunque mostrando algunas imperfecciones.

Como resultado de la combinación de estos factores (ver Tabla 1) se puede observar que, independiente de los precursores de aluminio (TBA o NAN), los sólidos preparados utilizando Tritón X-114 y calcinados directamente a 550 °C (SAO2 y SAI2), tienen mayor área específica y un menor diámetro medio de poros que los obtenidos utilizando Tritón X-100 (SAO1 y SAI1).

Por otra parte, para un surfactante dado, la utilización de TBA como precursor de aluminio conduce a un material con áreas específicas y diámetros de poros mayores que los obtenidos al utilizar un precursor inorgánico como el nitrato de aluminio. Consecuentemente, el volumen de poro de los materiales sintetizados utilizando TBA es mayor que el obtenido utilizando NAN como precursor de aluminio. Esto se puede ver claramente al comparar el volumen de poro de las muestras SAO1 con la muestras SAI1, y la muestra SAO2 con la muestra SAI2.

Al igual que en los sólidos calcinados directamente cuando los materiales se someten a tratamiento hidrotermal previo a la calcinación, el área superficial de los aluminosilicatos obtenidos con precursor alcóxido de Al (TBA) es más alta que el área obtenida con precursor inorgánico de aluminio (NAN). Sin embargo, tal como se esperaba, el área específica disminuye y el diámetro promedio de poro se incrementa por efecto del tratamiento hidrotermal. Es interesante notar (Tabla 1) que en los sólidos preparados utilizando Tritón X-100, el volumen de poro en los sólidos con o sin tratamiento hidrotermal es constante. En otras palabras, si bien puede ocurrir un colapso de algunos poros del sólido, el tratamiento hidrotermal parece actuar principalmente destruyendo las paredes de los poros vecinos y generando poros de mayor tamaño. En cambio, en los materiales obtenidos con Tritón X-114, el tratamiento hidrotermal genera una porosidad adicional a la que presenta el material sin tratamiento, lo cual se refleja en el aumento del volumen de poro simultáneo con el aumento del diámetro medio.

El efecto del uso de los diferentes surfactantes y del tipo de precursor de aluminio se manifiesta también sobre el grado de heterogeneidad del diámetro de poro del material sometido a tratamiento hidrotermal.

En la Figura 5, se muestran las distribuciones de poro de los cuatro aluminosilicatos sintetizados. Como se puede observar, los materiales obtenidos a partir de Tritón X-114 poseen distribuciones bastante más homogéneas que los materiales sintetizados con Tritón X-100, que muestran curvas de distribución más amplias, especialmente en el caso de utilizar el precursor orgánico de aluminio (TBA).

Como se observa en la Tabla 1, el volumen total de poro de los materiales sintetizados con precursores alcóxidos de silicio y aluminio es mayor que el que exhiben los sólidos obtenidos a partir de TEOS y nitrato de aluminio independiente del surfactante utilizado; sin embargo el sistema TEOS/TBA/Tritón X-114 es el que genera el mayor volumen total de poro después del tratamiento hidrotermal. Esta característica, adicional a un área superficial, sobre los 400 m^2/g, con diámetros de poro grandes y distribuciones simétricas, ratifica que la unión de los tres componentes que actúan en la reacción sol-gel para formar los aluminosilicatos mesoporosos es la más adecuada para lograr los fines deseados.

Por otra parte el análisis de difracción de rayos X de los materiales previo al tratamiento hidrotermal, indica que ninguno de los sólidos obtenidos utilizando Tritón X-100 (SAO-1 y SAO2) presenta patrón de difracción

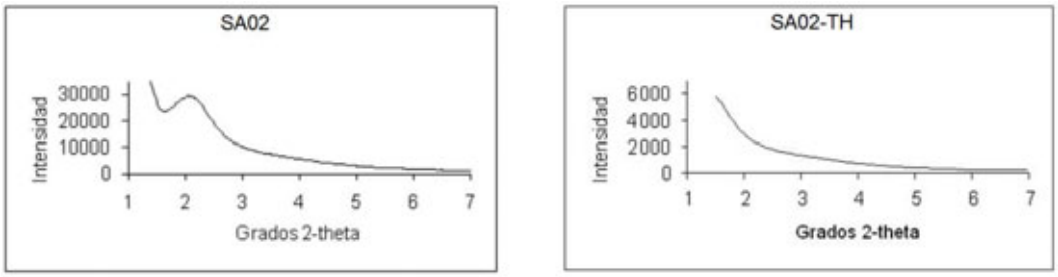


Figura 6: Patrones de difracción de aluminosilicatos mesoporosos obtenidos usando Tritón X-114 como director estructural. SAO2 represnta el material directamente calcinado a 550 °C. SAO2-TH se refiere al material con tratamiento hidrotermal a 150 °C durante 24 horas, previo a la calcinación.

alguno. Igual comportamiento presentan los materiales obtenidos a partir de TEOS/NAN/Tritón X-114 (SAI2). En cambio, como lo muestra la Figura 6, los aluminosilicatos sintetizados con Tritón X-114 y obtenidos a partir de precursores alcóxido (SAO2) muestran un pico a bajo ángulo, que se asocia con estructuras que presentan cierto grado de orden. No obstante, si las muestras tienen un tratamiento hidrotermal previo a la calcinación, el patrón de difracción se pierde independiente del surfactante usado.

Según lo anotado, el sistema TEOS/TBA/Tritón X-114 se toma como base para estudios posteriores acerca de la influencia de la variación en las condiciones del tratamiento hidrotermal y de cambios en la relación Si/Al sobre las propiedades de los materiales; además este trabajo se toma como referente para la síntesis de aluminosilicatos obtenidos usando quitosano como agente modelador de poro [17].

Conclusiones

Según el esquema de formación de aluminosilicatos a partir de micelas de diferentes tamaños planteado en este trabajo, se determinó que utilizando Tritón X-100 como agente modelador se obtienen áreas superficiales menores, con diámetros de poro superiores, a las obtenidas usando el surfactante Tritón X-114. Esto es debido al mayor tamaño de la micela formada en solución acuosa en presencia de Tritón X-100, lo cual conduce a la formación de poros con paredes más delgadas. Además, la sustitución isomórfica de Al por Si en la red en formación, hace que existan puntos lábiles en la capa de aluminosilicato condensado sobre la micela. Estos dos factores en conjunto, hacen que los poros colapsen más fácilmente en procesos posteriores como la calcinación o el tratamiento hidrotermal. Esto finalmente se refleja en materiales que exhiben mayor diámetro promedio de poro con distribuciones muy irregulares. Por otro lado, los materiales obtenidos con Tritón X-114 y tratamiento hidrotermal presentan mesoporos grandes, con distribuciones de diámetro de poro simétricas, lo que indica mayor regularidad en el tamaño promedio de poro.

En el estudio de la formación de los aluminosilicatos con Tritón X-114 y diferentes precursores de Al (NAN y TBA) se determinó que las propiedades texturales del sólido final son mejores, y presentan alta área superficial, con diámetro de poro sobre 60 Å y distribuciones de poro simétricas, cuando se utiliza alcóxidos (TEOS/ TBA) que cuando se usa TEOS y un precursor inorgánico como el nitrato de aluminio; lo cual se atribuye a que existe una mejor compatibilización entre las especies organo-inorgánicas que participan en la reacción sol-gel para la formación de la red.

A partir del análisis de los datos de difracción de rayos X sobre los aluminosilcatos mesoporosos obtenidos con Tritón X-114, se determina que los materiales presentan cierto grado de orden estructural en el arreglo de poros. Sin embargo, una vez que se someten a tratamiento hidrotermal el arreglo de poros colapsa, y el material es totalmente amorfo.

Estos resultados permiten concluir que el sistema TEOS /TBA/Tritón X-114, con el cual se logra obtener materiales con áreas sobre los 400 m^2/g (después del tratamiento hidrotermal) y poros de gran tamaño y volumen, es el que más adecuado para obtener aluminosilicatos de interés para posibles aplicaciones como soporte o material catalítico. Para esta última aseveración en futuros estudios será necesario determinar los sitios activos de carácter ácido que poseen los materiales.

La metodología y resultados obtenidos en este trabajo se toman como una referencia importante para la síntesis de aluminosilicatos obtenidos usando quitosano como agente modelador de poro [17], cuyas propiedades catalíticas han sido evaluadas en sistemas de craqueo para la conversión de cumeno [18], isopropilbenceno, ciclohexeno y 1,3,5 triisopropilbenceno [19]. Estos materiales se vislumbran como importantes aditivos, o incluso soportes-matriz, para el craqueo de moléculas de gran tamaño en sistemas de craqueo catalítico de fracciones de petróleo pesado.

Referencias

[1] Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C., and Beck, J. S. 1992. “Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism”. *Nature*. 359, 710-712.

[2] Beck, S., Vartuli, J. C., Roth, W. J., Leonowicz, M. E., Kresge, C. T., Schmitt, K. D., Chu, C. T. W., Olson,

D. H., and Sheppard, E. W. 1992. "A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates". *J. Am. Chem. Soc*. 114, 10834-10843.

[3] Tanev, P. T. and Pinnavaia, T. J. 1995. "A neutral templating route to mesoporous molecular sieves". *Science*. 267, 865-867.

[4] Zhang, W., Pauli, T. R., and Pinnavaia, T. J. 1997. "Tailoring the framework and textural mesopores of HMS molecular sieves through an electrically neutral (Si) assembly pathway". *Chem Mater*. 9, 2491-2498.

[5] Prouzet, E. and Pinnavaia, T. J. 1997. "Assembly of mesoporous molecular sieves containing wormhole motifs by a nonionic surfactant pathway: Control of pore size by synthesis temperature". *Angew. Chem. Int. E*. 36, 516-518.

[6] Bagshaw, S. A., Kemmitt, T., and Milestone, N. B. 1998. "Mesoporous [M]-MSU-X metallo-silicate catalysts by non-ionic polyethylene oxide surfactant templating acid $[N^0(N^+)X^-I^+]$ and base $(N^0M^+I^-)$ catalysed pathways". *Micropor. Mesopor. Mater*. 22, 419-433.

[7] Zhao, D., Feng, J., Huo, Q., Melosh, N., Fredrickson, G. H., Chmelka, B. F., and Stucky, G. D. 1998. "triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores". *Science*. 279, 548-552.

[8] Zhao, D., Huo, Q., Feng, J., Chmelka, B. F., and Stucky, G. D. 1998. "nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant synthesis of highly ordered, hydrothermally stable mesoporous silica structures". *J. Am. Chem. Soc*. 120, 6024-6036.

[9] Stucky, G. D., Chmelka, B. F., Zhao, D., Melosh-Huo, Q., Feng, J. N., Yang, P., Pine, D., Margolese, D., Lukens, W., Fredrickson, G. H., and Schmidt-Winkel, P. 1999. "Synthesis of highly ordered, hydrothermally stable mesoporous silica materials". Int. Patent. WO99/37705.

[10] Retuert, J., Quijada, R., Arias, V., and Yazdani-Pedram, M. 2003. "Porous silica derived from chitosan-containing hybrid composites". *J. Mater. Res*. 18, 487-494.

[11] Hidrobo, A. 2004. "Síntesis y caracterización de aluminosilicatos mesoporosos con aplicaciones en craqueo catalítico" Universidad de Chile, Tesis de Doctorado en Química: Santiago de Chile.

[12] Bagshaw, S. A. 1999. "Modification of [M]-MSU-X mesoporous silicate pore morphology by post-synthesis treatment". *Chem. Commun*. 271-272.

[13] Zhang, J., Wang, Z. L., Liu, J., Chen, Sh., and Liu, G-Y. 2003. "Self-Assembled Nanostructures". Kluwer Academic/Plenum publishers: New York. USA.

[14] Corma, A., Fornes, Y., Navarro, M. T., and Perez-Pariente, J. 1994. "Acidity and stability of MCM-41 crystalline aluminosilicates". *J. Catal*. 148, 569-574.

[15] Chen, X., Huang, L., Ding, G., and Li, Q. 1997. "Characterization and catalytic performance of mesoporous molecular sieves Al-MCM-41 materials". *Catal. Lett*. 44, 123-128.

[16] Schmidt, R., Akporiaye, D., Stoker, M., and Ellestad, O. H. 1994. "Synthesis of a mesoporous MCM-41 material with high levels of tetrahedral aluminium". *Chem. Commun*. 1493-1494.

[17] Hidrobo, A., Retuert, J., and Araya, P. 2003. "Stable zeolite-containing mesoporous aluminosilicates". *J. Porous Mater.* 10, 231-234.

[18] Hidrobo, A., Retuert, J., and Araya, P. 2009. "Aluminosilicatos mesoporosos catalíticamente activos obtenidos usando el biopolímero quitosano como agente formador de poros". *Avances en ciencias e ingenierías*. 1, 37-40.

[19] Falco, M., Retuert, J., Hidrobo, A., Covarruvias, C., Araya, P., and Sedrán, U. 2009. "Catalytic performance of silica-aluminas synthesised with the help of chitosan biopolymer". *Appl. Catal. A: Gen*. 366, 269-274.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
ARTÍCULO/ARTICLE SECCIÓN/SECTION A

Síntesis de 2,8,14,20-tetra-n-butilpirogalol[4]areno y estudio computacional conformacional

Cesar H. Zambrano[1*], Carlos A. Manzano[1†], Andrea A. Saltos[1], Eric E. Dueno[2], Matthew Zeller[3]

[1]*Colegio de Ciencias e Ingeniería - El Politécnico, Universidad San Francisco de Quito. Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador*
[2]*Department of Natural Sciences, Bainbridge University, Bainbridge, Georgia, USA*
[3]*Department of Chemistry, Youngstown State University, Youngstown, Ohio, USA*
[†]*Dirección Actual: Department of Chemistry Oregon State University, Corvalis, Oregon, USA*
[*]*Autor principal/Corresponding author, e-mail: czambrano@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: F. J. Torres, Dr.
Recibido/Received: 03/15/2010. Aceptado/Accepted: 04/05/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 05/21/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

The macrocycle 2,8,14,20-tetra-n-butilpirogalol[4]areno was syntesized by acid catalized condensation of pyrogallol and butanal. The product was isolated by recrystallization from an acetone-water mixture which yielded single crystals suitable for an X-ray diffraction study. The latter revealed a *P-1*, triclinic unit cell of dimensions a=11.63920(10) Å, b=12.8367(2) Å, c=17.5423(2) Å and α=104.1070(10)^o β=95.6630(10)^o γ=101.5790(10)^o, which contained two molecules of the tetramer related to each other by an inversion center. The solid state structure of the macrocycle shows an all cis- conformation (rccc), also called crown or cone structure, which is consistent with all other known aliphatic derivatives of pyrogallolarenes. A semiempirical computational calculation (AM1 and PM3) was carried out on the aforementioned compound to determine if the observed conformation was more stable than the chair (rctt) structure. These calculations were also performed on other reported derivatives of pyrogalloloarenes with aliphatic and also with aromatic substituents. The results indicated that for all pyrogallol**[4]**arenes the most stable (thermodynamic) conformation is the rccc; which suggest that the chair structure observed for aromatic derivatives may be a kinetic product.

Keywords. pyrogallolarene, butyl, X-ray, semiempirical calculations, conformation.

Resumen

El compuesto 2,8,14,20-tetra-n-butilpirogalol[4]areno se sintetizó mediante condensación de butiraldehido y pirogalol catalizada por ácido. El producto fue aislado en forma de monocristales y analizado por difracción de rayos X. La estructura cristalina corresponde a una celda triclínica de grupo espacial *P-1* que contiene dos moléculas del macrociclo por celda unitaria de dimensiones a=11.63920(10) Å, b=12.8367(2) Å, c=17.5423(2) Å y ángulos α=104.1070(10)^o β=95.6630(10)^o γ=101.5790(10)^o. El análisis de rayos X reveló que el macrociclo corresponde a un tetrámero del pirogalol que adopta la conformación todo cis (rccc) también llamada estructura de cáliz. El estudio computacional semi-empírico (AM1 y PM3) realizado en este compuesto y otros derivados alifáticos y aromáticos indicó que la conformación más estable para estos compuestos es la conformación de cáliz, mientras que la conformación de silla (rctt) no parece ser un producto termodinámico sino más bien una estructura de origen cinético.

Palabras Clave. pirogalolareno, butil, rayos-X, cálculos semiempíricos, conformación.

Introducción

Los pirogallolarenos son oligómeros macrocíclicos de 4 o 6 unidades que se forman por condensación de pirogallol con aldehidos, y adoptan conformaciones de silla o corona dependiendo del tipo de aldehido utilizado [1, 2, 3, 4]. A los macrociclos del pirogalol que presentan la estructura de corona se los incluye dentro de las moléculas llamadas calixarenos ya que su estructura se asemeja a la de un caliz. Dentro de esta categoría también se encuentran macrocíclos que se derivan de la condensación de aldehídos con fenol y resorcinol en medio ácido [4] (Figura 1).

Mientras que los primeros reportes sobre la existencia de macromoléculas en forma de corona o cáliz se remontan a los años 1940 [5], solo en las últimas dos déca-

ISSN 1390-5384

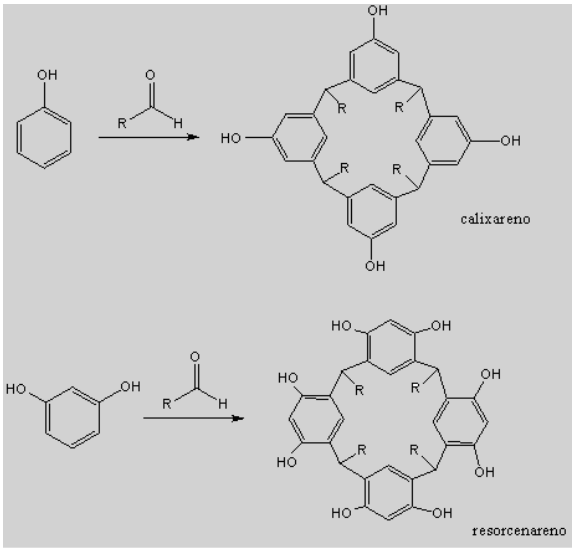


Figura 1: Síntesis y estructuras de calixarenos y resorcinarenos

das se han reportado una cantidad considerable de investigaciones dedicadas a estos compuestos [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14]. Igualmente, la metodología de síntesis y el control de las variables conformacionales de estas moléculas han mejorado considerablemente en los últimos años [15, 16, 17]. Recientemente, estos macrociclos han recibido una mayor atención por sus potenciales usos como: (i) plataformas moleculares para intercambio de ligandos con metales [18], (ii) materiales poliméricos [19, 20, 21], (iii) sistemas de auto-ensamblaje [22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 16], (iv) centros de reacción de procesos catalíticos [29, 30, 31]; al igual que para la extracción de metales pesados [32, 33, 34, 35], la detección de iones [36, 37, 38, 39, 40]; y especialmente como cápsulas moleculares para el transporte de compuestos específicos [41, 42, 43], filtros moleculares en estado sólido [34, 44, 45], y como modelos de membranas en solventes polares y estado cristalino [46, 47].

Como parte de nuestro continuo estudio de estas macromoléculas [48, 49, 50, 51], en este trabajo reportamos la síntesis de un nuevo compuesto de esta familia, el tetra-n-butylpirogalol[4]areno de conformación todo cis (rccc), y el estudio computacional de sus preferencias conformacionales.

Metodología

Experimental

Sintesis de 2, 8, 14, 20-tetra -n-butilpirogalol[4]areno

Un reactor redondo de vidrio de 200 mL de volumen fue cargado con 1.0 g de pirogalol (7.9 mmol) y 55 mL de 95 % etanol al 95 %. El reactor fue enfriado en un baño de agua/hielo por 30 minutos y se añadió a la solución de pirogalol 1.6 mL de 6 M HCl. A continuación se añadió lentamente (gota por gota) butiraldehido (0.7 g, 7.0 mmol) durante un periodo de 30 minutos sin permitir que la temperatura de la reacción supere los 3 ^{o}C. Una vez terminada la adición se permitió que el reactor se caliente lentamente hasta la temperatura ambiente, y 1 hora después se incrementó la temperatura a 80 ^{o}C con reflujo por 12 horas. Una vez enfriada la reacción (temperatura ambiente) se detectó la formación de cristales blancos en el fondo del reactor. Estos fueron recolectados por filtración y lavados con 50 mL de una mezcla fría de 50:50 (%v/v) de etanol:agua. Recristalización del producto en acetona generó 0.79 g (1.21 mmol) de producto seco. Rendimiento: 93 %, Punto de fusión del producto > 300 ^{o}C.

Análisis de la estructura cristalina

Un monocristal (blanco) del compuesto, 2, 8, 14, 20-tetra-n-butilpirogalol[4]areno, de dimensiones 0.40 x 0.35 x 0.26 mm fue analizado a 100(2) K con un difractómetro de rayos-x Bruker-Nonius SMART APEX equipado con un detector 4K CCD. Se usó radiación monocromática Cu Kα (λ =1.54178 Å). Los datos fueron corregidos respecto a efectos de polarización y de Lorentz durante la reducción de datos con el paquete computacional BRUKER SAINT [52]. El coeficiente de absorción experimental fue de 0.807 1/mm. La estructura fue elucidada usando métodos directos. Todos los átomos, excluyendo los hidrógenos, fueron refinados en forma anisotrópica sobre F^2 usando una matriz de mínimos cuadrados con el programa *SHELXTL 6.14* [53]. Todos los átomos de hidrógeno fueron ubicados en posiciones calculadas y refinados con parámetros de desplazamiento isotrópico de 1.5 (para grupos metilos e hidroxilos) o 1.2 veces mayores a aquellos de carbonos u oxígenos adyacentes. La información cristalográfica está indicada en la Tabla 1.

Computacional

El estudio computacional se llevó a cabo con el programa CAChe®[54], versión 5.0 de Fujitsu America Inc. equipado con MOPAC [55]. Las manipulaciones computacionales utilizadas fueron: (i) construcción interactiva de varios pirogalol[4]arenos con sustituyentes alifáticos y aromáticos, (ii) optimización de geometrías y (iii) cálculo de la energía de formación. Para los cálculos se usaron los métodos semi-empíricos AM1 y PM3 *Austin model 1* y *parameterized method 3*, respectivamente) [56, 57, 58, 59].

Resultados y Discusión

La reacción de obtención del 2,8,14,20-n-butilpirogalol-[4]areno es una reacción general de condensación catalizada por ácido. Es decir, la reacción del butiraldehído con el pirogallol ocurre en presencia de una cantidad catalítica de ácido clorhídrico (Figura 2)

Debido a que este tipo de reacciones ocurren lentamente a temperatura ambiente, se acostumbra realizar la reacción en reflujo durante 10-12 horas, después de lo cual el producto precipita en forma de un sólido blanco. Este sólido fue purificado por recristalización en acetona

Fórmula empírica	$C_{49}H_{72}O_{18}$
Peso fórmula	949.07
Sistema cristalino	Triclinico
Grupo espacial	P-1
Dimensiones de la celda unitaria	a =11.63920(10) Å α= 104.1070(10)^o
	b =12.8367(2) Å β= 95.6630(10) ^{o}
	c =17.5423(2) Å γ= 101.5790(10) ^{o}
Volumen	2459.97(5)Å^3
z	2
Densidad calculada	1.281 Mg/m^3
F(000)	1020
Rango de theta para datos recolectados	3.65 - 71.86 ^{o}
Indices limitantes	-14 $\leq h \leq$ 13, -14 $\leq k \leq$ 15, -21 $\leq l \leq$21
Reflecciones recolectadas/únicas	44704/9153 [R(int) = 0.0327]
Theta completada	71.86 (94.7 %)
Corrección de absorción	Numérico
Transmisión máxima/mínima	0.8176 / 0.7385
Datos / restricciones / parámetros	9153 / 1 / 644
Mejor ajuste sobreF^2	1.021
Indices finales de R [I>2σ(I)]	R1 = 0.0510, wR2 = 0.1359
Indices de R (todos los datos)	R1 = 0.0523, wR2 = 0.1371
Pico y hueco más grandes	1.890 and -0.666 e·Å^3

Tabla 1: Datos de la difracción de rayos-X del mono cristal del 2,8,14,20-n-butilpirogalol[4]areno y de su refinación estructural.

de la cual se obtuvieron monocristales adecuados para análisis por difracción de rayos-X. En la Figura 3 se muestra la estructura de rayos-X descrita con el programa Ortep [60]. La molécula adopta la característica conformación todo-cis para pirogalolarenos con sustituyentes alquílicos; esta geometría también se la conoce como rccc [2]. La parte aromática de esta macromolécula genera la forma de copa o caliz, donde su borde superior presenta grupos OH de anillos opuestos separados por una distancia máxima y mínima de 11.158 Å (O5 – O11) y 8.996 Å (O8 – O2), respectivamente; mientras que el borde inferior tiene una distancia máxima de 6.149 Å (entre carbonos C25 y C5) y mínima de 5.254 Å (entre carbonos C15 y C35). Una característica especial de esta molécula es que los cuatro anillos de pirogalol que forman la estructura tipo cáliz, no tienen la misma inclinación (ángulo con respecto al eje vertical de la cavidad), observándose que el grado de inclinación es igual para fragmentos opuestos de pirogallol. Así, los anillos formados por los carbonos C31 a C36 y C11 a C16 forman planos de 88.91^o con respecto del uno con el otro, y un ángulo de 44.45^o con respecto a la vertical; mientras que los anillos formados por C21 a C26 y C1 a C6 generan un ángulo de 53.78^o. Esta característica estructural demuestra que la molécula no es totalmente simétrica y posee una elongación en la dirección ecuatorial, lo que implica que la estructura del macrociclo es de cáliz ovalado. En vista de que la cavidad del macrociclo se asemeja a un *frustum* piramidal invertido, el volumen puede ser calculado mediante la ecuación:

$$V = \left(\frac{h}{3}\right)\left(R_1 + (R_1R_2)^{1/2} + R_2\right)$$

[61], donde *h* es la altura de la pirámide, y R_1 y R_2 son las áreas promedio de los anillos superior e inferior, respectivamente. El volumen calculado para el 2,8,14,20-tetra-n-butilpirogalol[4]areno es de 163 Å^3, que es ligeramente menor pero comparable al volumen calculado en macrociclos derivados de calixarenos y resorcinarenos (190 a 250 Å^3) [62, 63],

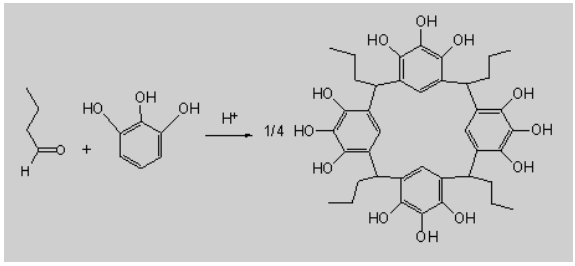


Figura 2: Reacción de síntesis de 2,8,14,20-n-butilpirogalol[4]areno

La celda unitaria del cristal contiene dos moléculas de pirogalolareno, relacionadas la una con la otra a través de un centro de inversión (*i.e*, grupo espacial *P-1*). Adicionalmente los datos de la difracción de rayos-X mostraron que la celda también contiene seis moléculas de solvente: tres acetonas y tres moléculas de agua que dan estabilidad a la estructura cristalina mediante la formación de puentes de hidrógeno con los pirogalolarenos. Los puentes de hidrógeno se pueden observar en la figura 4 como líneas punteadas. Las distancias de los puentes de hidrógeno varían entre 1.85 Å y 2.30 Å, longitudes que son similares a las observadas en otros compuestos hidroxilados de la misma familia de calixarenos y resorcinarenos [25, 47, 48, 49, 50, 51].

Los datos de difracción de rayos-X del cristal también revelan algo interesante, una de las moléculas de aceto-

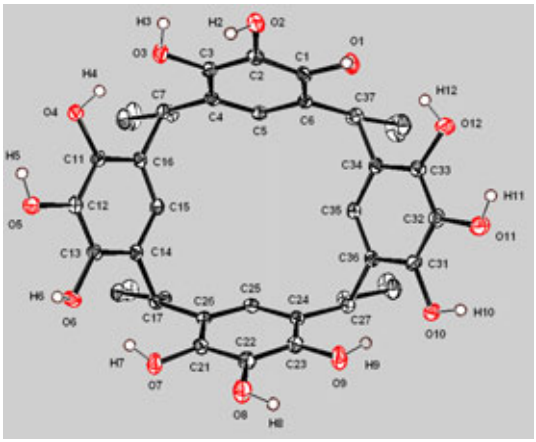


Figura 3: Dibujo Ortep® del compuesto 8,14,20-n-butilpirogalol[4]areno. Por claridad, los únicos átomos de hidrógeno que se muestran son los de los grupos OH y están representados por esferas de color blanco. Los átomos de carbono (negro) y oxígeno (rojo) se representan como elipsoides térmicos de 50 % de probabilidad.

na se encuentra atrapada dentro de la cavidad de un pirogalolareno. La causade esto es el puente de hidrógeno $(CH_3)_3C{=}O\cdots HO$ (distancia C=O···O 2.690 Å), aunque también se conciben interacciones de Van der Waals entre los grupos metilos de la acetona y los anillos aromáticos cercanos; así, las distancias C(metil)-C(α)-OH varían entre 3.640 Å y 3.740 Å, que son distancias que se pueden asociar a interacciones $\sigma - \pi$ y $\sigma^* - \pi$ entre grupos metilos y anillos de pirogalol. La Figura 5 muestra este fenómeno usando una representación CPK (*i.e., closely packed spheres*).

Con respecto al empaquetamiento en estado sólido se observa que las partes polares (hidrofílicas) de las moléculas de pirogalolareno se juntan entre sí al igual que las porciones hidrofóbicas formadas por las cadenas alifáticas de los sustituyentes. Esto genera un patrón peculiar de hileras de bicapas que se asemejan a las de las biomembranas (Figura 6). Estructuras similares han sido reportadas en otros pirogalolarenos alifáticos cuando se cristalizan en solventes polares; mientras que estructuras esféricas (octaédricas o tetraédricas) formadas por 4 ó 6 macrociclos que encapsulan a moléculas de solventes se autoensamblan en solventes no polares [1, 17, 16]

La evidencia experimental hasta ahora reportada ha indicado que los pirogalolarenos adoptan la conformación de caliz, todo cis (rccc) cuando provienen de la condensación de pirogalol con aldehidos alifáticos, mientras que la conformación de silla, rctt, se obtiene cuando se usan aldehidos aromáticos (Figura 7) [1, 4, 17, 42, 63]. Para corroborar esta evidencia, se procedió a realizar un estudio computacional con el 2,8,14,20-n-butilpirogalol[4]areno y también con otros derivados sintetizados en nuestro grupo [48, 49, 50, 51].

Empleando el programa Cache®, se crearon las moléculas en forma interactiva en sus dos conformaciones, silla (rctt) y caliz (rccc), y cada geometría fue optimizada mediante los métodos semiempíricos AM1 y PM3 incluidos dentro del paquete MOPAC-Cache® [54].

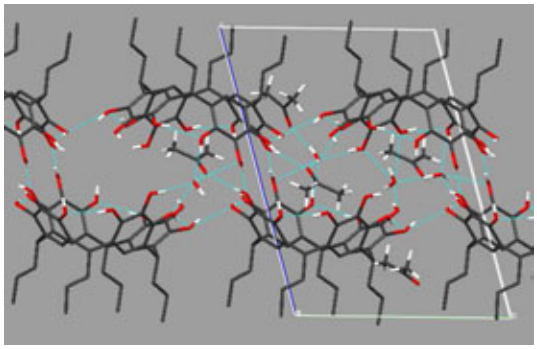


Figura 4: Empaquetamiento en estado sólido de 2,8,14,20-n-butilpirogalol[4]areno a lo largo del eje a de la celda unitaria triclínica. Los puentes de hidrógeno están indicados con líneas punteadas azules. Los átomos de oxígeno son rojos. Los hidrógenos que no intervienen en puentes de hidrógeno han sido excluidos para brindar mayor claridad.

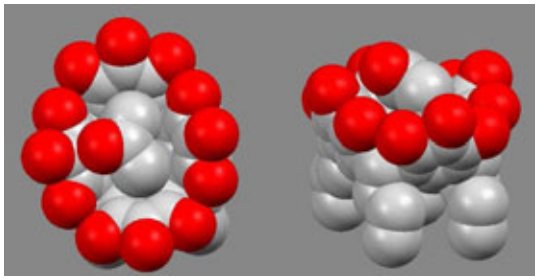


Figura 5: Representacion *closely packed spheres* (CPK) de una molécula del solvente, acetona, atrapada en la cavidad del pirogalolareno. El lado izquierdo corresponde a la vista superior de la cavidad; mientras que el lado derecho es la vista lateral. Los átomos de carbono, oxígeno e hidrógeno se representan con los colores gris, rojo y blanco, respectivamente.

Posteriormente se calculó la energía del punto cero de las estructuras optimizadas. Los resultados de los cálculos computacionales están indicados en la Tabla 2, en donde se evidencia que la conformación más estable (*i.e.,* valores más bajos de energía) para todos los pirogalol[4]arenos es la estructura de cáliz (rccc), no solo para los sustituyentes alifáticos sino también para los sustituyentes aromáticos, lo cual difiere con respecto a los resultados experimentales donde se ha reportado que los sustituyentes aromáticos producen estructuras de silla (rctt). Esta diferencia entre los resultados experimentales y nuestros cálculos teóricos podría atribuirse a que la investigación teórica con el programa Cache® involucra cálculos (semi-empíricos) que no describen de forma adecuada las interacciones electrónicas y los efectos del solvente y de cristalización. Sin embargo, resulta apropiado concebir que la conformación de silla (rctt) que se obtiene en forma experimental es un producto cinético definido por consideraciones de carácter electrónico; mientras que los grupos alifáticos debido a su carácter electrónico electrodonador, dan lugar a la formación del producto termodinámico que es la conformación de cáliz como lo demuestran los resultados del estudio teórico en la Tabla 2. Esto último también tiene su sustento en otros resultados que han sido obtenidos a lo largo de nuestras investigaciones donde la introducción de grupos sustutiyentes estericamente exigen-

	AM1		PM3		Ref.
Sustituyente-R	**Silla(rctt)**	**Cáliz(rccc)**	**Silla(rctt)**	**Cáliz(rccc)**	
n-decyl	-685.3301	-669.8065	-625.3907	-631.0430	53
n-butyl	-494.6995	-504.3109	-484.9320	-493.5278	Este trabajo
cyclohexyl	-522.0950	-541.3314	-495.1055	-515.8450	53
Phenyl	-301.6222	-318.1857	-299.5509	-311.9746	52
p-F-C_6H_5	-483.5708	-493.0383	-474.5070	-485.7098	53
p-Me-C_6H_5	-332.4653	-342.9815	-341.2416	-352.8730	53
p-HO-C_6H_5	-478.5159	-486.6745	-479.2065	-493.0759	51
p-MeO-C_6H_5	-452.5511	-456.2201	-453.1473	-465.3482	53

Tabla 2: Energías (Kcal/mol) de las conformaciones de silla y cáliz para varios derivados del pirogalol[4]areno. Los valores tienen una precisión de 0.0013.

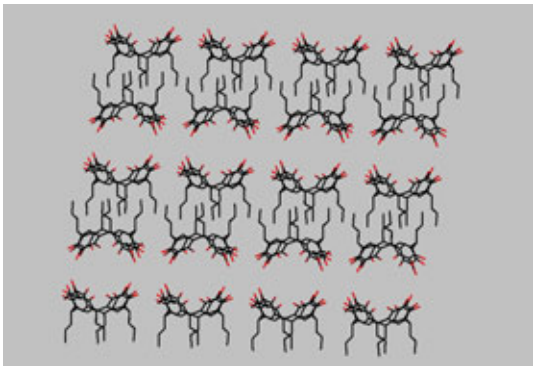


Figura 6: Empaquetamiento en bicapas del 2,8,14,20-n-butilpirogalol[4]areno a lo largo del eje cristalográfico b. Los átomos de hidrógeno han sido removidos para brindar mayor claridad.

tes como el ter-butilo [51] y ciclohexilo [50] no generan conformaciones tipo silla (rctt) sino que mantienen la estructura de cáliz (rccc) a pesar del volumen espacial que ocupan. Esto se observa incluso cuando se usa fenilacetaldehido, ya que el producto obtenido es el derivado tetra-benzílico rccc [50], lo que permite concluir que la presencia de un anillo aromático en una cadena alifática no afecta la conformación final del producto.

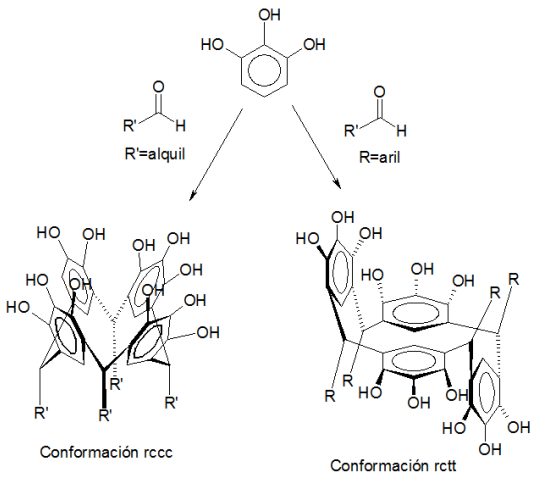


Figura 7: Reacciones de formación de dos confórmeros del pirogalolareno

Conclusiones

La síntesis de un nuevo derivado de la familia de los pirogalolarenos se llevó a cabo por condensación ácida de butiraldehido y pirogalol. El producto fue aislado en forma de monocristales y analizado por difracción de rayos X, lo cual reveló que el compuesto es un tetrámero del pirogalolareno que adopta la conformación de cáliz o rccc. El empaquetamiento cristalino demostró que, en cada celda unitaria, una molécula de acetona se encuentra atrapada dentro de la cavidad de un tetra-n-butilpirogalol[4]areno, fenómeno que puede ser atribuido a la orientación de cada molécula en la estructura cristalina y a las interacciones entre el solvente y el macrociclo. Con respecto al empaquetamiento se observó que las porciones hidrofílicas e hidrofóbicas se juntan y se alinean formando un sistema periódico similar a una bicapa, mientras que una gran cantidad de puentes de hidrógeno brindan rigidez a la estructura del cristal. Un estudio computacional semi-empírico (AM1 y PM3) se realizó para determinar la conformación más estable del compuesto sintetizado y de otros compuestos conocidos de la misma familia. Los resultados obtenidos revelaron que los derivados de sustituyentes alifáticos así como los de sustituyentes aromáticos presentan la conformación de menor energía cuando la estructura tiene forma de cáliz (rccc).

Agradecimientos

EED agradecen a la *National Science Foundation* por su apoyo a este proyecto mediante la concesión (EPSCOR Grant No. 450901). MZ agradece a la *National Science Foundation* (NSF Grant 0087210), al *Ohio Board of Regents* (Grant CAP-491), y a YSU por su ayuda para financiar el difractómetro. CZ agradece a los Chancellor Grants otorgados por la USFQ para el periodo 2009-2010. CZ también agradece a F. Javier Torres por sus relevantes sugerencias y discusiones.

Referencias

[1] Liam, C., Palmer, and Jr., J. R. 2005. "Hydrocarbon binding inside a hexameric pyrogallol[4]arene capsule." *Org. Lett*. 7(5), 787-789.

[2] Shivanyuk, A., Friese, J., Döring, S., and Jr, J. R. 2003. "Solvent-stabilized molecular capsules." *J. Org. Chem.* 68(17), 6489-6496.

[3] Shivanyuk, A., Far, A. R., and Jr., J. R. 2002. "Rigid tetranitroresorcinarenes." *Org. Lett.* 4(9), 1555-1558.

[4] Gutsche, D., Zouhair, A., Böhmer, V., Harrowfield, J., Vicens, J., and eds, M. S. 2001. "Synthesis of calixarenes and thiacalixarenes." *Springer Netherlands.* 1-25, 155-181.

[5] Niederl, J., Niederl, V., and Grumer, J. 1940. "Steric hindrance in ketone-phenol condensations. the condensation of guaiacol with cyclic ketones." *J. Am. Chem. Soc.* 62, 320-322.

[6] Lewis, P. and Strongin, R. 1998. "Resorcinarenes with deepened polyaromatic lower cavities: Synthesis and structure." *J. Org. Chem.* 63(17), 6065-6067.

[7] Moore, D. and Matthews, S. 2009. "O-alkyl resorcarenes: where are we now?." *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* 65(1-2), 137-155.

[8] Botta, B., Monache, G. D., Rosa, C. D., Seri, C., Benedetti, E., Iacovino, R., Botta, M., Corelli, F., Masignani, V., Tafi, A., Gacs-Baitz, E., Santini, A., and Misiti, D. 1997. "Synthesis of c-alkylcalix[4]arenes. 5. Design, synthesis, computational studies, and homodimerization of polymethylene-bridged resorc[4]arenes." *J. Org. Chem.* 62(6), 1788-1794.

[9] Botta, B., Monache, G. D., Ricciardi, P., Zappia, G., Seri, C., Gacs-Baitz, E., Csokasi, P., and Misiti, D. 2000. "Synthesis of c-alkylcalix[4]arenes, 6 The interaction of resorcin[4]arenes with FeIII in chloroform." *European Journal of Organic Chemistry.* 5, 841-847.

[10] Botta, B., D'Acquarica, I., Nevola, L., Sacco, F., Lopez, S. V., Zappia, G., Fraschetti, C., Speranza, M., Tafi, A., Caporuscio, F., Letzel, M., and Mattay, J. 2007. "Bis(diamido)-bridged basket resorcin[4]arenes as enantioselective receptors for amino acids and amines." *European Journal of Organic Chemistry.* 36, 5995-6002.

[11] Vicens, J., Böhmer, V., and (eds.) Kluwer Academic Publishers, D. 1990. "Calixarenes: a versatile class of macrocyclic compounds." The Netherlands. 5-27.

[12] Gutsche, D. 1990. "Calixarenes revisited monographs in supramolecular chemistry." The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House. 1-7,10-28,41-78.

[13] Gopalsamuthiram, V. and Wulff, W. 2004. "A new convergent strategy for the synthesis of calixarenes via a triple annulation of fischer carbene complexes." *J. Am. Chem. Soc.* 126(43), 13936-13937.

[14] Sakhaii, P., Verdier, L., Ikegami, T., and Griesinger, C. 2002 "Synthesis of a novel class of carbohydrate-containing calix[4]resorcinarene adopting an asymmetrical diamond structure." *Helvetica Chimica Acta.* 85(11), 3895-3908.

[15] Atkinson, M., Buar, D., Sokolov, A., Frii, T., Robinson, C., Bilal, M., Sinada, N., Chevannes, A., and MacGillivray, L. 2008. "General application of mechanochemistry to templated solid-state reactivity: rapid and solvent-free access to crystalline supermolecules." *Chem. Commun.* 48, 5713-5715.

[16] Barrett, E., Dale, T., and Rebek, J. 2007. "Synthesis and assembly of monofunctionalized pyrogallolarene capsules monitored by fluorescence resonance energy transfer." *Chem. Commun.* 41, 4224-4226.

[17] Antesberger, J., Cave, G., Ferrarelli, A., Heaven, M., Raston, C., and Atwood, J. 2005. "Solvent-free, direct synthesis of supramolecular nano-capsules ." *Chem. Commun.* 7, 892-894.

[18] Kleij, A., Souto, B., Pastor, C., Prados, P., and Mendoza, J. D. 2004. "Multinuclear calixarene synthons with covalently linked aryl-palladium(ii) complexes." *J. Org. Chem.* 69(19), 6394-6403.

[19] Yang, Y. and Swager, T. 2006. "Main-chain calixarene polymers: Conformational effects on polymerization." *Macromolecules* 39(6), 2013-2015.

[20] Abourahma, H., Bodwell, G., J.Lu, Moulton, B., Pottie, I., Walsh, R., and Zaworotko, M. 2003. "Coordination polymers from calixarene-like $[Cu_2(\text{dicarboxylate})_2]_4$ building blocks: Structural diversity via atropisomerism." *Crystal Growth & Design* 3(4), 513-519.

[21] Ueda, J., Kamigaito, M., and Sawamoto, M. 1998. "Calixarene-core multifunctional initiators for the ruthenium-mediated living radical polymerization of methacrylates." *Macromolecules.* 31(20), 6762-6768.

[22] Atwood, J. and Barbour, L. 2003. "Molecular graphics: From science to art." *Crystal Growth and Design* 3, 3-8.

[23] Avram, L. and Cohen, Y. 2004. "Self-recognition, structure, stability, and guest affinity of pyrogallol[4]arene and resorcin[4]arene capsules in solution." *J. Am. Chem. Soc.* 126(37), 11556-11563.

[24] Houmadi, S., Coquière, D., Legrand, L., Fauré, M., Goldmann, M., Reinaud, O., and Rémita, S. 2007. "Architecture-controlled 'smart' calix[6]arene self-assemblies in aqueous solution". *Langmuir* 23(9), 4849-4855.

[25] Notestein, J., Katz, A., and Iglesia, E. 2006. "Energetics of small molecule and water complexation in hydrophobic calixarene cavities." *Langmuir* 22(9), 4004-4014.

[26] Dalgarno, S., Power, N., Warren, J., and Atwood, J. 2008. "Rapid formation of metal-organic nano-capsules gives new insight into the self-assembly process ". *Chem. Commun.* 13, 1539-1541.

[27] Dalgarno, S., Claudio-Bosque, K., Warren, J., Glass, T., and Atwood, J. 2008. "Interpenetrated nano-capsule networks based on the alkali metal assisted assembly of p-carboxylatocalix[4]arene-o-methyl ether". *Chem. Commun.* 12, 1410-1412.

[28] Kulikov, O., Daschbach, M., Yamnitz, C., Rath, N., and Gokel, G. 2009. "Self-assembled, cogged hexameric nanotubes formed from pyrogallol[4]arenes with a unique branched side chain ". *Chem. Commun.* 48, 7497-7499.

[29] Ha, J., Solovyov, A., and Katz, A. 2009. "Synthesis and characterization of accessible metal surfaces in calixarene-bound gold nanoparticles". *Langmuir* 25(18), 10548-10553.

[30] Lynam, C., Jennings, K., Nolan, K., Kane, P., McKervey, A., and Diamond, D. 2002. "Tuning and enhancing enantioselective quenching of calixarene hosts by chiral guest amines." *Anal. Chem.* 74(1), 59-66.

[31] Buccella, D., Tanski, J., and Parkin, G. 2007. "Factors Influencing Coordination versus Oxidative Addition of C-H Bonds to Molybdenum and Tungsten: Structural and Spectroscopic Evidence That the Calixarene Framework Promotes C-H Bond Activation." *Organometallics.* 26(14), 3275-3278.

[32] Liu, L., Zakharov, L., Golen, J., Rheingold, A., and Hanna, T. 2008. "Synthesis and characterization of bismuth(III) and antimony(III) calixarene complexes." *Inorg. Chem* 47(23), 11143-11153.

[33] Grannas, M., Hoskins, B., and Robson, R. 1994. "Synthesis and x-ray crystal structures of a calixarene-related, tetraamino, tetraphenolic, polynucleating macrocyclic ligand and its $ZnII_4$ and $CoIII_3$ derivatives." *Inorg. Chem.* 33(6), 1071-1079.

[34] Zorzi, R. D., Guidolin, N., Randaccio, L., Purrello, R., and Geremia, S. 2009. "Nanoporous crystals of calixarene/porphyrin supramolecular complex functionalized by diffusion and coordination of metal ions." *J. Am. Chem. Soc.* 131(7), 2487-2489.

[35] Scott, P., Dalgarno, J., Warren, J., Teat, S., and Atwood, J. 2009. "Enhanced control over metal composition in mixed Ga/Zn and Ga/Cu coordinated pyrogallol[4]arene nanocapsules ." *Chem. Commun.* 23, 3348-3350.

[36] Kotch, F., Sidorov, V., Lam, Y., Kayser, K., Li, H., Kaucher, M., and Davis, J. 2003. "Water-mediated association provides an ion pair receptor." *J. Am. Chem. Soc.* 125(49), 15140-15150.

[37] Blazejczyk, A., Szczupak, M., Wieczorek, W., Cmoch, P., Appetecchi, G., Scrosati, B., Kovarsky, R., Golodnitsky, D., and Peled, E. 2005. "Anion-binding calixarene receptors: Synthesis, microstructure, and effect on properties of polyether electrolytes." *Chem. Mater.* 17(6), 1535-1547.

[38] Israëli, Y. and Detellier, C. 1997. "Complexation of the sodium cation by a calix[4]arene tetraester in solution. formation of a 2:1 calixarene:sodium complex." *J. Phys. Chem. B* 101(10), 1897-1901.

[39] Jin, T. and Ichikawa, K. 1991. "Dissociation kinetics of calixarene ester-sodium(1+) complexes: effect of the sodium ion exchange reaction on sodium-23 longitudinal magnetization recovery curves and proton NMR spectra." *J. Phys. Chem.* 95(6), 2601-2606.

[40] Jin, P., Dalgarno, S., Barnes, C., Teat, S., and Atwood, J. 2008. "Ion transport to the interior of metal-organic pyrogallol[4]arene nanocapsules." *J. Am. Chem. Soc.* 130(51), 17262-17263.

[41] Sarri, P., Venturi, F., Cuda, F., and Roelens, S. 2004. "Binding of acetylcholine and tetramethylammonium to flexible cyclophane receptors: Improving on binding ability by optimizing host's geometry." *J. Org. Chem.* 69(11), 3654-3661.

[42] Bassil, D., Dalgarno, S., Cave, G., Atwood, J., and Tucker, S. 2007. "Spectroscopic investigations of adma encapsulated in pyrogallol[4]arene nanocapsules." *J. Phys. Chem. B* 111(30), 9088-9092.

[43] Dalgarno, S., Szabo, T., Siavosh-Haghighi, A., Deakyne, C., Adams, J., and Atwood, J. 2009. "Exploring the limits of encapsulation within hexameric pyrogallol[4]arene nano-capsules ." *Chem. Commun.* 11, 1339-1341.

[44] Witte, T., Decker, B., Mattay, J., and Huber, C. 2004. "Formation of branched calixarene aggregates a time-resolved static light scattering study." *J. Am. Chem. Soc.* 126(30), 9276-9282.

[45] Cave, G., Dalgarno, S., Antesberger, J., Ferrarelli, M., McKinlay, R., and Atwood, J. enero 2008. "Investigations into chain length control over solid-state pyrogallol[4]arene nanocapsule packing ." *Supramolecular Chemistry.* 20(1,2), 157-159.

[46] Lonetti, B., Nostro, P. L., Ninham, B., and Baglioni, P. 2005. "Anion effects on calixarene monolayers: A Hofmeister series study." *Langmuir.* 21(6), 2242-2249.

[47] Dalgarno, S., Power, N., Antesberger, J., McKinlay, R., and Atwood, J. 2006. "Synthesis and structural characterisation of lower rim halogenated pyrogallol[4]arenes: bi-layers and hexameric nano-capsules ." *Chem. Commun.* 36, 3803-3805.

[48] Zambrano, C., Kass, J., Dueno, E., Ke, Y., and H. 2006. "Crystal structure of 2,8,14,20-tetranaphthylpyrogallol[4]arene." *Journal of Chemical Crystallography.* 36(1), 67-70.

[49] Dueno, E., Ray, T., Salvatore, R., Zambrano, C., Zeller, M., and Hunter, A. 2007. "2,8,14,20-tetrakis(4-hydroxyphenyl)pyrogallol[4]arene dimethylformamide hexasolvate." *Acta Cryst.* E63, O3533-O3534.

[50] Kass, J., Zambrano, C., Zeller, M., Hunter, A., and Dueno, E. 2006. "2,8,14,20-tetraphenylpyrogallol[4]arene dimethylformamide octasolvate." *Acta Cryst.* E62, O3179-O3180.

[51] Dueno, E., Hunter, A., Zeller, M., Ray, T., Salvatore, R., and Zambrano, C. 2008. "Crystal structure of 2, 8, 14, 20-tert -butylpyrogallol[4]arene." *Journal of Chemical Crystallography.* 38(3), 181-187.

[52] Sheldrick 2003. "G. M. sadabs in saint-plus (version 6.45)." Bruker Axs Inc., Madison, Wisconsin, USA. 2003.

[53] Sheldrick 2000. "G. M. shelxtl (version 6.14) program for crystal structure refinement", Bruker Axs Inc., Madison, Wisconsin, USA. 2003.

[54] 2000. "Cache for windows (version 5.0)." Fujitsu America, Inc.

[55] Stewart, J. 1990. "MOPAC: A general molecular orbital package." *Quant. Chem. Prog. Exch.* 10, 86-98 .

[56] Alemán, C., Luque, F., and Orozco, M. 1993. "Suitability of the PM3-derived molecular electrostatic potentials." *J. Comp. Chem.* 14, 799-808.

[57] Stewart, J. 2004. "Optimization of parameters for semiempirical methods IV: Extension of MNDO, AM1, and PM3 to more main group elements." *J. Mol. Model.* 155-164.

[58] Orozco, M., Bachs, M., and Luque, F. 1995. "Development of optimized MST/SCRF methods for semiempirical calculations. The MNDO and PM3 Hamiltonians." *J. Comp. Chem.* 16, 563-585.

[59] Rzepa, H. S., Yi, M. Y., Karelson, M. M., and Zerner, M. C. 1991. "Geometry optimization at the semiempirical self-consistent-reaction-field level using the AMPAC and MOPAC programs.." *J. Chem. Soc.* 5, 635-637.

[60] L.Farrugia 1997. "ORTEP-3 for windows cryst."

[61] Weisstein, E. "Pyramidal Frustum." From mathworld-a wolfram web resource. http://mathworld.wolfram.com/pyramidalfrustum.html.

[62] Cave, G. and Ferrarelli, M. 2005. “Nano-dimensions for the pyrogallol[4]arene cavity.” *Chem. Commun.* 22, 2787-2789.

[63] Maerz, A., Haunani, T., Power, N., Deakyne, C., and Atwood, J. 2010. “Dimeric nanocapsule induces conformational change.” *Chem. Commun.* 46, 1235-1237.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
ARTÍCULO/ARTICLE SECCIÓN/SECTION A

Generación de matrices para evaluar el desempeño de estrategias de búsqueda de testores típicos

Eduardo Alba[1*], **Roberto Santana**[2]

[1]*Colegio de Ciencias e Ingeniería - El Politécnico, Universidad San Francisco de Quito*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
[2]*Universidad Politécnica de Madrid*
Ramiro de Maeztu 7, 28040, Madrid, España
[*]*Autor principal/Corresponding author, e-mail: ealba@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: A. Hidrobo, Dr.
Recibido/Received: 05/24/2010. Aceptado/Accepted: 05/28/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 06/10/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

Testors, and particularly typical testors, have been used in feature selection and supervised classification problems. Deterministic algorithms have usually been used to find typical testors. Recently, a new approach based on evolutionary algorithms has been developed. A common problem to test the behavior of both approaches is the necessity of knowing, in advance, the number of typical testors of a given basic matrix. For an arbitrary matrix, this number can not be known unless all typical testors have been found. Therefore, this paper introduces, for the first time, a strategy to generate basic matrices for which the number of typical testors is known without to find them. This method is illustrated with some examples.

Keywords. Testor theory, algorithm for finding typical testors, fisure selection.

Resumen

Los testores, y en particular los testores típicos, han sido utilizados en problemas de selección de variable y problemas de clasificación supervisada. Comunmente se ha usado algoritmos determinísticos para hallar testores típicos. A principios de esta decada comenzó a desarrollarse un nuevo enfoque basado en algoritmos evolutivos. Un problema común para probar el comportamiento de ambos métodos es la necesidad de conocer a priori el número de testores típicos de una matriz dada. Para una matriz arbitraria, no se puede saber este número a menos de que se hayan encontrado todos los testores típicos. Por lo tanto, este trabajo introduce, por primera vez, una estrategia para generar matrices básicas para las cuales el número de testores típicos es conocido sin necesidad de aplicar un algoritmo para encontrarlos. Este método se ilustra con algunos ejemplos.

Palabras Clave. Teoría de testores, algoritmos para el cálculo de testores típicos, selección de variables.

Introducción

El concepto de testor típico juega un rol muy importante en la solución de problemas de reconocimiento supervisado de patrones, cuando se usa el enfoque lógico combinatorio [1, 2]. En una aproximación básica, un testor es una colección de características que discriminan las descripciones de objetos pertenecientes a diferentes clases, y es mínimo en el orden parcial determinado por la inclusión de conjuntos. A través de las etapas de la solución de un problema de reconocimiento de patrones, los testores típicos pueden ser aplicados para satisfacer diferentes objetivos. Por ejemplo, en problemas de selección de variables [3, 4, 5] y/o para determinar los conjuntos de apoyo en los algoritmos de precedencia parcial [2]. La teoría de testores también ha sido aplicada en la minería de textos [6, 7, 8, 9].

En el enfoque lógico combinatorio, la información de un problema de reconocimiento supervisado de patrones puede ser reducida a una matriz [2]. Los testores típicos se buscan entre todos los posibles subconjuntos de columnas (características) de esta matriz. El cómputo del conjunto de todos los testores típicos pertenece a la clase de problemas NP. Cuando la dimensión de la matriz es pequeña, se han estado usando algoritmos determinísticos (DA) [3, 10, 11]. A principios de esta década comenzaron a desarrollarse algoritmos evolutivos

ISSN 1390-5384

para tratar matrices de dimensiones mayores [12, 13].

De manera similar a otros problemas NP (TSP, clique máximo, etc.) [14] es necesario tener un conjunto de instancias para probar el desempeño de los diferentes algoritmos propuestos para calcular los testores típicos. Por otro lado, teniendo estas matrices el problema de los testores típicos se convierte en un problema útil para evaluar los algoritmos estocásticos de optimización.

A pesar de esto, los autores no encontraron ningún reporte previo sobre la construcción de matrices de prueba para asesorar el desempeño de las estrategias de búsqueda de testores típicos Para el problema de los testores típicos las matrices de prueba deben ser matrices cuyo conjunto de testores típicos puede ser determinado a priori. Además, deben garantizar poder probar los aspectos que influencian el desempeño de los algoritmos tales como la dimensión de las matrices, longitud de los testores típicos, cantidad de testores típicos, etc. Este artículo está organizado de la siguiente manera: primero, introducimos formalmente el concepto de testor típico para matrices booleanas. Luego, elaboramos resultados teóricos que sirven de soporte para una herramienta útil en la construcción de matrices de prueba. Finalmente, demostramos la aplicación de esta herramienta generando algunas clases de matrices de prueba.

Metodología

Los conceptos de Testor y Testor Típico.

Sea U una colección de objetos, estos objetos se describen mediante un conjunto de n características y están agrupados en l clases. Comparando característica a característica de cada par de objetos perteneciente a diferentes clases, podemos obtener una matriz $M = [m_{ij}]_{l\times n}$ donde $m_{ij} \in \{0, 1\}$ y l es el número de pares. $m_{ij} = 1\,(0)$ significa que los objetos del par denotado por i son similares (diferentes) en la característica j. Sea $I = \{i_1, \ldots, i_j\}$ el conjunto de las filas de M y $J = \{j_1, \ldots, j_n\}$ el conjunto de etiquetas de sus columnas (características). Sea $T \subseteq J$, $M_{/T}$ es la matriz obtenida de M al eliminar todas las columnas que no pertenecen al conjunto T.

Definición 1.- Un conjunto $T = \{j_{k_1}, \ldots, j_{k_l}\} \subseteq J$ es un testor de M si no existe ninguna fila de ceros en $M_{/T}$.

Definición 2.- La característica $j_{k_r} \in T$ es típica con respecto a T y M si $\exists q$, $q \in \{1, \ldots, l\}$ tal que $a_{i_q j_{k_r}} = 1$ y para $s > 1$ $a_{i_q j_{k_p}} = 0, \forall p$, $p \in \{1, \ldots, s\}$ $p \neq r$.

Definición 3.- Un conjunto T tiene la propiedad de tipicidad con respecto a una matriz M si todas las características en T son típicas con respecto a T y M.

Proposición 1.- Un conjunto $T = \{j_{k_1}, \ldots, j_{k_l}\} \subseteq J$ tiene la propiedad de tipicidad con respecto a la matriz M si y sólo si se puede obtener una matriz identidad en $M_{/T}$, eliminando e intercambiando algunas filas.

Definición 4.- Un conjunto $T = \{j_{k_1}, \ldots, j_{k_s}\} \subseteq J$ se denomina testor típico de M si es un testor y tiene la propiedad de tipicidad con respecto a M.

Sean a y b dos filas de M.

Definición 5.- Decimos que a es menor que b $(a < b)$ si $\forall i\, a_i \leq b_i$ y $\exists j$ tal que $a_j \neq b_j$.

Definición 6.- a es una fila básica de M si no existe otra fila menor que a en M.

Definición 7.- La matriz básica de M es la matriz M' que sólo contiene todas las filas básicas de M.

La siguiente proposición es una caracterización de la matriz básica.

Proposición 2.- M' es una matriz básica si y sólo si para dos filas a y b cualesquiera, $a,\ b \in M'$ existen dos columnas i y j tales que $a_i = b_j = 1$ y $a_j = b_i = 0$.

Dada una matriz A, denotamos como $\Psi^*(A)$ al conjunto de todos los testores típicos de A.

Proposición 3.- $\Psi^*(M) = \Psi^*(M')$.

De acuerdo con la proposición 3, para obtener el conjunto $\Psi^*(M)$ es conveniente encontrar la matriz M' y luego luego calcular el conjunto $\Psi^*(M')$. Teniendo en cuenta que M' tiene menor o igual número de filas que M, la eficiencia de los algoritmos debe ser mayor para M' que para M. De hecho, todas las matrices de prueba generadas en este ensayo son básicas.

Operadores de matrices y sus propiedades.

Definimos el operador *fusión simple*, denotado por φ:

$$\varphi:\ \Re^{p\times q} \times \Re^{p\times q'} \Rightarrow \Re^{p\times(q+q')},\ q > 0,\ p > 0.$$

Dadas dos matrices $A \in \Re^{p\times q}$ y $B \in \Re^{p\times q'}$:

$$\varphi\,(A, B) = [A\,B]$$

esto es, la matriz $C = \varphi\,(A, B)$ es la matriz formada por dos bloques: A y B.

Ejemplo 1:

Sean

$$A = \begin{bmatrix} 1 & 3 \\ 0 & 8 \\ 1 & 0 \end{bmatrix} \text{ y } B = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 5 & 1 \\ 1 & 6 & 1 \end{bmatrix},$$

$$C = \varphi\,(A, B)\,,$$

entonces:

$$C = \begin{bmatrix} 1 & 3 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 8 & 0 & 5 & 1 \\ 1 & 0 & 1 & 6 & 1 \end{bmatrix}$$

Propiedades del operador φ:

1. $\varphi(\varphi(A,B),C) = \varphi(A,\varphi(B,C)) = \varphi(A,B,C)$.

2. Sean A, B matrices booleanas. Si A o B son matrices básicas entonces $\varphi(A,B)$ es una matriz básica.

La primera propiedad es trivial dadas las características del operador fusión simple. La segunda propiedad puede ser demostrada con la proposición 2.

Ahora definimos el operador *fusión combinatoria*, denotada por θ:

$$\theta : \Re^{p\times q} \times \Re^{p'\times q'} \Rightarrow \Re^{pp'\times(q+q')}$$

Dadas dos matrices $A = [a_{ij}]_{p\times q}$ y $B = [b_{ij}]_{p'\times q'}$. La operación θ se define como

$$\theta(A,B) = \begin{bmatrix} A(1,:) & B(1,:) \\ \cdots & \cdots \\ A(1,:) & B(p',:) \\ \cdots & \cdots \\ A(p,:) & B(1,:) \\ \cdots & \cdots \\ A(p,:) & B(p',:) \end{bmatrix}$$

Ejemplo 2:

Sean

$$A = \begin{bmatrix} 1 & 5 \\ 0 & 9 \\ 7 & 8 \end{bmatrix} \text{ y } B = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 3 \\ 2 & 3 & 6 \end{bmatrix},$$

$$C = \theta(A,B),$$

entonces

$$C = \begin{bmatrix} 1 & 5 & 1 & 0 & 3 \\ 1 & 5 & 2 & 3 & 6 \\ 0 & 9 & 1 & 0 & 3 \\ 0 & 9 & 2 & 3 & 6 \\ 7 & 8 & 1 & 0 & 3 \\ 7 & 8 & 2 & 3 & 6 \end{bmatrix}$$

Propiedades del operador θ:

1. $\theta(\theta(A,B),C) = \theta(A,\theta(B,C)) = \theta(A,B,C)$.

2. Sean A y B matrices booleanas. Si A y B son matrices básicas, entonces $\theta(A,B)$ es una matriz básica.

Nótese que para esta operación ambas matrices deben ser básicas.

Sea I_n la matriz identidad $n \times n$.

Propiedades de I_n:

1. I_n es una matriz básica.

2. El número de testores típicos de I_n es igual a 1, es decir que $|\Psi^*(I_n)| = 1$.

3. $\Psi^*(I_n) = \{J_{I_n}\}$ donde J_{I_n} es el conjunto de todas las etiquetas de columnas de I_n.

Una vez definidos estos operadores vamos a presentar los resultados principales de este artículo. Estos resultados constituyen el marco teórico que usamos para desarrollar las estrategias para construir las matrices de prueba.

Resultados y Discusión

Resultados teóricos en la determinación de Ψ^*

Sea Q la fusión simple de N ($N > 1$) matrices $B \in \Re.^{p\times q}$, es decir, $Q = \varphi\left(\underbrace{B \ldots B}_{N}\right)$. Sea $\Psi^*(B) = \{T_1, \ldots, T_\nu\}$.

Teorema 1.- $|\Psi^*(Q)| = N^{|T_1|} + \ldots + N^{|T_\nu|}$

Demostración:

Sea $J_B = \{j_1, \ldots, j_q\}$ el conjunto de todas las columnas de B, entonces:

$$\begin{aligned} J_Q &= \{j_1, \ldots, j_q, j_{q+1}, \ldots, j_{2q}, \\ &\quad \ldots, j_{(N-1)q+1}, j_{(N-1)q+2}, \ldots, j_{Nq}\} \end{aligned}$$

El conjunto J_Q se puede particionar en q clases

$$\begin{aligned} J_Q^1 &= \left\{j_1, j_{q+1}, \ldots, j_{(N-1)q+1}\right\}, \\ J_Q^2 &= \left\{j_2, j_{q+2}, \ldots, j_{(N-1)q+2}\right\}, \ldots, \\ J_Q^q &= \{j_q, j_{2q} \ldots, j_{Nq}\}. \end{aligned}$$

Todas las columnas en la misma clase J_Q^k son idénticas y $\left|J_Q^k\right| = N, \forall k \in \{1, \ldots, q\}$. Por otro lado, considerando la manera en que se construyó Q se tiene $\Psi^*(B) \subset \Psi^*(Q)$. Ahora generamos el conjunto $G(\Psi^*(B))$. $G(\Psi^*(B))$ contiene $\Psi^*(B)$ y cualquier conjunto de etiquetas T' obtenida de la sustitución de una columna de cualquier T_i, $i = 1, \ldots, \nu$ por cualquier columna en su misma clase. Teniendo en cuenta la definición de testor típico, T' es un testor típico de Q, por lo tanto $G(\Psi^*(B)) \subseteq \Psi^*(Q)$. Hay N candidatos para seleccionar cada una de las $|T_i|$ columnas de T_i,entonces $|G(\Psi^*(B))| = N^{|T_1|} + \ldots + N^{|T_\nu|}$.

Ahora pasamos a demostrar que $\Psi^*(Q) \subseteq G(\Psi^*(B))$. Supongamos que existe un conjunto T' tal que $T' \in$

$\Psi^*(Q)$ y $T' \notin G(\Psi^*(B))$. El conjunto T' no puede contener dos columnas de la misma clase puesto que la propiedad de tipicidad de T' no sería satisfecha. Entonces todas las columnas de T' son de distintas clases. Para cada columna de T' consideremos el miembro de su clase que pertenece a B. Llamamos T'_B a este conjunto. Si T'_B es un testor típico de B, entonces $T' \in G(\Psi^*(B))$ lo que contradice nuestra suposición. Por otro lado, si T'_B no es un testor típico de B entonces T'_B no es un testor típico de Q. Teniendo en cuenta que $Q_{/T'} = Q_{/T'_B}$, T' no es un testor típico de Q por definición, lo cual también contradice nuestra suposición. Entonces $\Psi^*(Q) \subseteq G(\Psi^*(B))$. Por lo tanto $\Psi^*(Q) = G(\Psi^*(B))$ y $|\Psi^*(Q)| = |G(\Psi^*(B))| = N^{|T_1|} + \ldots + N^{|T_\nu|}$. Fin de la demostración.

Ejemplo 3:

Sean

$$B = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \text{ y}$$

$$\begin{aligned} Q &= \varphi(B,B,B) \\ &= \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}. \end{aligned}$$

Entonces

$$\Psi^*(Q) = 27.$$

Sean $A_1, \ldots, A_m$ m matrices tales que $A_i = I_{n_i} \forall i \in \{1, \ldots, m\}$. Sean $J_{A_1}, \ldots, J_{A_m}$ el conjunto de todas las columnas de estas matrices y $\left\{J_{A_i} \cap J_{A_j}\right\} = \emptyset$ $\forall i, j \in \{1, \ldots, m\}, i \neq j$.

Sea A la matriz obtenida al aplicar el operador fusión combinatoria a las matrices A_i, es decir:

$$A = \theta(A_1, \ldots, A_m).$$

Teorema 2.- $\Psi^*(A) = \{\Psi^*(A_1), \ldots, \Psi^*(A_m)\} = \{J_{A_1}, \ldots, J_{A_m}\}$

Demostración:

Dada la forma en que se construyó la matriz A, esta matriz se puede separar en m submatrices: La submatriz A_1^+ que contiene las primeras n_1 columnas de A, la matriz A_2^+ que contiene las siguientes n_2 columnas de A y así hasta la submatriz A_m^+ que contiene las últimas n_m columnas de A. Se puede ver que A_i^+ solo incluye filas de A_i $\forall i \in \{1, \ldots, m\}$.

Sea $J_A, J_{A_1^+}, \ldots, J_{A_m^+}$ el conjunto de columnas y I_A, $I_{A_1^+}, \ldots, I_{A_m^+}$ el conjunto de filas de las matrices A, $A_1^+, \ldots, A_m^+$ respectivamente. Ahora demostremos que:

1) $J_A, J_{A_1^+}, \ldots, J_{A_m^+} \in \Psi^*(A)$

2) $\Psi^*(A) \setminus \left\{J_A, J_{A_1^+}, \ldots, J_{A_m^+}\right\} = \emptyset$.

Teniendo en cuenta que $\forall i$, $i = 1, \ldots, m$, $I_{A_i^+} = I_{A_i}$; la submatriz de A determinada por las columnas de $J_{A_i^+}$ no contiene filas de ceros y cada etiqueta de columna de $J_{A_i^+}$ cumple con la propiedad de tipicidad, entonces $J_{A_i^+} \in \Psi^*(A)$. La condición 1) está demostrada, pasamos a demostrar la condición 2).

Supóngase que existe un conjunto $T \in \Psi^*(A)$ y $T \neq J_{A_i^+}, i = \{1, \ldots, m\}$. Considerando las propiedades de los testores típicos; $\forall i$, $J_{A_i^+} \subsetneq T$, por lo tanto $\forall i \; \exists j_i \in A_i^+$ tal que $j_i \notin T$. Tomamos la fila s_m donde $s_m = (s_{m-1} - 1)n_m + j_m$ y $s_1 = j_1$. Teniendo en cuenta las características del operador fusión combinatoria, la fila s_m de A tiene un 1 en cada columna j_i y ceros en el resto de columnas, incluídas las columnas de T. Esto significa que existe una fila de ceros en $A_{/T}$, por lo que T no es un testor. La suposición de que existe $T \in \Psi^*(A)$ es falsa. Fin de la demostración.

Ejemplo 4:

$$\begin{aligned} A_1 &= \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}, \\ \Psi^*(A_1) &= \{x_1, x_2\}, \\ A_2 &= \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \\ \Psi^*(A_2) &= \{x_3, x_4, x_5\} \end{aligned}$$

Sea $A = \theta(A_1, A_2) = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$,

$\Psi^*(A) = \{\{x_1, x_2\}, \{x_3, x_4, x_5\}\}$.

Corolario 1.- $|\Psi^*(A)| = m$.

Corolario 2.- $\left|\Psi^*\left(\varphi\left(\underbrace{A \ldots A}_{N}\right)\right)\right| = N^{n_1} + \ldots + N^{n_m}$.

Hemos terminado la presentación de un conjunto de resultados teóricos que son simples en su formulación. Aún así, constituyen una herramienta flexible y poderosa para la construcción de matrices de prueba.

Ejemplos de generación de matrices de prueba. En esta sección se presentan algunas recetas para usar los resultados previos en la evaluación de los algoritmos de búsqueda de testores típicos. Cada receta muestra cómo evaluar una característica específica de las matrices que puede influenciar en el desempeño de los algoritmos.

Estas matrices tienen pocos testores típicos que pueden ser determinados fácilmente.

Matrices con la misma dimensión y diferente número de testores típicos.

Supóngase que es necesario estudiar el desempeño de los algoritmos cuando el número de testores típicos aumenta. Para analizar la situación, se generan dos matrices de la misma dimensión con una diferencia grande en el número total de testores típicos de cada una. Las matrices Q_1 y Q_2 se generan cumpliendo las siguientes condiciones:

1.- $\dim(Q_1) = \dim(Q_2)$.

2.- $|\Psi^*(Q_1)| \neq |\Psi^*(Q_2)|$

Dadas estas dos condiciones, proponemos un procedimiento para crear estas matrices Q_1 y Q_2. Empezando por dos matrices simples B_1 y B_2 con la misma dimensión y distinto número de testores típicos, aplicamos el operador φ a cada matriz N veces, obteniendo Q_1 y Q_2.

Ilustramos con el siguiente ejemplo:

B_1 se toma como I_4 y $B_2 = \theta(I_2, I_2)$, entonces:

$$Q_1 = \varphi\left(\underbrace{B_1 \ldots B_1}_{N}\right) \text{ y } Q_2 = \varphi\left(\underbrace{B_2 \ldots B_2}_{N}\right).$$

Nótese que:

$\dim(Q_1) = \dim Q_2 = 4 \times 4N$

$\Psi^*(Q_1) = N^4$ y $\Psi^*(Q_2) = 2N^2$

Matrices con diferente dimensión y mismo número de testores típicos.

En este caso el objetivo es estudiar el desempeño de los algoritmos cuando el número de testores típicos a encontrar es el mismo, pero las matrices tienen diferente dimensión.

Dos matrices Q_1 y Q_2 se generan cumpliendo las siguientes condiciones:

1.- $\dim(Q_1) \neq \dim(Q_2)$.

2.- $|\Psi^*(Q_1)| = |\Psi^*(Q_2)|$

De manera similar al ejemplo anterior, el procedimiento empieza con dos matrices simples: las matrices identidad I_{n_1} e I_{n_2}. El operador φ se aplica a ambas matrices N_1 y N_2 veces respectivamente, obteniendo Q_1 y Q_2.

Para satisfacer ambas condiciones es necesario que $n_1 \neq n_2$ y $N_1^{n_1} = N_2^{n_2}$ (Corolario 2).

Por ejemplo, podemos escoger los siguientes parámetros: $n_1 = 2$, $N_1 = 9$, $n_2 = 4$, $N_2 = 3$.

Matrices con dimensión alta y pocos testores típicos.

Estas matrices son importantes para estudiar la sensibilidad de los algoritmos en problemas con pocas soluciones (testores típicos) y un espacio de búsqueda de dimensión alta. Pueden ser formadas aplicando el operador fusión combinatoria a un conjunto de matrices identidad de dimensión relativamente alta: sea $Q = \theta(I_{n_1}, \ldots, I_{n_2})$, entoces $\dim(Q) = (n_1 \ldots n_m) \times (n_1 \ldots n_m)$ y $|\Psi^*(Q)| = m$.

Conclusiones

En este trabajo se ha desarrollado un método general para crear matrices de prueba para evaluar el desempeño de estrategias de búsqueda de testores típicos. El método propuesto está basado en resultados teóricos que son simples en su formulación. A pesar de esto, estos resultados son una base sólida para obtener diferentes instancias que nos permiten probar varios casos del problema de búsqueda de testores típicos.

Hemos presentado algunos ejemplos que ilustran cómo generar la instancia necesaria para probar la influencia de una característica particular en el algoritmo de búsqueda de testores típicos.

Teniendo en cuenta que hemos introducido una herramienta general y flexible para la construcción de matrices de prueba, esperamos que este trabajo permita convertir al problema del testor típico en un punto de referencia para la evaluación de algoritmos de optimización estocásticos.

Referencias

[1] A. N. Dmitriev, Y. I. Zhuravlev and F. Krendeleiev 1966. "On the mathematical principles of patterns and phenomena classification." *Diskretnyi Analiz.* 7, 3-15.

[2] J. Ruiz, M. Lazo, E. Alba. 2001. "An overview of the concept of testor." *Pattern Recognition*. 34, 13-21.

[3] M. Lazo, J. Ruiz. 1995. "Determining the feature relevance for non classically described objects and a new algorithm to compute typical fuzzy testors." *Pattern Recognition Letters*. 16, 1259-1265.

[4] A. Carrasco, J. Martínez 2004. "Feature selection for natural disaster texts classification Using testors." Intelligent Data Engineering and Automated Learning. Springer- Verlag. 8, 424-429.

[5] R. Vázquez, S. Godoy. 2007. "Using testor theory to reduce the dimension of neural network models." *Special Issue in Neural Networks and Associative Memories*. 28, 93-103.

[6] J. Santos, A. Carrasco, J. Martínez. 2004. "Feature selection using typical testors applied to estimation of stellar parameters." *Computación y Sistemas*. 8, 015-023.

[7] A. Pons, R. Gil, R. Berlanga. 2007. "Using typical testors for feature selection in text categorization." Progress in Pattern Recognition, Image Analysis and Applications. 12th Iberoamericann Congress on Pattern Recognition. Springer Verlag.

[8] A. Pons, J. Ruiz, R. Berlanga. 2004. "A method for the automatic summarization of topic-based clusters of documents." 8th Iberoamerican Congress on Pattern Recognition. Springer Verlag. 596-603.

[9] F. Li, Q. Zhu, X. Lin. 2009. “Topic discovery in research literature based on non-negative matrix factorization and testor theory.” Asia-Pacific Conference on Information Processing. 2, 266–269.

[10] Sánchez, G. 1997. “Efficient algorithms to calculate typical testors from a basic matrix.” Design and program. Master thesis. BUAP, México.

[11] L. Morales, G. Sánchez. 2007. “FS-EX plus: A new algorithm for the calculation of typical FS-testor set.” Progress in Pattern Recognition, Image Analysis and Applications. 12th Iberoamericann Congress on Pattern Recognition. Springer Verlag.

[12] G. Sánchez, M. Lazo, O. Fuentes. 1999. “Genetic algorithm to calculate minimal typical testors.” Proceedings of the IV Iberoamerican Symposium on Pattern Recognition. 207-214.

[13] E Alba, R. Santana, A. Ochoa, M. Lazo. 2000. “Finding typical testors by using an evolutionary strategy.” Proceedings of the V Ibero American Symposium on Pattern Recognition. 267-278.

[14] M. Garey, D. Johnson. 1979. “Computers and intractability: A guide to the theory of NP-completeness” W. H. Freeman and Company. New York, NY.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
REVISIÓN/REVIEW SECCIÓN/SECTION A

Agujeros de gusano: solución exponencial

Carlos A.Marín[1*]

[1]*Colegio de Ciencias e Ingeniería - El Politécnico, Universidad San Francisco de Quito.*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
[*]*Autor principal/Corresponding author, e-mail: cmarin@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: C. Montúfar, Ph.D.
Recibido/Received: 01/09/2010. Aceptado/Accepted: 04/15/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 06/10/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

The fundamental properties of the Morris-Thorne wormholes are reviewed, together with the energy conditions (NEC, WEC, SEC, DEC) for the same. A new exponential solution for the equations derived by Morris and Thorne is introduced and, finally, we have calculated the total time to traverse a wormhole with exponential shape function.

Keywords. Wormhole, general relativity, hyperspace, Einstein.

Resumen

Se revisan las propiedades fundamentales de los agujeros de gusano del tipo Morris-Thorne, así como las condiciones de energía (NEC, WEC, SEC, DEC) para dichos agujeros. Se introduce una nueva solución de carácter exponencial para las ecuaciones derivadas por Morris y Thorne para los mencionados agujeros y, finalmente, se procede a calcular el tiempo que se demoraría un viajero en atravesar un agujero de gusano con función de forma exponencial.

Palabras Clave. Agujeros de gusano, relatividad general, hiperespacio, Einstein.

Introducción

Un agujero de gusano (wormhole) es un túnel en el hiperespacio que conecta dos puntos en el universo [1, 2] (el hiperespacio es un espacio plano hipotético con más de tres dimensiones espaciales, en el que está contenido el espacio curvo de nuestro universo). El wormhole tiene dos entradas llamadas "bocas". Las bocas están conectadas por un túnel a través del hiperespacio que puede ser muy corto (digamos unos pocos kilómetros de largo). Las bocas de un agujero de gusano se parecen al horizonte de sucesos de un agujero negro de Schwarzschild [2, 3, 4, 5, 6], con una diferencia importante: el horizonte de sucesos de un agujero negro es, si despreciamos los efectos cuánticos, una superficie de una sola vía; cualquier cosa puede entrar en el agujero, sin embargo nada puede escapar. Por el contrario, las bocas de un wormhole son superficies que pueden ser cruzadas en ambas direcciones, hacia adentro del agujero de gusano y de regreso hacia el “universo externo” (nuestro universo).

Los wormholes fueron descubiertos matemáticamente como una solución a las ecuaciones de campo de Einstein en 1935, en un artículo de Albert Einstein y Nathan Rosen publicado en la revista Physical Review, en el que trataban de hallar una conexión (un puente) entre los agujeros negros y los agujeros blancos [7]. John Archibald Wheeler junto con su equipo de investigación los estudiaron profundamente en los años 50 y desde 1985 son el objeto de estudio de numerosos científicos alrededor del mundo, tales como Kip S. Thorne, Mike Morris, Don Page y otros.

Supongamos que queremos viajar desde la Tierra hasta algún lugar muy cercano a la estrella Betelgeuse ubicada a 424 años luz de nosotros [8]. Si el viaje se lo realiza a través del “universo externo” (a través de nuestro universo), tomaría 424 años viajando a la velocidad de la luz o a una velocidad próxima a la misma. Sin embargo, el viaje sería muy corto si se lo realizara a través de un túnel en el hiperespacio conectando la Tierra con Betelgeuse (es decir un wormhole). Si nosotros entráramos a través de la boca del wormhole cercana a la Tierra, nos encontraríamos con un túnel. Viajando tan sólo unos pocos kilómetros a lo largo de éste, alcanzaríamos la otra boca y emergeríamos cerca de Betelgeuse como se ilustra en la figura que sigue a continuación. En este

ISSN 1390-5384

diagrama, el espacio de nuestro universo es representado en dos dimensiones y las bocas del wormhole son círculos. Sin embargo, en nuestro universo tridimensional las bocas tendrían en realidad forma esférica.

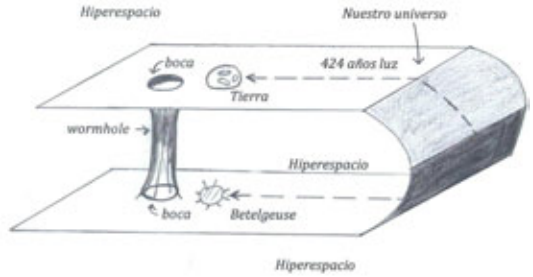


Figura 1: Hiperespacio.

De acuerdo con las ecuaciones de campo de Einstein, el tiempo de vida de un wormhole es en promedio muy pequeño, por lo que nada en absoluto (persona, radiaciones, señal de cualquier clase) puede viajar a través del túnel del agujero de gusano. La única manera de mantener abierto el agujero por un tiempo mucho mayor es mediante la presencia de algún tipo de material "exótico", a lo largo del wormhole, que empuje sus paredes gravitacionalmente, manteniéndolas separadas. Al material se le denomina "exótico", porque como Kip Thorne demostrara en 1985, debe tener una densidad de energía promedio negativa, con respecto a un haz de luz viajando a través del agujero de gusano. El material "exótico" repele gravitacionalmente los rayos de luz por lo que los haces luminosos se desenfocan, como se ilustra en la figura a continuación.

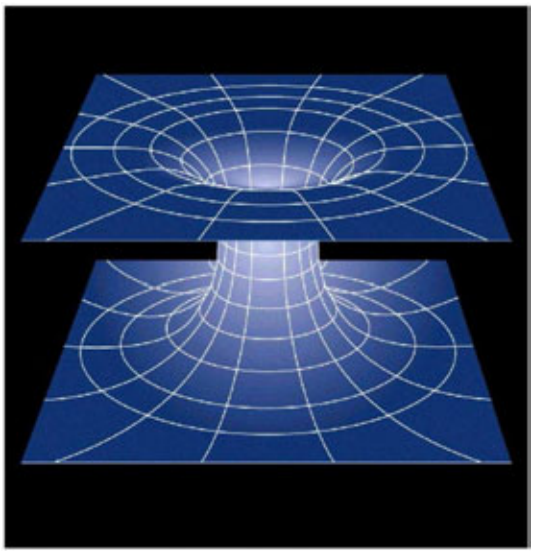


Figura 2: Wormhole.

El que la densidad de energía promedio sea negativa no implica que el material exótico tenga una energía negativa con respecto a un observador en reposo en el interior del agujero de gusano. El concepto de densidad de energía es relativo al sistema de referencia utilizado; en un sistema de referencia puede ser positiva, y en otro, puede ser negativa.

Nadie sabe exactamente de que puede estar hecho el material exótico. Robert Wald [1] ha probado que en un espacio-tiempo curvo, bajo una amplia variedad de circunstancias, la curvatura distorsiona las fluctuaciones del vacío de caracter gravitacional convirtiéndolas en exóticas debido a que su densidad de energía promedio se hace negativa. Dichas fluctuaciones del vacío son análogas a las fluctuaciones del vacío de naturaleza electromagnética. Son fluctuaciones aleatorias en la curvatura del espacio causadas porque regiones del espacio, están continuamente tomando energía de regiones adyacentes para luego devolverla. Bajo circunstancias ordinarias las fluctuaciones son tan pequeñas que ningún científico las ha podido detectar hasta ahora. Otra posibilidad es que el material exótico esté formado por energía oscura que como sabemos, tiene densidad de energía negativa y es el 74 % de la energía del universo.

En el presente artículo revisaremos las propiedades fundamentales de los agujeros de gusano del tipo Morris-Thorne (secciones 1 a 14) [9], analizaremos las condiciones de energía en dichos agujeros, presentaremos una nueva solución para las ecuaciones derivadas por Morris-Thorne para los mencionados agujeros y, finalmente, calcularemos el tiempo que se demoraría un viajero en atravesar un wormhole.

1 Propiedades fundamentales

Un agujero de gusano practicable (a través del cual se pueda viajar) debe satisfacer algunas propiedades básicas, las cuales están enumeradas en el artículo de Morris y Thorne [9] y que las reproducimos a continuación:

"1. La métrica debe tener simetría esférica y debe ser independiente del tiempo.

2.- Las soluciones deben satisfacer las ecuaciones de campo de Einstein.

3.- Para que la solución represente un agujero de gusano, debe tener una garganta (throat) conectando dos regiones asintóticamente planas del espacio-tiempo.

4.- El wormhole no puede tener un horizonte de sucesos, ya que este impediría el viaje en ambas direcciones a través del mismo.

5.- Las fuerzas de marea gravitacionales que experimenta el viajero deben ser tolerables.

6.- Un viajero debe ser capaz de atravesar el wormhole en un tiempo propio finito y razonablemente pequeño, no solamente medido por el, sino por cualquier otro observador dentro o fuera del agujero.

7.- La distribución de materia-energía y los campos que generan la curvatura del espacio-tiempo del agujero de gusano deben tener un tensor de energía-esfuerzo fisicamente razonable.

8.- La solución debería ser perturbativamente estable.

9.- Debería ser posible construir el wormhole, pero siempre que su construcción requiera mucha menos masa que la del universo y que ello requiera de un tiempo mucho menor que la edad del universo."

Morris y Thorne han denominado a las propiedades 1 al 4 "criterios básicos de un agujero de gusano", mientras que a los enunciados 5 al 9 los han denominado "criterios de uso del wormhole".

2 Métricas

En el artículo de Morris y Thorne se consideran dos métricas:

i)

$$(ds)^2 = e^{2\Phi}c^2(dt)^2 - f\,(r)\,(dr)^2 - r^2(d\Omega)^2 \qquad (1)$$

donde s representa el elemento de arco. r, θ y φ son las coordenadas esféricas de un punto y t es el tiempo coordenado medido por un observador remoto en reposo. $(d\Omega)^2 = (d\theta)^2 + \sin^2\theta(d\varphi)^2$
$f(r) = \left(1 - \frac{b(r)}{r}\right)^{-1}$. A $b(r)$ se le denomina función de forma del agujero de gusano, y determina la forma espacial del mismo. La función $\Phi = \Phi(r)$ se denomina función de corrimiento hacia el rojo.

ii)

$$(ds)^2 = c^2(dt)^2 - (dl)^2 - (l^2 + b_0^2)(d\Omega)^2 \qquad (2)$$

donde $-\infty < l < \infty$ es la distancia propia medida de dirección radial, b_0 es una constante y t es el tiempo coordenado.

Nosotros, fijaremos nuestra atención únicamente en la primera métrica y a continuación deduciremos las ecuaciones de campo correspondientes a la misma. En un próximo artículo se estudiará en detalle la métrica ii).

3 Símbolos de Christoffel y Tensor de Riemann-Christoffel

Para la métrica (1), el cuadrado del elemento de arco $(ds)^2$ se puede escribir:

$$(ds)^2 = g_{\mu\nu}dx^\mu dx^\nu \qquad (3)$$

donde $g_{\mu\nu} = \begin{bmatrix} e^{2\Phi} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -f(r) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -r^2 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -r^2\sin^2\theta \end{bmatrix}$

El tensor contravariante correspondiente es:

$$g^{\mu\nu} = \begin{bmatrix} e^{-2\Phi} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -(f(r))^{-1} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -r^{-2} & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -r^{-2}\sin^{-2}\theta \end{bmatrix}$$

Los símbolos de Christoffel de segunda especie son:

$$\Gamma^\mu_{\rho\sigma} = \frac{1}{2}g^{\mu\alpha}\left\{\frac{\partial g_{\rho\alpha}}{\partial x^\sigma} + \frac{\partial g_{\sigma\alpha}}{\partial x^\rho} - \frac{\partial g_{\rho\sigma}}{\partial x^\alpha}\right\} \qquad (4)$$

donde x^μ es el cuadrivector posición de la partícula. Las letras griegas como: μ, σ, ρ, etc. toman los valores 0, 1, 2 y 3. Hemos adoptado la convención de suma de Einstein en la que se suma sobre índices que se repiten dos veces.

En coordenadas esféricas $x^0 = ct$, $x^1 = r$, $x^2 = \theta$ y $x^3 = \varphi$.

Dichos símbolos se pueden calcular facilmente usando el teorema:

Si $g_{\mu\nu} \neq 0$ para $\mu \neq \nu$
a)$\Gamma^\rho_{\mu\nu} = 0\ \forall \mu \neq \nu \neq \rho$,
b)$\Gamma^\mu_{\mu\mu} = \frac{1}{2g_{\mu\mu}}\frac{\partial g_{\mu\mu}}{\partial x^\mu}$ para μ fijo,
c)$\Gamma^\mu_{\mu\nu} = \frac{1}{2g_{\mu\mu}}\frac{\partial g_{\mu\mu}}{\partial x^\nu}$ para $\mu \neq \nu$ fijos,
d)$\Gamma^\mu_{\nu\nu} = -\frac{1}{2g_{\mu\mu}}\frac{\partial g_{\nu\nu}}{\partial x^\mu}$ para $\mu \neq \nu$ fijos,

El resultado es que los únicos símbolos de Christoffel diferentes de cero son:

$$\Gamma^1_{11} = -\frac{[b(r) - rb'(r)]}{2r^2\left(1 - \frac{b(r)}{r}\right)} \qquad (5)$$

$$\Gamma^0_{10} = \Gamma^0_{01} = \Phi'(r) \qquad (6)$$

$$\Gamma^2_{12} = \Gamma^2_{21} = \frac{1}{r} \qquad (7)$$

$$\Gamma^3_{13} = \Gamma^3_{31} = \frac{1}{r} \qquad (8)$$

$$\Gamma^3_{23} = \Gamma^3_{32} = \cot\theta \qquad (9)$$

$$\Gamma^1_{00} = e^{2\Phi}\Phi'\left(1 - \frac{b(r)}{r}\right) \qquad (10)$$

$$\Gamma^1_{22} = -r + b(r) \qquad (11)$$

$$\Gamma^1_{33} = (-r + b(r))\sin^2\theta \qquad (12)$$

$$\Gamma^2_{33} = -\frac{\sin(2\theta)}{2} \qquad (13)$$

donde $b'(r) \equiv \frac{db}{dr}$ y $\Phi'(r) = \frac{d\Phi}{dr}$. El tensor de Riemann-Christoffel está dado por la expresión:

$$\begin{aligned} R^\mu_{\nu\rho\sigma} &= \frac{\partial}{\partial x^\rho}\left(\Gamma^\mu_{\nu\sigma}\right) - \frac{\partial}{\partial x^\sigma}\left(\Gamma^\mu_{\nu\rho}\right) \\ &+ \Gamma^\mu_{\alpha\rho}\Gamma^\alpha_{\nu\sigma} - \Gamma^\alpha_{\nu\rho}\Gamma^\mu_{\alpha\sigma} \end{aligned} \qquad (14)$$

Las 24 componentes de dicho tensor diferentes de cero son:

$$\begin{aligned} R^0_{101} &= -R^0_{110} = -\Phi''(r) - (\Phi'(r))^2 \\ &+ \frac{(rb'(r)-b)}{2r(r-b)}\Phi'(r) \end{aligned} \tag{15}$$

$$R^0_{202} = -R^0_{220} = \Phi'(r)(b-r) \tag{16}$$

$$R^0_{303} = -R^0_{330} = \Phi'(-r+b)\sin^2\theta \tag{17}$$

$$\begin{aligned} R^1_{010} &= -R^1_{001} = e^{2\Phi}[\Phi''\left(1-\frac{b}{r}\right) \\ &+ (\Phi')^2\left(1-\frac{b}{r}\right) \\ &+ \Phi'\left(\frac{b-rb'}{2r^2}\right)] \end{aligned} \tag{18}$$

$$R^1_{212} = -R^1_{221} = \frac{(rb'-b)}{2r} \tag{19}$$

$$R^2_{121} = -R^2_{112} = \frac{(rb'-b)}{2r^2(r-b)} \tag{20}$$

$$R^1_{313} = -R^1_{331} = \frac{(rb'-b)\sin^2\theta}{2r} \tag{21}$$

$$R^3_{131} = -R^3_{113} = \frac{(rb'-b)}{2r^2(r-b)} \tag{22}$$

$$R^2_{323} = -R^2_{332} = \frac{b}{r}\sin^2\theta \tag{23}$$

$$R^3_{232} = -R^3_{223} = \frac{b}{r} \tag{24}$$

$$R^2_{020} = -R^2_{002} = e^{2\Phi}\Phi'\frac{(r-b)}{r^2} \tag{25}$$

$$R^3_{030} = -R^3_{003} = e^{2\Phi}\Phi'\frac{(r-b)}{r^2} \tag{26}$$

Para el cálculo de las componentes nulas, hemos usado propiedades tales como:

$$R^\mu_{\nu\rho\rho} = 0 \text{ para } \rho \text{ fijo} \tag{27}$$

$$R^\mu_{\mu\rho\sigma} = 0 \text{ para } \mu \text{ fijo y } g_{\mu\nu} \text{ diagonal, etc} \tag{28}$$

4 Marco de referencia propio

Consideremos dos sistemas de referencia, al uno lo llamaremos sistema de refererencia no primado y al otro sistema primado. Sea $\{\vec{e}_\alpha\}$ con $\alpha = 0, 1, 2$ y 3 la base de vectores asociada al sistema de referencia no primado, y $\{\vec{e}_\alpha{}'\}$ la base de vectores asociada al sistema primado ($\vec{e}_\alpha$, $\vec{e}_\alpha{}'$, son vectores en el espacio-tiempo, es decir, tienen cuatro componentes). Un vector $\vec{A}$ en el espacio tiempo se puede escribir:

$$\begin{aligned} \vec{A} &= A^\alpha \vec{e}_\alpha \text{ en la base } \{\vec{e}_\alpha\}, \\ \vec{A} &= A'^\mu \vec{e}_\mu{}' \text{ en la base } \{\vec{e}_\alpha{}'\} \end{aligned}$$

de manera que $A^\alpha \vec{e}_\alpha = A'^\mu \vec{e}_\mu{}'$. Si $A'^\mu = \Lambda^\mu_\alpha A^\alpha$, entonces podemos escribir:

$$A^\alpha(\Lambda^\mu_\alpha \vec{e}_\mu{}' - \vec{e}_\alpha) = \vec{0}$$

ya que A^α representan las componentes de un vector arbitrario, tenemos:

$$\vec{e}_\alpha = \Lambda^\mu_\alpha \vec{e}_\mu{}' \tag{29}$$

y también, si Λ es una matriz invertible:

$$\vec{e}_\mu{}' = (\Lambda^{-1})^\alpha_\mu \vec{e}_\alpha \tag{30}$$

Sea $\{\vec{e}_\alpha\}$la base ortogonal de vectores asociada con las coordenadas $x^0 = ct$, $x^1 = r$, $x^2 = \theta$ y $x^3 = \varphi$. Introduzcamos una base ortonormal de vectores $\{\vec{e}_\mu{}'\}$ definidos por:

$$\begin{pmatrix} \vec{e}_0{}' \\ \vec{e}_1{}' \\ \vec{e}_2{}' \\ \vec{e}_3{}' \end{pmatrix} = \Lambda^{-1} \begin{pmatrix} \vec{e}_0 \\ \vec{e}_1 \\ \vec{e}_2 \\ \vec{e}_3 \end{pmatrix} \tag{31}$$

donde

$$\Lambda = \begin{pmatrix} e^\Phi & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \left(1-\frac{b}{r}\right)^{-1/2} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & r & 0 \\ 0 & 0 & 0 & r\sin\theta \end{pmatrix}$$

Es fácil demostrar que

$$\begin{aligned} g'_{\alpha\beta} &\equiv \vec{e}_\alpha{}' \cdot \vec{e}_\beta{}' = \eta_{\alpha\beta} = \\ &\text{diagonal}\,(1,-1,-1,-1) \end{aligned} \tag{32}$$

Esta base nos permite introducir un nuevo sistema de coordenadas del marco de referencia propio "proper reference frame":

$$x'^\alpha = \Lambda^\alpha_\beta\, x^\beta \tag{33}$$

o:

$$x'^0 = e^\Phi x^0 \tag{33a}$$

$$x'^1 = \left(1-\frac{b}{r}\right)^{-1/2} x^1 \tag{33b}$$

$$x'^2 = r x^2 \tag{33c}$$

$$x'^3 = r\sin\theta x^3 \tag{33d}$$

Estas son las coordenadas de un conjunto de observadores que siempre permanecen en reposo en el campo gravitacional del agujero de gusano. Es decir que tienen:

$$r, \theta \text{ y } \varphi \text{ constantes}$$

En esta nueva base, las componentes del tensor de Riemann-Christoffel se pueden calcular a partir de la relación:

$$R'^{\ \mu}_{\nu\rho\sigma} = \frac{\partial x^{\alpha_1}}{\partial x'^{\nu}} \frac{\partial x^{\alpha_2}}{\partial x'^{\rho}} \frac{\partial x^{\alpha_3}}{\partial x'^{\sigma}} \times \frac{\partial x'^{\mu}}{\partial x'^{\beta}} R^{\beta}_{\alpha_1\alpha_2\alpha_3} \quad (34)$$

El resultado es que las 24 componentes no nulas son:

$$\begin{aligned} R'^{0}_{\ 101} &= -R'^{0}_{\ 110} \\ &= -R'^{1}_{\ 010} \\ &= R'^{1}_{\ 001} \\ &= \left(1-\frac{b}{r}\right)[-\Phi'' - (\Phi')^2 + \\ &\quad \frac{(rb'-b)}{2r(r-b)}\Phi'] \end{aligned} \quad (35)$$

$$\begin{aligned} R'^{0}_{\ 202} &= -R'^{0}_{\ 220} = -R'^{2}_{\ 020} = R'^{2}_{\ 002} \\ &= R'^{0}_{\ 303} = -R'^{0}_{\ 330} = -R'^{3}_{\ 030} \\ &= R'^{3}_{\ 003} = \frac{(b-r)}{r^2}\Phi' \end{aligned} \quad (36)$$

$$\begin{aligned} R'^{1}_{\ 212} &= -R'^{1}_{\ 221} = R'^{2}_{\ 121} = -R'^{2}_{\ 112} \\ &= R'^{1}_{\ 313} = -R'^{1}_{\ 331} = R'^{3}_{\ 131} \\ &= -R'^{3}_{\ 113} = \frac{(rb'-b)}{2r^3} \end{aligned} \quad (37)$$

$$R'^{2}_{\ 323} = -R'^{2}_{\ 332} = R'^{3}_{\ 232} = -R'^{3}_{\ 223} = \frac{b}{r^3}. \quad (38)$$

5 Tensor y escalar de Ricci

El tensor de Ricci se define por la expresión

$$R'_{\mu\nu} \equiv R'^{\ \alpha}_{\mu\alpha\nu} \quad (39)$$

Las componentes no nulas de dicho tensor son:

$$\begin{aligned} R'_{00} = &\ \Phi''\left(1-\tfrac{b}{r}\right) + (\Phi')^2\left(1-\tfrac{b}{r}\right) \\ &+ \left(\tfrac{b-rb'}{2r^2}\right)\Phi' + \tfrac{2(r-b)}{r^2}\Phi' \end{aligned} \quad (40)$$

$$\begin{aligned} R'_{11} = &\ -\Phi''\left(1-\tfrac{b}{r}\right) - (\Phi')^2\left(1-\tfrac{b}{r}\right) \\ &+ \left(\tfrac{rb'-b}{2r^2}\right)\Phi' + \tfrac{(rb'-b)}{r^3} \end{aligned} \quad (41)$$

$$R'_{22} = R'_{33} = \frac{(b-r)}{r^2}\Phi' + \frac{(rb'-b)}{2r^3} + \frac{b}{r^3} \quad (42)$$

El escalar de Ricci es:

$$R' = g'^{\mu\nu} R'_{\mu\nu} = R'_{00} - R'_{11} - R'_{22} - R'_{33} \quad (43)$$

Introduciendo (40-42) en (43) tenemos:

$$\begin{aligned} R' = &\ 2\Phi''\left(1-\frac{b}{r}\right) + 2(\Phi')^2\left(1-\frac{b}{r}\right) \\ &+ \left(\frac{b-rb'}{r^2}\right)\Phi' - 2\frac{(rb'-b)}{r^3} \\ &- \frac{4(b-r)}{r^2}\Phi' - \frac{2b}{r^3} \end{aligned} \quad (44)$$

6 Tensor de Einstein

Las componentes no nulas del tensor de Einstein [3, 4, 5, 6]

$$G'_{\mu\nu} = R'_{\mu\nu} - \frac{1}{2}R'\, g'_{\mu\nu}$$

son:

$$G'_{00} = \frac{b'}{r^2} \quad (45)$$

$$G'_{11} = -\frac{2(b-r)}{r^2}\Phi' - \frac{b}{r^3} \quad (46)$$

$$\begin{aligned} G'_{22} = G'_{33} = &\left(1-\frac{b}{r}\right)[\Phi'' + (\Phi')^2 \\ &+ \frac{\Phi'}{r} + \frac{(b-rb')}{2r(r-b)}\Phi' \\ &- \frac{(rb'-b)}{2r^2(r-b)}] \end{aligned} \quad (47)$$

7 Ecuaciones de Campo de Eintein y tensor energía-momentum

De acuerdo a las ecuaciones de campo de Einstein [3, 4, 5, 6]

$$G'_{\mu\nu} = \frac{8\pi G}{c^4} T'_{\mu\nu}, \quad (48)$$

los tensores de Einstein $G'_{\mu\nu}$ y de energía-momentum $T'_{\mu\nu}$, son proporcionales. Ello implica que las únicas componentes no nulas de $T'_{\mu\nu}$ son T'_{00}, T'_{11} y $T'_{22} = T'_{33}$, donde:

$$T'_{00} = \rho(r)\, c^2 \quad (49)$$

$$T'_{11} = -\tau(r) \quad (50)$$

$$T'_{22} = T'_{33} = P(r) \tag{51}$$

En la ecuación (49) $\rho(r)$ es la densidad de total de masa-energía medida por un observador estático en el campo gravitacional del agujero de gusano, $\tau(r)$es la tensión por unidad de área medida por dichos observadores en la dirección radial (es el negativo de la presión radial), y $P(r)$ es la presion medida en las direcciones laterales (ortogonales a la dirección radial). En el fluido perfecto $P(r) = -\tau(r)$.

A partir de (48) podemos escribir:

$$G'_{00} = \frac{8\pi G}{c^4} T'_{00}$$

usando las ecuaciones (45) y (49), podemos demostrar que:

$$b'(r) = k\, r^2 \rho(r)\, c^2 \tag{52}$$

donde

$$k = 8\pi G/c^4$$

La ecuación (48) para $\mu = \nu = 1$ da:

$$\Phi' = \frac{\left(b - kr^3\tau\right)}{2r(r-b)} \tag{53}$$

por otro lado,

$$\begin{aligned} \Phi'' &= \tfrac{1}{2r(r-b)}[b' - kr^2(3\tau + r\tau') \\ &\quad -\Phi'(4r - 2b - 2rb')] \end{aligned} \tag{54}$$

La ecuación (48) para $\mu = \nu = 2$ nos da:

$$G'_{22} = kP(r) \tag{55}$$

de manera que si introducimos (54) en (47), a partir de la ecuación (55) obtenemos:

$$\begin{aligned} \tau' &= \Phi'\left(\rho(r)\, c^2 - \tau\right) \\ &\quad -\tfrac{2}{r}\left(P(r) + \tau(r)\right) \end{aligned} \tag{56}$$

La ecuación (56) es la ecuación de equilibrio hidrostático para el materia del que está constituido el agujero de gusano.

Las ecuaciones (52), (53) y (56) también se pueden escribir:

$$\rho(r)\, c^2 = \tfrac{b'}{kr^2} \tag{57}$$

$$\tau(r) = \tfrac{1}{kr^2}\left[\tfrac{b}{r} - 2(r-b)\,\Phi'\right] \tag{58}$$

$$\begin{aligned} P(r) &= -\tau(r) + \frac{r}{2} \times \\ &\quad \left[\Phi'\left(\rho(r)\, c^2 - \tau\right) - \tau'\right] \end{aligned} \tag{59}$$

Las últimas tres ecuaciones junto con las ecuaciones de estado

$$P = P(\rho) \quad \text{y} \quad \tau = \tau(\rho) \tag{60}$$

constituyen un sistema de cinco ecuaciones con cinco funciones incógnitas:

$$\rho, \tau, P, \Phi \text{ y } b.$$

Para hallar una solución a dichas ecuaciones, nosotros usaremos la misma filosofía de Morris y Thorne [9], probando con funciones $b(r)$ y $\Phi(r)$ que nos permitan construir un agujero de gusano apropiado para un viaje interestelar.

8 Condiciones de borde y ausencia de un horizonte de sucesos

Consideraremos que el agujero de gusano está confinado en el interior de una esfera de radio $r = R_S$ de manera que para $r > R_S$ ρ, τ y P son iguales a cero. Por otro lado supondremos que en el límite cuando $r \to R_S$, $\tau \to 0$ pero ρ y P permanecen finitos.

Ya que para $r > R_S$, $\rho = 0$, la ecuación (52) nos dice que $b' = 0$. Por lo tanto:

$$b(r) = b(R_S) = D = constante \tag{61}$$

Adicionalmente, $\tau = 0$ para $r > R_S$ implica (ecuación (53)):

$$2\Phi' r(r-b) = b \tag{62}$$

de donde tenemos $\Phi' = D/2r(r-D)$.

Integrando la anterior ecuación y teniendo en cuenta que $\Phi(r \to \infty) \to 0$, obtenemos:

$$\Phi(r > R_S) = \tfrac{1}{2}\ln\left(1 - \tfrac{D}{r}\right) \tag{63}$$

Otra condición que debe cumplirse es

$$\lim_{r\to\infty}(b/r) \quad = 0 \tag{64}$$

ya que el espacio tiempo debe ser asintóticamente plano lejos del campo gravitacional del wormhole. En efecto, la métrica (1) para $r > R_S$ se escribe:

$$\begin{aligned}(ds)^2 \quad &= \left(1-\tfrac{D}{r}\right)c^2\,(dt)^2 \\ &\quad -\left(1-\tfrac{D}{r}\right)^{-1}(dr)^2 \\ &\quad -r^2\,(d\Omega)^2\end{aligned} \tag{65}$$

que es la métrica de Schwarzchild si hacemos $\gamma = 1 - D/r$ (ver referencias [3, 4, 5, 6]).

Matemáticamente, los horizontes de sucesos, en un espacio descrito por una métrica estática y asintóticamente plana, se obtienen haciendo $g_{00} \to 0$. Para nuestra métrica (1) tendríamos:

$$g_{00} \quad = e^{2\Phi} \to 0 \tag{66}$$

o $\Phi \to -\infty$, de manera que la condición fundamental de que el agujero de gusano practicable no deba tener ningún horizonte de sucesos, solo se puede cumplir si la funcion $\Phi(r)$ es finita en cualquier punto del espacio.

9 Parámetro de corrimiento hacia el rojo

Consideremos una fuente en el agujero de gusano que emite pulsos de luz de energía E'. Para un observador distante (muy alejado del campo gravitacional del agujero), la energía que recibe de los pulsos de luz (E) será:

$$E \quad = (g_{00})^{1/2}\,E' \tag{67}$$

donde $E = hc/\lambda_{recibida}$ y $E' = hc/\lambda_{emitida}$ ($\lambda_{emitida}$ y $\lambda_{recibida}$ son las longitudes de onda de las señales emitida y recibida, respectivamente).

El parámetro de corrimiento hacia el rojo se define a través de la relación:

$$\begin{aligned}z \quad &= \tfrac{\Delta\lambda}{\lambda} = \tfrac{\lambda_{recibida}-\lambda_{emitida}}{\lambda_{emitida}} \\ &= \tfrac{\lambda_{recibida}}{\lambda_{emitida}} - 1\end{aligned} \tag{68}$$

Usando la ecuación (67), tenemos:

$$z \quad = e^{-\Phi} - 1 \tag{69}$$

Por esta razón, la función $\Phi(r)$ se denomina función de corrimiento hacia el rojo gravitacional.

10 Superficies de inserción (embedding surfaces)

Para un tiempo fijo t y tomando $\theta = \pi/2$ (plano ecuatorial), la parte espacial de la métrica (1) se puede escribir:

$$\begin{aligned}(ds')^2 \quad &= -(ds)^2 = f(r)\,(dr)^2 \\ &\quad +r^2\,(d\varphi)^2\end{aligned} \tag{70}$$

que representa un elemento de arco en el plano ecuatorial. Deseamos construir en el espacio Euclideo tridimensional, una superficie bidimensional que tenga la misma geometría que la del elemento de arco descrito por (70). Entonces, uno podría encajar la geometría del espacio curvo bidimensional en la geometría plana de un espacio Euclideo tridimensional [10]. En dicho espacio Euclideano, introduciremos coordenadas cilíndricas z, r y φ. La métrica Euclideana del espacio de inserción (embedding space) es:

$$\begin{aligned}(ds_{Euclidean})^2 \quad &= \left(1+\left(\tfrac{dz}{dr}\right)^2\right)(dr)^2 \\ &\quad +r^2\,(d\varphi)^2\end{aligned} \tag{71}$$

En (71), nosotros suponemos que $z = z(r)$ (consideramos que la superficie insertada tiene simetria axial).

Si nosotros identificamos las coordenadas (r, φ) del espacio Euclideano con las coordenadas (r, φ) del espacio-tiempo del agujero de gusano, el elemento de arco (71) será el mismo que el descrito por la ecuación (70) a través del wormhole. Podemos entonces escribir:

$$1+\left(\frac{dz}{dr}\right)^2 \quad = \tfrac{1}{1-\frac{b(r)}{r}} \tag{72}$$

de donde obtenemos:

$$\left(\frac{dz}{dr}\right) \quad = \pm\left(\tfrac{r}{b}-1\right)^{-1/2} \tag{73}$$

La ecuación (73) describe la forma en la que la función $b(r)$ modela la geometría espacial del agujero de gusano.

Todo agujero de gusano tiene un radio mínimo $r = b_0$ para el cual la superficie insertada del espacio curvo bidimensional es vertical. Es decir, para $b(r) = r = b_0$,

$$\left.\left(\frac{dz}{dr}\right)\right|_{r=b=b_0} \quad = \pm\infty \tag{74}$$

dicho radio define la garganta del agujero de gusano.

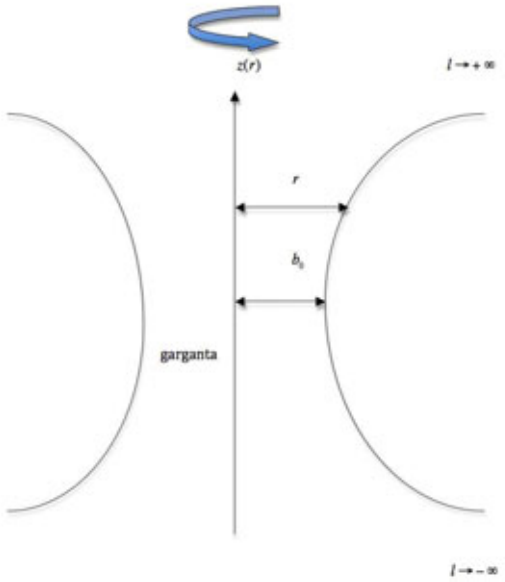


Figura 3: Diagrama de inserción para un agujero de gusano. En la garganta se cumple $b(r) = r = b_0;\ l = 0$. Para generar el agujero de gusano, se debe rotar la curva de la figura alrededor del eje z.

Debido a que la coordenada radial r no se comporta adecuadamente cerca de la garganta del wormhole, es más apropiado definir una "distancia propia radial":

$$l(r) = \pm \int_{b_0}^{r} \left(1 - \frac{b(r)}{r}\right)^{-1/2} dr \tag{75}$$

La distancia propia radial debe ser finita a través del espacio-tiempo. l es positiva sobre la gargante del wormhole, y negativa por debajo de la misma. Lejos de la garganta, en ambas direcciones radiales, el espacio debe ser asintóticamente plano por lo que dz/dr debe aproximarse a cero a medida que $l \to \pm\infty$ (o $b/r \to 0$ cuando $l \to \pm\infty$).

11 Viajando a través de un agujero de gusano

Consideremos una sonda espacial viajando en dirección radial a través de un agujero de gusano. La sonda parte del reposo desde una estación espacial ubicada en la posición $l = -l_1$ y arriba a otra estación ubicada en $l = +l_2$ donde queda en reposo. La velocidad radial de la sonda medida por un observador en reposo en el agujero de gusano es:

$$v(r) = \mp c\frac{dx'^1}{dx'^0} \tag{76}$$

usando las ecuaciones (33a) y (33b) tenemos:

$$v(r) = \mp \frac{dr}{\left(1-\frac{b}{r}\right)^{1/2} e^{\Phi} dt} \tag{77}$$

o en términos de la distancia propia radial

$$v(r) = \frac{dl}{e^{\Phi} dt} \tag{78}$$

Si τ_T es el tiempo propio medido por un observador a bordo de la sonda, entonces podemos escribir:

$$\gamma d\tau_T = e^{\Phi} dt \tag{79}$$

donde $\gamma = \left(1 - \frac{v^2}{c^2}\right)^{-1/2}$, por lo que (78) también se escribe:

$$\gamma v(r) = \frac{dl}{d\tau_T} = \mp \frac{dr}{\left(1-\frac{b}{r}\right)^{1/2} d\tau_T} \tag{80}$$

El signo negativo en la ecuación (80) lo tomaremos para el viaje debajo de la garganta del agujero, mientras que el signo positivo será para el viaje en la parte superior. En las estaciones espaciales tenemos $v = 0$ mientras $v > 0$ para $-l_1 < l < +l_2$. Supondremos que las estaciones espaciales están lo suficientemente alejadas de la garganta wormhole, de manera que, los efectos gravitacionales del mismo sean muy pequeños. Esto quiere decir que la geometría del espacio en las estaciones es casi plana. El corrimiento hacia el rojo gravitacional de las señales enviadas desde las estaciones hacia el infinito también debe ser muy pequeño por lo que usando la ecuación (69) tendremos:

$$z = e^{-\Phi} - 1 \approx -\Phi \ll 1 \tag{81}$$

o simplemente $|\Phi| \ll 1$

Para que el viaje a través del agujero de gusano sea conveniente para los seres humanos, los tiempos empleados en viajar desde la estación ubicada en $l = -l_1$ hasta la estación ubicada en $l = +l_2$, medidos tanto por el viajero a bordo de la sonda como por los observadores en las estaciones espaciales deberían ser menores que un año [9]:

$$\Delta\tau_T = \int_{-l_1}^{+l_2} \frac{dl}{v\gamma} \leq 1 a\tilde{n}o \tag{82}$$

$$\Delta t = \int_{-l_1}^{+l_2} \frac{dl}{ve^{\Phi}} \leq 1 a\tilde{n}o \tag{83}$$

A continuación procederemos a calcular el valor de la aceleración de la gravedad medida por los observadores en reposo en las estaciones espaciales. El cuadrivector aceleración de un objeto en las estaciones es:

$$a'^{\alpha} = c\frac{\delta u'^{\alpha}}{\delta x'^{0}} = \left(\frac{\partial u'^{\alpha}}{\partial x'^{\beta}} + \Gamma'^{\alpha}_{\beta\gamma}u'^{\gamma}\right)u'^{\beta} \quad (84)$$

donde u'^{α} representa el cuadrivector velocidad. Para un observador en reposo dichas estaciones las podemos escribir:

$$u'^{\alpha} = \left(u'^{0}, 0, 0, 0\right) \quad (85)$$

Donde $u'^{0} = c$. Entonces, para un observador en reposo

$$a'^{\alpha} = \left(\frac{\partial u'^{\alpha}}{\partial x'^{0}} + \Gamma'^{\alpha}_{00}u'^{0}\right)u'^{0}. \quad (86)$$

Por otro lado, ya que $\Gamma^{0}_{00} = \Gamma^{2}_{00} = \Gamma^{3}_{00} = 0$, usando

$$\Gamma'^{\rho}_{\mu\nu} = \frac{\partial x^{\alpha}}{\partial x'^{\mu}}\frac{\partial x^{\beta}}{\partial x'^{\nu}}\frac{\partial x'^{\rho}}{\partial x^{\gamma}}\Gamma^{\gamma}_{\alpha\beta} + \frac{\partial^{2}x^{\alpha}}{\partial x'^{\mu}\partial x'^{\nu}}\frac{\partial x'^{\rho}}{\partial x^{\alpha}} \quad (87)$$

podemos demostrar que

$$\Gamma'^{0}_{00} = \Gamma'^{2}_{00} = \Gamma'^{3}_{00} = 0 \quad (88)$$

y

$$\Gamma'^{1}_{00} = \left(1 - \tfrac{b}{r}\right)^{1/2}\Phi' \quad (89)$$

(debido a que la transformación entre las coordenadas x^{α} y x'^{α} es lineal, entonces $\left(\frac{\partial^{2}x^{\alpha}}{\partial x'^{\mu}\partial x'^{\nu}}\right) = 0$). Las componentes del cuadrivector aceleración son por lo tanto:

$$a'^{0} = a'^{2} = a'^{3} = 0 \quad (90)$$

y

$$a'^{1} = \Gamma'^{1}_{00}c^{2} = \left(1 - \tfrac{b}{r}\right)^{1/2}\Phi'c^{2} \quad (91)$$

La aceleración de la gravedad medida en las estaciones es:

$$g' = -(-a'^{\alpha}a'_{\alpha})^{1/2} = -(-a'^{1}a'_{1})^{1/2} \quad (92)$$

con $a'_{1} = -a'^{1}$. Usando la ecuación (91) tenemos:

$$g' = -\Gamma'^{1}_{00}\,c^{2} \quad (93)$$

de manera que introduciendo (89) en (93) obtenemos:

$$g' = -\left(1 - \frac{b}{r}\right)^{1/2}\Phi'c^{2} \approx -\Phi'c^{2} \quad (94)$$

$\left(\text{ya que } \frac{b}{r} \to 0\right)$ .Esta aceleración debe ser menor o igual que el valor de la aceleración de la gravedad en la superficie de la Tierra:

$$|g'| = |\Phi'c^{2}| \leq g_{\oplus} = 9{,}8\left[m/s^{2}\right] \quad (95)$$

Debido a que $|\Phi'| << 1$ en las estaciones, el tiempo medido por relojes colocados en las mismas es igual al tiempo coordenado t.

Para la métrica de Schwarzschild

$$b = r_{s} = \frac{2GM}{c^{2}} \quad (96)$$

y

$$\Phi = \frac{1}{2}\ln\left(1 - \frac{r_{s}}{r}\right) \quad (97)$$

donde M es la masa que genera el campo gravitacional. La aceleración de la gravedad (usando la ecuación (94)) será en este caso:

$$g' = -\frac{GM}{r^{2}}\left(1 - \frac{2GM}{rc^{2}}\right)^{-1/2}. \quad (98)$$

12 Aceleración experimentada por el viajero

La transformación entre las coordenadas del wormhole (x'^{ν}) y las coordenadas del marco de referencia del viajero en la sonda (x''^{μ})es

$$x''^{\mu} = \Lambda'^{\mu}_{\nu}x'^{\nu} \quad (99)$$

donde

$$\Lambda' = \begin{bmatrix} \gamma & \pm\gamma\beta & 0 & 0 \\ \pm\gamma\beta & \gamma & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

donde $\beta = \frac{v}{c}$. Esta transformación nos permite introducir una base de vectores para el marco de referencia del viajero:

$$\vec{e}''_{\alpha} = \left(\Lambda'^{-1}\right)^{\beta}_{\alpha}\vec{e}'_{\beta} \quad (100)$$

o

$$\vec{e}''_{0} = \gamma\vec{e}'_{0} \mp \gamma\beta\vec{e}'_{1} \quad (101)$$

$$\vec{e}''_{1} = \mp\gamma\beta\vec{e}'_{0} + \gamma\vec{e}'_{1} \quad (102)$$

$$\vec{e}''_2 = \vec{e}'_2 \tag{103}$$

$$\vec{e}''_3 = \vec{e}'_3 \tag{104}$$

estos vectores satisfacen:

$$\vec{e}''_\alpha \cdot \vec{e}''_\beta = \eta_{\alpha\beta} \tag{105}$$

por lo que constituyen una base ortonormal de vectores. El cuadrivector velocidad del viajero es

$$\vec{u} = c\vec{e}''_0 \tag{106}$$

Los cuadrivectores aceleración $(\vec{a})$ y velocidad $(\vec{u})$ del viajero son ortogonales de manera que usando (106) tenemos

$$\vec{a} \cdot \vec{e}''_0 = 0 \tag{107}$$

Por otro lado, podemos escribir:

$$\vec{a} = a''^\alpha \vec{e}''_\alpha, \tag{108}$$

de manera que $a''^0 = 0$.

Si el viajero se mueve en dirección radial, su aceleración debe ser radial $(a''^2 = a''^3 = 0)$,por lo que

$$\vec{a} = a''^1 \vec{e}''_1 = a\vec{e}''_1 \tag{109}$$

donde a representa la magnitud de aceleraión experimentada por el viajero.

En la base $\{\vec{e}_\alpha\}$

$$\begin{aligned} \vec{a}.\vec{e}_0 &= (a^0\vec{e}_0 + a^1\vec{e}_1 + a^2\vec{e}_2 + a^3\vec{e}_3) \cdot \vec{e}_0 \\ &= g_{00}a^0 = a\vec{e}''_1 \cdot \vec{e}_0 = ae^\Phi \vec{e}''_1 \cdot \vec{e}'_0 \\ &= \mp\gamma\beta a e^\Phi \end{aligned}$$

De esta última relación, deducimos que

$$\begin{aligned} a^0 &= \mp\gamma\beta a e^\Phi g^{00} \\ &= \mp\gamma\beta a e^{-\Phi} \end{aligned} \tag{110}$$

En la base $\{\vec{e}_\alpha\}$, $\vec{u} = u^\mu \vec{e}_\mu$ con $u^\mu = (u^0, u^1, u^2, u^3)$, mientras en la base $\{\vec{e}'_\alpha\}$, $\vec{u} = u'^\mu \vec{e}'_\mu$ con

$$u'^\mu = (\gamma c, \gamma v, 0, 0). \tag{111}$$

Usando

$$u'^\mu = \frac{\partial x'^\mu}{\partial x^\nu} u^\nu, \tag{112}$$

podemos demostrar que

$$u^0 = e^{-\Phi}\gamma c \tag{113}$$

$$u^1 = \left(1 - \frac{b}{r}\right)^{\frac{1}{2}} \gamma v \tag{114}$$

$$u^2 = u^3 = 0 \tag{115}$$

en la base $\{\vec{e}'_\alpha\}$, también tenemos

$$\begin{aligned} a^\alpha &= u^\alpha{}_{,\beta} u^\beta \\ &= \left(\frac{\partial u^\alpha}{\partial x^\beta} + \Gamma^\alpha_{\beta\gamma} u^\gamma\right) u^\beta \end{aligned} \tag{116}$$

donde $u^\alpha = u^\alpha(r)$.

Para $\alpha = 0$ (116) se escribe

$$a^0 = \left(\frac{\partial u^0}{\partial x^1}\right) u^1 + 2\Gamma^0_{01} u^0 u^1 \tag{117}$$

con $x^1 = r$. Introduciendo los valores de u^0, u^1 y Γ^0_{01} dados por (113), (114) y (6), respectivamente obtenemos:

$$\begin{aligned} a^0 &= \left(1 - \frac{b}{r}\right)^{\frac{1}{2}} e^{-2\Phi} \\ &\times \gamma c^2 \beta \frac{d}{dr}\left(\gamma e^\Phi\right) \end{aligned} \tag{118}$$

La ecuación (118), conjuntamente con la ecuación (110), nos permite calcular el valor de a:

$$\begin{aligned} a &= \mp\left(1 - \frac{b}{r}\right)^{\frac{1}{2}} e^{-\Phi} \\ &\times c^2 \frac{d}{dr}\left(\gamma e^\Phi\right) \end{aligned} \tag{119}$$

o en términos de la derivada con respecto a l:

$$a \quad = e^{-\Phi} c^2 \frac{d}{dl}\left(\gamma e^{\Phi}\right). \tag{120}$$

donde hemos usado

$$dr \quad = \mp v \left(1 - \frac{b}{r}\right)^{\frac{1}{2}} e^{\Phi} dt,$$

y

$$dl \quad = v e^{\Phi} dt$$

La condición de que la aceleración del viajero con respecto al agujero de gusano no debe sobrepasar el valor de la aceleración de la gravedad en la superficie de la Tierra es:

$$|a| \quad = c^2 \left| e^{-\Phi} \frac{d}{dl}\left(\gamma e^{\Phi}\right) \right| \leq g_{\oplus} \tag{121}$$

que nos da la condición:

$$\left| e^{-\Phi} \frac{d}{dl}\left(\gamma e^{\Phi}\right) \right| \quad \leq \frac{1}{0{,}971 \text{ años luz}}. \tag{122}$$

13 Aceleración de marea gravitacional

Las aceleraciones de marea $\Delta\vec{a}$ entre varias partes del cuerpo de un viajero no deben exceder el valor de la aceleración de la gravedad en la superficie de la Tierra. Sea $\vec{\xi}$ el cuadrivector separación entre dos partes del cuerpo de un viajero (por ejemplo, la rodilla y la cabeza). En el marco de referencia del viajero, $\vec{\xi}$ es puramente espacial $\left(\xi''^{\,0} = 0\right)$, de manera que

$$\vec{u}.\vec{\xi} \quad = c\xi''^{\,0} = 0 \tag{123}$$

La aceleración de marea gravitacional está dada por la ecuación de desviación de la geodésica [2, 3, 4, 5, 6] , que en la base $\{\vec{e}''_{\alpha}\}$ es :

$$\Delta a''^{\nu} = \frac{\delta^2 \xi''^{\nu}}{\delta \tau_T^2} = -R''^{\nu}_{\ \beta\gamma\mu} \xi''^{\gamma} u''^{\beta} u''^{\mu},$$

y ya que $\vec{\xi}$ es puramente espacial, $\Delta a''^{\,\nu}$ también lo es. Por ello, podemos escribir:

$$\Delta a''^{\,i} \quad = \frac{\delta^2 \xi''^{\,i}}{\delta \tau_T^2} = -c^2 R''^{\,i}_{\ 0j0} \xi''^{\,j} \tag{124}$$

Finalmente, como $R''^{\,i}_{\ 0j0} = -R''_{\ i0j0}$, tenemos:

$$\Delta a''^{\,i} \quad = c^2 R''_{\ i0j0} \xi''^{\,j} \tag{125}$$

donde los $R''_{\ i0j0}$ se pueden calcular a partir de la relación:

$$\begin{aligned} R''_{\ \mu\nu\rho\sigma} \quad &= \frac{\partial x'^{\,\alpha}}{\partial x''^{\,\mu}} \frac{\partial x'^{\,\beta}}{\partial x''^{\,\nu}} \frac{\partial x'^{\,\gamma}}{\partial x''^{\,\rho}} \\ &\times \frac{\partial x'^{\,\delta}}{\partial x''^{\,\sigma}} R'_{\ \alpha\beta\gamma\delta}, \end{aligned} \tag{126}$$

usando las ecuaciones:

$$\begin{aligned} x'^{\,0} &= \gamma x''^{\,0} \mp \gamma\beta x''^{\,1}, \\ x'^{\,1} &= \mp\gamma\beta x''^{\,0} + \gamma x''^{\,1} \text{ y} \\ x'^{\,2} &= x''^{\,2}; \; x'^{\,3} = x''^{\,3} \end{aligned}$$

obtenidas a partir de la expresión (99). El resultado es:

$$\begin{aligned} R''_{\ 1010} \quad &= \left(1 - \frac{b}{r}\right)\left[-\Phi'' + \right. \\ &\left. + \frac{(rb' - b)}{2r(r-b)}\Phi' - (\Phi')^2\right] \end{aligned} \tag{127}$$

$$\begin{aligned} R''_{2020} \quad &= R''_{3030} = \frac{\gamma^2}{2r^2}[2(b-r)\Phi' + \\ &+ \frac{\beta^2}{r}(b - rb')] \end{aligned} \tag{128}$$

$$R''_{1020} \quad = R''_{1030} = R''_{2030} = 0 \tag{129}$$

$$R''_{2010} \quad = R''_{3010} = R''_{3020} = 0 \tag{130}$$

(esta última relación es debido a que $R''_{\mu\nu\rho\sigma} = R''_{\rho\sigma\mu\nu}$). Por lo tanto, las componentes de la aceleración son:

$$\begin{aligned} \Delta a''^{\,1} \quad &= c^2 R''_{\ 1010} \xi''^{\,1} = c^2 \left(1 - \frac{b}{r}\right) \\ &\times\left[-\Phi'' + \frac{(rb' - b)}{2r(r-b)}\Phi'\right. \\ &\left. -(\Phi')^2\right]\xi''^{\,1} \end{aligned} \tag{131}$$

$$\begin{aligned}\Delta a''^{\,2} &= c^2 R''_{2020}\xi''^{\,2} \\ &= c^2\frac{\gamma^2}{2r^2}[2(b-r)\Phi' + \\ &\quad +\frac{\beta^2}{r}(b-rb')]\xi''^{\,2}\end{aligned} \tag{132}$$

$$\begin{aligned}\Delta a''^{3} &= c^2 R''_{3030}\xi''^{3} \\ &= c^2\frac{\gamma^2}{2r^2}[2(b-r)\Phi' + \\ &\quad +\frac{\beta^2}{r}(b-rb')]\xi''^{\,3}\end{aligned} \tag{133}$$

Si tomamos $\left|\xi''^{\,i}\right| \approx$ 2metros (que es aproximadamente el tamaño de un ser humano) y con la condición:

$$\left|\Delta a''^{\,i}\right| \leq g_{\oplus} = 9{,}8\text{m/s}^2$$

tenemos:

$$\begin{aligned}|R''_{1010}| &= \left|\left(1-\frac{b}{r}\right)[-\Phi'' + \right. \\ &\quad \left. +\frac{(rb'-b)}{2r(r-b)}\Phi' - \left(\Phi'\right)^2\right]\Big| \\ &\leq \frac{g_{\oplus}}{2\,[m]\,c^2} \\ &\approx \frac{1}{(1{,}36\times 10^8 m)^2}\end{aligned} \tag{134}$$

$$\begin{aligned}|R''_{2020}| &= |R''_{3030}| = \left|\frac{\gamma^2}{2r^2}\right. \\ &\quad \left.\times\left[2(b-r)\Phi' + \frac{\beta^2}{r}\,(b-br')\right]\right| \\ &\leq \frac{g_{\oplus}}{2\,[m]\,c^2} \\ &\approx \frac{1}{(1{,}36\times 10^8 m)^2}\end{aligned} \tag{135}$$

A (134) y (135) se les denomina restricciones de marea gravitacional radial y laterales, respectivamente [9]. La ecuación (134) puede considerarse como una restricción de la función de corrimiento hacia el rojo Φ (de hecho $\Phi' = 0$ satisface dicha restricción). La ecuación (135) es en cambio una restricción sobre la velocidad v con la que el viajero puede atravesar el agujero de gusano.

14 Materia Exótica

En la garganta del agujero de gusano ($r = b = b_0$) la tensión dada por:

$$\tau_0 = \frac{1}{kb_0^2} \tag{136}$$

(ver ecuación (53)). Reemplazando el valor de la constante k, podemos escribir:

$$\tau_0 = 4{,}83\times 10^{40}\left(\frac{N}{m^2}\right)\left(\frac{10m}{b_0}\right)^2 \tag{137}$$

Esta tensión es enorme. en efecto, para $b_0 = 1$km, la tensión es:

$$\tau_0 = 4{,}83\times 10^{36}\frac{\text{Newtons}}{m^2}$$

Consideremos la función:

$$\varsigma \equiv \frac{\tau - \rho c^2}{|\rho c^2|} \tag{138}$$

usando las ecuaciones (57) y (58), (138) se escribe:

$$\varsigma = \frac{\dfrac{b}{r} - 2(r-b)\Phi' - b'}{|b'|}. \tag{139}$$

Cerca de la garganta, $\left.\dfrac{d^2r}{dz^2}\right|_{r=b=b_0} > 0$ (en inglés esta condición se denomina "outward flaring of the throat"). A partir de la expresión (73) podemos calcular dicha segunda derivada, y el resultado es:

$$\frac{d^2r}{dz^2} = \frac{b-rb'}{2b^2} \tag{140}$$

de manera que introduciendo esta relación en (139), tenemos:

$$\varsigma = \frac{2b^2}{r|b'|}\left(\frac{d^2r}{dz^2}\right) - \frac{2\,(r-b)\,\Phi'}{|b'|}. \tag{141}$$

En la garganta

$$\varsigma_0 = \frac{2b_0^2}{r|b'|_{r=b=b_0}} \left(\frac{d^2 r}{dz^2}|_{r=b=b_0} \right). \qquad (142)$$

Ya que ρ es finito, la ecuación (57) nos dice que b' también lo es. Por lo tanto, ya que la segunda derivada es positiva en la garganta tenemos:

$$\varsigma_0 \quad = \frac{\tau_0 - \rho_0 c^2}{|\rho_0 c^2|} > 0 \qquad (143)$$

de manera que $\tau_0 > \rho_0 c^2$. Esta última restricción nos dice que en la garganta , la tensión (τ_0) debe ser tan grande como para exceder a la densidad total de masa-energía ($\rho_0 c^2$). Esta restricción es obviamente conflictiva. A un material que satisface esta propiedad, $\tau > \rho c^2 > 0$, Morris y Thorne lo han denominado "exótico" [9].

Un observador que viaja a través del agujero de gusano con una velocidad radial v, mide una densidad de energía T''_{00}, que puede ser calculada a partir de la expresión:

$$T''_{\mu\nu} = \frac{\partial x'^{\alpha}}{\partial x''^{\mu}} \frac{\partial x'^{\beta}}{\partial x''^{\nu}} T'_{\alpha\beta} \qquad (144)$$

el resultado es:

$$T''_{00} = \gamma^2 T'_{00} \mp 2\gamma^2 \beta T'_{01} + \gamma^2 \beta^2 T'_{11},$$

reemplazando los valores de los símbolos de Christoffel (ver sección 7), obtenemos:

$$T''_{00} = \gamma^2(\rho c^2 - \beta^2 \tau). \qquad (145)$$

Cerca de la garganta del agujero

$$T''_{00} = \gamma^2(\rho_0 c^2 - \tau_0) + \tau_0 \qquad (146)$$

donde hemos usado la relación $\gamma^2\beta^2 = \gamma^2 - 1$. Si la velocidad radial es próxima a la velocidad de la luz, $\gamma >> 1$ y entonces:

$$T''_{00} \quad \approx \gamma^2(\rho_0 c^2 - \tau_0) \qquad (147)$$

y como $\tau_0 > \rho_0 c^2$, tenemos:

$$T''_{00} \quad < 0 \qquad (148)$$

de manera que el viajero medirá una densidad de masa-energía negativa en la garganta del wormhole. Una manera de minimizar la "exoticidad" (en palabras de Morris y Thorne) del material de la garganta del agujero, es establecer la restricción de que en todas partes se cumpla:

$$\rho c^2 \quad \geq 0 \qquad (149)$$

(para observadores en reposo en el interior del wormhole, $\gamma \approx 1$, por lo que $T''_{00} \approx \rho_0 c^2$, de manera que podríamos tener quizas $\rho_0 c^2 < 0$).

15 Condiciones de energía

Especificaremos las condiciones de energía en el caso en el que el tensor de energía-momentum $T_{\mu\nu}$ es diagonal, es decir:

$$T_{\mu\nu} \quad = \text{diagonal}(\rho c^2, P_1, P_2, P_3). \qquad (150)$$

Condición de Energía Nula (NEC: Null Energy Condition): Esta condición nos dice que para cualquier cuadrivector nulo k^μ se tiene:

$$T_{\mu\nu} k^\mu k^\nu \quad \geq 0, \qquad (151)$$

esta condición, para el tensor (150) se puede escribir:

$$\rho c^2 + P_i \geq 0 \qquad \forall i$$

Condición de Energía Débil (WEC: Weak Energy Condition): Establece que para cualquier cuadrivector cuasi temporal V^μ (V^μ puede ser el cuadrivector velocidad) debe cumplirse:

$$T_{\mu\nu} V^\mu V^\nu \quad \geq 0, \qquad (152)$$

esta condición, para el tensor (150) implica que

$$\rho c^2 \geq 0 \quad \text{y} \quad \rho c^2 + P_i \geq 0 \quad \forall i.$$

La condición WEC implica la NEC por continuidad.

Condición de Energía Fuerte (SEC: Strong Energy Condition): Para cualquier cuadrivector cuasitemporal V^μ debe cumplirse:

$$\left(T_{\mu\nu} - \frac{1}{2} T g_{\mu\nu} \right) V^\mu V^\nu \geq 0 \qquad (153)$$

donde $T = g^{\alpha\beta}T_{\alpha\beta}$. Esta condición aplicada al tensor (150) nos da:

$$\rho c^2 + P_i \geq 0 \quad \text{y} \quad \rho c^2 + \sum_{i=1}^{3} P_i \geq 0 \quad \forall i$$

La condición SEC implica la NEC, pero no necesariamente la WEC.

Condición de Energía Dominante (DEC: Dominant Energy Condition): Establece que para cualquier cuadrivector cuasitemporal V^μ:

$$T_{\mu\nu}V^\mu V^\nu \geq 0 \quad \text{y} \quad T_{\mu\nu}V^\nu \tag{154}$$

no es cuasiespacial.

Esta condición implica que

$$\rho c^2 \geq 0 \text{ y } \mathrm{P_i} \in \left[-\rho c^2, \rho c^2\right] \quad \forall i$$

de manera que la condición DEC implica la condición WEC que a su vez implica la condición NEC, pero no necesariamente la SEC.

Si en la base $\{\vec{e}'_\alpha\}$ calculamos (151) con $k'^\mu = (1, 1, 0, 0)$ tenemos

$$T'_{\mu\nu}k'^\mu k'^\nu = \rho\left(r\right)c^2 - \tau\left(r\right) \tag{155}$$

que en la garaganta es

$$T'_{\mu\nu}k'^{\,\mu}k'^{\,\nu}|_{r=b=b_0} = \rho_0 c^2 - \tau_0 < 0$$

y que como vemos viola la condición NEC. A la materia que viola dicha condición se le denomina “exótica"[9] [11].

En los años 60 y comienzos de los setenta, la mayoría de los físicos consideraban como algo inviolable, el hecho de que ningún observador debería ser capaz de medir una densidad de energía negativa. A esta aserción se le denomina “Condición de Energía Débil”, que como vimos en (153), con algunas restricciones adicionales se transforma en la “Condición de Energía Fuerte”. En la actualidad, sin embargo, sabemos que ciertos campos cuánticos pueden violar dichas condiciones de energía. Por ejemplo, cualquier observador estático ubicado sobre el horizonte de sucesos de un agujero negro de Schwarzschild (rodeado por el vacío) puede verificar que el valor esperado de la densidad de energía es negativo y es independiente del tiempo.[12] Esta densidad de energía negativa está asociada con la creación y emisión de partículas, antipartículas y radiación por el agujero negro y la consecuente evaporación del mismo [3, 4, 5, 6]. Otro ejemplo de violación de todas las condiciones de energía es el “Efecto Casimir”[13]. Un análisis muy interesante de las condiciones de energía y las singularidades del espacio-tiempo se puede encontrar en la referencia [14].

16 Soluciones a las ecuaciones de Morris-Thorne con fuerza de marea gravitacionales nulas en la dirección radial.

Si $\Phi = \Phi_0$ =constante (en particular $\Phi = 0$) y $v(r)$ es muy pequeña, entonces $\triangle a^{\text{”}\,1} = 0$. Es decir que la fuerza de marea gravitacionat en la dirección radial es cero. En ese caso, podemos escribir(ver ecuaciones 57-59)

$$b = b\left(r\right) \tag{156}$$

$$\rho\left(r\right)c^2 = \frac{b'}{kr^2} \tag{157}$$

$$\tau\left(r\right) = \frac{b}{kr^3} \tag{158}$$

$$P\left(r\right) = \frac{\left(b - rb'\right)}{2kr^3} \tag{159}$$

Adicionalmente tenemos (ver ecuaciones (139) y (141)):

$$\begin{aligned} \varsigma\left(r\right) &= \frac{2b^2}{r\left|b'\right|}\left(\frac{d^2r}{dz^2}\right) \\ &= \frac{\left(b - rb'\right)}{r\left|b'\right|}. \end{aligned} \tag{160}$$

La función de forma $b(r)$ que genera estas soluciones debe satisfacer las condiciones de borde enunciadas en la sección 8.

En el artículo de Morris-Thorne se presentan soluciones a las ecuaciones (57-59) de la forma [9]

$$b\left(r\right) = b_0\left(\frac{r}{b_0}\right)^{1-\eta} \tag{161}$$

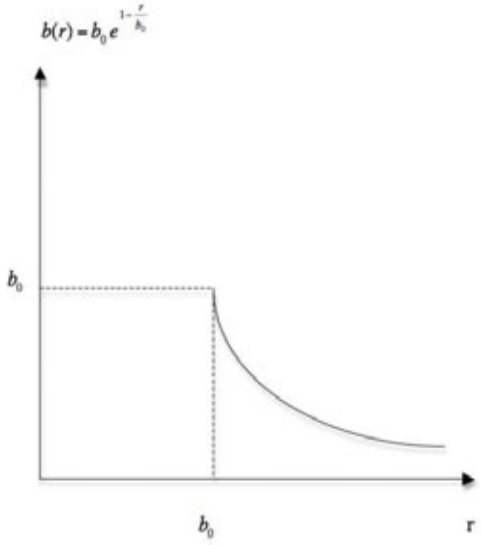
$$\Phi = \Phi_0 = \text{constante}$$

donde η es una constante, $0 < \eta < 1$ y $b_0 \leq r < R_s$ (R_s es el radio de la esfera en la que está confinado el agujero de gusano). En esta sección, introduciremos una solución exponencial a dichas ecuaciones:

$$b\left(r\right) = b_0 e^{1-\frac{r}{b_0}} \tag{162}$$

Se puede verificar fácilmente que dicha solución satisface las condiciones de borde

$$b(b_0) = b_0 \quad \text{y}$$
$$\lim_{r\to\infty}\left(\frac{b(r)}{r}\right) = 0.$$



m

Figura 4: Función de forma exponencial.

El valor de $\varsigma(r)$ es, usando (160):

$$\varsigma\left(r\right)=1+\frac{b_o}{r}>0\ \ \forall r \tag{163}$$

de manera que $\tau(r) > \rho(r)c^2\ \forall r$, lo que significa que el material es exótico para todos los valores de r. Por otro lado, a partir de (157) podemos calcular el valor de la densidad de masa-energía, que resulta ser

$$\rho\left(r\right)c^2=-\frac{e^{1-\frac{r}{b_0}}}{kr^2}<0, \tag{164}$$

de manera que tenemos materia con una densidad de masa-energía negativa medida por observadores en reposo con respecto al agujero de gusano. Los valores de $\tau(r)$ y $P(r)$ los podemos calcular usando (158) y (159), el resultado es:

$$\tau\left(r\right)=\frac{b_0e^{1-\frac{r}{b_0}}}{kr^3} \tag{165}$$

$$P\left(r\right)=\frac{\left(r+b_0\right)e^{1-\frac{r}{b_0}}}{2kr^3}. \tag{166}$$

En el límite cuando $r \to \infty$ tenemos:

$$\lim_{r\to\infty}\left(\rho(r),\tau(r),P(r)\right)=0,$$

de manera que para distancias muy grandes medidas en relación al agujero de gusano, el material exótico será extremadamente débil (prácticamente despreciable). A partir de (164-166) , podemos demostrar que la ecuación de estado del material exótico es:

$$\begin{aligned}\rho\left(r\right)c^2 &= -\frac{r}{b_0}\tau\left(r\right) \\ &= -\frac{2r}{r+b_0}P\left(r\right)\end{aligned} \tag{167}$$

La distancia propia en dirección radial es:

$$l=\pm\int_{b_0}^{r}\frac{r^{\frac{1}{2}}dr}{\left(r-b_0e^{1-\frac{r}{b_0}}\right)^{\frac{1}{2}}} \tag{168}$$

y fácilmente podemos demostrar que

$$l\to\pm\infty \text{ cuando } r\to\infty$$

y

$$l\to 0 \text{ cuando } r\to b_0$$

Por otro lado, (73) se puede escribir,

$$\frac{dz}{dr}=\pm\left(\frac{r}{b_0e^{1-\frac{r}{b_0}}}-1\right)^{-\frac{1}{2}} \tag{169}$$

que evaluada en $r = b_0$ nos da:

$$\left.\frac{dz}{dr}\right|_{r=b_o}=\pm\infty \tag{170}$$

de manera que la pendiente de la superficie de inserción es vertical. De (169) tenemos adicionalmente

$$\frac{d^2r}{dz^2}=\frac{e^{1-\frac{r}{b_0}}\left(r+b_0\right)}{2b^2}>0 \tag{171}$$

por lo que se satisface la condición que habíamos mencionado en la sección 14 para el diagrama de inserción (outward flaring). También, a partir de (169), podemos demostrar que $\lim_{r\to 0}(z)=0$.

Fácilmente se puede demostrar que la solución con factor de forma exponencial (162), viola todas las condiciones de energía mencionadas en la sección 15.

A partir de la solución (162), construiremos una solución más completa y real de las ecuaciones de Morris-Thorne.

17 Materia Exótica límitada a la vecindad de la garganta del agujero de gusano

Si nosotros queremos soluciones con una densidad de masa-energía positiva $\rho \geq 0$, debemos permitir que la materia exótica ocupe una región macroscopicamente larga del espacio definida por una radio crítico r_c tales que $r_c = b_0 + \triangle r$ con $\triangle r \geq b_0$. Fuera de este radio crítico, el material no es exótico. Tomando una pequeña pendiente en r_c:

$$\left(\frac{dz}{dr}\right)\Big|_{r=r_c} = \pm\left(\frac{r}{b}-1\right)^{-\frac{1}{2}}\Big|_{r=r_c} = 0{,}1 \qquad (172)$$

con $b(r_c) = b_0 e^{1-\frac{r_c}{b_0}}$. La solución de la ecuación (172) es $\frac{r_c}{b_0} = 4{,}184$. Por lo tanto, para $r_c \leq r \leq R_s$ (donde R_S es el radio de la esfera dentro de la que está confinado el wormhole), nosotros tomaremos

$$b(r) = \frac{r}{200}, \Phi = \Phi_0 = \text{constante}. \qquad (173)$$

De (173) tenemos, $b'(r) = \frac{1}{200} > 0$, lo cual implica (ver ecuación (157)) ,

$$\rho(r)\, c^2 = \frac{1}{200kr^2} > 0 \qquad (174)$$

Similarmente tenemos de (158-160)

$$\tau(r) = \rho(r)\, c^2, P(r) = 0 \;\; \text{y} \varsigma = 0. \qquad (175)$$

Para conectar la solución en el interior del agujero de gusano con el vacío externo, consideremos una capa de transición de espesor $\triangle R$ tales que:

$$\rho(r) = \frac{\tau(R_s)}{c^2}\left(\frac{R_s}{\Delta R}\right) \qquad (176)$$

$$\tau(r) = \tau(R_s) - \left[\frac{\tau(R_s)}{\Delta R}\right](r - R_s) \qquad (177)$$

con $R_s < r < R_s + \triangle R$. De (177) vemos que cuando $r \to R_s$, $\tau \to \tau(R_s)$ y cuando $r \to R_s + \triangle R$, $\tau \to 0$. La ecuación (176) nos dice que el material en la capa de transición es noexótico.

Integrando (157) (entre los límites R_s y r), tenemos:

$$b(r) = b(R_s) + \frac{k\tau(R_s)\, R_s}{3\Delta R}\left(r^3 - R_s^3\right). \qquad (178)$$

Por otro lado, $\Phi'(R_S) = 0$ implica (ver (58))

$$b(R_s) = kR_s^3\tau(R_s). \qquad (179)$$

Usando la aproximación $r^3 - R_s^3 \approx 3(r - R_s)R_s^2$ (ya que $r \approx R_s$) y la expresión (179), (178) se puede escribir,

$$b(r) \approx b(R_s) + \frac{(r - R_s)}{\Delta R} b(R_s) \qquad (180)$$

Si elegimos,

$$\Delta R = b(R_s) \qquad (181)$$

con $R_s >> b_0$, tenemos

$$\begin{aligned} \Delta R &= b_0 e^{1-\frac{R_s}{b_0}} << \\ & \quad R_s e^{-\frac{R_s}{b_0}} << R_s. \end{aligned} \qquad (182)$$

Definiendo $B \equiv b(R_s + \triangle R)$, y usando (180), podemos escribir aproximadamente,

$$B \approx 2b(R_s) \qquad (183)$$

Si introducimos la expresión para $b(r)$ dada por (180) en la ecuación (53), usando (177) , (179) y las aproximaciones

$$r \approx R_s$$

$$r - b = R_s\left(1 - \frac{\Delta R}{R_s}\right) \approx R_s,$$

es fácil demostrar que

$$\Phi'(r) \approx \frac{(r - R_s)}{\Delta R}\frac{B}{2R_s^2}, \qquad (184)$$

(con $R_s < r < R_S + \triangle R$) y por lo tanto

$$\Phi'(R_s + \Delta R) \approx \frac{B}{2R_s^2} \qquad (185)$$

Similarmente, partiendo de (59), se puede demostrar que

$$P(r) \approx \frac{R_s\tau(R_s)}{2\Delta R} \qquad (186)$$

para $R_s < r < R_s + \triangle R$. Por lo tanto, la ecuación de estado del material de la capa de transición es:

$$P(r) = \frac{\rho(r)\, c^2}{2} \qquad (187)$$

donde $\rho(r)$ es independiente de τ(ver ecuación (176)).

Si localizamos las estaciones espaciales al final de la región de Schwarzschild ($r_1 = r_2 = R_s + \triangle R$) y requerimos que el viajero sea capaz de llegar a dichas estaciones sin ser triturado gravitacionalmente, entonces usando (95) y (185), tenemos

$$|\Phi'(R_s + \Delta R)| \approx \frac{B}{2R_s^2} \leq \left(9{,}2 \times 10^{15} m\right)^{-1}$$

Usando $\frac{B}{2} = b(R_s) = \triangle R$ podemos escribir la siguiente desigualdad:

$$\frac{b(R_s)}{R_s^2} \leq \left(9{,}2 \times 10^{15} m\right)^{-1} \tag{188}$$

De la ecuación (173)

$$b(R_s) = \frac{R_s}{200} \quad (r \geq R_s + \Delta R) \tag{189}$$

por lo que obtenemos

$$R_s \geq 4{,}6 \times 10^{13}[m] = 306{,}7\, a.u. \tag{190}$$

donde $1\, a.u. = 1{,}5 \times 10^{11} m$.

Cuando la solución exterior de Schwarzschild (ver ecuación (63) reemplazando D por B y r por R_s) es aplicada a la capa de espesor $\triangle R$, tenemos:

$$\Phi = \Phi_0 = \frac{1}{2} \ln\left(1 - \frac{B}{R_s}\right) \tag{191}$$

Ya que $R_s >> b_0$, usando (183) resulta que

$$\frac{B}{R_s} = 2\frac{b_0}{R_s} e^{1-\frac{R_s}{b_0}} << 1 \tag{192}$$

de manera que podemos usar la aproximación $\ln(1 - x) \approx -x$ para $x << 1$ y escribir

$$\Phi = \Phi_0 = -\frac{B}{2R_s}. \tag{193}$$

Por lo tanto

$$e^{2\Phi} = e^{2\Phi_0} = e^{-\frac{B}{R_s}} \to 1. \tag{194}$$

Vemos entonces que de acuerdo a (194), $e^{2\Phi}$ difiere de la unidad únicamente por una cantidad muy pequeña, lo cual implica que el tiempo propio medido por observadores estáticos es aproximadamente igual al tiempo coordenado t a través del agujero de gusano.

Utilizando la expresión (189) , (178) se puede escribir

$$b(r) = \frac{R_s}{200} + \frac{\left(r^3 - R_s^3\right)}{3R_s^2} \tag{195}$$

para $R_S \leq r \leq R_S + \triangle R$. Similarmente a partir de (191) y (193) obtenemos:

$$\Phi(r) = \begin{cases} \Phi_0 = -\frac{1}{200}, \mathrm{b}_0 \leq r \leq R_s + \Delta R \\ \frac{1}{2}\ln\left(1 - \frac{R_s}{100r}\right), r \geq R_s + \Delta R \end{cases} \tag{196}$$

18 Solución completa

A continuación resumimos la solución hallada en la sección 17.

$$b(r) = \begin{cases} b_0 e^{1-\frac{r}{b_0}}\ , \ \mathrm{b}_0 \leq r \leq r_c \\ \frac{r}{200}\ , \qquad r_c \leq r \leq R_s \\ \frac{R_s}{200} + \frac{\left(r^3 - R_s^3\right)}{3R_s^2}\ , R_s \leq r \leq R_s + \Delta R \end{cases}$$

con $r_c = 4{,}184\, b_0$.

$$\Phi(r) = \begin{cases} \Phi_0 = -\frac{1}{200}, \mathrm{b}_0 \leq r \leq R_s + \Delta R \\ \frac{1}{2}\ln\left(1 - \frac{R_s}{100r}\right), r \geq R_s + \Delta R \end{cases}$$

$$\varsigma = \begin{cases} 1 + \frac{b_0}{r} > 0 \quad , \quad b_0 \leq r \leq r_c \\ 0, \qquad r_c \leq r \leq R_s \end{cases}$$

$$\begin{aligned} \rho(r)\, c^2 &= -\frac{r\tau(r)}{b_0} \\ &= -\frac{2rP(r)}{r + b_0} < 0\,, \quad b_0 \leq r \leq r_c \end{aligned}$$

$$\tau(r) = \rho(r)\, c^2, \quad P(r) = 0\,, \quad r_c \leq r \leq R_s$$

En la capa de transición de espesor $\triangle R$

$$\rho = \frac{R_s \tau(R_s)}{\Delta R c^2},$$

$$\begin{aligned} \tau(r) &= \tau(R_s) - \left[\frac{\tau(R_s)}{\Delta R}\right](r - R_s)\,, \\ \text{para} \qquad & R_s \leq r \leq R_s + +\Delta R, \end{aligned}$$

y finalmente,

$$\tau = \rho c^2 = P = 0 \text{ para } r \geq R_s + \Delta R.$$

19 Viajando a través de un agujero de gusano con función de forma exponencial

Consideremos un viajero a bordo de una sonda espacial que se desplaza entre las dos estaciones espaciales descritas en la sección 11. Ya que para un agujero de gusano con función de forma exponencial se tiene, $e^{\Phi} \approx 1$ (ver 194), la velocidad radial de la sonda será aproximadamente $v(r) = dl/dt$, y la magnitud de su aceleración será entonces

$$\left|\frac{dv}{dt}\right| = \left|\frac{d^2l}{dt^2}\right| \leq g_{\oplus} \tag{197}$$

Supongamos que el viajero realiza la siguiente travesía: acelera partiendo del reposo desde la estación ubicada en $l = -l_1$ en dirección hacia la garganta del agujero de gusano hasta que se encuentra a medio camino de la misma, entonces desacelera hasta que llega a quedar en reposo en la garganta , luego acelera nuevamente alejándose de la garganta hasta que se encuentra a medio camino de la estación ubicada en $l = +l_2$ y finalmente desacelera llegando a quedar en reposo en dicha estación. Si las estaciones se encuentran ubicadas sobre la superficie de la esfera en la que está confinado el wormhole, entonces $l_1 = l_2 = R_s$

La velocidad máxima del viajero en cualquiera de las cuatro etapas de la mencionada travesía es

$$\begin{aligned} v_{\max} &= (g_{\oplus} R_s)^{\frac{1}{2}} \\ &= 9{,}9 \times 10^5 \, (m/s) \left(\frac{R_s}{10^{11} m}\right)^{\frac{1}{2}} \\ &= 3{,}3 \times 10^{-3} c \left(\frac{R_s}{10^{11} m}\right)^{\frac{1}{2}}. \end{aligned} \tag{198}$$

Si reemplazamos $v_{\text{máx}}$ por c en la expresión (198), obtenemos que $R_s << 10^{16}[m]$, por lo que

$$\gamma_{\text{máx}} = \left(1 - \left(\tfrac{v_{\text{máx}}}{c}\right)^2\right)^{-\frac{1}{2}} \approx 1.$$

Entonces, los tiempos empleados en viajar desde la una estación hasta la otra, medidos tanto por el viajero a bordo de la sonda como por los observadores en reposo en las estaciones espaciales serían:

$$\begin{aligned} \Delta\tau_T &\approx \Delta t \approx \int_{-l_1}^{+l_2} \frac{dl}{v} \\ &\approx \frac{4}{(2g_{\oplus})^{\frac{1}{2}}} \int_0^{\frac{R_s}{2}} \frac{dl}{l^{\frac{1}{2}}} \\ &= 4 \left(\frac{R_s}{g_{\oplus}}\right)^{\frac{1}{2}}. \end{aligned} \tag{199}$$

La última ecuación también se puede escribir:

$$\Delta\tau_T = \Delta t = 4{,}68 \, (dias) \times \left(\frac{R_s}{10^{11} metros}\right)^{\frac{1}{2}}. \tag{200}$$

Si tomamos (ver ecuación 190) $R_s = 4{,}6 \times 10^{13}$ metros, obtenemos $\triangle\tau_T = \triangle t = 100{,}38 \ \ días$, por lo que el viaje completo requerirá un tiempo de 100 días aproximadamente.

Conclusiones

Una de las más fascinantes predicciones de la Teoría General de la Relatividad de Einstein es la posible existencia de agujeros de gusano (túneles en el hiperespacio que conectan dos puntos en el universo). Desde 1985, principalmente, son el objeto de estudio de numerosos físicos alrededor del mundo.

En este artículo, hemos revisado las propiedades fundamentales de los agujeros de gusano del tipo Morris-Thorne. Hemos visto cómo la materia exótica (si existe) de la que estarían formados dichos agujeros, viola la Condición de Energía Nula (NEC). En la actualidad, sin embargo, sabemos que ciertos campos cuánticos pueden violar dicha condición. Ejemplos de tal violación son la radiación emitida por un agujero negro (radiación Hawking) y el "Efecto Casimir" que viola además las otras condiciones (WEC, SEC, DEC).

En la sección 16 hemos presentado una nueva solución a las ecuaciones derivadas por Morris-Thorne (ecuaciones 57, 58, 59). Para hallar dicha solución, hemos empleado la misma filosofía usada por Morris y Thorne, probando con funciones $b(r)$ y $\Phi(r)$ que permitan construir un agujero de gusano apropiado para un viaje interestelar. En la mencionada solución, el factor de forma $b = b(r)$ tiene carácter exponencial, mientras que la función de corrimiento hacia el rojo $\Phi = \Phi(r)$ es constante. A partir de esta solución, hemos construido una solución más realista (ver secciones 17 y 18) limitando el material exótico a la vecindad de la garganta del wormhole. Esta solución, por cierto, viola todas las condiciones de energía.

De existir el material exótico, una civilización muy avanzada podría hacer uso del mismo para crear un wormhole que podría estar abierto un intervalo de tiempo suficientemente largo para que se pueda viajar a través del mismo.

Partiendo de la función de forma exponencial, hemos demostrado que, para un viajero a bordo de una sonda espacial que se desplaza entre dos estaciones espaciales que se encuentran ubicadas sobre la superficie de la esfera en la que está confinado el wormhole, el tiempo

empleado en viajar desde una estación hasta la otra (medido tanto por el viajero a bordo de la sonda como por los observadores en reposo en las estaciones espaciales) sería, para $R_S = 306{,}7$ unidades astronómicas, aproximadamente 100 días. Este es un tiempo muy razonable para un viaje de las características mencionadas.

Sin embargo, y como lo señalan Morris y Thorne, el agujero de gusano podría ser inestable: "El material exótico podría interactuar fuertemente con la materia ordinaria, haciendo que el viaje a través del mismo sea impracticable, debido fundamentalmente a las enormes fuerzas de marea generadas por el campo exótico".

Solamente un claro entendimiento de la estructura del material exótico nos permitirá tener una mejor idea de si es posible o no la construcción de un agujero de gusano practicable. Nuestro estado de conocimiento hasta el presente, no nos permite excluir la existencia de dichos agujeros.

Referencias

[1] Thorne, K.S. 1994. "Black holes and time warps: Einstein's outrageous legacy." W. W. Norton & Company. New York, NY .

[2] Kaku, M. 1994. " Hyperspace." Oxford University Press, Inc. New York, NY.

[3] Kenyon, I. R. 1996. "General Relativity." Oxford University Press. Oxford, UK.

[4] Schutz, B. F. 2005. "A first course in general relativity." Cambridge University Press. Cambridge, UK.

[5] Marín, C. 2009. "Cayendo hacia un agujero negro de Schwarzschild." *Avances en Ciencias e Ingenierías.* 1, 79-90.

[6] Marín, C. 2007. "La Expansión del Universo." Una Introducción a cosmología, relatividad General y física de partículas. Quito-Ecuador.

[7] Einstein, A., Rosen, N. 1935. "The particle problem in the general theory of relativity." *Phys. Rev.* 48, 73-77.

[8] Chaisson, E., Mc Millan, S. 2004. "Astronomy." 4^{th} edition, Pearson-Prentice Hall. New York, NY.

[9] Morris, M. S., Thorne, K. S. 1988. "Wormholes in spacetime and their use for interstellar travel: A tool for teaching general relativity." *Am. J. Phys.* 56, 395-412.

[10] Misner, C. W., Thorne, K.S. and Wheeler, J. A. 1973. "Gravitation." W. H. Freeman & Company. New York, NY.

[11] Lobo, F. S. N. 2005. "Energy conditions, traversable wormholes and dust shells." *Gen. Rel. Grav.* 37, 2023-2038.

[12] Candelas, P. 1980. "Vacuum polarization in Schwarzschild spacetime." *Phys. Rev. D.* 21, 2185-2202.

[13] Khabibullin, A. R., Khusnutdinov, N. R., Sushkov, S. V. 2006. "Casimir effect in a wormhole spacetime." *Class. Quant. Grav.* 23, 627-634.

[14] Tipler, F. J. 1978. "Energy conditions and spacetime singularities." *Phys. Rev. D.* 17, 2521-2528.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
COMUNICACIÓN/COMMUNICATION SECCIÓN/SECTION B

Evidencia de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos provenientes de bacterias ambientales

Patricio A. Valencia C.[1*], **Verónica Barragán**[1], **Gabriel A. Trueba P.**[1]

[1] *Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
[*] *Autor principal/Corresponding author, e-mail: pv86@hotmail.com.*

Editado por/Edited by: S. Zapata, M.Sc.
Recibido/Received: 02/09/2010. Aceptado/Accepted: 04/01/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 05/25/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

This study looked for the presence of environmental antibiotic resistance genes and their capacity to disseminate through conjugation. Water and soil samples were collected from pristine zones of the Ecuadorian Amazon Basin (Sucumbíos, Napo and Orellana provinces), and they were inoculated in a modify wheat grain medium (WGM). Some of WGM cultures contained diverse bacterial species that were able to transfer antibiotic resistance genes to *Escherichia coli* K12. Finally, 10 strains were isolated and proved to be responsible of antibiotic resistance gene transfer. Strains were identified (using 16S rDNA sequences) as *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., *Listonella* sp., and *Aeromonas* sp. In this work, we proved that environmental bacteria can transfer antibiotic resistance genes as tetraciclin and ampicilin.

Keywords. Conjugation, horizontal gen transfer, antibiotic resistance genes, environmental bacteria.

Resumen

El presente estudio exploró la presencia y la capacidad de diseminación de genes de resistencia a antibióticos provenientes de bacterias ambientales. Se recolectó muestras de agua y suelo de zonas prístinas de la Amazonía ecuatoriana (provincias de Sucumbíos, Napo y Orellana) las cuales fueron inoculadas en un medio de grano de trigo modificado (WGM). Algunos de estos cultivos multi-bacterianos (mixtos) demostraron tener bacterias capaces de transferir genes de resistencia a antibióticos a una cepa de *Escherichia coli* K12. A partir de los cultivos mixtos se aisló 10 cepas bacterianas responsables de esta transferencia. Las cepas aisladas fueron identificadas mediante el secuenciamiento del gen del ARN ribosomal 16S (16S rDNA) como *Serratia* sp., *Pseudomonas* sp., *Listonella* sp. y *Aeromonas* sp. El hallazgo más importante del presente trabajo fue el probar que existe transferencia de genes que proveen resistencia a antibióticos como la tetraciclina y ampicilina a partir de bacterias ambientales.

Palabras Clave. Conjugación, transferencia horizontal de genes, genes de resistencia a antibióticos, bacterias ambientales.

Introducción

La existencia de una amplia diversidad de bacterias resistentes a antibióticos ha sido relacionada con el uso masivo de estos fármacos en el tratamiento de infecciones y en prácticas de ganadería. Sin embargo, los genes de resistencia a antibióticos están presentes en bacterias que pululan en ríos y suelos de zonas remotas, lejanas a la actividad humana. Más aún, el medio ambiente probablemente fue el escenario natural donde se originaron y evolucionaron estos genes [1]. Existe evidencia de que estos genes han evolucionado y se han diversificado antes de la llamada era de los antibióticos [2]. Los antibióticos por lo general son producidos por miembros de comunidades microbianas ambientales complejas, muchos antibióticos actúan como un medio de comunicación química entre bacterias. Otros antibióticos sirven para eliminar la competencia por nutrientes. Las bacterias del suelo y de los ríos han estado expuestas a antibióticos por miles de millones de años y han evolucionado genes que codifican mecanismos de protección (genes de resistencia a antibióticos). La colonización y urbanización de bosques remotos no solo expone a la humanidad a nuevas enfermedades tropicales sino a nuevos genes de resistencia a antibióticos [3]. El propósito de esta investigación fue identificar genes de

ISSN 1390-5384

resistencia a antibióticos provenientes de bacterias ambientales capaces de ser transferidos a bacterias de la microbiota intestinal humana (*E. coli*).

Materiales y métodos

Recolección de muestras:

Diez muestras de agua y suelo fueron tomadas de las regiones de Saladero, Tena y Papallacta (Provincia de Napo), Aguas Negras, Lago Agrio (Provincia de Sucumbíos) y Tiputini (Provincia de Orellana). Las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente.

Tamizaje de poblaciones bacterianas con genes de resistencia a antibióticos

Se preparó medio grano de trigo modificado (WGM) para lo cual se tomó 5 gramos de suelo, se lo colocó en 8 ml de agua destilada (en un tubo de cristal), se añadió un grano de trigo y se sometió a esterilización por autoclave. Luego, se adicionó 2 gramos de cada muestra de suelo ó 1 ml de muestra de agua a un tubo con 8 ml de WGM y se cultivó a temperatura ambiente entre 2 a 3 semanas en presencia de luz blanca. Cada una de las muestras de agua y suelo sembradas en medio WGM se denominaron cultivos mixtos. Un mililitro del cultivo mixto en medio WGM fue colocado en un tubo con 4 ml de caldo BHI y se incubó durante 24 horas a 37 °C.

Para la conjugación se añadió al tubo del cultivo mixto (en BHI) un volumen similar de caldo BHI en el que se cultivó (24 horas a 37 °C) la cepa receptora *E. coli* k12 resistente a ácido nalidíxico (K12RAN). Finalmente se tomó 100ul del caldo de conjugación y se lo extendió en dos tipos de medios: A) placas agar nutritivo con ácido nalidíxico (15 ug/ml) y ampicilina (50 ug/ml) y B) agar nutritivo con ácido nalidíxico (15 ug/ml) y tetraciclina (12 ug/ml). Todas las colonias que crecieron en los medios con antibióticos identificadas como *E. coli* (transconjugados) fueron seleccionadas, cultivadas y almacenadas en congelación.

Aquellos cultivos mixtos a partir de los cuales se obtuvo crecimiento de transconjugados en los medios A y B fueron utilizados para aislar cepas individuales capaces de transferir resistencia a antibióticos.

Identificación de bacterias donadoras

Los cultivos mixtos en WGM con bacterias donadoras de genes de resistencia a antibióticos fueron extendidos en dos tipos de placas petri: (i) agar nutitivo mas ampicilina (50 μg/ml) y (ii) agar nutritivo mas tetraciclina (12 μg/ml). Cada colonia aislada fue sembrada en un tubo con 4 ml de caldo BHI e incubada por 24 horas a 37 °C. Para la conjugación se añadió al tubo del cultivo mixto (en BHI) un volumen similar de caldo BHI en el que se cultivó (24 horas a 37 °C) la cepa receptora *E. coli* K12RAN.

Localidad de Colección	Blast Highest Hit
Aguas Negras	*Serratia marcensces strain RS25*
Tiputini	*Pseudomonas aeruginosa strain LCB52*
Tiputini	*Listonella anguillarum strain MHK12*
Tiputini	*Serratia marcensces strain RI42*
Lago Agrio	*Serratia nematodiphila strain P36*
Lago Agrio	*Serratia marcensces strain RS25*
Lago Agrio	*Serratia marcensces strain RI42*
Tena	*Aeromonas sp. A33*
Aguas Negras	*Serratia marcensces strain RS25*
Tiputini	*Serratia marcensces strain RI42*

Tabla 1: Sitios de aislamiento y Blast Highest Hit de las cepas ambientales que mostraron capacidad para transferir resistencia a ampicilina o tetraciclina hacia *E. coli* K12RN.

Se tomó 100ul de cada caldo de conjugación y se lo extendió en dos tipos de medios: A) y B) según se describió previamente. La capacidad de cada bacteria aislada para transferir genes fue determinada mediante conjugación. Las colonias bacterianas capaces de transferir genes fueron cultivadas individualmente y sometidas a congelación.

Para la identificación genética de las bacterias capaces de trasnferir genes de resistencia a antibióticos, se extrajo ADN utilizando CTAB (CTAB 2 %, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM pH 8, HCl 100 mM pH 8). Posteriormente se amplificó la región V3 del rDNA 16S utilizando los primers 16SV3f (5'-CTACGGGAGGCAGCAG-3') y 16SV3r (5'-ATTACCGCGGTGCTGG-3'), esta región corresponde a la posición 341 - 534 en *E. coli*. [4] Para la amplificación se utilizó 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.3uM de cada primer, 200 μM de dNTP's y 1 U de Taq polimerasa. Las condiciones programadas en el termociclador para la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C (4 minutos), seguida de 30 ciclos de amplificación a 94 °C durante 30 segundos para la desnaturación, 55 °C (1 minuto) para alinear los primers, elongación a 72 °C durante 30 segundos y una extensión final a 72 °C durante 20 minutos. Los amplicones fueron enviados a MACROGEN (Corea del Sur) para el secuenciamiento y las secuencias fueron posteriomente analizadas e identificadas utilizando el programa en red, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

Resultados y Discusión

Tamizaje de poblaciones bacterianas con genes de resistencia a antibióticos

De los cultivos mixtos en WGM provenientes de las 10 muestras recolectadas, 8 (1A, 2A, 3A, 3T, 4A, 4T, 5A y 5T) generaron transconjugados resistentes a antibioticos y presentaron resistencia a ampicilina (75 %) y a tetraciclina (25 %).

Identificación de cepas donadoras

Se amplificó un segmento de 200 pb perteneciente a la región 16s rDNA en cada una de las 10 cepas ambientales aisladas utilizando los primers 16SV3f y 16SV3r. El Blast Highest Hit para las secuencias correspondientes a cada una de las 10 cepas ambientales se muestra en la Tabla 1, y corespondieron a los géneros *Serratia*, *Pseudomonas*, *Listonella* y *Aeromonas*.

En el presente estudio se identificó bacterias ambientales de la región Amazónica ecuatoriana capaces de transferir genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina a *E. coli*. El método utilizado demostró ser eficiente para evidenciar la presencia de genes de resistencia a antibióticos de origen ambiental. Este estudio corrobora los resultados de otras investigaciones realizadas en regiones remotas del mundo como Alaska [5]. Se ha intentado sin éxito amplificar las secuencias de los genes de resistencia a ampicilia provenientes de la Amazonía utilizando primers TEMf y TEMr (que amplifican una amplia variedad de beta lactamasas). Esta observación sugiere que estos genes son distintos a los previamente descritos. No obstante con el fin de confirmar este hecho es necesaria la caracterización de los genes capturados durante el estudio [6]. Hasta donde hemos podido indagar, esta investigación muestra por primera vez el fenómeno de transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos a partir de bacterias ambientales aisladas en zonas prístinas de la Amazonía ecuatoriana. Los hallazgos generados en este estudio nos permitirán continuar con estudios similares que ayuden a conocer más sobre el origen y la evolución de los genes que codifican para la resistencia a antibióticos.

Agradecimientos

Al Instituto de Microbiología de la USFQ por el financiamiento de este proyecto. A Daysi Parrales por toda su ayuda.

Referencias

[1] Allen, K. 2009. Functional metagenomics reveals diverse beta lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME Journal*. 3, 243–251.

[2] Bustos, E. 1985. Transferencia plasmidial de multirresistencias en cepas enteropatogénicas de *E. coli*. *Revista Chilena de Pediatría*. 56, 445–449.

[3] Correa, G. 2008. Impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo de la medicina contemporánea. *Revista Médica*. 16, 9–10.

[4] Gérvas, J. 2000. La resistencia a los antibióticos un problema de salud pública. *Atención Primaria*. 25, 589–596.

[5] Hall, B. 2004. Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. *Nature*. 2, 430–435.

[6] Jorgen, J. 2005. Ribosomal DNA sequencing. *APMIS*. 113, 621–628.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
ARTÍCULO/ARTICLE SECCIÓN/SECTION B

Evaluación preliminar de la diversidad genética del leoncillo *Callithrix pygmaea* (Primates: Cebidae: Callithrichinae) mediante microsatélites (SSR: Short Sequence Repeat)

Diego A. Nieto M.[1], **Stella de la Torre**[1*], **Ana Troya**[1], **Venancio Arahana**[1], **María L. Torres**[1]

[1] *Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
[*] *Autor principal/Corresponding author, e-mail: sdelatorre@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: C. Zambrano, Ph.D.
Recibido/Received: 02/08/2010. Aceptado/Accepted: 03/20/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 05/21/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

The pygmy marmoset (*Callithrix pygmaea*) is one of the most specialized Ecuadorian primate species. Its high specialization in habitat and diet, and the increase of human activities in the Amazon region may cause pygmy marmosets to go through population bottle necks, losing genetic diversity. To estimate the magnitude of this threat, since 2008 we carried out a pilot study for evaluating the genetic diversity of four wild groups of this species in a population located on the margins of the Aguarico river. For the genetic analyses we used 50 fecal samples collected from September 2008 to February 2009; 50 % of the samples belonged to group P4, groups P1, P2 and P5 provided the remaining 50 %. We extracted DNA from the feces using the QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). With PCR we amplified 9 microsatellite primers reported for a related species of Callitrichinae. DNA bands were visualized in polyacrylamide (6 %) and urea (5M) gels. Statistical analyses were carried out with GenAlEx 6 software. Three to eight alleles were found per locus. The Hardy-Weinberg equilibrium test suggested that inbreeding may be occurring in group P4. Expected heterocigocity in groups P1 and P2 is 0.5, while in group P4 ranges from 05. to 0.836. Nei's genetic distance between groups P1 and P2 is 1.211, whereas group P4 differs 0.612 and 0.485 from groups P2 and P1, respectively. This is the first study of this type for this species in Ecuador and elsewhere, the results point out the need to evaluate human impact on the genetic diversity of Ecuadorian species.

Keywords. *Callithrix pygmaea*, genetic diversity, microsatellites (SSR).

Resumen

El leoncillo (*Callithrix pygmaea*) es uno de los primates ecuatorianos con mayor grado de especialización de hábitat y de dieta. Esta alta especialización y la intensificación de las actividades humanas en la Amazonía ecuatoriana podrían causar que las poblaciones del leoncillo atraviesen por cuellos de botella y pierdan su diversidad genética. Con el fin de estimar la magnitud de esta amenaza, desde el año 2008, se realizó un estudio piloto para evaluar el nivel de variabilidad genética de cuatro grupos de esta especie de una población a orillas del río Aguarico. Para la realización del análisis genético se utilizó un total de 50 muestras de heces, colectadas durante el período de septiembre 2008 y febrero 2009; el 50 % de las muestras correspondió al grupo P4, los grupos P1, P2 y P5 aportaron con el restante 50 %. A partir de estas muestras se extrajo ADN con el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN). Mediante la técnica de PCR se amplificaron nueve primers de microsatélites reportados para otra especie de Callitrichinae. La visualización de bandas se realizó en geles denaturantes de poliacrilamida al 6 % y Urea 5M. El análisis estadístico fue realizado con el programa GenAlEx 6. Los resultados obtenidos muestran que existen de 3 a 8 alelos/locus, la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg sugiere que en el grupo P4 puede estar sucediendo endogamia, la heterocigocidad esperada en los grupos P1 y P2 tiene valores de 0.5, mientras que los valores del grupo P4 varían de 0.5 a 0.836. La distancia genética de Nei entre los grupos P1 y P2 es de 1.211, mientras que el grupo P4 difiere 0.612 y 0.485 con respecto de los grupos P2 y P1. Este estudio es pionero en este campo y evidencia la necesidad de continuar con investigaciones para evaluar el impacto humano sobre la diversidad genética en esta y otras especies ecuatorianas.

Palabras Clave. *Callithrix pygmaea*, diversidad genética, microsatélites (SSR).

ISSN 1390-5384

CC BY NC SA

Introducción

La conservación de las especies de primates ecuatorianos es fundamental ya que estas mantienen la estructura y dinámica de los ecosistemas. Estas especies están actualmente amenazadas por la destrucción de hábitats, la cacería y el tráfico de animales. Como consecuencia muchas especies han reducido su número o se han extinguido localmente [1, 2].

El leoncillo (*Callithrix pygmaea*) es la especie más pequeña de primate antropoide en el mundo. Estudios sobre su ecología y comportamiento han sido realizados por de la Torre y colaboradores [2] en diferentes poblaciones de la Amazonía ecuatoriana; entre ellas, la población San Pablo, que se encuentra ubicada en las orillas del río Aguarico (coordenadas UTM, Zona 18, Datum PSAD 56 341767 E, 9969737 N, Figura 1), en la que se realizó el presente estudio.

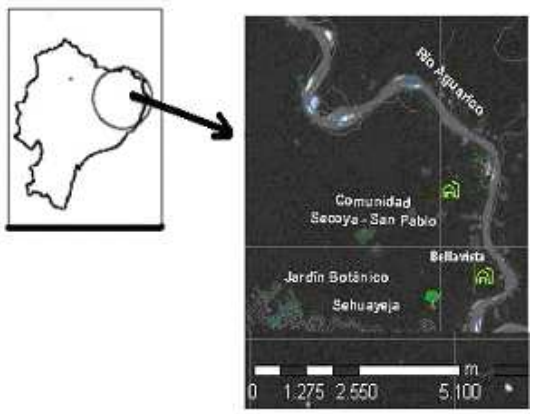


Figura 1: Localización de los grupos de leoncillos P1, P2, P3, P4 y P5 (población San Pablo - sector Bellavista).

La localidad de San Pablo tiene una altitud de 260 msnm y originalmente estuvo cubierta de bosques de varzea, inundados temporalmente por aguas blancas, que en algunas áreas han sido talados para actividades agrícolas [2]

El tamaño de los grupos de leoncillos en Ecuador varía de 2 a 8 individuos incluyendo infantes, siendo el tamaño promedio 6 individuos por grupo. Estos se encuentran conformados por una pareja de adultos (macho y hembra), entre 0 a 3 sub-adultos, entre 0 a 2 juveniles e infantes. El área de vida promedio de los grupos es de 0.9 hectáreas [2]. Su principal fuente de alimento son exudados provenientes de las especies de árboles *Sterculia apetala*, *Cedrela odorata*, *Inga marginata* y *Parkia balslevii*, entre otras [3].

El leoncillo es uno de los primates ecuatorianos con mayor grado de especialización de hábitat y dieta [2]. Esta alta especialización y la intensificación de las actividades humanas en la Amazonía ecuatoriana podrían causar que las poblaciones de esta especie atraviesen por cuellos de botella y pierdan su diversidad genética. Es por estos motivos que el presente estudio tiene como fin evaluar en forma preliminar el nivel de variabilidad genética de una población de esta especie, para estimar si esta ha atravesado por un cuello de botella poblacional y/o si la fragmentación de hábitats está afectando a los procesos naturales de dispersión y reproducción de los individuos. La información generada por este estudio, pionero en este campo, es importante para delinear acciones de conservación y manejo de esta especie y para evaluar el impacto humano sobre la diversidad genética en esta y otras especies ecuatorianas.

Metodología

Obtención de muestras

La colección de muestras fecales se realizó entre septiembre de 2008 y febrero de 2009. Cuatro grupos de leoncillos (P1, P2, P4 y P5) de la población San Pablo localizados en las orillas del Río Aguarico fueron observados periódicamente para recolectar las heces de los individuos. La colección consistió en ubicar hojas grandes de plátano (*Musa x paradisiaca*) en la base del principal árbol de exudados de cada grupo. Posteriormente, cada muestra fue colocada en papel filtro y a su vez guardada en un frasco con un desecante (sílica gel). Los frascos con las muestras así conservadas fueron expuestas al sol durante uno o dos días para reducir la proliferación de hongos en las heces. Finalmente, después de ser transportados a Quito, los frascos fueron guardados en un congelador a -20 ^{o}C.

Extracción de ADN

La extracción de ADN a partir de las muestras de heces fecales fue realizada mediante el protocolo (*QIAamp DNA Stool Handook*) que se encuentra en el kit de extracción QIAamp DNA Stool Mini Kit de *QIAGEN*. Una cuantificación aproximada del ADN extraído se realizó en geles de agarosa al 1 %. La cuantificación espectrofotométrica de ADN se realizó utilizando el equipo NANODROP 1000.

Primer	Temp. óptima de annealing (^{o}C)	Total de muestras amplificadas	Rango de peso de bandas obtenidas (pb)
CJ-1	58	11	128-176
CJ-6	58	0	-
CJ-7	50	13	119-127
CJ-10	50	4	217-243
CJ-11	50	14	106-142
CJ-12	58.4	27	132-168
CJ-13	50	0	-
CJ-14	56.2	9	156-184
CJ-15	50	15	124-138

Tabla 1: Temperaturas de annealing, número de muestras amplificadas y pesos de bandas (pb) para los primers transferidos a la especie C. *pygmaea*. Se observa que siete primers fueron transferidos y que sus temperaturas de annealing están entre 50 y 58 ^{o}C.

Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR

La amplificación de los microsatélites se realizó mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction).

Se utilizó los primers CJ-1, CJ-6, CJ-7, CJ-10, CJ-11, CJ-12, CJ-13, CJ-14 y CJ-15 establecidos por Nievergelt et al. [4] para la especie *Callithrix jacchus*. El volumen final de reacción fue de 25 μL el cual incluía buffer 1X, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 μM de dNTP's, 0.24 μM de cada primer, 0.5U de Taq polimerasa (Invitrogen) y 5 ng de ADN.

El programa de amplificación consistió en 3 minutos de denaturación inicial a 95 ^oC; 40 ciclos de denaturación a 94 ^oC durante 1 minuto, annealing de 50 o 58 ^oC, según el primer, durante 1 minuto y extensión a 72 ^oC durante 1 minuto. La extensión final se hizo a 72 ^oC durante 5 minutos (Tabla 1).

Análisis de microsatélites

La separación de las bandas se realizó mediante electroforesis en geles denaturantes de poliacrilamida al 6 % y úrea 5 M, en cámaras verticales Sequi-Gen® (BIO-RAD). Los geles se revelaron mediante la técnica de tinción con plata [5].

Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico no se incluyeron las muestras para las que no se obtuvo amplificación. También se redujo el número de loci a ser analizados (Tabla 2), debido a que en los loci *CJ-10* y *CJ-14* se obtuvo un bajo número de muestras amplificadas por grupo. Además, se descartó el uso del grupo P5 ya que no se obtuvo ninguna amplificación de ningún primer.

El análisis estadístico se realizó con el software GenAlEx 6 para determinar los siguientes parámetros poblacionales: frecuencias alélicas, equilibrio Hardy-Weinberg, heterocigocidad observada (H_o) y heterocigocidad esperada (H_e), estadístico *Fst*, distancia genética de Nei y análisis de coordenadas principales (PCoA).

Grupo	Locus	Número de muestras	Número de alelos (Na)	Ho	He
P1	CJ-1	1	1	0.000	0.000
	CJ-7	1	2	1.000	0.500
	CJ-11	0	0	0.000	0.000
	CJ-15	1	1	0.000	0.000
	CJ-12	3	2	1.000	0.500
P2	CJ-1	0	0	0.000	0.000
	CJ-7	1	2	1.000	0.500
	CJ-11	0	0	0.000	0.000
	CJ-15	3	2	1.000	0.500
	CJ-12	3	4	1.000	0.722
P4	CJ-1	9	8	0.556	0.815
	CJ-7	8	3	1.000	0.625
	CJ-11	9	4	0.667	0.512
	CJ-15	8	7	0.750	0.836
	CJ-12	12	2	1.000	0.500

Tabla 2: Heterocigocidad observada (Ho) y Heterocigocidad esperada (He), número de muestras amplificadas y número de alelos por locus para los grupos de leoncillos P1, P2 y P4.

Resultados y Discusión

Muestras obtenidas

Un total de 53 muestras fueron obtenidas para los cuatro grupos de leoncillos, de éstas las que se utilizaron en los análisis iniciales fueron: 8 para el grupo P1, 13 para el grupo P2, 25 para el grupo P4 y 7 para el grupo P5.

El peso promedio de las muestras de heces para el grupo P1 fue de 0.073 g, para el grupo P2 fue de 0.069 g, para el grupo P4 fue de 0.088 g y para el grupo P5 fue de 0.078 g. El tamaño de las muestras se debe al pequeño tamaño de los animales de la especie en estudio (aprox. 12 cm los individuos adultos, [1]).

Cuantificación de ADN

Con base en la intensidad de las bandas de los geles de agarosa al 1 % se observó que para ciertas muestras se obtuvo una cantidad moderada de ADN, mientras que para otras hubo cantidades menores (Figura 2).

En la cuantificación espectrofotométrica de ADN las muestras del grupo P1 tuvieron una concentración de ADN promedio de 11.85 ng/uL, las del grupo P2 12.21 ng/uL, grupo P4 18.75 ng/uL y grupo P5 6.46 ng/uL. Las bajas concentraciones de ADN de este último grupo impidieron la posterior amplificación de los primers y determinaron su exclusión de los análisis estadísticos.

Estos resultados son confirmados por otros estudios en los cuales el ADN obtenido a partir de muestras no invasivas, por lo general heces fecales, posee baja calidad (ADN degradado, inhibidores para PCR y contaminación por otro ADN) y cantidad (el ADN que se obtiene se encuentra en el rango de picogramos). Esto trae como consecuencia errores en otras técnicas posteriores como el PCR, ya que puede presentarse la pérdida de alelos o la presencia de alelos falsos y a su vez da como resultado una falsa genotipificación de la especie en estudio [6].

Amplificación de ADN microsatélite mediante PCR

Siete de los nueve primers establecidos por Nievergelt et al. [4] para la especie *Callithrix jacchus* fueron transferidos a la especie *Callithrix pygmaea*. Los primers que amplificaron bandas del tamaño esperado fueron CJ-1, CJ-7, CJ-10, CJ-11, CJ-12, CJ-14 y CJ-15, equivalente al 78 % de los primers probados. Esto corrobora lo reportado en otros estudios sobre la posibilidad de que los marcadores moleculares microsatélites (SSR) pueden ser utilizados entre especies del mismo género o hasta de la misma familia [4, 7, 8].

Estadísticos poblacionales

Para los cinco loci analizados (*CJ-1*, *CJ-7*, *CJ-11*, *CJ-12* y *CJ-15*) el número de alelos por locus varió entre 3 y 8, estos valores son similares a los obtenidos en la especie *Callithrix jacchus* (2-6 alelos/locus) [9]. Con respecto a las frecuencias alélicas en los tres grupos, el locus *CJ-1* posee un rango de 0.056 a 1.00, el locus *CJ-7* de 0.25 a 0.5, el locus *CJ-11* de 0.056 a 0.667, el locus *CJ-12* de 0.167 a 0.5 y el locus *CJ-15* de 0.063 a 1.00. Con base en las frecuencias alélicas de los diferentes loci, el test de equilibrio *Hardy-Weinberg* sugiere que los grupos P1 y P2 parecen estar reproduciéndose al

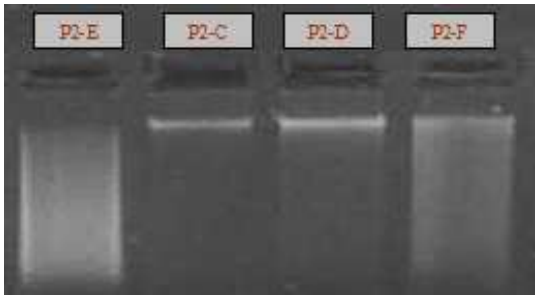


Figura 2: Electroforesis de ADN extraído a partir de heces de C. *pygmaea* del grupo P2 en geles de agarosa al 1 %, para evaluar la concentración y calidad de ADN.

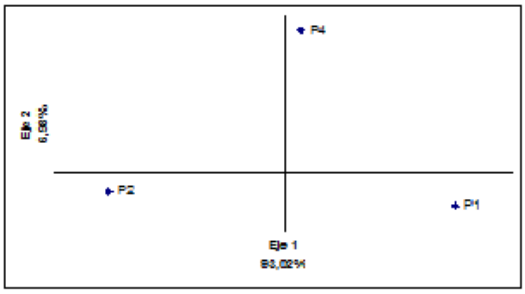


Figura 3: Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) entre los grupos de leoncillos P1, P2 y P4 a partir de la distancia genética de Nei. Se observa una diferencia de 93,02 % de los grupos P1 y P4 con el grupo P2, tomando en cuenta el Eje 1.

azar (P=0.083-0.317). Sin embargo, en el grupo P4, tres loci muestran frecuencias alélicas que se desvían significativamente de las esperadas por azar (CJ-7, P=0,046; CJ-12, P=0,001 y CJ-15, P=0,047). Esto sugiere que en este grupo no se están dando cruces al azar, lo cual sucede cuando individuos emparentados se aparean en una proporción mayor, reduciendo de cierta manera la heterocigocidad y aumentando la homocigocidad. Esto puede producir, a su vez, una reducción en la diversidad genética por depresión endogámica, si los alelos recesivos deletéreos o letales se representan en estado homocigoto [10].

En el grupo P1 la heterocigocidad esperada para el locus *CJ-7* fue de 0.5 igual que para el locus *CJ-12*. En el grupo P2 las heterocigocidades esperadas obtenidas fueron de 0.5 para el loci *CJ-7* y *CJ-15* y de 0.722 para el locus *CJ-12*. Las heterocigocidades esperadas en el grupo P4 fueron de 0.815, 0.625, 0.512, 0.836 y 0.5, para los loci *CJ-1*, *CJ-7*, *CJ-11*, *CJ-15* y *CJ-12*, respectivamente (Tabla 2). Estos niveles de heterocigocidad son altos en comparación con la heterocigocidad de 0.35 obtenida en *Callithrix jacchus* [9] pero son necesarios más datos para concluir algo sobre las diferencias genéticas entre las dos especies.

La distancia genética obtenida a partir del índice F_{st} entre los grupos P1 y P2 es de 0.569; entre los grupos P1 y P4 es de 0.265, y entre los grupos P2 y P4 es de 0.306. Esto indica que existe una diferencia genética moderada entre los grupos P1 y P2, mientras que el grupo P4 no se diferencia mayormente de los grupos P1 y P2.

Estos resultados se corroboran con los cálculos de la distancia genética de Nei que muestran que existe una distancia genética de 1.211 entre el grupo P1 y P2, mientras que el grupo P4 difiere 0.612 y 0.485 con respecto de los grupos P2 y P1, respectivamente. El PCoA calculado a partir de esta matriz indica que los grupos P1 y P4 difieren en un 93.02 % del grupo P2 (considerando el Eje 1), mientras que los grupos P2 y P1 difieren en un 6.98 % del grupo P4 (considerando el Eje 2) (Figura 3).

Estos patrones parecen estar relacionados con barreras físicas para la dispersión entre los grupos: los grupos P1 y P2, que son los más distantes genéticamente, tienen áreas abiertas, casas y cultivos como barreras entre sus áreas de vida. Los grupos P1 y P4 (que tienen las menores distancias genéticas) hasta hace aproximadamente 2 años tenían un bosque que conectaba las áreas de vida de ambos grupos. Entre las áreas de vida de los grupos P2 y P4 (distancia genética intermedia) existen áreas abiertas con algunos árboles pero no existen viviendas [2, 11]

Conclusiones

Este estudio piloto demostró que se puede obtener ADN de poblaciones silvestres de leoncillos por métodos no-invasivos, un aporte importante considerando la vulnerabilidad de esta especie a la captura y manipulación [2].

La variabilidad del ADN obtenido de los grupos de leoncillos fue analizado mediante un protocolo de PCR (Polymerase Chain Reaction) con cinco pares de primers inicialmente usados en una especie hermana C. *jacchus*. Este estudio es pionero en este campo y evidencia la necesidad de continuar con investigaciones para evaluar el impacto humano sobre la diversidad genética en esta y otras especies ecuatorianas.

Agradecimientos

Investigación financiada gracias al programa de becas Small Grants de la USFQ, con apoyo adicional de fundación VIHOMA y University of Wisconsin, Madison, USA. Agradecemos especialmente a Hernán Payaguaje y Pablo Yépez por su ayuda en la recolección de muestras en el campo y a Charles T. Snowdon por su apoyo con materiales para el estudio de laboratorio.

Referencias

[1] de laTorre, S. 2000. “Primates de la amazonía ecuatoriana.” Proyecto Petramaz/SIMBIOE. Quito.

[2] de laTorre, S., Yépez, P., and Snowdon, C. 2009. “Conservation status of Pygmy Marmosets *Callithrix (Cebuella) pygmaea* in Ecuador”, The smallest anthropoids: The Marmoset/Callimico radiation.

[3] Yépez, P., de laTorre, S., and Snowdon, C. 2005. “Interpopulation differences in exudate feeding of pygmy marmosets in ecuadorian Amazonia”. *American Journal of Primatology*. 145–158.

[4] Nievergelt, C., Mundy, N., and Woodruff, D. 1998. "Microsatellite primers for genotyping common marmoset (*Callithrix jacchus*) and other callitrichids". *Molecular Ecology*.

[5] Benbouza, H., Jacquemin, J., and Baudoin, J. 2006. "Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels", Vol. 10, No. 2.

[6] Chu, J., Lin, Y., and Wu, H. 2006. "Applicability of noninvasive sampling in population genetic study of taiwanese macaques (*Macaca cyclopis*)". *Taiwania*. 51, 258–265.

[7] Clisson, M., Lathuilliere, M., and Crouau-Roy, B. 2000. "Conservation and evolution of microsatellite loci in primate taxa". *American Journal of Primatology*. 50, 205–214.

[8] Muniz, L. and Vigilant, L. 2008. "Isolation and characterization of microsatellite markers in the white-faced capuchin monkey (*Cebus capucinus*) and cross-species amplification in other new world monkeys". *Molecular Ecology Resources*. 402–405.

[9] Nievergelt, C., Digby, L., Ramakrishnan, U., and Woodruff, D. 2000. "Genetic analysis of group composition and breeding system in a wild common marmoset (*Callithrix jacchus*) population". *International Journal of Primatology*. 21, 1–20

[10] Frankham, R., Ballou, J., and Briscoe, D. 2003. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press: United Kingdom.

[11] de laTorre, S., Yépez, P., Snowdon, C., and Payaguaje, A. 2005. "Ecología, comportamiento y conservación del leoncillo *Callithrix (cebuella) pygmaea* en Tierras Secoya". En: Caminando en el sendero, hacia la conservación del ambiente y la cultura Secoya. S. de la Torre y P. Yépez. Fundación VIHOMA. Quito.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
ARTÍCULO/ARTICLE SECCIÓN/SECTION B

Cultivo in vitro del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)

María L. Torres P.[1*], **Diana Trujillo P.**[1], **Venancio Arahana B.**[1]

[1] *Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad San Francisco de Quito*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
[*] *Autor principal/Corresponding author, e-mail: ltorres@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: S. de la Torre, Ph.D.
Recibido/Received: 02/25/2010. Aceptado/Accepted: 04/01/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 05/21/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

Due to the economic and agronomic potencial that mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) has in Ecuador, the objective of this research was to establish *in vitro* propagation methods for this species by seed germination and by shoot growth from axillary buds. Modified Woody Plant Medium [1] (mWPM) was used, in which up to 60.7 % of seeds germinated. A strong cytokine, trans-zeatin riboside, TZR (1 mg/l), combined with α-napthaleneacetic acid, NAA (0.05 mg/l), was used to subculture the *in vitro* germinated plantlets. The use of basal medium without hormones or with 2iP, 6-(gamma,gamma-dimethylalylamino) purine, allowed elongation and rooting of plantletss. The acclimatization of mortiño plants has not yet been standardized, and further research is needed to find the conditions that are suitable for this process. To establish *in vitro* cultures by axillary buds, apical segments of the stem were disinfected and introduced in medium mWPM containing TZR, (7 mg/l) combined with NAA (0.1 mg/l). Growing buds were transferred to media with 2iP (3 or 5 mg/l) for propagation and elongation. This investigation is a preliminary study for the *in vitro* culture of mortiño, setting the basis for future research with this species.

Keywords. trans-zeatin riboside (TZR), 6-(gamma,gamma-dimethylalylamino) purine (2iP), *Vaccinium floribundum* Kunth, in vitro germination, axillary buds.

Resumen

Debido al potencial agrícola y económico que tiene el mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) para el Ecuador, esta investigación tuvo como objetivo establecer métodos de propagación *in vitro* de esta especie como germinación de semillas y brotación de yemas axilares. Se utilizó un medio basal sin hormonas, Woody Plant Medium [1] modificado (mWPM), en el que las semillas germinaron con hasta un 60.7 % de eficiencia. Para el subcultivo de plántulas germinadas *in vitro* , se usó una citoquinina fuerte, la trans zeatina ribóside, TZR (1 mg/l) en combinación con ácido α-naftalenacético, NAA (0.05 mg/l). El medio basal sin hormonas o con 2iP, 6-(gamma,gamma-dimetilalilamino) purina, permitió la elongación de las plántulas germinadas in vitro y su enraizamiento. La aclimatación de las plantas de mortiño cultivadas *in vitro* aún no está estandarizada y se requiere mayor investigación para encontrar los factores necesarios para completar satisfactoriamente este proceso. Para la introducción *in vitro* de yemas axilares se desinfectaron los extremos apicales de tallos de mortiño, y se los introdujo en medio mWPM suplementado con TZR (7 mg/l) en combinación con NAA, (0.1 mg/l). Las yemas brotadas se subcultivaron en medios que contenían 2iP (3 ó 5 mg/l) para su propagación y elongación. Esta investigación representa un estudio piloto para el cultivo *in vitro* del mortiño, sentando las bases para futuras investigaciones con esta especie.

Palabras Clave. trans zeatina ribóside (TZR), 6-(gamma,gamma-dimetilalilamino) purina (2iP) , *Vaccinium floribundum* Kunth, germinación *in vitro*, brotación de yemas axilares.

Introducción

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) es una fruta de la familia de las Ericáceas que crece en forma silvestre en los páramos o zonas húmedas de las montañas de Ecuador y Colombia, entre 1400 hasta 4350 msnm de altitud. Es un arbusto pequeño que excepcionalmente puede alcanzar 3.5 m de altura, y la fruta es una baya esférica azul de menos de 1cm de diámetro, con sabor agridulce [2] (Figura 1). En Ecuador y Colombia, el mortiño es utilizado en mermeladas y en pastelería [3]. En Ecuador es conocido por su uso en la preparación de la colada morada, bebida típica del Día de los Difuntos [2]. Los frutos de *Vaccinium* contienen cantidades al-

ISSN 1390-5384

tas de vitamina C, pectina, celulosa y antocianinas, las cuales tienen propiedades antioxidantes, antitumorales, antiulcerales y antiinflamatorias [4].

A pesar de tener propiedades alimenticias y medicinales, no se ha fomentado el cultivo del mortiño en Ecuador, y los frutos que se venden en los mercados locales se obtienen de plantas silvestres [2]. En noviembre del 2008, la caja de mortiño se vendió por 40 dólares [5]. Con una tecnología adecuada, esta fruta podría competir a nivel mundial con otras frutas como el arándano y el *lingonberry* que son las versiones norteamericanas y europeas del mortiño [2]. Se ha investigado poco acerca de esta planta andina pero su potencial uso la convierte en una especie de interés para el desarrollo agrícola de variedades locales en el país.

El cultivo *in vitro* de plantas comprende una serie de técnicas o herramientas para la propagación y mejoramiento de especies vegetales [6]. Determinar el medio de cultivo apropiado y los balances hormonales que promuevan la proliferación y diferenciación celular es básico para aprovechar las potencialidades de las técnicas in vitro. El medio de cultivo que se usa comúnmente para la propagación de *Vaccinium* es el Woody Plant Medium (WPM), o modificaciones de éste, el cual ha sido desarrollado específicamente para plantas leñosas [1], que suelen ser sensibles a las concentraciones altas de sal. En cuanto a los balances hormonales, se ha observado que *Vaccinium* requiere de citoquininas para su proliferación celular, y comúnmente son usadas la zeatina y el 2iP [7, 8, 9].

Figura 1: Hojas y frutos de una planta silvestre de mortiño. Barra: 1 cm.

Hay pocos estudios sobre germinación *in vitro* de semillas de *Vaccinium* [10, 11, 12], y la forma de propagación in vitro más usada es el establecimiento de cultivos a partir de yemas axilares [4, 7].

Este estudio tuvo como objetivo establecer protocolos *in vitro* para la germinación de semillas, brotación de yemas axilares y micropropagación del mortiño, como una contribución al fomento del cultivo y mejoramiento de esta especie en el país.

Metodología

Material Vegetal

Las semillas de mortiño para las pruebas de germinación se obtuvieron de frutos comprados en mercados locales de Quito. Las plántulas obtenidas de semillas germinadas in vitro sirvieron para los ensayos de subcultivo. Para los ensayos de brotación de yemas axilares *in vitro* se usaron tallos de mortiño recolectados en el páramo de las provincias de Pichincha (Pasochoa) y Cotopaxi, donde el mortiño crece de forma silvestre.

Germinación in vitro de semillas de mortiño

Para las pruebas de germinación se usaron dos medios de cultivo Woody Plant Medium (WPM)[1] modificado (mWPM), y Murashige & Skooge (MS) [13] con la mitad de concentración de sales (1/2 MS) (Tabla 1).

Para la desinfección de las semillas, éstas fueron sumergidas en alcohol al 70 % por tres minutos, luego fueron lavadas con agua destilada estéril y desinfectadas por 10 minutos en hipoclorito de sodio (2.5 % con 4 gotas de Tween 20).

	mWPM	**MS**	**1/2 MS**	**WPM**
Macronutrientes (mg/l)				
$Ca(NO_3)_2*4H_2O$	***	***	***	684
KNO_3	392	1900	950	190
NH_4NO_3	540	1650	825	400
KH_2PO_4	170	170	85	170
$CaCl_2*2H_2O$	368	440	220	***
$MgSO_4*7H_2O$	370	370	185	370
Micronutrientes (mg/l)				
H_3BO_3	6.2	6.2	3.1	6.2
$CoCl_2*6H_2O$	0.025	0.025	0.0125	0.025
$CuSO_4*5H_2O$	0.025	0.025	0.0125	0.25
$MnSO_4*4H_2O$	22.3	22.3	11.15	22.3
KI	0.83	0.83	0.415	0.83
$Na_2MoO_4*2H_2O$	0.25	0.25	0.125	0.25
$ZnSO_4*7H_2O$	8.6	8.6	4.3	8.6
Elementos Orgánicos (mg/l)				
Ácido nicotínico	0.5	0.5	0.25	0.5
Tiamina	0.1	0.1	0.05	0.1
Piridoxina	0.5	0.5	0.25	0.5
Myo-inositol	100	100	50	100
Glicina	***	***	***	2
Quelato de Hierro (mg/l)				
$FeSO_4*7H_2O$	27.8	27.8	13.9	27.8
Na_2EDTA	37.2	37.2	18.6	37.2
Azúcar: 20 g/l	***	***	***	***
Agar: 5.8 g/l	***	***	***	***
pH: 5.2	***	***	***	***

Tabla 1: Composición de medios de cultivo usados para la propagación *in vitro* del mortiño

Finalmente, las semillas fueron lavadas 5 veces con agua destilada estéril y sembradas en frascos con medio 1/2 MS o mWPM sin hormonas. Con la intención de evaluar el efecto de la luz y la temperatura sobre la germinación de las semillas, algunos frascos fueron cultivados bajo un fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, otros en oscuridad total, y algunos recibieron tratamiento de frío a 4 ^oC por dos semanas.

Subcultivo de plántulas de mortiño

Para el subcultivo de plántulas de mortiño obtenidas de semillas germinadas in vitro, se usó el medio basal

Citoquininas			Giberelina	Auxinas
BAP	**TZR**	**2iP**	**GA3**	**NAA**
***	***	***	1 - 10	***
**	***	***	5 - 10	0.02
1	***	***	***	***
1	***	***	5 -10	***
0.5 - 3	***	***	5 - 10	0.01 - 0.04
1 - 10	***	***	***	0.01 - 0.05
**	0.5 - 7	***	***	***
**	1 - 2	***	10	***
**	1	***	***	0.05
**	1	1 - 5	***	***
**	1	1 - 5	***	0.05
**	***	1 - 5	***	***
**	***	1 - 5	***	0.05-0.1

Tabla 2: Combinaciones de hormonas utilizadas para la propagación de plántulas de mortiño obtenidas a partir de semillas germinadas in vitro

mWPM y diferentes combinaciones de hormonas que se describen en la Tabla 2. Para promover elongación de las plantas, se probaron diferentes concentraciones de GA_3 solo o en combinación con NAA. Para procurar el engrosamiento del tallo y la ramificación de la plántula, se usó una citoquinina (2iP, BAP, o TZR) sola o en combinación con una auxina o giberelina. En los ensayos iniciales de propagación, se probó BAP, GA_3 y NAA, solos o en combinación. A fin de determinar el efecto de TZR sobre la propagación del mortiño, se probó TZR solo, combinado con GA_3 o con NAA en plántulas provenientes de semillas germinadas in vitro, en segmentos de tallo y en plantas ya subcultivadas anteriormente en TZR. La combinación de TZR (1 mg/l) y NAA (0.05 mg/l) se usó durante el resto de la investigación para una propagación continua de material vegetal necesario para otros ensayos. Finalmente, para obtener una mejor elongación y ramificación de las plantúlas de mortiño se analizó el efecto del 2iP en plántulas que habían sido cultivadas previamente en TZR y NAA. Se usó 2iP solo, o con TZR y NAA.

Introducción in vitro y brotación de yemas axilares de mortiño

Se usaron los extremos apicales de ramas jóvenes de mortiño silvestre, los cuales fueron lavados con agua de la llave por tres a cinco minutos.

Luego se removieron todas las hojas con una tijera. Se cortaron segmentos de tallo, de 5 cm de largo, incluyendo cinco o más yemas axilares, que fueron sumergidos por tres minutos en alcohol al 70 % y luego lavados con agua destilada estéril. Posteriormente se los sumergió en hipoclorito de sodio (NaClO) al 2.5 % con 3 ó 4 gotas de Tween 20, por 10 a 12 minutos, se hicieron tres lavados con agua destilada estéril.

Se usó el medio basal mWPM con reguladores de crecimiento (Tabla 3) para la brotación de las yemas. Al principio se colocaron cinco explantes por frasco de 477 ml, pero debido a contaminación cruzada resultó más conveniente poner explantes individuales en frascos de 4 ml. Los brotes obtenidos se subcultivaron en medios mWPM, 1/2 MS y MS, para promover su elongación y enraizamiento. Se los incubó a 23 ^{o}C, con fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad.

Citoquininas			Auxinas
BAP	**TZR**	**2iP**	**NAA**
Introducción			
***	***	***	3
1 - 5	***	***	***
5	***	***	0.02
**	0.5	***	***
**	1 - 7	***	0.05 - 0.5
**	1 - 7	***	0.1
**	***	1 - 5	***
**	***	1 - 5	0.05 - 0.1
Subcultivo			
***	***	3 - 5	***
**	***	3 - 5	0.1

Tabla 3: Combinaciones de hormonas utilizadas para la propagación *in vitro* de mortiño a partir de yemas axilares

Elongación, enraizamiento y aclimatación de plántulas de mortiño

Las plántulas de mortiño desarrolladas bajo condiciones in vitro, fueron sometidas a pruebas de enraizamiento y elongación. Se probaron diferentes combinaciones de hormonas en medio basal mWPM. Para inducir elongación se probó GA_3 (1 a 5 mg/l) y BAP (3 mg/l) con NAA (0.02 mg/l), en tanto que para inducir enraizamiento se probó IBA (1 a 5 mg/l) y NAA (0.02 a 5 mg/l). Los medios basales mWPM, 1/2 MS y WPM (Tabla 1) sin reguladores de crecimiento también fueron probados para la elongación y enraizamiento de las plántulas.

Para la aclimatación de las plántulas se utilizaron frascos de vidrio que en su interior contenían macetas de cerámica rellenas de tierra y que fueron esterilizados en autoclave a 121 ^{o}C por una hora. Se escogieron las plántulas de mejor aspecto y con un sistema de raíces bien desarrollado. Se las extrajo del medio de cultivo, se removió el agar de las raíces así como las hojas cafés y/o callo en la base de las plántulas y se las sembró en los frascos de aclimatación que fueron tapados con papel plástico. Las plantas fueron mantenidas bajo un fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad a 23 ^{o}C. Después de 1 a 4 semanas se empezó a retirar progresivamente la cubierta plástica del frasco hasta retirarla completamente en las dos semanas subsiguientes, para reducir paulatinamente la humedad relativa interna y procurar la adaptación de las plántulas al medio ambiente natural. Las plantas que sobrevivieron fueron transferidas a fundas de plástico negro con tierra tipo I de Multiflor (tierra especial para orquídeas), Agroterra (tierra que se comercializa para cultivos en general), tierra del Pasochoa, de la misma localidad donde se recolectaron las plantas de mortiño (Pasochoa), o una mezcla de turba mas perlita comercial (Sunshine All Purpose Planting Mix) mezclada con tierra del Pasochoa.

Resultados y Discusión

Germinación in vitro de semillas de mortiño

El medio de cultivo Woody Plant Medium modificado (mWPM) fue el adecuado para la germinación de semillas y subsiguiente cultivo de plántulas de mortiño. Este medio se formuló emulando la composición de macronutrientes de WPM [14], en tanto que se mantuvo sin

cambios las concentraciones de micronutrientes. El pH del medio fue 5.2 y la concentración de sacarosa de 20 g/l [15, 16, 17].

Se observaron diferencias en los porcentajes de germinación de las semillas entre los diferentes tratamientos (Tabla 4). El porcentaje más alto, 60.7 %, se dio en semillas sembradas en mWPM con luz (fotoperíodo 16/8) y con tratamiento de frío (4 ^{o}C por dos semanas). La luz parecería ser el factor determinante en las diferencias de los porcentajes de germinación (15 % de diferencia entre los promedios de germinación con tratamientos de luz y oscuridad), lo cual concuerda con reportes que indican requerimientos de luz de ciertas especies para germinar, y que implicaría activación de genes inducidos por el fitocromo [18]. En cambio, no hubo diferencias en el tiempo requerido por las semillas para germinar; así, sin importar el tratamiento, las semillas germinaron en aproximadamente 20 días y las primeras hojas aparecieron a los 30 días de iniciado el ensayo. El porcentaje de germinación de semillas de mortiño obtenido en este estudio es relativamente bajo, en comparación con un estudio en *lingonberry* y *milberry* [12], en el que se obtuvo un 90 % de germinación de semillas después de 2 semanas. La diferencia del porcentaje de germinación in vitro entre estas especies puede ser atribuida a que se trata de especies distintas que responden de diversas formas a este tipo de cultivo.

Subcultivo del mortiño

Para el subcultivo de plántulas de mortiño obtenidas a partir de semillas germinadas in vitro, se probaron diferentes concentraciones y combinaciones de hormonas ya que las plántulas no se ramificaban en medio basal.

Plántulas de mortiño subcultivadas en mWPM suplementado con TZR (1 mg/l) + NAA (0.05 mg/l), ramificaron abundantemente. Después de varios subcultivos de estas plantas, la rapidez de ramificación y de crecimiento aumentó y en algunos casos el aspecto de la planta mejoró (Figura 2).

En los experimentos realizados se observó que a concentraciones bajas de 2iP (1 mg/l), las plántulas elongaron normalmente, mientras que concentraciones más altas de este regulador (5 mg/l), indujeron abundante ramificación pero inhibieron la elongación de las plántulas. Las plántulas crecidas en medio de cultivo suplementado con 3 mg/l de 2iP tuvieron moderada elongación, con aspecto robusto.

En otros casos, utilizando medio de cultivo mWPM suplementado con varias concentraciones de GA_3 (1-10 mg/L) (Tabla 2), las plántulas se elongaron, pero no se ramificaron, y adquirieron una consistencia delgada y débil.

En medio de cultivo suplementado mWPM con BAP + NAA + GA_3 y TZR + GA_3 (Tabla 2), las plántulas de mortiño ramificaron poco, algunas formaron callo en la base del tallo y otras formaron raíces aéreas. Esto concuerda con los resultados de un estudio realizado con

Figura 2: Plántulas de mortiño, a las 8 semanas cultivo en mWPM suplementado con TZR-1 mg/l + NAA-0.05 mg/l, (23^{o}C, fotoperíodo 16/8).

bilberry y *lingonberry* [12] utilizando BAP y NAA en el que no se lograron establecer cultivos in vitro de estas especies pues las plantas en general no presentaban un buen aspecto. En otro estudio [15] los autores observaron que el GA_3 tenía un efecto negativo para la multiplicación de *Vaccinium* .

Se conoce que tanto 2iP como TZR son citoquininas que probablemente reducen la dominancia apical fuerte que es característica de varias especies de *Vaccinium*, permitiendo así el desarrollo de las yemas axilares [8, 19]. Los protocolos de cultivo in vitro de *Vaccinium* reportados en la literatura científica [4, 7, 12, 20] no fueron totalmente aplicables al mortiño y fue necesario optimizar el medio y las combinaciones hormonales para el cultivo in vitro de esta especie. Este estudio demostró que el medio mWPM suplementado con TZR (1 mg/l) y NAA (0.05 mg/l), es el adecuado para el subcultivo de plántulas de mortiño, especialmente si se quiere promover abundante ramificación para usarlas como fuente de explantes para su posterior micropropagación. González et al. [15], reportaron resultados similares: abundante ramificación con inhibición de elongación al utilizar zeatina. Por otro lado, se obtuvieron plántulas elongadas y robustas cuando se utilizaron medios de cultivo suplementados con 2iP (3 mg/l).

Introducción in vitro y brotación de yemas axilares de mortiño

El protocolo de desinfección utilizado no permitió erradicar totalmente la contaminación de los tallos introducidos *in vitro* (40 % de contaminación). Tetsumura et al. [16] también observaron un porcentaje de contaminación de hasta 40 %, utilizando explantes de plantas de blueberry mantenidas en un espacio abierto. Los explantes de mortiño se obtuvieron de plantas silvestres que estaban creciendo en su hábitat natural, lo cual podría explicar el alto porcentaje de contaminación que se observó. Entonces, la estrategia recomendada es colocar los explantes individualmente en frascos de 4 ml, para evitar la contaminación cruzada entre ellos.

De las combinaciones hormonales probadas en medio mWPM, la mezcla de 7 mg/l de TZR + 0.1 mg/l de NAA

Medio	Tratamiento utilizado	Tratamiento utilizado	Semillas Sembradas/ Semillas Germinadas	Germinación (%)
BAP	**TZR**	**2iP**	**GA3**	**NAA**
1/2 MS	Luz	******	229/98	42.8(%)
mWPM	Luz	******	1713/948	55.3 (%)
mWPM	Oscuridad	******	147/66	44.9 (%)
mWPM	Luz	4°C	433/263	60.7 (%)
mWPM	Oscuridad	4°C	102/41	40.2 (%)

Tabla 4: Porcentaje de germinación de semillas de mortiño según el medio y tratamientos utilizados

fue la que mejores resultados dio en la brotación de yemas (100 %) (Figura 3). También se vio brotación de yemas usando 1y 5 mg/l de TZR con 0.1 mg/l de NAA. Sin embargo, al reducir la concentración de NAA a 0.05, no hubo brotación a pesar de mantener las concentraciones de TDZ fijas (1-7 mg/l). Esto indica la importancia de la interacción y balance citoquinina/ auxina en la inducción de procesos de crecimiento y diferenciación in vitro.

En medio mWPM suplementado con 2iP con o sin NAA (Tabla 3), las yemas brotaron únicamente en 2iP – 5 mg/l, aunque con una eficiencia menor que en medios que contenían TZR y NAA.

En medios de cultivo suplementados con BAP solo o en combinación con NAA (Tabla 3), no hubo respuesta.

La auxina NAA, sola (3 mg/l), también indujo brotación de yemas, pero las plántulas presentaron anomalías y apareció callo en la base del tallo.

En cualquier caso, solo fue exitosa la brotación de yemas axilares al usar explantes extraídos de la parte apical del tallo.

Dado que los brotes obtenidos de yemas en medios suplementados con TDZ 7 mg/l + NAA 0.1 mg/l, crecían muy lentamente, fue necesario transferirlos a medios mWPM suplementados con 2iP, con o sin NAA (Tabla 3). En estos medios sobrevivieron la mayoría de plántulas, se ramificaron y crecieron normalmente. Particularmente en 3 y 5 mg/l de 2iP, sin NAA, las hojas tenían un color verde de aspecto saludable. Hay varios estudios con *Vaccinium* en los que el cultivo se estableció en medios con zeatina y posteriormente se pasó a medios con 2iP para la elongación ya que 2iP puede producir efectos tóxicos en los explantes nuevos [8, 15, 20, 21]. Las yemas necesitan concentraciones altas de citoquininas para brotar [21], lo cual podría explicar la necesidad de usar TZR en los pasos iniciales de introducción *in vitro* del mortiño.

Las plántulas subcultivadas en medios 1/2 MS y mWPM sin reguladores de crecimiento se elongaron pero se observó poco enraizamiento, mientras que en medio MS se tornaron rojas y no crecieron.

Elongación, enraizamiento y aclimatación de plántulas de mortiño

Plántulas de mortiño subcultivadas en mWPM suplementado con BAP + NAA o GA_3 , al principio se elongaron, pero eventualmente se tornaron cafés y murieron. En los subcultivos con mWPM + IBA (1, 3 ó 5 mg/l), se obtuvo un porcentaje de enraizamiento de hasta el 60 %, pero las raíces eran aéreas y escasas (Tabla 4). Posteriormente, se subcultivaron plántulas de mortiño en medios mWPM y 1/2 MS, donde crecieron considerablemente y muchas tenían raíces en la base de la planta, otras presentaron raíces aéreas y en algunas se observaron raíces de los dos tipos. Las plántulas con raíces en la base del tallo tenían un aspecto robusto, con hojas de 3 mm de tamaño, y muchas de ellas fueron usadas en ensayos de aclimatación (Figura 4). En WPM hubo escasa formación de raíces con moderada elongación de la plántula.

Según la literatura científica, para varias especies de *Vaccinium*, se lleva a cabo un proceso de aclimatación que dura entre 2 semanas a 2 meses [8, 22]. En la aclimatación del mortiño, sin embargo, algunas plantas murieron durante el proceso antes de ser transferidas a fundas plásticas con tierra, mientras otras se contaminaron y murieron. Al pasar las plantas que sobrevivieron a fundas plásticas, la mayoría murieron enseguida o en las siguientes semanas. Esto se debió probablemente a que las raíces eran delgadas y varias de ellas aéreas, lo que sugiere que posiblemente no eran funcionales. Se debe investigar todavía las condiciones adecuadas de la aclimatación de plantas de mortiño cultivadas in vitro para lograr su traslado al campo.

Figura 3: Brotación de yemas axilares de mortiño cultivadas en mWPM suplementado con TZR - 7 mg/l + NAA - 0.1 mg/l, a las 10 semanas de cultivo (23°C, fotoperíodo 16/8)

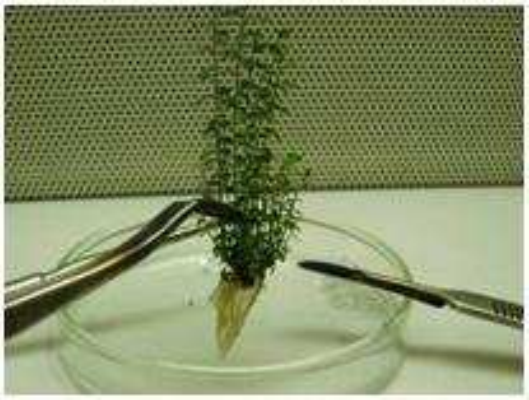


Figura 4: Plántula de mortiño enraizada, a las 16 semanas de cultivo en medio 1/2 MS sin hormonas (3^{o}C, fotoperíodo 16/8)

Conclusiones

En este trabajo se proponen varias estrategias que pueden ser utilizadas para el establecimiento del cultivo *in vitro* del mortiño. Por un lado, se demostró que es posible la germinación de semillas *in vitro* y el posterior crecimiento de plántulas, a través de subcultivos en medios de cultivo con reguladores de crecimiento. También se describe un método para la introducción *in vitro* de yemas axilares, donde fue necesario una alta concentración de citoquininas, particularmente TZR, para iniciar el crecimiento. Es necesario seguir trabajando en la aclimatación de las plántulas producidas in vitro para su adecuado traslado al campo. Este trabajo representa un estudio pionero en el mortiño con la intención de conocer mejor su comportamiento in vitro y lograr en un futuro un manejo más controlado de su cultivo.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración del grupo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito en la realización de esta investigación. Un gracias especial a Diana Ayala por sus contribuciones en la escritura de este artículo.

Referencias

[1] Lloyd, G., and McCown, B. 1980. "Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture." *Comb. Proc. Intl Plant Prop. Soc.* 30, 421–427.

[2] Asturizaga, A. S., Øllgaard, B., and Balslev, H. 2006. "Frutos comestibles." *Botánica Económica de los Andes Centrales*. 329–346.

[3] Luteyn, J. L. 2002. "Diversity, adaptation, and endemism in neotropical ericaceae: Biogeographical patterns in the Vaccinieae." *The Botanical Review*. 68, 55–87.

[4] Debnath, S. C. 2006. "Propagation of *Vaccinium* in vitro: A review." *International Journal of Fruit Science*. 6, 47–71.

[5] Grupo El Comercio (eds.) Noviembre 2008. "El mortiño es un apetitoso regalo de la tierra de la serranía de Ecuador." *Revista Líderes*. 3, 17.

[6] Taji, Acram, P. K. and Lackshmanan, P. 2002. *In vitro Plant Breeding*. 1–4.

[7] Debnath, S. C. 2004. "In vitro culture of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.)" *Small Fruits Review*. 39, 393–408.

[8] Debnath, S. C. and McRae, K. B. 2001. "In vitro culture of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* l.): The influence of cytokinins and media types on propagation." *Small Fruits Review*. 1, 3–19.

[9] Ostrolucká, M., Libiaková, G., Ondrušková, E., and Gajdošová, A. 2004. "In vitro propagation of *Vaccinium* species." *Acta Universitatis Latviensis, Biology*. 676, 207–212.

[10] Debnath, S. C. 2003. "Improved shoot organogenesis from hypocotyl segments of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* l.)" *In Vitro Cell. Dev. Biol*. 39, 490–495.

[11] Pereira, J. M. 2006. "Conservation of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae) by micropropagation using seedling nodal explants." *In Vitro Cell. Dev. Biol*. 42, 65–68.

[12] Jaakola, L., Tolvanen, A., Laine, K. and Hohtola A. 2001. "Effect of N6-isopentenyladenine concentration on growth initiation in vitro and rooting of bilberry and lingonberry microshoots." *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 66, 73–77.

[13] Murashige, T. and Skoog., F. 1962. "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures." *Physiol. Plantarum*. 15, 473–497.

[14] Rowland, L. J. and Ogden, E. L. 1992. "Use of a cytokinin conjugate for efficient shoot regeneration from leaf sections of highbush blueberry." *HortScience*. 27, 1127–1129.

[15] González, M. V., López, M., Valdez, A. E., and Ordas, R. J. 2000. "Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from fieldgrown plants." *Ann. appl Biol.* 137, 073–078.

[16] Tetsumura, T., Matsumoto, Y., Sato, M., Honsho, C., Yamashita, K., Komatsu, H., Sugimoto, Y., and Kunitake, H. 2008. "Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars." *Scientia Horticulturae*. 1–3.

[17] Cao, X., Fordham, I., Douglass, L., and Hammerschlag, F. A. 2003. "Sucrose level influences micropropagation and gene delivery into leaves from in vitro propagated highbush blueberry shoots." *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 75, 255–259.

[18] Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. Sunderland, Ma. Sinauer Associates, Inc. Publishers. 483–516.

[19] Debnath, S. C. and McRae, K. B. 2001. "An efficient in vitro shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) by axillary bud proliferation." *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 37, 243–249.

[20] Reed, B. M. and Abdelnour-Esquivel, A. 1991. "The use of zeatin to initiate in vitro cultures of *Vaccinium* species and cultivars." *HortScience*. 26, 1320–1322.

[21] Eccher, T. N., Noé, N. 1989. "Comparison between 2ip and zeatin in the micropropagation of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*)." *Acta Horticulturae*. 241, 185–190.

[22] Noé, N., Eccher, T. N. 1994. “Influence of irradiance on in vitro growth and proliferation of *Vaccinium corymbosum* (highbush blueberry) and subsequent rooting in vivo.” *Physiologia Plantarum*. 91, 273–275.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
ARTÍCULO/ARTICLE SECCIÓN/SECTION B

Propagación de tomate de árbol (*Solanum betaceum*) vía embriogénesis somática

Venancio Arahana B.,[1*] **Antonio R. Cabrera V.,**[1] **María L. Torres P.**[1]

[1]*Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad San Francisco de Quito*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
[*]*Autor principal/Corresponding author, e-mail: varahana@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: S. de la Torre, Ph.D.
Recibido/Received: 02/25/2010. Aceptado/Accepted: 04/01/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 05/21/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

A reproducible micropropagation protocol for tamarillo (*Solanum betaceum*) via somatic embryogenesis was established in this study. Three types of explants were assayed: leaves, hypocotyls and zygotic embryos; all of them obtained from *in vitro* cultured seeds.
Different concentrations of auxins 2, 4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and NAA (α-napthaleneacetic acid) and sucrose were tested to find out an appropriate medium that stimulated the formation of embryogenic calli. MS medium supplemented with 5 mg/L of NAA and 90 g/L of sucrose (pH 5.8) induced somatic embryos formation from the upper thirds of hypocotyls and from zygotic embryos. One-hundred percent of the explants derived from zygotic embryos and hypocotyls developed big whitish calli. However, only 40 % of the hypocotyl-derived calli and 70 % of the zygotic embryo-derived calli produced somatic embryos. The results showed that somatic embryos were obtained after a four-week incubation period in MS medium supplemented with 5 mg/L of NAA and 90 g/L of sucrose. The somatic embryos grew rapidly and produced plantlets with normal phenotypes. These results suggest that this technique could be applied for large scale production of Tamarillo and other agronomically important Andean fruit crops.

Keywords. Somatic embryogenesis, *Solanum betaceum*, sucrose, NAA (α-napthaleneacetic acid), somatic embryo.

Resumen

En esta investigación se estableció un método reproducible de micropropagación de tomate de árbol (*Solanum betaceum*), a partir de embriones somáticos. Se usaron tres tipos de explantes, hojas, hipocótilos y embriones cigóticos, los cuales fueron obtenidos a partir de semillas de tomate de árbol de la variedad anaranjada común cultivadas in vitro.
Se probaron dos tipos de auxinas 2,4-D (ácido 2,4-dicloro fenoxiacético) y ANA (ácido α-naftalenacético), y sacarosa en distintas concentraciones a fin de encontrar un medio de cultivo que estimule la formación de callo embriogénico. Se encontró que el medio MS suplementado con 5 mg/L de ANA y 90 gr/L de sacarosa a pH 5,8 promovió la formación de embriones somáticos a partir del tercio superior de los hipocótilos y de embriones cigóticos. El 100 % de los explantes provenientes de embriones cigóticos y de hipocótilos formaron callos de buen tamaño y de una coloración blanco cremosa. Sin embargo, la formación de embriones somáticos en los callos obtenidos a partir de hipocótilos fue tan solo del 40 %, mientras que con los embriones cigóticos fue del 70 %. Los resultados mostraron que en medio MS suplementado con 5 mg/L de ANA y 90 gr/L de sacarosa se obtuvieron embriones somáticos a partir de la cuarta semana de cultivo, los cuales se desarrollaron rápidamente y produjeron plántulas sin anormalidades. Estos resultados evidencian la aplicabilidad de esta técnica para la producción a gran escala de plantas de interés agrícola para el país.

Palabras Clave. Embriogénesis somática, *Solanum betaceum*, sacarosa, ANA (ácido α-naftalenacético), embrión somático.

Introducción

El tomate de árbol (*Solanum betaceum)* es un arbusto semileñoso de 2 a 3 metros de altura, originario de los Andes, principalmente de Perú, Chile, Ecuador, Bolivia y Argentina; sin embargo, su producción se ha expandido hasta zonas de Centro América y el Sureste Europeo [1]. Las variedades más conocidas son el tomate común, cuyo fruto tiene forma alargada, color morado o anaranjado; el tomate redondo, de color anaranjado rojizo, y el tomate mora, oblongo de pulpa morada [2]. Desde el

ISSN 1390-5384

punto de vista nutricional, el tomate de árbol posee un alto contenido de fibra, vitaminas A y C, además de ser rico en minerales como calcio, hierro y fósforo; actúa como antioxidante y fortalece el sistema inmunológico [3]. En el Ecuador se dedican cerca de 5000 hectáreas al cultivo del tomate de árbol con un rendimiento entre 60 a 80 Ton/ha/año, siendo la principal variedad cultivada la anaranjada común [3]. Comercialmente es considerado como uno de los productos con mayor potencial agro exportable entre los cultivos propios de Sur América; además, la demanda mundial se ha incrementado, principalmente en la Unión Europea. Nueva Zelanda es el principal país productor y exportador de este fruto, además de ser donde mayores avances se han hecho en el desarrollo y tecnificación del cultivo [4].

En el Ecuador la producción de tomate de árbol con fines de exportación es incipiente, debido a deficientes sistemas de producción, problemas fitosanitarios, especialmente la presencia de la mosca de la fruta, y una falta de homogeneización en la calidad de la fruta. Por tales motivos el acceso del tomate de árbol ecuatoriano a mercados internacionales como Estados Unidos está restringido [1].

Las técnicas de cultivo in vitro podrían contribuir a resolver algunos problemas que afronta la producción de tomate de árbol en el Ecuador. La embriogénesis somática ofrece la posibilidad de propagar masivamente líneas o variedades élite sin el riesgo de alteración en su constitución genética, garantizando de esta manera la uniformización de las plantaciones. A través del mejoramiento in vitro, ya sea induciendo variación somaclonal o mediante la inserción de ADN foráneo por ingeniería genética, se podría generar variedades con diversas resistencias a insectos, patógenos y factores ambientales, así como mejorar la calidad de la fruta y el rendimiento. Además la embriogénesis somática tiene aplicación en áreas de investigación como variación clonal, estudios celulares y crioconservación de líneas embriogénicas [5].

Los primeros ensayos de embriogénesis somática en tomate de árbol fueron reportados por Canhoto y Lopes [6] en Portugal, quienes tuvieron éxito con el uso de auxinas, principalmente 2,4-D (ácido 2-dicloro fenoxiacético) en suspensiones líquidas, a partir de hojas e hipocótilos. Trabajos de embriogénesis somática realizados en otras solanáceas como la papa mostraron resultados eficientes con el uso de la auxina ANA (ácido naftalenacético) y con combinaciones de ANA y 2,4-D [7].

El objetivo de esta investigación fue desarrollar un método reproducible de micropropagación de una variedad local de tomate de árbol vía embriogénesis somática.

Metodología

Material Vegetal

Se adquirieron frutos de la variedad anaranjada común de tomate de árbol de un supermercado de Quito. Se extrajeron las semillas de los frutos, se las lavó y secó. Luego, las semillas fueron desinfectadas, para lo cual se las sumergió en etanol al 70 %, por 5 minutos, posteriormente fueron lavadas con agua destilada estéril y transferidas por 20 minutos a una solución de hipoclorito de sodio al 2,5 %, más 4 gotas de Tween 20. Por último se realizaron 5 lavados con agua destilada estéril y las semillas fueron cultivadas en medio Murashige and Skoog, 1962 (MS) con 30 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar a pH 5.8 [8]. Se sembraron de 8 a 10 semillas por frasco, y para su germinación y desarrollo se llevaron a un cuarto de cultivo a una temperatura de 22 ^{o}C con un fotoperiodo de 16 horas-luz / 8 horas-oscuridad.

A medida que el proceso de germinación de las semillas progresaba se tomaron diferentes explantes para las pruebas de embriogénesis somática, así: embriones completos, extraídos de la semilla luego de la imbibición de ésta y cuando la radícula empezaba a emerger; hipocótilos (de 2 semanas de emergidos de la semilla) y hojas (de 4 semanas de edad).

Inducción de callo embriogénico y desarrollo de embriones

Se usó el medio basal MS, suplementado con sacarosa y auxinas (ANA y 2,4-D), cuyas concentraciones variaron de acuerdo con el explante utilizado (Tabla 1).

Establecimiento de ensayos con hojas: Se usaron 10 medios de cultivo con distintas concentraciones hormonales y de sacarosa (Tabla 1); de cada medio se prepararon dos cajas Petri y se colocaron 5 explantes por caja. A partir de hojas cortadas en la parte superior, inferior y lateral se obtuvieron explantes de aproximadamente 5 mm^2 que fueron colocados con el haz de la hoja hacia arriba en los diferentes medios de cultivo previamente mencionados. Los explantes fueron incubados en una estufa a 28 ^{o}C en oscuridad total.

Establecimiento de ensayos con hipocótilos: Se utilizó el medio basal MS suplementado con 8 diferentes combinaciones hormonales y de sacarosa (Tabla 1). Los hipocótilos fueron divididos en tercios: superior, medio e inferior para evaluar el potencial embriogénico de cada uno de estos segmentos. A dichos explantes se les realizaron cortes horizontales en la parte superior e inferior para que su exposición al medio de cultivo fuera mayor y de esta manera aumentar las posibilidades de obtener gran cantidad de callo. Se prepararon dos cajas de cada uno de los medios de cultivo anteriormente mencionados, y se colocaron 5 explantes por caja. Posteriormente, los hipocótilos fueron incubados en una estufa a 28 ^{o}C en oscuridad total hasta la germinación de los embriones.

Establecimiento de ensayos con embriones cigóticos: Se usó el medio basal MS suplementado con 5 concentraciones de auxinas y sacarosa. Se prepararon dos cajas de cada medio (Tabla 1). Los embriones cigóticos en proceso de germinación fueron liberados completamente de la testa de la semilla usando una pinza. Una vez

Hojas				Hipocótilo				Embriones Cigóticos			
Medio de Cultivo	Reguladores de crecimiento		Sacarosa (%)	Medio de Cultivo	Reguladores de crecimiento		Sacarosa (%)	Medio de Cultivo	Reguladores de crecimiento		Sacarosa (%)
Murashige and Skoog	2,4-D (mg/L)	ANA (mg/L)		Murashige and Skoog	2,4-D (mg/L)	ANA (mg/L)		Murashige and Skoog	2,4-D (mg/L)	ANA (mg/L)	
medio 1	2	0	3	medio 1	0	5	3	medio 1	2	0	3
medio 2	5	0	3	medio 2	0	5	9	medio 2	2	0	3
medio 3	2	0	9	medio 3	0	5	8	medio 3	2	0	3
medio 4	5	0	9	medio 4	2	0	3	medio 4	2	0	3
medio 5	0	5	3	medio 5	5	0	3	medio 5	2	0	3
medio 6	0	5	8	medio 6	2	5	8				
medio 7	0	7	3	medio 7	2	0	9				
medio 8	0	7	8	medio 8	5	0	9				
medio 9	2	5	9								
medio 10	2	5	8								

Tabla 1: Medios de cultivo usados para la inducción de embriones somáticos a partir de explantes de hojas, hipocótilo y embriones cigóticos

extraídos, los embriones fueron colocados en los medios de cultivo, 5 embriones por caja, y se los incubó a 28 ^{o}C en oscuridad total hasta la germinación de los embriones somáticos.

Seguimiento y manejo de los ensayos

Se revisaron los cultivos cada semana y aquellos que mostraban indicios de formación de estructuras embriogénicas fueron observados con el estereomicroscopio. Los callos confirmados como embriogénicos fueron subcultivados en un medio de cultivo fresco de iguales características del que provenían.

Cuando se obtuvieron embriones somáticos, éstos fueron mantenidos a 28 ^{o}C en oscuridad total, hasta que tuvieron un tamaño aproximado de 5 mm. Posteriormente fueron transferidos a un medio MS basal con 30 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar pH 5.8, y mantenidos en el cuarto de cultivo con un fotoperíodo de 16 horas-luz y 8 horas-oscuridad y temperatura de 22$\pm$1 ^{o}C, para que continúen su desarrollo hasta plántulas.

Aclimatación de las plántulas obtenidas vía embriogénesis somática

Tierra comercial Multiflor fue tamizada y puesta en recipientes de barro, los cuales fueron colocados en el interior de frascos de vidrio, los mismos que fueron tapados con papel aluminio para su esterilización en autoclave.

Plántulas de un tamaño aproximado de 8 cm fueron transferidas a los frascos que contenían tierra estéril, a los que se les colocó una cubierta plástica, la cual se retiró paulatinamente a medida que las plántulas avanzaban en su proceso de aclimatación. Después de 30 días, las plantas que se encontraban completamente libres de la cubierta plástica y se mostraban vigorosas fueron transferidas a fundas plásticas con tierra comercial "Multiflor" hasta que alcanzaran un tamaño de 15 cm luego de lo cual fueron transferidas a campo abierto.

Resultados y Discusión

Ensayos con hojas

Los medios suplementados con 2,4-D, en concentraciones de 2 mg/L no dieron buenos resultados, puesto que los callos formados eran de mala calidad y al poco tiempo empezaron a morir. Solo en el medio 4 (5 mg/L 2,4-D + 9 % sacarosa) (Tabla 1), se obtuvo un callo de tamaño medio (cerca de 1 cm de diámetro) y de un color blanco cremoso a las 3 semanas de iniciado el ensayo. Este callo se mantuvo en observación durante 2 meses, al cabo de los cuales fue desechado pues no proliferó mayormente y por el contrario fue deteriorándose paulatinamente. En los medios de cultivo que contenían 5 mg/L de ANA se obtuvieron callos a las 3 semanas de iniciado los ensayos, mientras que en los medios de cultivo que contenían 7 mg/L de ANA la formación de callo se dio a las 2 semanas. Aunque en todos los ensayos realizados con ANA se obtuvieron callos grandes de coloración blanca cremosa y textura friable, no mostraron signos de ser embriogénicos. Igualmente se mantuvieron en observación durante 2 meses y luego fueron desechados. Finalmente, en los ensayos realizados con los medios de cultivo 9 y 10 (Tabla 1), la formación de callo se dio precariamente en los bordes de los explantes a partir de la cuarta semana de cultivo, sin embargo una semana después, los callos formados empezaron a morir.

Otro aspecto a considerar fue que el porcentaje de explantes que formaron callo en los ensayos con 2,4-D fue muy bajo, teniendo el máximo en el medio 4 (25 %), mientras que en el medio 1 solo un 10 % de los explantes formaron callo (Tabla 1, Figura 1). Mientras que en los ensayos con ANA, a excepción del medio 5 (95 %), en todos los demás medios el 100 % de los explantes formaron callo (Tabla 1, Figura 1).

Ensayos con hipocótilos

Los ensayos en los que se usó el tercio superior del hipocótilo, formaron callo con un mayor crecimiento en comparación con los ensayos en los que se utilizó los tercios medio e inferior de los hipocótilos. La formación de callo empezó a partir de la segunda semana de cultivo en todos los medios usados (Tabla 1). En general los callos eran de tamaño mediano a grande (de 1 a 2 cm de diámetro) y de color blanco, a excepción de los callos formados en los medios 7 y 8 (Tabla 1), los cuales eran pequeños (cerca de 5 mm de diámetro) y amarillentos. Sin embargo solo los callos que se formaron en los medios de cultivo suplementados con 5 mg/l de ANA

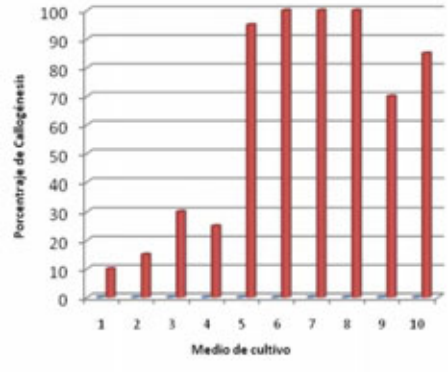


Figura 1: Porcentaje de explantes que formaron callo a partir de segmentos de hojas. La composición de los medios de cultivo (eje x) se detalla en la Tabla 1

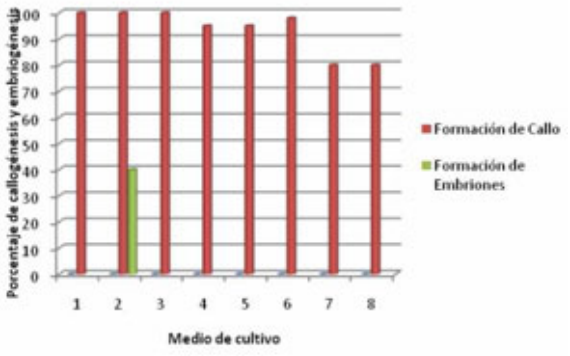


Figura 2: Porcentaje de explantes que formaron callo y embriones somáticos a partir del tercio superior del hipocótilo. La composición de los medios de cultivo (eje x) se detalla en la Tabla 1

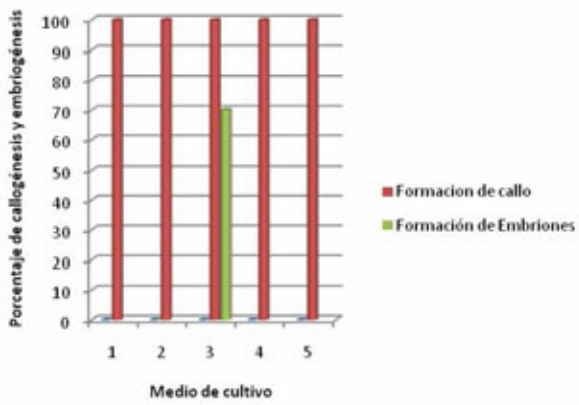


Figura 3: Porcentaje de explantes que formaron callo y embriones somáticos a partir de embriones cigóticos extraídos luego de la emergencia de la radícula. La composición de los medios de cultivo (eje x) se detalla en la Tabla 1

y 9 % de sacarosa, produjeron embriones somáticos a los 24 días de iniciado el ensayo con una eficiencia del 40 % (Figuras 2 y 4). Con los demás medios utilizados, aunque se obtuvo callo friable de color blanco brillante, éste no llegó a producir embriones somáticos. A pesar de que los callos obtenidos en los medios 1 y 6 (Tabla 1) daban indicios de tener regiones embriogénicas, éstas nunca llegaron a desarrollarse y más bien al poco tiempo se tornaron friables y adquirieron una coloración café.

Ensayos con embriones cigóticos

En los ensayos realizados con embriones extraídos de la semilla antes de que emergiera la radícula, solo se formó un callo superficial, tenue, de color verde negruzco y demasiado friable, el cual a los pocos días se tornó café.

Por el contrario, los ensayos con embriones extraídos de la semilla, luego de la emergencia de la radícula, produjeron un callo de desarrollo acelerado, a los 7 días de iniciado el ensayo. Esto se observó en todos los medios de cultivo usados, en los que el 100 % de los explantes formaron callo (Figura 3), de un tamaño medio (1 cm de diámetro) y de color blanco cremoso, características que se asemejan a las reportadas por Canhoto y Lopes [6]. En el medio de cultivo suplementado con 5 mg/L de ANA y 9 % de sacarosa se obtuvo callo embriogénico a los 10 días de iniciado el ensayo, y en el 70 % de los callos se formaron embriones somáticos (Figura 3).

Embriones Somáticos

Los callos embriogénicos provenientes ya sea de hipocótilos, como de embriones cigóticos, se obtuvieron con el medio MS suplementado con 5 mg/l de ANA y 9 % de sacarosa. En los ensayos con hipocótilos, solo 40 % de callos obtenidos en el medio 2 (Tabla 1), formaron embriones somáticos (Figura 2). Germinaron cerca de 15 embriones somáticos por explante, de los cuales, 10 % se perdieron por contaminación, 50 % detuvieron su desarrollo al ser transferidos a medio MS basal con 3 % de sacarosa y solo un 40 % formaron plántulas que crecieron normalmente. Al contrario, en los ensayos con embriones extraídos de la semilla, luego de la emergencia de la radícula, el 70 % de los callos obtenidos en el medio 3 (Tabla 1) (Figura3), produjeron cerca de 15 embriones somáticos por explante, de los cuales, 5 % se perdieron por contaminación, 15 % detuvieron su desarrollo al ser transferidos a medio MS basal con 3 % de sacarosa y el 80 % se desarrollaron hasta plántulas que crecieron normalmente.

Los embriones somáticos que detuvieron su crecimiento, como se menciona anteriormente, tomaron un color rojizo morado y empezaron a morir a los pocos días del subcultivo, lo cual posiblemente se debió a un shock osmótico producido por el cambio brusco de una alta concentración de sacarosa (9 %) a una baja concentración de sacarosa (3 %).

En general, el callo embriogénico era de color blanco cremoso, translúcido y brillante (Figura 4A), como los reportados por Canhoto y Lopes [6]. Al cabo de 5 días de subcultivo de los callos embriogénicos en medio MS basal sólido, el desarrollo de estructuras proembrioides y de torpedo fue detectado (Figura 4B).

A la tercera semana de haberse instalado los ensayos de embriogénesis somática, tanto a partir de embriones cigóticos como del tercio superior de los hipocótilos, se pudo observar a simple vista la aparición de los embriones somáticos. A la cuarta semana éstos alcanzaron

cerca de 5 mm de largo (Figura 4C). Los embriones somáticos subcultivados en MS basal con 3 % de sacarosa germinaron rápidamente, a los 8 días de subcultivo se observó la brotación de la radícula y la formación de pequeñas hojas, además de que la coloración de los embriones pasó de blanco a un verde rojizo (Figura 4D), para luego continuar con un egrosamiento y alargamiento del hipocótilo, ensanchamiento de hojas y aparición de raíces secundarias, lo cual sucedió a partir de las dos semanas de iniciado el subcultivo. A las 4 semanas, la plántula ya estaba completamente formada (Figura 5A) y a las 6 – 8 semanas, las plántulas estaban listas para la fase de aclimatación. El periodo de acliamatación se realizó aproximadamente por dos meses y luego las plantas fueron pasadas a campo abierto, donde se desarrollaron normalmente (Figuras 5B y 5C).

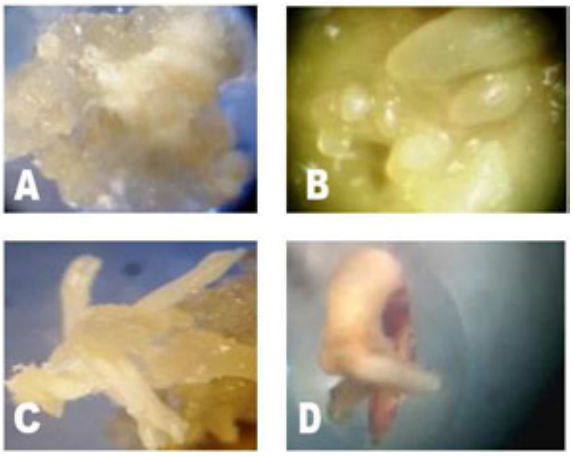


Figura 4: Fases de desarrollo del los embriones somáticos obtenidos en medio MS suplementado con 5 mg/L de ANA y 90 gr/L de sacarosa a pH 5,8. (A) Callo embriogénico obtenido en oscuridad total a 28 ºC. (B) Estructuras globulares y de torpedo vistas al estéreo microscopio en la superficie del callo embriogénico. (C) Embriones somáticos de 5 mm de longitud obtenidos a partir de hipocótilo y mantenidos en oscuridad total a 28 ºC. (D) Embriones somáticos con indicios de brotación de radícula y hojas, después de 7 días de ser sub cultivados a medio MS basal con 30 gr/L de sacarosa a pH 5,8.

Los medios de cultivo que indujeron la formación de embriones somáticos tanto a partir de hipocótilos como de embriones cigóticos fueron los suplementados con 5 mg/L de ANA y 90 gr/L de sacarosa. Resultados similares reporta López Vela [7] en trabajos realizados con *Solanum tuberosum*, en los que se obtuvieron embriones somáticos rápidamente en el medio de cultivo que contenía ANA, aunque con un índice de producción muy bajo en relación al potencial que posee la embriogénesis somática.

El tiempo en el que se obtienen embriones somáticos puede representar una ventaja a explotar posteriormente. Así, en el presente trabajo a las tres semanas de iniciados los ensayos ya se obtuvieron embriones somáticos, mientras que en los reportes de Canhoto y Lopes [6], éstos se obtuvieron a los 4 meses de haber iniciado los ensayos.

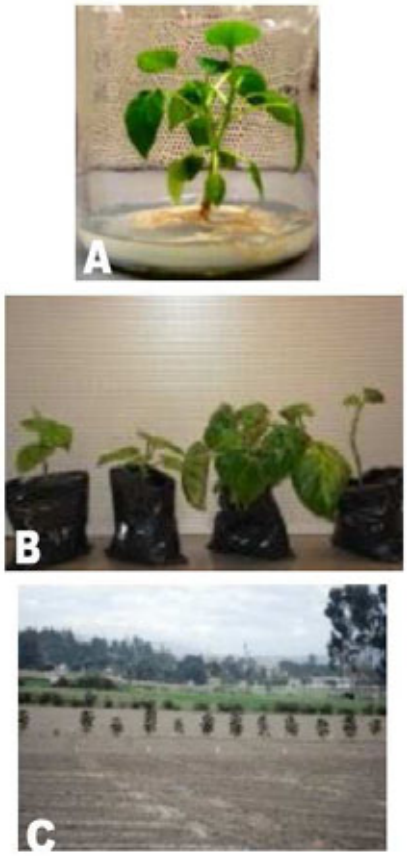


Figura 5: Plantas de tomate de árbol obtenidas vía embriogénesis somática . (A) Planta completa cultivada en MS basal a 22 ºC y fotoperiodo 16 horas-luz / 8horas-oscuridad. (B) Plantas durante la fase de aclimatación en tierra, mantenidas en cuarto de cultivo a 22 ºC y fotoperiodo 16 horas-luz / 8 horas-oscuridad. (C) Plantas después de 9 meses de crecimiento en campo abierto.

Hay dos aspectos importantes a considerar en la embriogénesis somática, la edad del explante y el medio de cultivo. Mientras más joven sea el tejido, éste suele ser más susceptible al proceso de diferenciación celular hacia un estado embriogénico; sin embargo, si el tejido es demasiado joven, pudiese no soportar el estrés provocado por las condiciones del medio de cultivo y morir [9].

El hecho de que los embriones cigóticos extraídos de semillas antes de emerger la radícula formaran callo de precaria apariencia puede deberse a que el eje embrionario no estaba expuesto, por la presencia de los cotiledones que lo cubrían, y por tanto no había tejido sensible a la acción de las hormonas.

Además la concentración de sacarosa en el medio de cultivo ha mostrado ser de gran importancia para la maduración y posterior desarrollo de los embriones somáticos. Según lo reportan Márquez y Sánchez [10], agentes como el manitol, Polietilenglicol (PEG), altas concentraciones de sacarosa, sorbitol y el ácido abscísico (ABA) inducen en las células un proceso de estrés hídrico durante la formación del callo embriogénico [10]. Este estrés hídrico induce a las células a acumular sustancias de reserva como proteínas y carbohidratos, lo

cual favorece el desarrollo de las células embriogénicas e inhibe una germinación precoz de los embriones somáticos [11]. Podría ser que muchos de los callos con potencial embriogénico que se obtuvieron en este trabajo no formaron embriones al inhibirse la maduración de las células por falta de una concentración apropiada de sacarosa que indujera a las células a acumular nutrientes.

Las plantas obtenidas vía embriogénesis somática son morfológicamente similares a las plantas obtenidas vía semillas, seguramente porque los mecanismos celulares involucrados en la formación del embrión son comunes en los dos tipos de embriogénesis [12], lo cual se pudo comprobar con las plantas obtenidas en el presente trabajo.

Conclusiones

Como conclusión, se puede decir que el medio MS suplementado con 5 mg/L de ANA y 90 gr/L de sacarosa es el adecuado para la obtención de embriones somáticos de tomate de árbol a partir del tercio superior del hipócotilo o de embriones cigóticos. La aplicación de la técnica de embriogénesis somática para la producción agrícola representa una valiosa herramienta para la obtención de plantas con las características que se quiere propagar, a más de proporcionar una base para futuras investigaciones a nivel celular y de reproducción clonal en *Solanum betaceum*.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración del grupo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito en la realización de esta investigación, y al apoyo financiero obtenido a través de un Small Grant de la USFQ. Un gracias especial a Diana Ayala y Nicolás Bastidas por sus contribuciones en la escritura de este artículo.

Referencias

[1] Soria, N. 2005. “Tomate de árbol/tamarillo/sweet tomato.” Technical report. Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador.

[2] Lebn, J. 1996. “Guía para el cultivo de tomate de árbol.” Technical report. INIAP-COTESUP.

[3] Cadena, E. 2006. “Estudio de prefactibilidad para el tomate de árbol.” Technical report. SICA, Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador.

[4] Kreuter, M. L. 2006. “Andean fruits and vegetables of the world.” Technical report. MNS, European Fruits and Vegetals Reports.

[5] Hernández, L. and Carneros, E. 2005. “Embriogénesis somática como elemento de la biotecnología forestal.” Technical report. Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural (IMIDRA).

[6] Canhoto, J. M. and Lopes, M. L. 2005. “Protocol of somatic embryogenesis: Tamarillo (*Cyphomandra betacea*).” Technical report. Facultad de Ciencias e Tecnologia. Universidade de Coimbra.

[7] López-Vela, D. 2005. “Embriogénesis somática en *Solanum tuberosum*.” Technical report. L. Cv Andinita. Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural (IMIDRA).

[8] Murashige, T. and Skoog, F. 1962. “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.” *Physiol. Plant*. 15, 473–497.

[9] Jiménez, V. and Guevara, E. 1995. “Regeneración in vitro mediante embriogénesis somática de variedades de cítricos.” Technical report. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. San José de Costa Rica.

[10] Márquez, M. Sánchez, R. 2003. “Factores que afectan la obtención de embriones somáticos blanco-opacos de aguacate.” Technical report. Dpto. de Biología Vegetal. Universidad de Málaga. Málaga, España.

[11] Merkle, S. A. and Parrot, B. S. 1995. “Morphogenic aspects of somatic embryogenesis.” *In Vitro Embryogenesis in Planta*. 155–203.

[12] Gomez, R. 1998. “Generalidades sobre la embriogénesis somática.” Technical report. Resúmenes del curso Internacional de Propagación in vitro de especies vegetales. Santa Clara, Cuba.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
ARTÍCULO/ARTICLE SECCIÓN/SECTION B

Status of the Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*) in the Cuyabeno Reserve, Ecuador

Judith Denkinger[1*]

[1] *Galapagos Academic Institute for the Arts and Sciences (GAIAS), Universidad San Francisco de Quito Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador*
[*] *Autor principal/Corresponding author, e-mail: jdenkinger@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: C. Zambrano, Ph.D.
Recibido/Received: 05/14/2010. Aceptado/Accepted: 05/06/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 05/25/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

Amazonian manatees live in black water rivers and lakes in the Amazon basin. A study of Amazonian manatees in the Cuyabeno Reserve conducted by Timm et al. [1] in 1983 gave first information on distribution of manatees in the Cuyabeno Reserve and they suggested a possible extinction of the Amazonian Manatee in the following decade. Here I present results of observations, and interviews, realized 13 years after the first study as complementary observations during a research project on Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*) from 1996 to 1999. We surveyed during more than 127 days covering about 6.175km in manatee habitat with more than 456 hours continuously observing black water rivers and lagoons and we carried out manatee surveys paddling in the Lagunas Grandes de Cuyabeno. Interviews with tour guides, park rangers and native Indians give a complete sighting list for the presence of manatees and insight into the current situation in the Reserve. The relative abundance of manatees in the Cuyabeno River is 0.01 animals/h effort and even less in the Lagartococha River with 0.007 animals/h effort. Populations in the Lagartococha River seem to be severely reduced. Hunting in both rivers continued despite legal protection with 16 manatees killed from 1995 to 1998. Overall 40 to 49 animals were seen in the Cuyabeno Reserve from 1996 to 1998. Even though, predictions that manatees would be extinct by 1993 were not fulfilled, they are rare in the Reserve and living in a protected area does not necessarily safeguard this species.

Keywords. Amazonian manatee, *Trichechus inunguis*, status, Cuyabeno Reserve, Ecuador.

Resumen

Los manatíes amazónicos viven en ríos de aguas negras y lagunas de la Cuenca Amazónica. La primera información sobre la distribución y el estado de conservación de manatíes en la Reserva Cuyabeno proviene de un estudio realizado en 1983 por Timm y otros [1]. Ellos concluyeron que el manatí se puede extinguir en la próxima década. En este artículo se presenta los resultados de observaciones y entrevistas realizados desde 1996 a 1999, trece años después. Durante 127 días de monitoreo del Delfín Amazónico (*Inia geoffrensis*) en el hãbitat del manatí a lo largo de ríos y lagunas de agua negra, se observó durante 456 horas. Adicionalmente se realizaron monitoreos dirigidos a manatíes en las Lagunas Grandes de Cuyabeno. Entrevistas con guías de turismo, guardaparques e indígenas dan una lista completa de avistamientos de manatíes, su distribución y la situación de conservación. La abundancia relativa estimada en el Río Cuyabeno es de 0,01 animales/hora de esfuerzo y aũn menor en el río Lagartococha con 0,007 animales/ hora de esfuerzo. Las poblaciones en el rio Lagartococha parecen severamente reducidas. En ambos ríos la caza entre 1995 y 1998 continuó. A pesar de la protección legal se mataron al menos 16 animales dentro de la Reserva Cuyabeno, por ende el hecho de vivir en una ãrea protegida no necesariamente significa la sobrevivencia de la especie.

Palabras Clave. Manatí amazónico, *Trichechus inunguis*, estado, Reserva Cuyabeno, Ecuador.

Introduction

Amazonian Manatees (*Trichechus inunguis*), are the only fresh-water Sirenian endemic to the Amazon basin where they were once abundant [2]. The shy, secretive nature of the manatee makes it difficult to observe. It breathes approximately once every 3 – 5 minutes but in moments of danger can remain submerged for up to 25 minutes [2]. Therefore population studies are rare and estimates are fairly inaccurate: [3] for example estimates the population of the Amaña lagoon to range from 500-

ISSN 1390-5384

1000 animals. According to [4] the total population of manatees in Brasil is unknown. In the Pacaira – Samiria National Reserve in north eastern Peru, [5] state that there are only very few manatees left. As for Brasil and Peru, manatees seem to be very rare in most of their range [6] . In the Cuyabeno Reserve, according to native Indians, manatees used to be abundant in most of the lagoons and black water rivers. But the first manatee study in Ecuador by [1] during fall 1983 in the Cuyabeno Reserve in the Aguarico river system and the Napo river system, showed that manatees were abundant only in the Laguna Lagartococha close to the border with Peru, and apparently extinct in the Zancudococha lagoon.

As one of the largest mammals in the Amazon, manatees are one of the preferred items of prey for native Indians. Documentation of manatee hunting dates back to 1542 [7] and has been the main cause of severe population depletion [8] [9] . Manatees are hunted throughout the year [4] but they are more vulnerable during the dry season, when they concentrate in deeper lagoons and canals [10].

Since 1973 manatees are protected in most of the countries, as they were included in CITES Appendix I and countries like Peru, Ecuador and Brasil legally protect manatees, but in none of the countries is there any control or enforcement of the laws [4] . Hunting of the Amazonian manatee still continues in Brasil [4], Peru [5], and Ecuador [1]. Therefore in Ecuador, manatees are considered the most endangered mammal species of the country [11] and are listed as critically endangered [11] . Here, we show the current situation of the Amazonian Manatee in the Cuyabeno Reserve based on observatiobns complementary to a 4 year research on Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*).

Methodology

Study area

The Cuyabeno River is a 150km black water river with the Lagunas Grandes de Cuyabeno, a system of 16 lagoons in the upper course and several oxbow lakes in its lower course. The Lagunas Grandes are connected by the Cuyabeno Chico, a small river which has its source in the west of the Cuyabeno Reserve and passes oil fields of *Petroecuador* outside the reserve. Flooded forests surround the lagoons with *Macrolobium dendrifolium* as the dominant trees interspersed by floating meadows. The lagoons tend to dry out during the dry seasons from September to November and from December to March.

The Lagartococha river in the north of the Cuyabeno Reserve, borders with Peru. The upper parts of the Lagartococha River are situated near the confluence of the Guepi and the Pacuya Grande River from where it flows east into the Aguarico River, approximately 150km downstream from the source. On its course, it passes through areas of flooded forest, wide extensions of floating meadows and numerous lagoons on both sides. Although some of the lagoons may dry completely during the dry season, the Lagartococha River always remains deep enough for river dolphins, manatees and boat traffic.

In the Reserve, there are 5 settlements of 4 different ethnic groups. The Secoya, Quichua and Cofan Indians live along the Aguarico River. The Sionas live on the Cuyabeno River, close to the Lagunas Grandes and there are 3 Military camps at the Aguarico river and one upstream on the Lagartococha River. The Ecuadorian army is based in the Reserve with 4 camps each hosting 10 to 20 soldiers; one camp is situated at the mouth of the Cuyabeno River, one in Zancudo, another camp at the mouth of the Lagartococha and the Aguarico river, with a Peruvian military camp just on the other side of the Aguarico River and upstream of the Lagartococh River (Map 1).

Occasional sightings during Amazon river dolphin surveys

In the years 1996 to 1998 aquatic mammal surveys were carried out in the Cuyabeno and the Lagartococha Rivers of the Cuyabeno Reserve [12] (Map 1). During a total of 127 days with 146 transects, we covered a total distance of 6,175km in manatee habitat in a twelve-meter long dug out canoe powered with a Johnson 25 HP outboard motor and a speed of between 10 and 15 km/h. Two observers continuously watched the river one in front and one behind the canoe during a total of 456 hours.

Dedicated manatee surveys in the Lagunas Grandes de Cuyabeno

We paddled a small dugout canoe in the Lagunas Grandes de Cuyabeno and adjacent streams. In May 1998 during mid water conditions, we carried out 3 manatee surveys for a total of 9.75 hours and another 7 surveys in June 1998 during high water conditions with 13 hours surveyed. Each survey lasted for a minimum of 2 hours and a maximum of 8:30 hours. Canoes were paddled slowly to avoid any disturbance due to noise and stopped for observation periods of 30 minutes to one hour to float nearby areas containing potential food resources (e.g. “floating meadows” (Paspalo – *Echinochloetum*) and water hyacinths (*Eichhornia* sp.).

Incidental sightings and interviews

Tour guides, park rangers and native people living or working in the Cuyabeno Reserve were interviewed about Amazonian manatee presence and hunting trends. All manatees observation from 1996 to 1999 (personal and reported observations), were listed and plotted on a map.

Results

Relative abundance during river dolphin surveys

On all of the 146 river dolphin surveys, only 4 manatees were seen on 3 occasions. Two of these sightings were

	Distance surveyed (km)	# Transects	km Traveled	Hours suveyed	# Manatees sighted	Relative abundance (manatees/h)
Cuyabeno River	64.9	81	3426.3	311.95	3	0.010
Lagartococha River	136.1	65	2749.5	142.10	1	0.007

Table 1: Effort on surveys in manatee habitat and relative abundance of manatees in the Cuyabeno and Lagartococha river in the Cuyabeno Reserve.

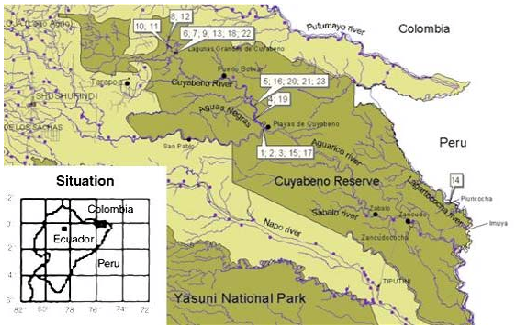


Figure 1: Manatee sightings in the Cuyabeno Reserve. Legend: Numbers are sighting numbers as listed in table 1; o = military camps, dots = settlements.

in the lower part of the Cuyabeno River and one in Piuricocha, in the middle course of the Lagartococha River. This gives a relative abundance of 0.01 manatees/h in the Cuyabeno River and 0.007manatees/h in the Lagartococha river (Table 2)

Manatee surveys

Eleven surveys by paddling, specifically dedicated to study manatees, were carried out in the Lagunas Grandes of Cuyabeno in April and June1998 with a total of 31.45 hours surveyed. According to natives, manatees are frequently seen in these lagoons at this time of the year. On none of the eleven surveys were manatees seen.

Sighting reports and interviews

In the Cuyabeno Reserve 26 reports of incidental sightings with a total of 40 to 49 Manatees have been collected for the years 1996 – 1998. Most sightings were in the Cuyabeno River and in the Lagunas Grandes de Cuyabeno, only one sighting is from the Lagartococha river.

Most of the manatee sightings were in the Laguna Grande (6 sightings) and in the estuary from the Cuyabeno River (5 sightings). In the Cuyabeno River close to Puerto Bolívar, a community of native Sionas, there are 4 recorded manatee sightings. A maximum of 15 and minimum of 11 animals were estimated for these sightings. In most of the other sites, manatees were only seen once or twice (Cuyabeno Aguas Negras 2; Cuyabeno Posa de la Boa Grande 1, Mateococha 2; Patococha 2 and Piuricocha 1). Most sightings consisted of one or two animals. Groups with more than 2 animals were seen at Aguas Negras, Mateococha and Puerto Bolívar. (Table 1, Figure1).

#	Date	Area	Manatees sighted min	max	Behaviour	Cue	Observer
1	01/04/96	Cuyabeno Mouth	2	2	floating		Parkranger
2	06/07/96	Cuyabeno Mouth	1	1	floating	snout	Judith Denkinger
3	18/09/96	Cuyabeno Mouth	1	2	floating		Tour Guide
4	28/09/96	Cuyabeno Aguas Negras	2	2			Quichua
5	06/10/96	Cuyabeno Posa de la Boa Grande	2	2	feeding	snout	Judith Denkinger
6	27/12/96	Cuyabeno Laguna Grande	1	1		snout	Judith Denkinger
7	27/12/96	Cuyabeno Laguna Grande	1	1		snout	Judith Denkinger
8	01/08/97	Cuyabeno Mateococha	4	4			Siona
9	01/10/97	Cuyabeno Laguna Grande	1	1			Tour Guide
10	15/10/97	Cuyabeno Patococha	1	1			Tour Guide
11	01/11/97	Cuyabeno Patococha	1	1			Tour Guide
12	01/12/97	Cuyabeno Mateococha	2	2			Siona
13	21/12/97	Cuyabeno Laguna Grande	1	2			Tour Guide
14	29/12/97	Cuyabeno Piuricocha	1	2	floating	back	Judith Denkinger
15	03/01/98	Cuyabeno Mouth	1	1	floating	back	Judith Denkinger
16	01/03/98	Cuyabeno Posa de la Boa Grande	2	2			Quichua
17	20/03/98	Cuyabeno Mouth	1	2	travelling	back	Native/ Parkranger
18	28/03/98	Cuyabeno Laguna Grande	1	1	floating	back	Native
19	30/03/98	Cuyabeno Aguas Negras	2	3	feeding	back	Indio
20	01/04/98	Cuyabeno Posa de la Boa Grande	4	5	travelling	back	Native
21	02/04/98	Cuyabeno Posa de la Boa Grande	1	1			Native
22	03/04/98	Cuyabeno Laguna Grande	1	1		snout	Tour Guide
23	01/05/98	Cuyabeno Posa de la Boa Grande	4	6	travelling	back	Native

Table 2: Observations of Amazonian Manatees (*Trichechus inunguis*) in the Cuyabeno Reserve from 1996 to 1998.

Interviews

Twenty-one comments about Amazon manatees were collected in the Cuyabeno Reserve. All of the people interviewed know about manatees as opposed to Ashuar Indians in the Pastaza area in the southern Amazon of Ecuador, who had no knowledge of manatees. In the Cuyabeno Reserve, Sionas from Puerto Bolivar have seen manatees in the Lagunas Grandes and adjacent lagoons, especially in Mateococha, Caimancocha, Aucacocha and Canangueno. In the upper course of the Cuyabeno River, manatees were seen during seasonal changes. Groups travelling upstream have been observed in May 1998 in the upper course of the Cuyabeno River. In the lower course of the Cuyabeno River, Quichuas from Playas de Cuyabeno saw manatees feeding on the vegetation in the confluence of the Balatayacu with the Cuyabeno River and in the Cuyabeno River close to Linococha. Cofan Indians from Zábalo state that manatees

Year	#	Description	Area	Source
1995	1	One or more killed	Cuyabeno River	Park ranger
1995	1	Kept as a pet in a pool and starved	Cuyabeno River	Siona
1995	2	Hunted by Sionas	Cuyabeno River	Siona
1996	1	One or more killed	Cuyabeno River	Park ranger
1996	2	Hunted by Sionas	Cuyabeno River	Siona
1997	1	Cranium at Peruvian Military camp	Imuya, Lagartococha River	Personal observation
1997	5	Hunted by Sionas	Cuyabeno River	Siona
1997	1	Hunted by Quichuas	Lower Cuyabeno River	Quichua
1998	1	Hunted by Quichuas	Lower Cuyabeno River	Quichua
1998	1	Hunted by militaries	Lower Cuyabeno River	Quichua

Table 3: Reports on manatees hunted from 1995 to 1998 in the Cuyabeno Reserve.

live in the Sabalo River and lagoons.

Information about hunting is quite varied. The Director of the Cuyabeno Reserve, Luis Borbor, mentioned that manatees were hunted in the Lagartococha area, while Ecuadorian and Peruvian soldiers from camps in the Lagartococha river claim that they have not seen any manatees for 10 years. But in 1997 during our surveys in the Lagartococha River, a manatee cranium was observed at a hunting camp on the Peruvian side close to Imuya. Luis Borbor also mentioned that there was a self-imposed ban on manatee hunting by the Siona Indians, while Siona Indians claim that they killed at least 5 manatees in 1997. Some of the Park rangers know that manatees were hunted in 1995 and 1996. Another comment by a Siona Indian was that one of them has killed at least two manatees every year until 1996. In 1993 one manatee was caught and kept in a pool until Ecuadorian biology students released it. In 1995 another manatee was caught by a Siona and kept in a pool as a pet until it died from starvation. The Quichuas from Playas de Cuyabeno hunted one manatee in 1997 and one in 1998. Another manatee was killed in 1998 by soldiers in Linococha in the same area.

According to these reports at least 16 manatees have been killed in the Cuyabeno Reserve in the three years from 1995 to 1998. (Table 2). Estimates provided by ten of the local people interviewed about the population size of Amazonian manatees in the Cuyabeno Reserve were widely disparate. Three of the natives interviewed and the director of the Cuyabeno Reserve suppose that about 50 manatees might live in the Cuyabeno River system. Two of these native Indians are manatee hunters. Overall there is a common sense in most native Indians and Park rangers, that there are fewer manatees than there used to be several years ago. Five statements about the population size were that there are hardly any manatees left. One tour guide has never seen a single manatee during the 10 years she has worked in the Reserve. Four of the Siona Indians questioned have not seen any manatees during the last 6 years. According to a Quichua from Zancudo, in the Iripari lagoon manatees disappeared in the early 90s (Tangoy, pers. com. 1997).

Discussion

The survey effort of the Cuyabeno and Lagartococha River from 1996 to 1999 has been very high and the water surface was constantly surveyed for many hours, concentrating on anything that moves and appears to be an aquatic mammal, but manatees were only seen on 4 occasions. Although the travelling speed of 10 to 15 km/h might have been too fast and manatees could be scared away by the noise of the motor, the high effort should still account for more animals if manatees were abundant in the area. Observations on the West Indian Manatee show that manatees become habituated to the sounds and do not avoid areas with heavy boat traffic [13]. However our sightings indicate that manatees still live in the Cuyabeno and Lagartococha Rivers, although there was only one manatee sighted every 100 hours in the Cuyabeno River or 7 manatees every 1000 hours of survey in the Lagartococha River. This indicates that since the surveys conducted by [1] in 1983, when manatees were only abundant in the Lagartocha lagoon, the situation has now completely changed. In our surveys, numbers in the Lagartococha River were considerably lower than in the Cuyabeno river which means that during the last decade the manatee population in the Lagartococha river seems to have severely declined. Even though most manatees were sighted in the Cuyabeno River system, where there is also most activity of possible observers, no animals were sighted on dedicated surveys in the Lagunas Grandes de Cuyabeno. Since in this area, most manatees were sighted during the last years, our surveys indicate that even in the Cuyabeno River system populations seem to be at very low levels.

However, compilation of occasional sightings of park rangers, natives, tour guides and own observations without dedicated surveys give an encouraging result of a total of 40 – 49 manatees seen in the Cuyabeno Reserve during 3 years. But for each year this only counts for 10 to 17 animals seen and only one sighting is from the Lagartococha river system. Even thoug there is far more activity of potential observers in the Cuyabeno river than in the more remote Lagartococha river, this still indicates that manatee numbers in the Lagartocha river seem to be critically low and Manatees are not as abundant as they used to be in the Cuyabeno river and the Lagunas Grandes de Cuyabeno. If we consider our information on manatees killed, 2 – 7 animals were killed each year since 1995. In 1997 the 7 manatees killed would be more than 60 % of all the animals seen, which is far from being sustainable.

Besides, on our surveys in the Lagartococha River we frequently met Peruvian hunters, who travelled all the way upstream the Lagartococha River to hunt black caimans and according to some conversations with them, they occasionally take manatees as well. But they say that they hardly find them any more.

As for observations by [4] in Brasil, in the Cuyabeno Reserve, there is no definite hunting season but manatees are killed whenever possible. According to [14] the Siona Indians practised a self-imposed ban on manatee hunting in 1984 because of low manatee populations. But in 1996 four manatees were reportedly killed by the

Siona Indians (Sionas pers. com), and in 1998 a total of eight manatees were killed, six by the Sionas and two by the Quichua Indians (Sionas and Quichuas pers. com.). Hence, hunting was carried on throughout the years and the hunting ban was never in force.

Considering that our hunting reports do not count for all manatees taken from the Cuyabeno reserve and numbers mentioned here are likely underestimates, [11] are probably wrong in assuming that the fact that most manatee habitat is within protected areas, gives some protection to manatees in Ecuador. If actual trends continue, manatees in the Lagartococha River will soon follow the situation of Zancudococha, where they were extirpated since the early 90s. For the entire Amazon basin, Grimwood in 1968 already mentions that the Amazonian Manatee is considered "nearer extinction than perhaps any other mammal of the Amazon region". Timm [14] estimated that if the current level of harvest goes on unabated, Amazonian manatees would be extinct in Ecuador within 10 – 15 years. However, our study carried out 16 years later, shows that few animals remain in the Cuyabeno River, numbers in the Lagartococha river seem to be critically low and manatees have disappeared from the Iripari Lagoon about five years before our survey started.

Conclusions

To date, there is no improvement in control and enforcement of the laws in Ecuador, besides other threats such as habitat degradation, oil spills and contamination of rivers in even remote areas like the Cuyabeno and Lagartocha river (see [12]) are not considered here. And since 1999, no further studies on manatees have been carried out in the Cuyabeno Reserve or any other area of the Ecuadorian Amazon. However, Amazonian manatees have maintained a high genetic variability, which might indicate recovery of the population after severe hunting until 30 to 40 years ago [15]. More research on population size and conservation education programs are urgently needed and in order to avoid extinction of Amazonian Manatees, breeding programmes following the example of the INPA aquatic mammal centre in Manaus, should be implemented in other countries.

Acknowledgements

During the four years project, Park rangers of the Cuyabeno Reserve helped in the field and with the logistics. I am especially grateful to Gonzalo Meza, Eugenio Ortiz, Daniel Payauaje, Luis Borbor and my field assistants Rafael Aguinda, Susanne Thaler, Becky Miller, Kumi Rattenbury, and many others. My thanks also go to the tour-guides, Sionas, Cofanes and Quichuas who provided information and to Luis Albuja and Kelly Swing, who gave important comments. This project was financed by Yaqu Pacha eV., Germany and with a grant of the German Academic Exchange Program (DAAD).

Referencias

[1] Timm, R., Albuja, L., and Clausson, B. 1986. "Ecology, distribution, harvest and conservation of the amazonian manatee *Trichechus Inunguis* in Ecuador." *Biotropica*. 2, 150–156.

[2] Colores, F., Colares, F., Rosas, F., and Colares, E. 1990. "Amazonian manatee (*Trichechus inunguis*): A 15 year long-term study." *Proceedings American Association of Zoo Veterinarians*.

[3] Best, R. 1983. "Apparent dry-season fasting in amazonian manatees (mammalia: sirenia)." *Biotropica*. 15, 61–64.

[4] Rosas, F. 1994. "Biology, conservation and status of the amazonian manatee *Trichechus Inunguis*." *Mammal Rev*. 24, 49–59.

[5] Reeves, R., Leatherwood, S., Jefferson, T., Curry, B., and Henningsen, T. 1996. "Amazonian manatees, *Trichechus inunguis*, in Perú: Distribution, exploitation and conservation status." *Interciencia*. 6, 246–254.

[6] Junk, W. and daSilva, V. 1997. "Mammals, reptiles and amphibians." *Ecological Studies*. 409–413.

[7] Best, R. 1984. "The aquatic mammals and reptiles of the Amazon." *Unknown Journal*. 371–412.

[8] Grimwood, I. 1968. "Endangered mammals in Perú." *Oryx 9*. 411–421.

[9] Pinedo-Vasquez, M. 1988. "The river people of maynas." Technical report. Univ. of California Press, Berkeley.

[10] Best, R. 1982. "Seasonal breeding in the amazonian manatee, *Trichechus inunguis* (mammalia: sirenia)." *Biotropica*. 14, 76–78.

[11] Tirira, D., Utreras, V., and Denkinger, J. 2001. "Manatí Amazónico (*Trichechus Inunguis*)." Libro rojo de los mamíferos del Ecuador. SIMBIOE EcoCiencia Ministerio de Ambiente UICN. Serie Libros rojos de Ecuador, Publicación especial sobre los mamíferos del Ecuador 4. Quito. 124–125.

[12] Denkinger, J. 2001. "*Demographic studies of the amazon river Dolphin (*Inia Geoffrensis*) in the Cuyabeno Reserve, Ecuador*" PhD thesis University of Bielefeld, Germany2001.

[13] Reynolds, J. 1981. "Behaviour in the west indian manatee with emphasis on feeding and diving." *Florida Scientist*. 1, 233–242.

[14] Timm, R., Albuja, L., and Clausson, B. 1989. "Siona hunting techniques for the larger aquatic vertebrates in amazonian Ecuador." *Studies on Neotropical Fauna*. 24, 1–7.

[15] Cantanhede, A., Silva, V. D., Farias, I., Hrbek, T., Lazzarini, S., and Alves-Gomes, J. 2005. "Phylogeography and population genetics of the endangered amazonian manatee, *Trichechus inunguis* Natterer, 1883 (mammalia, Sirenia)." *Molecular Ecology*. 14, 401–413.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
REVISIÓN/REVIEW SECCIÓN/SECTION B

Los primates ecuatorianos, estudios y perspectivas

Stella de la Torre[1*]

[1] *Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
[*] *Autor principal/Corresponding author, e-mail: sdelatorre@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: C. Zambrano, Ph.D.
Recibido/Received: 03/30/2010. Aceptado/Accepted: 05/13/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 05/25/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

There are 20 primate species in Ecuador, 17 species live in the forests east of the Andes and 4 in the west. Despite the ecological importance of this group, we know very little about the distribution and population status of the species. Most of the primatological studies have been carried out in two protected areas in the Amazon, the Cuyabeno Reserve and the Yasuní National Park. There are even less studies of primates west of the Andes. In general, the studies have focused only on some primate communities and populations and although they have provided important information for the conservation of this Order, our knowledge is still incomplete. The pygmy marmoset *Callithrix pygmaea* is likely to be the primate species of which we have more information about its population status in Ecuador. From 1996 to date we have carried out ecological and behavioral research including periodical censuses in gallery forests in 9 Amazonian localities. We have found evidence that the degree of human impact has an inverse relationship with the ecological density of the marmosets. To increase our knowledge and to promote the conservation of Ecuadorian primates we need to develop new studies and to continue with the on-going ones. A network of primatologist could facilitate information exchange and the development of compatible and comparable methods. We also need to promote local participation in research to assure the continuity of the studies and to support the education and environmental awareness of the people who share the forests with non-human primates.

Keywords. Ecuador, primates, ecology, behavior, conservation.

Resumen

En el Ecuador habitan 20 especies de primates, 17 especies en los bosques del oriente y 4 especies en los del occidente de los Andes. A pesar de la importancia ecológica de este grupo, conocemos muy poco sobre la distribución real de las especies y el estado de sus poblaciones. La mayoría de los estudios primatológicos se han realizado en dos áreas protegidas de la Amazonía, la Reserva Faunística Cuyabeno y el Parque Nacional Yasuní, hay muy pocos estudios en otras regiones del país. En términos generales, las investigaciones realizadas se han enfocado sólo en una parte de las comunidades y poblaciones de primates del país y aunque estos estudios han aportado con información importante para la conservación de este Orden, todavía es mucho lo que nos queda por conocer. El leoncillo *Callithrix pygmaea* es probablemente la especie de primate ecuatoriano sobre la que tenemos más información del estado de sus poblaciones. Desde 1996 hasta el presente hemos realizado estudios de ecología y comportamiento que han incluido censos periódicos en bosques de galería de 9 localidades de la Amazonía. Hemos encontrado evidencia de que el grado de impacto humano tiene una relación inversa con la densidad ecológica de los leoncillos. Para mejorar el conocimiento y aportar a la conservación de los primates ecuatorianos es necesario realizar nuevas investigaciones de ecología y comportamiento aplicadas a la conservación y continuar con las existentes. La creación de una red de investigadores facilitaría el intercambio de información y el desarrollo de métodos compatibles y comparables. La participación local en las investigaciones debe promoverse para asegurar la continuidad de los estudios y contribuir a la educación y conciencia ambiental de la gente que comparte el bosque con los primates.

Palabras Clave. Ecuador, primates, ecología, comportamiento, conservación.

ISSN 1390-5384

CC BY NC SA

Introducción

Ecuador, el más pequeño de los países megadiversos, se destaca por el alto número de especies presentes en cada uno de sus 256 000 km^2 [1, 2]. Entre las miles de especies nativas y endémicas del país, dedicar un artículo a 20 de estas especies podría parecer exagerado, pero la importancia de las 20 especies de primates ecuatorianos es tal, que amerita no solo un artículo si no un sinnúmero de estudios y acciones que nos permitan conocerlos, conservarlos y mantener sus funciones ecológicas como dispersores, polinizadores, depredadores y presas en los ecosistemas tropicales. Esta importancia fue reconocida hace cientos de años por comunidades ancestrales que dieron a los primates un papel protagónico en su cosmovisión y cultura. En el siglo XXI, su estudio nos permite atisbar en la historia evolutiva de nuestra especie y de nuestro comportamiento [3, 4]. Los primates son, pues, un patrimonio natural único para las presentes y futuras generaciones.

Sin embargo, a pesar de su importancia y de las graves amenazas antropogénicas que los afectan, como la pérdida de hábitat, la cacería y el tráfico de animales vivos [3, 5, 6], los primates ecuatorianos han recibido poca atención por parte de la comunidad científica nacional e internacional. En este artículo haré una breve introducción de las especies de primates ecuatorianos y revisaré en forma general los estudios que con ellas se han realizado, para luego presentar algunos de los resultados de la investigación que con mi equipo de trabajo hemos realizado en los últimos 14 años con la especie de primate antropoide más pequeña del mundo, el leoncillo *Callithrix pygmaea*, para entender su ecología, comportamiento y así apoyar a su conservación. Finalmente, propondré acciones que deberíamos realizar para que el desarrollo futuro de la primatología en el Ecuador tenga un impacto positivo de mayor magnitud sobre la conservación de nuestros parientes más cercanos.

Metodología

La investigación bibliográfica fue realizada en bibliotecas nacionales (USFQ, ECOLAP, TBS, PUCE) y bases de datos electrónicas internacionales que incluyeron la del Wisconsin Regional Primate Research Center, JStor y EBSCO; algunas publicaciones fueron proporcionadas directamente por los autores.

La metodología de las investigaciones de campo que se analizan en algunas secciones del artículo ha sido presentada en detalle en las publicaciones respectivas y se describe también en la sección específica.

Primates ecuatorianos, taxonomía y distribución

De acuerdo a la taxonomía propuesta por Groves [7], en el Ecuador existen 20 especies de primates pertenecientes a las familias Aotidae (2 especies), Atelidae (6 especies), Cebidae:Hapalinae (4 especies), Cebidae:Cebinae (4 especies) y Pithecidae (4 especies) (Figura 1). La cordillera de los Andes es una importante barrera para la distribución de estas especies, 17 de ellas habitan los bosques de la región amazónica, al este de los Andes, mientras que 4 habitan en los bosques al oeste de esta cadena montañosa [3, 8, 9] (Tabla 1). Aunque no conocemos completamente cuál es la distribución de estas especies, sabemos que las distribuciones del mono araña de la costa *Ateles fusciceps* y el mono capuchino de la costa *Cebus capucinus*, al occidente de los Andes, están considerablemente disminuidas, en gran parte por la destrucción antropogénica de los ecosistemas naturales en esta región en tiempos históricos y actuales [1, 3, 8]. Entre las especies con distribuciones restringidas al este de los Andes están el chichico de manto dorado *Saguinus tripartitus* y el cotoncillo negro *Callicebus lucifer* [3, 8].

Figura 1: Fotografías de primates del Ecuador (créditos: Pablo Yépez).

La magnitud de los impactos antropogénicos sobre la distribución de los primates ecuatorianos puede ser mejor entendida si se considera que el Ecuador es el país con la más alta densidad poblacional de América del Sur (aprox. 51 habitantes/km^2) y una elevada tasa de deforestación, estimada entre 150 000 y 190 000 ha por año [1, 10]. La destrucción de los hábitats de los primates ha sido mayor en los bosques de la costa (al occidente de los Andes) pues desde tiempos prehistóricos, ésta ha sido la región con mayor desarrollo agrícola gracias a la disponibilidad de agua, grandes planicies y suelos fértiles [1]. No hay estudios sistemáticos sobre los efectos de la cacería y la captura de animales vivos en las poblaciones de primates en Ecuador; sin embargo, existe evidencia que sugiere que éstos son negativos y considerables, al menos en algunas áreas (i.e., Amazonía norte, incluyendo la Reserva de Biósfera Yasuní y la Reserva de Producción Faunística Cuyabeno) y para algunas especies (i.e., leoncillos, chorongos *Lagothrix* spp. y monos araña *Ateles belzebuth*) [11, 12, 13, 14].

De las 35 áreas que conforman el Patrimonio de Áreas Naturales Protegidas del Ecuador y que protegen alrededor del 19 % de la superficie del país, 24 estarían albergando a poblaciones de diferentes especies de primates; esta estimación se basa inicialmente en la ubicación

	Nombre Común Español – Inglés	Occidente	Oriente
Familia Aotidae			
Aotus lemurinus	Mono nocturno - Owl monkey		X
Aotus vociferans	Mono nocturno - Owl monkey		X
Familia Atelidae			
Alouatta palliata	Aullador negro - Mantled howler monkey	X	
Alouatta seniculus	Aullador rojo - Red howler monkey		X
Ateles belzebuth	Mono araña de vientre amarillo - White-bellied spider monkey		X
Ateles fusciceps	Mono araña de cabeza marrón - Brown-headed spider monkey	X	
Lagothrix lagotricha	Mono lanudo cenizo - Common woolly monkey		X
Lagothrix poeppigii	Mono lanudo rojizo - Poeppig's woolly monkey		X
Familia Cebidae - Subfamilia Hapalinae			
Callithrix pygmaea	Leoncillo - Pygmy marmoset		X
Saguinus fuscicollis	Chichico rojo - Saddle-back tamarin		X
Saguinus graellsi	Chichico negro - Graellś tamarin		X
Saguinus tripartitus	Chichico de manto dorado - Golden-mantle tamarin		X
Familia Cebidae - Subfamilia Cebinae			
Cebus albifrons	Machín blanco - White-fronted capuchin	X	X
Cebus apella	Machín café - Brown capuchin		X
Cebus capucinus	Machín de cara blanca - White-faced capuchin	X	
Saimiri sciureus	Mono ardilla - Squirrel monkey		X
Familia Pitheciidae			
Callicebus discolor	Cotoncillo rojo - Dusky titi monkey		X
Callicebus lucifer	Cotoncillo negro - Yellow-handed titi monkey		X
Pithecia aequatorialis	Parahuaco ecuatorial - Equatorial saki		X
Pithecia monachus	Parahuaco negro - Monk saki		X

Tabla 1: Primates del Ecuador, distribución al occidente y oriente de los Andes.

geográfica de las áreas y en una revisión de los inventarios faunísticos que usualmente se realizan en cada área como un requisito previo a su declaratoria [15]. Considerando que la información de los inventarios en algunas de estas áreas es todavía incompleta, he preferido usar el modo condicional al inicio de este párrafo pues lo cierto es que desconocemos cuáles especies de primates habitan en algunas de las áreas protegidas del país. Tampoco conocemos cuál es el estado de conservación, la estructura y la dinámica de la mayoría de las poblaciones primates, aun en aquellas áreas donde se ha confirmado su presencia. De ello se deduce que cualquier análisis sobre la efectividad de las áreas protegidas en la conservación de estas especies no pasa de ser una especulación.

Estudios primatológicos en el Ecuador

El análisis de la sección anterior evidencia la necesidad de generar información sobre los rangos de distribución de las especies de primates ecuatorianos, la disponibilidad y calidad de sus hábitats y el estado de sus poblaciones, tanto dentro de las áreas protegidas como fuera de ellas. Considerando las amenazas que se ciernen sobre este grupo, estos conocimientos son fundamentales para desarrollar acciones de conservación adecuadas y eficaces [16]. Sin embargo, una buena parte de las escasas investigaciones primatológicas realizadas en el Ecuador, si bien han contribuido con información importante sobre algunas especies, no han tenido como objetivo principal el determinar el estado de sus poblaciones pues han buscado responder a preguntas de otros campos de la ecología y el comportamiento (i.e., comportamiento territorial, relaciones afiliativas, patrones de movimiento, dieta, etc.) de interés para los investigadores y centros de investigación, en su mayoría extranjeros, que han financiado estos estudios. La escasez de estudios sobre el estado de las poblaciones de primates, y de prácticamente todos los taxa de la megadiversidad ecuatoriana, es resultado, en parte, de la falta de apoyo político y financiero a la investigación científica y a los temas ambientales en el país pues este tipo de información debería ser prioritaria para quienes nacimos en él.

Los estudios primatológicos en el Ecuador se iniciaron en la década de los 80s a ambos lados de los Andes; uno de ellos fue una descripción general de la comunidad de primates de la Reserva Cuyabeno [17], mientras que el otro fue un estudio de una población del mono araña de la costa [18]. El estudio de Ulloa [17] fue el inicio de una serie de estudios en la Reserva Cuyabeno sobre aspectos ecológicos (i.e., preferencias de hábitat, área de vida, dieta) y comportamentales (épocas reproductivas, patrones de movimiento) de algunas especies de esa comunidad como el chichico negro *Saguinus graellsi* [19], el parahuaque *Pithecia monachus*, el cotoncillo negro *Callicebus lucifer* y el mono machín *Cebus albifrons* [20]. Con base en estas investigaciones, a mediados de los 90 se publicó un pequeño artículo sobre la primatología en el Ecuador que no ha sido actualizado hasta ahora [21]. A pesar de sus auspiciosos inicios, la mayoría de estos estudios no tuvo continuidad por lo que, desde finales de los 90, las investigaciones primatológicas en esta Reserva disminuyeron considerablemente, aunque se mantuvo el estudio a largo plazo del leoncillo realizado por mi equipo de trabajo en ésta y otras áreas de la Amazonía [6, 22, 23, 24, 25, 26]. A mediados de los 90 hicimos también un estudio piloto para evaluar el impacto humano sobre el comportamiento vocal del aullador rojo *Alouatta seniculus* en dos áreas de la Reserva [27].

A finales de los 90, se iniciaron los estudios primatológicos en el Parque Nacional Yasuní y su área de influencia, gracias a la creación de dos estaciones científicas manejadas por la Universidad Católica y la Universidad San Francisco de Quito, respectivamente. Estos estudios se han enfocado en especies como el leoncillo, el chichico de manto dorado *Saguinus tripartitus*,

el mono nocturno *Aotus vociferans*, el songo songo *C. discolor,* el parahuaque *P. aequatorialis*, el chorongo *Lagothrix poeppigii* y el mono araña *Ateles belzebuth* [6, 14, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42]. Adicionalmente, se han realizado algunos estudios preliminares sobre comunidades de primates en ciertas áreas de la Amazonía sur del Ecuador, como por ejemplo la reserva Oglán [43]. El aporte de investigaciones como las realizadas por Dew [14], Dew et al. [29] y Link y Di Fiore [36] para la conservación de los primates y sus hábitats es indudable pues han contribuido con evidencia clara sobre la importancia ecológica de algunas especies como dispersoras de semillas (i.e., monos araña y chorongos) y sobre los impactos de actividades humanas, como la cacería y la construcción de carreteras, en las poblaciones de estas especies.

Los estudios primatológicos al oeste de los Andes han sido más escasos; entre ellos están los realizados con los aulladores negros *Alouatta palliata* en las Reservas de Bilsa, Cerro Blanco y Los Cedros [44, 45] y en los remanentes de bosque del río Pachijal, al noroccidente de Quito [46]. Luego del trabajo de Madden y Albuja [18], el mono araña de la costa volvió a ser estudiado en los últimos tres años en la Reserva Los Cedros [45, 47]. En esta Reserva se realizó también recientemente un estudio poblacional preliminar del mono capuchino de la costa *Cebus capucinus* [45] y se ha implementado un programa exitoso de educación ambiental con el proyecto Primenet [48]. En el 2002, Albuja y Arcos [49] hicieron una evaluación de las poblaciones del machín de cara blanca de la costa *Cebus albifrons* cf. *aequatorialis* en 28 localidades en el centro y sur de la región costera.

Esta breve revisión evidencia que las investigaciones realizadas se han enfocado solo una parte de las comunidades y poblaciones de primates ecuatorianos. Por si esto fuera poco, el acceso a esta información en el país es limitado; en el último año, por ejemplo, los resultados de investigaciones museológicas y bibliográficas realizadas por estudiantes del curso de Mastozoología Neotropical de la Universidad San Francisco de Quito para conocer detalles de la distribución de los primates ecuatorianos, fueron bastante pobres, no solo por la escasez de colecciones y estudios sino también porque no existen medios y canales adecuados de difusión de la información. Esta falta de información sobre la dinámica de las poblaciones de los primates ecuatorianos e incluso sobre su distribución geográfica dificulta considerablemente el diseño y ejecución de acciones adecuadas de protección de sus hábitats y de control de las actividades humanas que las afectan.

Las especies de primates incluidas en el Libro Rojo de Mamíferos del Ecuador publicado en el año 2001 son: *Ateles fusciceps* (En Peligro Crítico), *Alouatta palliata, Ateles belzebuth, Cebus capucinus* y *Lagothrix lagotricha* (Vulnerables), *Saguinus fuscicollis, Saguinus tripartitus, Cebus albifrons aequatorialis* y *Cebus apella* (Casi amenazados), *Aotus lemurinus* y *Pithecia aequatorialis* (Datos deficientes) [50]. Sin restar valor a esta primera categorización, la elaboración de estas listas se basó más en el principio de precaución y en estudios en otros países, que en estudios sobre la ecología y estado de las poblaciones en el Ecuador. Este procedimiento dio origen a errores, como la exclusión inicial del leoncillo *Callithrix pygmaea* pues en ese momento no se consideró la evidencia acumulada en la investigación que, con mi equipo de trabajo, hemos realizado en varias poblaciones de esta especie [6]. Con esta evidencia en el año 2009, el leoncillo fue re-evaluado e incluido en la lista de especies Vulnerables en el Ecuador a ser publicada en un futuro próximo. En la siguiente sección, presentaré algunos de los resultados de nuestro estudio sobre la ecología y comportamiento del leoncillo, relacionándolos con lo que conocemos sobre su estado de conservación.

Área de Estudio	Tipo de Bosque	Impacto Humano	ind/km de Río $\pm$ S.E.
Hormiga	Hábitat borde entre Tierra Firme e Igapó	Alto turismo y tráfico humano	4.38$\pm$0.2
Zancudo	Hábitat borde entre Tierra Firme e Igapó	Bajo turismo y tráfico humano	6.39$\pm$0
San Pablo	Varzea	Agricultura y tala intensivas, tráfico humano moderado	3.3$\pm$0.2
Sehuaya	Varzea	Agricultura moderada, alta tala y tráfico humano	4.3$\pm$0
Sacha	Varzea	Alto turismo, intenso tráfico humano	7.28$\pm$0.1
Amazoonico	Varzea	Turismo moderado, alto tráfico humano	3.13$\pm$0.3
Aguas Blancas	Varzea	Bajo tráfico humano	5.6$\pm$0.3
Tiputini	Varzea	Turismo y tráfico humano moderado	1.9$\pm$0.4
Shushufindi	Hábitat borde entre Tierra Firme e Igapó	Baja agricultura, tala y tráfico humano moderados	5.36$\pm$0

Tabla 2: Densidad ecológica del leoncillo (individuos/km de orilla de río) en las áreas de estudio, promediada entre años.

Ecología y conservación del leoncillo, *Callithrix pygmaea*, en la Amazonía ecuatoriana

El leoncillo es probablemente la especie de primate ecuatoriano de la que conocemos más sobre el estado de sus poblaciones. Desde 1996 hasta el presente, como parte de nuestra investigación eco-etológica, hemos realizado censos periódicos en los bosques de galería, hábitat de esta especie, en 9 localidades de la Amazonía ecuatoriana, cada una con diferente grado de alteración e impacto humano (Tabla 2), para estimar la densidad ecológica de sus poblaciones. Los censos anuales, en transectos de 3 km de río, fueron realizados con una canoa a remo por 2-3 investigadores durante dos días, en la mañana (de 06h00 a 10h00) y en la tarde (de 15h00 a 18h00). Estas horas coinciden con picos normales de actividad de los leoncillos y por lo tanto, facilitan su observación desde

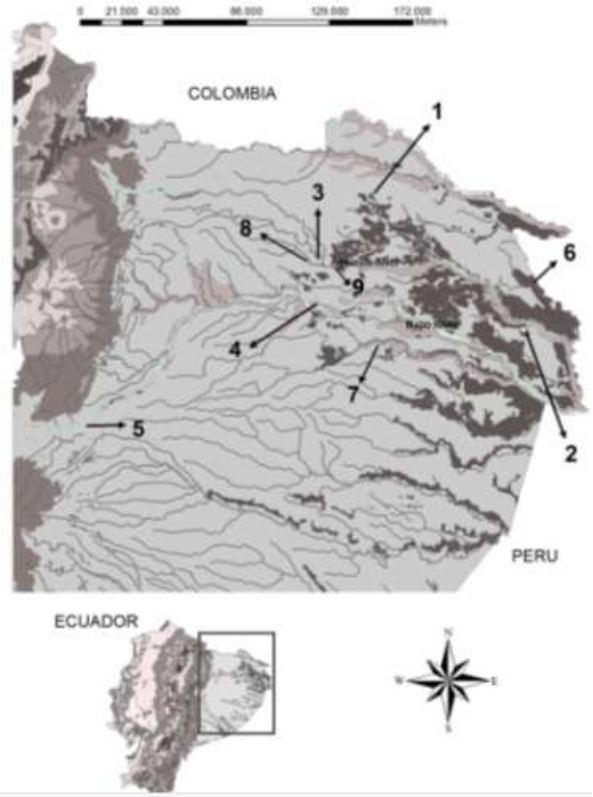


Figura 2: Poblaciones de leoncillos estudiadas en la Amazonía ecuatoriana (1: Hormiga, 2: Zancudo, 3: San Pablo, 4: Sacha, 5: Amazoonico, 6: Aguas Blancas, 7: Tiputini, 8: Shushufindi, 9: Sehuaya).

el río [26]. Los censos en ríos grandes, como el Napo y Aguarico, se hicieron durante dos días en el margen norte y dos días en el margen sur, pues al ser ríos de más de 200 m de ancho, no es posible observar a los leoncillos de las dos orillas simultáneamente. Los transectos incluyeron las áreas de vida de varios de nuestros grupos de estudio [6]. En cada censo buscamos árboles de exudados comidos por los leoncillos y nos guiamos por estos árboles y por las vocalizaciones de estos animales para encontrar los grupos. Para calcular la densidad ecológica de leoncillos (número de individuos por unidad de área adecuada disponible, en este caso, por kilómetro de orilla de río [51] usamos el promedio de individuos por grupo de todas las poblaciones estudiadas en la Amazonía norte del Ecuador [6].

Nuestros resultados sugieren que la densidad de leoncillos es mayor en los bosques inundados a orillas de grandes ríos de aguas blancas (varzeas) que en los bosques inundados por aguas negras (igapó). Hemos encontrado también evidencia de que el grado de impacto humano tiene una relación inversa con la densidad, pues en los bosques más afectados por actividades humanas como tala y agricultura, tanto de varzea como de igapó, las densidades de los leoncillos tienden a ser menores (Tabla 2).

La destrucción y fragmentación de los bosques de galería para la agricultura y ganadería, el aumento del ruido ambiental y de tráfico humano, la cacería y la captura de animales vivos para el mercado de mascotas son factores que afectan negativamente a las poblaciones de esta especie [5, 6, 24].

La mayoría de los resultados de nuestros censos poblacionales están de acuerdo con este patrón; sin embargo, hasta la fecha, la densidad más baja de leoncillos ha sido registrada en bosques de varzea a orillas del río Tiputini, un río de mediano caudal en un área de relativamente bajo impacto humano. Estos resultados llamaron nuestra atención pues esperábamos que, al ser ésta un área con varzeas bien conservadas, las densidades fueran por lo menos tan altas como en áreas características similares (i.e., río Aguas Blancas) (Figura 2). Con el afán de entender mejor cuáles son las condiciones ambientales del área que podrían estar relacionadas con la baja densidad de leoncillos, decidimos estudiar con más profundidad a uno de los escasos grupos de leoncillos a orillas del río Tiputini. Este grupo era, además, particularmente interesante pues estaba constituido únicamente por una pareja de un macho y una hembra, que desde el 2007 ocupó un área cercana a la Estación de Biodiversidad Tiputini de la Universidad San Francisco de Quito.

Desde el año 2007, obtuvimos información sobre el área de vida, dieta y comportamientos afiliativos de este grupo para evaluar los potenciales cambios que pudieran darse mientras la pareja se consolidaba, información importante pues se conoce muy poco sobre el proceso de establecimiento de nuevos grupos en esta especie. Ahora sabemos que el presupuesto de tiempo diario y el patrón de alimentación no son diferentes a los reportados en grupos de otras poblaciones en el Ecuador. Adicionalmente, las especies que estos animales usan como fuentes de exudados (*Parkia balslevii, Sloanea* cf. *guianensis, Spondias mombin*) también son usadas por leoncillos de otras poblaciones [26]. El tamaño del área de vida de esta pareja (aprox. 0.4 ha) es proporcional al de otros grupos en otras localidades considerando que en ella viven apenas dos individuos. No hemos registrado interacciones inusuales entre estos leoncillos y otras especies (de primates o de otros taxa) por lo que hasta el momento no hemos podido identificar diferencias entre este grupo y los de otras poblaciones que expliquen la baja densidad de esta especie en el área.

Existe, sin embargo, un factor que continuamos estudiando y que se relaciona con la posibilidad de que la calidad y/o cantidad de los exudados producidos en las varzeas del Tiputini sea diferente de la de otros bosques. Hace aproximadamente 3 años empezamos a tomar muestras de suelo en los alrededores de las plantas productoras de exudados en 4 poblaciones de leoncillos (Amazónico, San Pablo, Sehuaya y Tiputini); estas muestras han sido analizadas para varios parámetros físico-químicos en los laboratorios del SESA (Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria). Al mismo tiempo hemos medido la concentración de azúcar de muestras de los exudados producidos por estas fuentes con

Figura 3: Fotografías del programa de educación ambiental para la conservación de los primates y de sus hábitats (créditos: Pablo Yépez).

un refractómetro portátil (REF113 Brix). Los resultados preliminares sugieren que los suelos del Tiputini son más ácidos y tienen menos materia orgánica que los suelos de las varzeas en las otras poblaciones, y en el Tiputini las concentraciones de azúcar de los exudados están entre las más bajas registradas (de la Torre et al., en prep.). Esperamos que en el futuro este estudio nos permita dilucidar en qué medida las características edáficas pueden afectar a la producción de exudados y a la estructura y dinámica de las poblaciones de leoncillos.

Por otro lado, la investigación que realizamos sobre el proceso de consolidación de la pareja de leoncillos en el Tiputini muestra que, si bien, los comportamientos afiliativos, como el acicalamiento, entre los dos individuos han aumentado con el paso del tiempo, su frecuencia es todavía baja comparada con la de otros grupos [24, 52] lo cual estaría relacionado con el hecho de que la pareja todavía no tiene crías, aun cuando ha estado junta por alrededor de 2 años. Estos resultados sugieren que el establecimiento de nuevos grupos en esta especie es un proceso lento y complicado que dificultaría la recuperación de poblaciones afectadas por actividades humanas.

La eventual recuperación de los leoncillos en otras áreas de la Amazonía, con más impacto humano que el Tiputini, es todavía más difícil por el grado de fragmentación de los bosques de galería usados por esta especie. En una de las poblaciones estudiadas en el río Aguarico, en un periodo de 4 años, desde el año 2001 al 2005, el área total de los fragmentos de bosque de varzea se redujo en un 85 % al ser éstos transformados en cultivos y pastizales; una reducción similar se dio en el área promedio de cada fragmento. Esta alteración de los hábitats estuvo relacionada con una disminución de la densidad poblacional de la especie en aproximadamente un 70 % en esta localidad [11]. La población se recuperó lentamente en los años siguientes gracias a una mayor protección de los remanentes de bosques en la zona. En el 2009 iniciamos un estudio de marcadores moleculares con ADN extraído de heces para evaluar la variabilidad genética en esta población de leoncillos y estimar cómo ésta es afectada por la fragmentación de los hábitats. Los resultados de este estudio piloto sugieren que los grupos que están más aislados por la fragmentación muestran una variabilidad genética reducida y una menor heterocigosidad que sugiere la existencia de endogamia [53].

Con el fin de aportar más directamente a solucionar los problemas de conservación detectados en esta especie, hace aproximadamente 8 años iniciamos un programa de educación ambiental en las comunidades indígenas y de colonos, vecinas a las poblaciones de leoncillos que estudiamos. Nuestro objetivo fue promover un cambio de actitud en la población, basado en el conocimiento, valoración y respeto a los primates y a todas las formas de vida, que se tradujera en una disminución del tráfico de animales vivos, la cacería y la deforestación. Inicialmente enfocamos este programa en niños y jóvenes, quienes participaban en talleres para los cuales desarrollamos varias herramientas pedagógicas como cuadernillos, juegos, manualidades, obras de títeres y videos [5] (Figura 3).

Aunque la acogida a este esfuerzo fue grande y nuestro grupo meta, en todas las comunidades, demostró interés y pareció haber entendido nuestro mensaje, siempre hemos estado conscientes de nuestras limitaciones. Todos los procesos de educación son lentos y los resultados positivos obtenidos en un taller de 1 o 2 días de duración pueden borrarse rápidamente de la mente de un niño si en su familia y comunidad sus padres y vecinos tienen poca conciencia ambiental y escasez de alternativas de sustento. Es por esto que, aunque hemos mantenido y, en lo posible, incrementado nuestros talleres de educación ambiental, decidimos, desde el año 2004, ir un paso más allá y desarrollar un programa más ambicioso de conservación en una de las áreas donde trabajamos y en la cual tenemos estrechas relaciones de amistad con sus habitantes ancestrales, los Secoya [54, 55].

En este programa desarrollamos líneas de investigación con parabiólogos Secoya que tienen una participación directa en el trabajo de campo, en el análisis de los datos y publicación de los resultados. La aplicación de estas investigaciones, incluyendo la investigación primatológica, contribuye al manejo de la diversidad y los recursos naturales en estas tierras al ser la base sobre la cual se sustenta la implementación de regulaciones de actividades extractivas, como la cacería, y el desarrollo de proyectos de producción sustentable, como el turismo comunitario, la cría de peces nativos y la agroforestería ecológica, que esperamos sean fuentes de ingresos para los Secoya que les permitan dejar de lado otras actividades, como la tala y la agricultura a gran escala, y conservar sus bosques, su biodiversidad y su cultura: su única y particular forma de entender el mundo.

Implicaciones para la conservación

Es evidente que aun conocemos muy poco sobre los primates ecuatorianos y que carecemos de información básica sobre la distribución y estado de las poblaciones,

necesaria para desarrollar adecuadamente herramientas y acciones de conservación. Es prioritario, entonces, llevar a cabo investigaciones que nos permitan llenar estos vacíos de información; entre los temas de investigaciones que deberían realizarse en el corto plazo se sugieren los siguientes:

- Inventarios detallados en aquellas áreas protegidas en las que no se conoce con exactitud cuáles especies de primates están presentes y estudios biogeográficos en todos los ecosistemas de distribución potencial del Orden para definir la distribución de las especies en el país,
- Estudios de evaluación de la eficacia de las áreas protegidas para conservar poblaciones viables de primates,
- Estudios de ecología de paisaje que incluyan análisis espacio-temporales de las tasas de deforestación y de fragmentación de los hábitats utilizados por los primates a ambos lados de los Andes para evaluar su potencial impacto sobre las poblaciones y para evaluar estrategias que permitan mitigar sus efectos,
- Estudios de la diversidad genética de poblaciones para evaluar su grado de aislamiento, los efectos de la fragmentación y su nivel de vulnerabilidad,
- Estudios ampliados de la intensidad de la cacería y la captura de animales vivos y de su efecto sobre las poblaciones de las especies afectadas,
- Estudios ampliados sobre las funciones ecológicas de las especies en los diferentes ecosistemas,
- Estudios de manejo adaptativo de las diferentes especies

El apoyo del estado ecuatoriano para este tipo de investigaciones ha sido escaso o inexistente; es posible, sin embargo, desarrollar alianzas con investigadores y organizaciones foráneas, una modalidad de colaboración iniciada hace varios años en toda Latinoamérica [56]; pero es también necesario incrementar el número de primatólogos ecuatorianos que puedan participar en estas investigaciones. La formación de estos investigadores es un reto para las universidades del país y para quienes ahora trabajamos en este campo. Debemos, sin duda, mejorar la difusión de los estudios realizados entre los estudiantes universitarios de carreras de biología o ecología, mi decisión de escribir este artículo en español obedece no sólo a que éste es mi idioma natal, sino también a que creo que con ello puedo difundir mejor esta información entre las generaciones jóvenes de ecuatorianos.

La creación de una red de investigadores ecuatorianos y extranjeros que realicen estudios primatológicos en el país facilitaría el intercambio de información y el desarrollo de metodologías compatibles y comparables. La red podría ayudarnos a definir aquellas áreas y temas que requieren de más estudios y podría promover las relaciones de colaboración entre programas y científicos que podrían luego traducirse en propuestas de estrategias de conservación y manejo de los primates ecuatorianos.

La participación local en las investigaciones debe ser fomentada e incrementada para asegurar la continuidad de los estudios y para aportar a la educación y conciencia ambiental de las comunidades que comparten los bosques con los primates; esta estrategia es fundamental para la conservación de este Orden. La velocidad de los cambios ambientales por acciones humanas es tal que, tarde o temprano, quienes hacemos investigación tenemos que involucrarnos en proyectos de conservación con las comunidades en cuyos bosques trabajamos. Con estas comunidades debemos caminar juntos un camino desconocido y azaroso buscando formas de vida sustentables que permitan que culturas ancestrales, como la Secoya, que se originó y evolucionó en los bosques tropicales, todavía tengan un espacio y una posibilidad de existir. El camino hacia esas nuevas formas de vida está lleno de problemas, desilusiones y frustraciones, pero los leoncillos, los otros monos, los seres humanos y toda la vida, bien merecemos el esfuerzo.

Agradecimientos

Las siguientes instituciones han apoyado nuestra investigación en sus diferentes etapas: Ministerio del Ambiente del Ecuador, Wisconsin Regional Primate Center (NIH Grant RR00167), Estación Biológica Tiputini, Transturi, Neotropic Turis, Selva Viva y Sacha Lodge. Un especial agradecimiento a Pablo Yépez y Charles T. Snowdon, mis compañeros de sueños y aventuras, a Delfín Payaguaje, Alfredo Payaguaje, José Payaguaje, Hernán Payaguaje, Daniel Payaguaje, Lucía de la Torre, Monserrat Bejarano, Fernanda Tomaselli, Natalie Herdoíza, Diego Nieto, Hernán Castaneda, Santiago Molina, Beatriz Romero, Margarita Brandt, André Izurieta y Carolina Proaño por su valiosa asistencia en la investigación y a Rodrigo Arcos y dos revisores anónimos por sus valiosos comentarios sobre este manuscrito. Las siguientes becas han permitido el desarrollo de nuestro trabajo: NIH Grant MH 29775, National Geographic Society Grant 5806-96, Primate Action Funds/Conservation International, Milwaukee Zoological Society, Tinker-Nave Fund, University of Wisconsin Davis Fund, Latin American Studies Program in American Universities, LASPAU, USFQ-Small Grants, fundación VIHOMA, Ecofondo/FAN y WCS/USAID.

Referencias

[1] Ministerio del Ambiente, EcoCiencia, UICN. 2001. “La biodiversidad del Ecuador; Informe 2000.” Ministerio del Ambiente/EcoCiencia/UICN. Quito

[2] Mittermeier, R. A., Robles, P., and Goettsch-Mittermeier, C. 1997. “Megadiversidad, los países

biológicamente más ricos del mundo." *CEMEX S.A. y Agrupación Sierra Madre, México*.

[3] de la Torre, S. 2000. "Primates de la Amazonía Ecuatoriana - Primates of Amazonian Ecuador." *Proyecto PETRAMAZ/SIMBIOE, Quito*.

[4] Vickers, W. 2000. "*Los Sionas y Secoyas, su adaptación al ambiente amazónico.*", Editorial Abya-Yala, Quito.

[5] de la Torre, S. and Yépez, P. 2003. "Environmental education, a didactic tool for the conservation of pygmy marmosets *Cebuella pygmaea* in ecuadorian amazon." *Neotropical Primates*. 11, 73–75.

[6] de la Torre, S., Yépez, P., and Snowdown, C. T. 2009. "Ecology and conservation of pygmy marmosets in amazonian ecuador." In L. C. Davis, S. M. Ford, and L. Porter, (ed.), The smallest anthropoids: The *Marmoset/Callimico Radiation*, 451–464. Springer Verlag, New York.

[7] Groves, C. 2001. "Primate Taxonomy." Smithsonian Institution Press, Washington DC.

[8] Tirira, D. 2007. "*Guía de campo de los mamíferos del Ecuador.*" Ediciones Murciélago Blanco. Publicación especial sobre los mamíferos del Ecuador 6, Quito.

[9] Arcos, R., Albuja, L., and Moreno, P. 2007. "Nuevos registros y ampliación del rango de distribución de algunos mamíferos del ecuador." *Politécnica 27(4) Biología 7*. 133–139.

[10] Varea, A., Barrera, C., Maldonado, A. M., Endara, L., and Real, B. 1997. "*Ecologismo ecuatorial.*", CEDEP/Abya-Yala, Quito.

[11] de la Torre, S., Yépez, P., and Snowdown, C. T. 2007. "Ecología y conservación del leoncillo *Callithrix (Cebuella) pygmaea* en tierras Secoya." En Caminando en el sendero, hacia la conservación del ambiente y la cultura Secoya. 91–98 Fundación VIHOMA. Quito.

[12] Tufiño, P. 2007. "El cuarto jinete del apocalipsis." Revista GAIA, Quito.

[13] WCS–Programa Ecuador 2006. "Efectos de las carreteras sobre la fauna silvestre en el Parque Nacional Yasuní." WCS Boletín 1, Quito.

[14] Dew, J. L., Greenberg, J., Franzen, M., and Fiore, A. D. 2003. "Road to extinction: GIS modeling of road development and hunting pressure on Amazonian primates." *American Journal of Physical Anthropology Suppl*. 36:89.

[15] ECOLAP, Ministerio del Ambiente 2007. "Guía del patrimonio de áreas naturales protegidas del Ecuador." ECOLAP/MAE/ECOFONDO/FAN/ DARWINNET: IGM, Quito.

[16] Brockelman, W. Y. and Ali, R. 1987 "Methods of surveying and sampling forest primate populations." In C. W. Marsh and R. A. Mittermeier, (ed.), Primate Conservation in the tropical rain forest, 23–59. Alan R. Liss, Inc., New York.

[17] Ulloa, R. 1998. "Estudio sinecológico de primates en la reserva de producción faunística cuyabeno, amazonía ecuatoriana." Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.

[18] Madden, R. and Albuja, L. 1989. "Estado actual de *Ateles fusciceps fusciceps* en el noroccidente ecuatoriano." *Revista Politécnica*. 14, 113–157.

[19] de la Torre, S., Campos, F., and deVries, T. 1995. "Home range and birth seasonality of *Saguinus nigricollis graellsi* in Ecuadorian Amazon." *American Journal of Primatology*. 37, 39–56.

[20] de Vries, T., Campos, F., de la Torre, S., Asanza, E., Sosa, A., and Rodríguez, F. 1993. "La investigación para la conservación de la diversidad biológica en el Ecuador." In P. A. Mena and L. Suárez, (ed.), La investigación para la conservación de la diversidad biológica en el Ecuador, 167–22. Ecociencia, Quito.

[21] de la Torre, S., Utreras, V., and Campos, F. 1995. "An overview of primatological studies in Ecuador: primates of the Cuyabeno Reserve." *Neotropical Primates*. 3, 169–171.

[22] de la Torre, S. and Snowdown, C. T. 2002. "Environmental correlates of vocal communication of wild pygmy marmosets." *Animal Behaviour*. 63, 847–856.

[23] de la Torre, S. and Snowdown, C. T. 2009. "Dialects in pygmy marmosets? inter-population variation in call structure." *American Journal of Primatology*. 71, 333–342.

[24] de la Torre, S., Snowdown, C. T., and Bejarano, M. 2009. "Effects of human activities on pygmy marmosets in Ecuadorian Amazon." *Biological Conservation*. 94, 153–163.

[25] Snowdon, C. T. and de la Torre, S. 2002. "Multiple environmental contexts and communication in pygmy marmosets." *Journal of Comparative Psychology*. 116, 182–1883.

[26] Yépez, P., de la Torre, S., and Snowdown, C. T. 2005. "Interpopulation differences in exudate feeding of pygmy marmosets in Ecuadorian Amazonia." *American Journal of Primatology*. 66, 145–158.

[27] de la Torre, S., Snowdown, C. T., and Bejarano, M. 1999. "Preliminary survey of the effects of ecotourism and human traffic on the howling behaviour of red howler monkeys, *Alouatta seniculus*, in ecuadorian amazon." *American Journal of Primatology*. 3, 84–86.

[28] Carrillo-Bilbao, G., Fiore, A. D., and Fernández-Duque, E. 2005. "Dieta, forrajeo y presupuesto de tiempo en cotoncillos *(callicebus discolor)* del Parque Nacional Yasuní en la Amazonia Ecuatoriana." *Neotropical Primates*. 13, 7–11.

[29] Dew, J. L. 2005. "Foraging, food choice, and food processing by sympatric ripe fruit specialists: *Lagothrix lagotricha poeppigii* and *Ateles belzebuth belzebuth*." *International Journal of Primatology*. 26, 1107–1135.

[30] Fiore, A. D. 2004. "Diet and feeding ecology of woolly monkeys in a western Amazonian rain forest." *International Journal of Primatology*. 25, 767–801.

[31] Fiore, A. D. 2009. "Genetic approaches to the study of dispersal and kinship in new world primates." In P. A. Garber, A. Estrada, J. C. Bicca-Marques, E. W. Heymann, and K. B. Strier, (ed.), South American Primates: Comparative Perspectives in the Study of Behavior, Ecology, and Conservation, 211–250 Springer, New York.

[32] Fiore, A. D. and Fleischer, R. C. 2005. "Social behavior, reproductive strategies, and population genetic structure of *lagothrix poeppigii*." *International Journal of Primatology*. 26, 1137–1173.

[33] Fiore, A. D. and Schwindt, D. M. 2004. "A preliminary study of social behavior and pair-bonding in wild titi monkeys *(Callicebus discolor)* in Amazonian Ecuador." *International Journal of Primatology Supplement*. 38:87.

[34] Fiore, A. D. and Fernandez-Duque, E. 2007. "Adult male replacemente in socially monogamous equatorial saki monkeys *(Pithecia aequatorialis)*." *Folia Primatologica*. 78, 88–98.

[35] Kostrub, C. E. 2004. "Preliminary field observations of goldenmantled tamarins, *Saguinus tripartitus*, in eastern Ecuador." *Neotropical Primates*. 5, 102–103.

[36] Link, A. and Fiore, A. D. 2006. "Seed dispersal by spider monkeys and its importance in the maintenance of neotropical rain-forest diversity." *Journal of Tropical Ecology*. 22, 235–246.

[37] Pozo-Rivera, W. 2001. "Social behavior and diet of the spider monkey, *Ateles belzebuth*, in the Yasuni National Park, Ecuador." *Neotropical Primates*. 9, 74.

[38] Pozo-Rivera, W. 2004. "Habitat preferences of six non-Atelidae primates of Yasuni, Ecuador." *Ecología Aplicada*. 3, 128–133.

[39] Schmitt, C., Fiore, A. D., Hurst, D., and Fernandez-Duque, E. 2005. "Maternally-initiated babysitting by wild adult male equatorial sakis *(Pithecia aequatorialis)* in Yasuní National Park, Ecuador." Yasuní National Park, Ecuador. 1st Annual NYCEP Symposium: "Monkeys: Old and New".

[40] Sendall, C., Fernandez-Duque, E., and Fiore, A. D. 2006. "A brief investigation into the maintenance of proximity during estrus by titi monkeys *(Callicebus discolor)*." 34th Annual Meeting of the Canadian Association for Physical Anthropology.

[41] Sendall, C., Fernandez-Duque, E., and Fiore, A. D. 2007. "A preliminary study of mate-guarding in wild titi monkeys *(Callicebus discolor)*." *American Journal of Physical Anthropology Supplement*. 44, 214–215.

[42] Youlatos, D. and Pozo-Rivera, W. 1999. "Preliminary observations on the songo songo (dusky titi monkey, *Callicebus moloch)* of northeastern ecuador." *Neotropical Primates*. 7, 45–46.

[43] Carrillo-Bilbao, G. A., Bravo, J. J., Martin-Solano, S. and Huynen, M. C. 2007. "Preliminary approach of the community of primates in the protected area of Oglán Alto, Arajuno-Pastaza, Ecuador." Abstracts of the 2nd Congress of European Federation of Primatology. Praga.

[44] Charlat, S., Thatcher, O. R., Hartmann, N., Patel, Y. G., Saillan, M., and Vooren, E. 2000. "Survey of *Alouatta palliata* at the Bilsa Biological Reserve, north-west Ecuador." *Neotropical Primates*. 8, 40–44.

[45] Gavilanez-Endara, M. M. 2006. "Demografía, actividad y preferencia de hábitat de tres especies de primates *(Alouatta palliata, Ateles fusciceps y Cebus capucinus)* en un bosque nublado del noroccidente ecuatoriano." Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.

[46] Arcos, R. and Ruiz, A. 2008. "Preferencias en el uso del estrato vertical por monos aulladores *(Alouatta palliata)*." Memorias de las XXXII Jornadas Nacionales de Biología, Loja.

[47] Tirira, D. 2004. "Estado actual del mono araña de cabeza café (*Ateles fusciceps* Gray, 1866) (Primates:Atelidae) en el Ecuador." *Lyonia*. 6, 17–24.

[48] Tirira, D. 2008. "*Mamíferos de los bosques húmedos del noroccidente del Ecuador.*", Ediciones Murciélago Blanco. Publicación especial sobre los mamíferos del Ecuador 7, Quito.

[49] Albuja, L. and Arcos, R. 2007. "Evaluación de las poblaciones de *Cebus albifrons cf. aequatorialis* en los bosques suroccidentales ecuatorianos." *Politécnica 27(4) Biología 7*. 59–69.

[50] Tirira, D. 2001. "*Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador.*", Quito: SIMBIOE / Ecociencia / Ministerio del Ambiente / UICN, Serie Libros Rojos del Ecuador, Tomo 1, Publicación Especial sobre los Mamíferos del Ecuador 4.

[51] Smith, R. L. and Smith, T. M. 2000. "*Elements of Ecology.*", Addison-Wesley Longman. NY.

[52] Herdoíza, N. 2008. "*Actividad, comportamientos de pareja y aspectos ecológicos de un grupo en formación de leoncillos* Cebuella pygmaea *en la Estación de Biodiversidad Tiputini*.", Tesis de Licenciatura. Universidad San Francisco de Quito, Quito.

[53] Nieto, D., de la Torre, S., Troya, A., Arahana, V., and Torres, M. L. 2010. "Evaluación preliminar de la diversidad genética del leoncillo *Callithrix pygmaea* (Primates:Cebidae: Callithrichinae) mediante microsatélites (SSR: Short sequence repeat)." *Avances en Ciencias e Ingenierías*. 2, B1–B5.

[54] de la Torre, S. and Yépez, P. 2007. "*Caminando en el sendero, hacia la conservación del ambiente y la cultura Secoya.*", Fundación VIHOMA. Quito.

[55] Yépez, P., de la Torre, S., Cerón, C., and Palacios, W. 2005. "*Al inicio del sendero: Estudios Etnobotánicos Secoya.*", Ed. Arboleda. Quito.

[56] Estrada, A. and A.Garber, P. 2009 "Comparative perspectives in the study of South American primates: research priorities and conservation imperatives." In P. A. Garber, A. Estrada, J. C. Bicca-Marques, E. W. Heymann K. B., and Strier, (ed.), South American Primates: Comparative Perspectives in the Study of Behavior, Ecology, and Conservation, 509–531 Springer, New York.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
COMUNICACIÓN/COMMUNICATION SECCIÓN/SECTION C

Strain hardening of crystalline materials

Edison A. Bonifaz[1*]

[1]*Colegio de Ciencias e Ingeniería - El Politécnico, Universidad San Francisco de Quito.*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
[*]*Autor principal/Corresponding author, e-mail: edisonb@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: F. J. Torres, Dr.
Recibido/Received: 01/26/2010. Aceptado/Accepted: 02/25/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 05/21/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

To describe the work hardening process of crystalline materials in uniaxial deformation, a gradient-one-internal-variable model (GM1) constructed in the basis of the Kocks-Mecking model is proposed. The time and temperature dependence of flow stress is accounted via grain boundary migration, and the migration is related to annihilation of extrinsic grain boundary dislocations (EGBD's) by climb *via* lattice diffusion of vacancies at the triple points. To model the polycrystalline behavior of commercially pure nickel (from a composite point of view) by means of the finite element method, virtual specimens with dimensions in the range 3 - 25 *um* should be used.

Keywords. Dislocations, grain boundary, finite element method, polycrystalline behavior.

Resumen

Para describir el proceso de endurecimiento de materiales cristalinos en deformación uniaxial, un modelo de gradiente variable interna simple (GM1) construido en base del conocido modelo de Kocks-Mecking es propuesto. La dependencia en tiempo y temperatura de la tensión de flujo es considerada vía migración de bordes de grano, y la migración es relacionada al aniquilamiento de dislocaciones de borde de grano extrínsecas (EGBD's) mediante climb vía difusión de red de vacancias en puntos triples. Para modelar el comportamiento policristalino de níquel comercialmente puro (desde un punto de vista de un compuesto) por medio del método del elemento finito, probetas virtuales con dimensiones en el rango de 3–25 μm deberían ser usadas.

Palabras Clave. Dislocaciones, borde de grano, método de los elementos finitos, comportamiento policristalino.

Introducción

Ashby [1] showed that polycrystalline specimens, even in pure metals, deform plastically in a non-uniform way, so, the total dislocation density, ρ^T, defined as the sum of geometrically necessary dislocations ρ^G and statistically stored dislocations ρ^S can be used to represent polycrystalline flow stress at any strain by means of the following equation

$$\sigma = \sigma_0 + M\alpha Gb\sqrt{\rho}^T \qquad (1)$$

Here, σ_o considers the additive contribution from lattice resistance at zero temperature σ_p (Peierls or friction stress), and solution hardening stress from alloying elements σ_{ss}, i.e., $\sigma_0 = \sigma_p + \sigma_{ss}$,*M* is the average Taylor factor, which evolves in the process of straining, *b* is the magnitude of the Burgers vector, *G* an appropriate shear modulus and α a constant of order 0.3. Equation (1) is supported from the experimental observations carried out by Narutani and Takamura [2] and other investigators [3] [4] [5] , indicating that the flow stress is proportional to the square root of dislocation density ρ, irrespective of the grain size, amount of strain and test temperature. Ashby's total dislocation density ρ^T definition assume that the geometrically necessary dislocations, ρ^G, have no direct influence on the accumulation of the statistically stored dislocations ρ^S. The statistically stored dislocations are accumulated in the matrix of pure crystals during straining and are responsible for the normal 3-stage hardening [1] . On the other hand, the difference in crystallographic orientation between neighboring grains can be corrected by introducing geometrically necessary dislocations, which are introduced to accommodate the incompatibility of deformation between grains.

Thompson et al [6] have shown during straining that in-

ISSN 1390-5384

homogeneous deformation occurs adjacent to grain boundaries, leading to a concept of a harder 'mantle' close to the boundary and a softer 'core' in the grain interior. Furthermore, Li [7] has shown that grain boundaries can act as sources for dislocations and via TEM Murr [8] corroborated Li's proposal that grain boundary ledges act as sources for dislocations during straining. Therefore besides the intrinsic grain boundary dislocations, extrinsic grain boundary dislocations (EGBD's), can be formed during straining, giving the mantle of geometrically necessary dislocations adjacent to the grain boundary. It was also shown by Meyers and Ashworth [9] that shear stresses can exist initially at low strain levels in the grain boundaries, up to three times higher than the overall homogeneously applied stress. Therefore generation of dislocations would usually occur at grain boundary ledges, before sources operated in the grain interior. The flow stress in the boundary therefore is greater than the overall bulk value, this being the mantle and core proposal of Thompson et al. [6]

Previous research by our group has shown that 2.5 - 6 % strain give the highest Σ_{sp} values, where sigma is the reciprocal density of coincident sites. For these low strain values, it was proposed that strain levels around 2.5-6 % produce the mantle-core effect, whereas greater strains such as 9 and 12 % strains result in the flow stress of the core and mantle being approximately the same [10]. During subsequent heat treatment at these low strain values recovery process are underway and recrystallization does not occur, whereas at higher strain levels, depending on temperature, recrystallization may occur and new high angle grain boundaries form destroying the existing microstructure which is conducive to the formation of special boundaries.

During the annealing of lightly strained 316 stainless steel, Sangal and Tangri [11] showed, that the non-equilibrium grain boundaries formed by straining (EGBD's), can be transferred to an equilibrium state via grain boundary migration, and the migration is related to annihilation in the area of the grain boundary. The annihilation of the EGBD's is a function of temperature and time is given by the following equation [11] :

$$\rho^e = \frac{1}{\frac{1}{\rho^o} + \left\{ \frac{D_s G V \left[1 - 2\ln\left(\frac{r_o}{L}\right)\right]}{L(1-v)kT\ln\left(\frac{R_o}{r_o}\right)} \right\}} \qquad (2)$$

where ρ^o is the initial dislocation density, D_s is the self-diffusion coefficient, V is the atomic volume, L is the length of grain boundary, r_o is approximately equal to the Burger's vector, R_o is approximately equal to the half distance between triple points, G is the shear modulus and t is time. Note that at temperatures below the recovery process, $\rho^e \approx \rho^o$.

The Gradient one-internal-variable model (GM1)

This model is constructed on the basis of the following equations [12] :

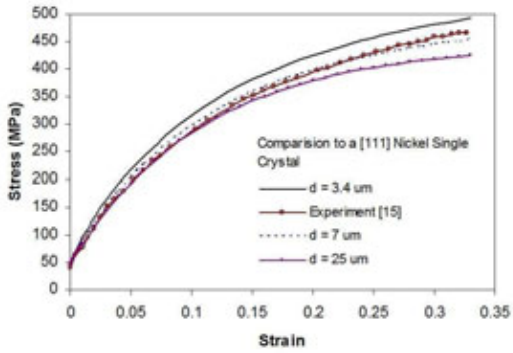


Figure 1: Experimental and calculated stress-strain curves for [111] single crystals. Model parameters: *M*=3, α=0.3, *b*= 2.52E-8 cm, *G*=116.5 GPa, =293 K, ρ^e =1E8 cm^{-2}, K_1=947000 cm^{-1} [2] , K_2=6.12 [2] , *d*=3.4, 7 and 25 *um*, σ_o = 21.8 MPa [13] .

$$\sigma = \sigma_0 + M\alpha Gb\sqrt{\rho^S + \rho^G} \qquad (3)$$

$$\rho^S = \left[\frac{K_1}{K_2}\left(1 - e^{\frac{-MK_2\overline{\varepsilon}}{2}}\right) + \sqrt{\rho^e} e^{\frac{-MK_2\overline{\varepsilon}}{2}} \right]^2 \qquad (4)$$

$$\rho^G \approx \frac{\overline{\varepsilon}}{4bd} \qquad (5)$$

Here, $\overline{\varepsilon}$ represents the tensile equivalent strain and ρ^e is the dislocation density at time t. K_1 and K_2 characterize the processes of dislocation storage and concurrent dislocation annihilation by dynamic recovery, respectively [2] [14] . To validate the model, true stress-true strain curves for three grain sizes of nickel are shown in Fig. 1, as a comparison to a [111] crystal result.

The grain size diameter *d* = 7 *um* is shown to agree very well, while the grain sizes *d*= 3.4 *um* and *d* = 25 *um* agree reasonably well.

Conclusions

A gradient-one-internal-variable model constructed in the basis of the Kocks-Mecking model is proposed. If all of the above parameters are consistent with experimental observations, to model the polycrystalline behaviour of commercially pure nickel (from a composite point of view) by means of the finite element method, virtual specimens with dimensions in the range 3 - 25 *um* should be used.

Referencias

[1] Ashby, M. F. 1970. "The Deformation of Plastically Non-homogeneous Materials". *Phil. Mag.* 21, 399-421

[2] Narutani, T. and Takamura, J. 1991. "Grain-size Strengthening in Terms of Dislocation Density Measured by Resistivity". *Acta Metall. Mater.* 39(8), 2037–2049.

[3] Mecking, H. and Kocks, U. 1981. "Kinetics of Flow and Strain-hardening". *Acta Metall*. 29, 1865-1875.

[4] Meakin, J. D. and Petch, N. J. 1974. "Strain-hardening of Polycrystals: the Alfa-brass". *Phil. Mag.* 30, 1149-1156.

[5] Dingley, D. J. and McLean, D. 1967. “Components of the Flow Stress of Iron”. *Acta Metall*. 15. 885-901.

[6] Thompson, A. W. and Flanagan, W. F. 1973. “The Dependence of Polycristal Work Hardening on Grain Size”. *Acta Metall*. 21, 1017-1028.

[7] James, C. and Li, M. 1963. “Petch Relation and Grain Boundary Sources”. *Trans. of the Metallurgical Society of AIME*. 227, 239–247.

[8] Murr, L. 1975. *Met. Trans.* 6A, 505-515.

[9] Meyers, A. and Ashworth, E. *Phil. Mag. A.* 46(5), 737-759.

[10] Guyot, S. and Richards, N. L. 2005. “Effect of Small Strain Levels on Special Boundary Distribution in Commercially Pure Nickel”. *Journal of Materials Eng. and Performance*. 14, 85-90.

[11] Sangal, S. and Tangri, K. 1989. “The Effect of Small Plastic Deformation and Annealing on the Properties of Polycristals: Part I and Part II”. *Met. Trans.* 20A, 471-485.

[12] Bonifaz, E. A. 2000. *“Modelo Elastoplástico de Estructuras Bifásicas Policristalinas”* PhD thesis University of Navarra-Spain.

[13] Thompson, A. W. 1975. “Yielding in Nickel as a Function of Grain or Cell Size”. *Acta Metall*. 23, 1337-1342.

[14] Estrin, Y. 1988. “Dislocation Theory based Constitutive Modelling: Foundations and Applications”. *Journal of Materials Processing Technology*. 33-39.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
ARTÍCULO/ARTICLE SECCIÓN/SECTION C

Una nueva infraestructura para el desarrollo de agentes autónomos en RoboCup

Enrique V. Carrera[1*]

[1]*Colegio de Ciencias e Ingeniería - El Politécnico, Universidad San Francisco de Quito*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
[*]*Autor principal/Corresponding author, e-mail: vcarrera@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: F. J. Torres, Dr.
Recibido/Received: 01/29/2010. Aceptado/Accepted: 02/25/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 05/21/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

ROBOCUP is an international competition for autonomous robots intended to promote research and education in Artificial Intelligence. The competition contains several separate leagues, one of which is called *Simulator League* and deals with purely simulated players. A team of players for this league can be written in any programming language. However, a major problem when constructing ROBOCUP players is to implement the basic functionality of each player, since there are several problems related to information retrieval, processing, and management, as well as the development of basic skills for the soccer players. Thus, this paper proposes a new infrastructure oriented to simplify the programming of ROBOCUP teams allowing us to concentrate on the job of controlling players without worrying about the low-level tasks previously mentioned. Besides describing the proposed infrastructure, this paper evaluates our Java implementation of the infrastructure using isolated players and complete ROBOCUP teams.

Keywords. Autonomous agents, robot soccer, software development.

Resumen

ROBOCUP es una competencia internacional para robots autónomos orientada a promover la investigación y educación en el campo de la Inteligencia Artificial. La competencia incluye varias ligas separadas, una de las cuales se denomina *Liga de Simulación* y trata únicamente con jugadores de fútbol virtuales. Un equipo para esta liga puede ser escrito en cualquier lenguaje de programación. Sin embargo, uno de los mayores problemas al momento de programar los agentes autónomos es implementar la funcionalidad básica de cada jugador, pues existen varios inconvenientes asociados a la recuperación, procesamiento y administración de la información, así como también al desarrollo de las habilidades típicas de un jugador de fútbol. Siendo así, este artículo propone una nueva infraestructura orientada a facilitar la programación de equipos para ROBOCUP, permitiendo que los programadores se concentren en las estrategias de alto nivel aplicadas por los agentes antes que en las tareas de bajo nivel previamente mencionadas. Además de describir la infraestructura propuesta, este artículo evalúa una implementación en *Java* de la mencionada infraestructura usando tanto jugadores aislados como equipos completos.

Palabras Clave. Agentes autónomos, fútbol de robots, desarrollo de software.

Introducción

Varios problemas estandarizados han sido la fuerza motriz básica para el desarrollo de las investigaciones en Inteligencia Artificial (IA). El más típico ejemplo de un problema estándar es el juego de ajedrez por computador [1]. Las investigaciones en este juego llevaron al descubrimiento de varios algoritmos de búsqueda poderosos. Siguiendo esa línea, ROBOCUP (*Robot World Cup Soccer Initiative*) propuso un nuevo problema estándar para la investigación en IA y Robótica. La propuesta busca utilizar el juego de fútbol como una plataforma para un amplio rango de investigaciones en IA, como por ejemplo: principios de diseño de agentes autónomos, colaboración entre múltiples agentes, adquisición de estrategias, razonamiento en tiempo real y fusión de sensores [2].

El objetivo a largo plazo de ROBOCUP es eventualmente producir equipos de robots que puedan competir con humanos en 2050. Para alcanzar esta meta, ROBOCUP mantiene una competencia anual para robots jugadores de fútbol y agentes inteligentes. La competencia incluye varias ligas, una de las cuales trata con robots enteramente simulados. Esta liga es denominada *Liga de*

ISSN 1390-5384

Simulación y libera a los investigadores de lidiar con problemas propios de los robots físicos como el reconocimiento de objetos, la comunicación, problemas de hardware, y otras limitaciones actuales de la robótica.

La Liga de Simulación usa un simulador de fútbol denominado *Soccer Server* [3]. Usando este simulador, un equipo de agentes escritos en cualquier lenguaje de programación que ofrezca facilidades de comunicación por *sockets* UDP/IP y manejo de cadenas de caracteres puede jugar un partido contra otro equipo. Sin embargo, uno de los mayores problemas al programar agentes para la Liga de Simulación es la implementación de la funcionalidad básica de cada jugador de fútbol. Existen varios inconvenientes relacionados a la recuperación, procesamiento y administración de la información, así como al desarrollo de las habilidades mínimas presentes en todo jugador de fútbol.

En términos generales, los programadores deben preocuparse por detalles de bajo nivel como la comunicación por *sockets* UDP, el análisis de cadenas de caracteres, la administración de la información, la ejecución de comandos, etc. Adicionalmente, habilidades básicas como encontrar el balón, mover el balón, patear en la dirección deseada, etc. deben también ser desarrolladas con la finalidad de implementar estrategias de juego de más alto nivel. De esta manera, los equipos ROBOCUP existentes son sistemas de software extremadamente sofisticados. Por ejemplo, el código C++ base del equipo *Trilearn 2003* [4], ganador de la competencia ROBOCUP 2003, tiene más de 32 mil líneas de código, mismo excluyendo las estrategias de control de alto nivel usadas por este equipo para ganar el campeonato.

Basado en lo anterior y considerando que no existen plataformas de software ampliamente utilizadas para el desarrollo de sistemas multi-agente, este artículo propone una nueva infraestructura de software para la implementación de agentes autónomos orientados a participar en ROBOCUP. La propuesta se enfoca en simplificar la programación de un equipo completo para la Liga de Simulación ofreciendo un API (*Application Programming Interface*) simple, flexible y genérico. Si bien, la primera implementación de nuestra infraestructura se basa en la programación Java, no existe nada en la propuesta que dependa del lenguaje de programación utilizado.

Para evaluar la infraestructura propuesta, se han construido varios jugadores individuales, así como equipos completos basados en estrategias de juego simples. Todos los jugadores utilizan la funcionalidad y habilidades ofrecidas por nuestra infraestructura a través del API correspondiente. De esta forma se demuestra que es posible implementar un equipo ROBOCUP completo y funcional, utilizando pocas líneas de código y sin mucha complejidad.

Fundamentos Teóricos

Esta sección discute la motivación por detrás de las competencias de ROBOCUP, así como el simulador oficial utilizado en estas competencias. Un análisis del uso de ROBOCUP en la enseñanza de IA es también realizado.

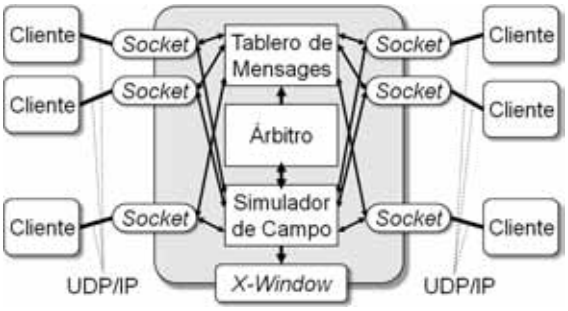


Figura 1: Estructura general del *Soccer Server***.**

RoboCup y Sistemas Multi-Agente

ROBOCUP es un intento por fomentar la investigación en IA al proveer un problema estándar en el que una amplia gama de tecnologías pueden ser integradas y examinadas. Desde el punto de vista de los sistemas multiagente, el fútbol es un buen ejemplo de problemas con muchas propiedades del mundo real, pero todavía moderadamente abstracto. El juego del fútbol se puede caracterizar principalmente porque:

- El ambiente cambia de forma dinámica y en tiempo real.
- La robustez es más importante que la elaboración.
- La cooperación dentro de un equipo es obviamente ventajosa.
- La información sobre el estado del universo es únicamente parcial.
- La capacidad de adaptación es una propiedad deseada.
- La comunicación entre jugadores no es necesariamente precisa.

En el pasado, varios dominios han sido utilizados como ejemplo para evaluar el desempeño de los sistemas multi-agente, pero normalmente se han tratado de ambientes simples y pequeños. Un partido de fútbol, por otro lado, es un ambiente complejo y relativamente grande, y las características detalladas arriba demuestran que este juego ofrece varias formas para evaluar el comportamiento de este tipo de sistemas [3]. Adicionalmente, el fútbol es un deporte conocido a nivel mundial con una gran trayectoria a lo largo de la historia.

El Simulador de RoboCup

En la Liga de Simulación, el juego entre 2 equipos virtuales de fútbol es simulado y controlado usando una arquitectura cliente-servidor. El servidor, denominado *Soccer Server*, provee la cancha de fútbol virtual y simula todos los movimientos de los jugadores y el balón. Cada cliente puede proveer la 'inteligencia' de un jugador conectándose al *Soccer Server* a través de una red

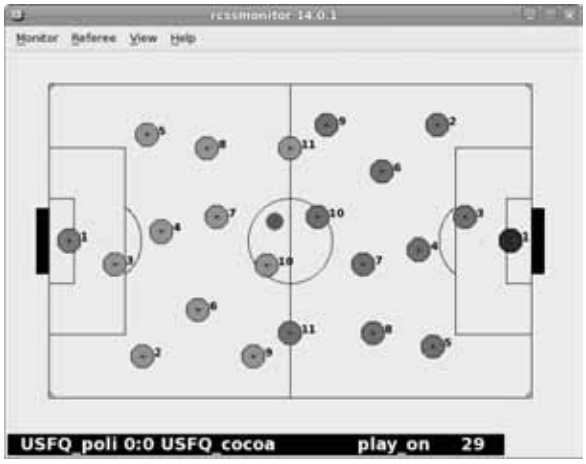


Figura 2: Visualización de un partido de fútbol a través del *Soccer Server Monitor***.**

de computadores (*i.e.*, usando *sockets* UDP/IP) y especificando las acciones que el jugador debe llevar a cabo. Como respuesta, el cliente recibe información tanto visual como auditiva capturada por los sensores del jugador correspondiente. Con la finalidad de que los clientes pueden ser programados en cualquier lenguaje, toda la comunicación entre el servidor y los clientes utiliza cadenas de caracteres en formato ASCII.

La figura 1 muestra una visión general de como el *Soccer Server* se comunica con sus clientes. Como se observa, el *Soccer Server* consta de los siguiente 3 módulos:

1. El simulador de campo crea el mundo virtual básico (*i.e.*, la cancha de fútbol), calcula los movimientos de los objetos, y verifica las posibles colisiones. La cancha de fútbol y todos los objetos en ella son bidimensionales, al punto que los jugadores y el balón son tratados como círculos. También existen varias marcaciones especiales en el campo que son utilizadas por los clientes para determinar la posición del jugador, su orientación, o la velocidad y dirección de su movimiento.
2. El tablero de mensajes maneja la comunicación auditiva entre el *Soccer Server* y sus clientes. Versiones últimas del *Soccer Server* permiten que cada equipo también tenga un entrenador que se comunica con sus jugadores a través de este tablero de mensajes.
3. El árbitro garantiza el cumplimiento de las reglas del juego. Este módulo advierte los goles, determina cuando el balón no está en juego, controla la posición de los jugadores en los tiros libres, tiros de esquina y saques, etc. Los juzgamientos del árbitro son anunciados a todos los clientes mediante mensajes audibles.

Como se aprecia en la figura 1, el *Soccer Server* también ofrece una interface para conectar un monitor *X-Window*. Una captura de pantalla del *Soccer Server Monitor* oficial es mostrada en la figura 2.

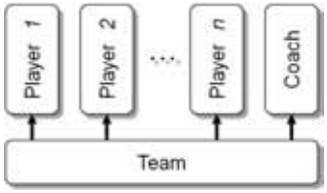


Figura 3: Estructura lógica de un equipo de fútbol.

Una característica importante del *Soccer Server* es la inclusión automática de ruido [5]. De forma a reflejar la naturaleza del mundo real, el servidor introduce varios tipos de incertidumbres en la simulación. De esta manera, valores aleatorios son adicionados al movimiento de los objetos, a los parámetros de los comandos, a la información de los sensores, etc. produciendo que los agentes interactúen con un mundo no-determinístico.

RoboCup en la Enseñanza de IA

Un problema en la enseñanza de ciencias abstractas es encontrar ejemplos ilustrativos que presenten los conceptos respectivos. Una alternativa es PBL (*Problem Based Learning*), el planteamiento de problemas a resolver mientras el profesor cambia su papel de experto al de guía. De esta forma, los estudiantes adquieren conocimientos durante la búsqueda de soluciones a los problemas planteados.

ROBOCUP encaja perfectamente en el paradigma PBL, ya que incluye problemas fácilmente definidos con una amplia variedad de soluciones potenciales, requiriendo mayor investigación y un profundo entendimiento por parte de los estudiantes. Como ROBOCUP plantea problemas que no tienen soluciones 'correctas', los estudiantes son desafiados a mejorar las ideas presentadas en libros texto o aquellas implementadas por sus compañeros.

Infraestructura Propuesta

La infraestructura propuesta sustenta su accionar en 3 clases base que pueden ser extendidas por los programadores conforme los requerimientos del equipo a crear. Estás 3 clases base son: `Team`, `Player` y `Coach`.

Team

El componente de más alto nivel en nuestra infraestructura ROBOCUP es el equipo de fútbol representado por la clase `Team`. Esta clase inicia configurando los parámetros principales de la simulación como son el nombre del equipo, el número de jugadores, la dirección IP del servidor, etc. y posteriormente invoca a los controladores de cada uno de los jugadores. El código que controla cada jugador es una clase derivada de `Player`, explicada más adelante. Adicionalmente, la clase `Team` puede también crear una instancia de la clase `Coach` que hace las veces de entrenador.

La relación entre las diversas clases base asociadas a un equipo se describe gráficamente en la figura 3. Es importante notar, que con la finalidad de cumplir las reglas

vigentes en las competencias de ROBOCUP, cada agente ejecuta de forma completamente independiente con relación a sus compañeros de equipo (*i.e.*, no existe comunicación local entre los jugadores surgidos a partir de una misma clase `Team`). De esta manera, el comportamiento de cada agente depende exclusivamente de la información sensorial colectada desde el *Soccer Server* y de su propia estrategia de control.

Player

Este componente contiene el código base que controla cada uno de los jugadores que participan de un partido de fútbol. El código de `Player` puede ser extendido de forma diferente para cada jugador o tener extensiones similares para un grupo de jugadores. La estructura de esta clase no es trivial, una visión general de como está conformado cada jugador se muestra en la figura 4. Como puede observarse, `Player` fundamenta su operación en los siguientes 7 elementos:

- *Communicator*. Este elemento está a cargo de realizar la comunicación UDP entre el agente y el *Soccer Server*. Adicionalmente, debido a que el *Soccer Server* interactúa con los clientes usando una escala de tiempo discreta (*i.e.*, los agentes pueden emitir comandos cada 100 ms y reciben la información visual correspondiente cada 150 ms), este elemento marca el inicio de cada ciclo al recibir una nueva actualización de la información visual.
- *Parser*. Este elemento analiza e interpreta toda la información sensorial que viene desde el servidor y traduce los comandos del agente al lenguaje del *Soccer Server*. Un factor clave en este módulo es la noción de independencia de lado: no importa el lado de la cancha en el que juegue el agente, toda la información ofertada a los elementos superiores es relativa a su propio lado (*i.e.*, no existe arco izquierdo o derecho, sino arco propio y arco oponente, no existen banderas superiores o inferiores, sino banderas derechas e izquierdas dependiendo del lado en que juega el agente).
- *WorldState*. Los datos mantenidos por este elemento reflejan la visión que tiene el agente del mundo real. Esta visión es generalmente incompleta y con ruido, pues se sustenta en la interpretación de la información sensorial enviada por el *Soccer Server*. Con la finalidad de tener un sistema de referencia espacial simple, un sistema de coordenadas rectangulares es utilizado para posicionar todos los objetos en la cancha. El centro de la cancha corresponde al punto `(0, 0)`, y los ejes de coordenadas son relativos a la dirección hacia donde ataca el jugador. De esta forma, se tiene acceso a una visión mucho más genérica del campo de juego.
- *PlayerState*. Los datos en este elemento resumen el estado del mundo real y la situación del agente desde su propio punto de vista. Se basa no sólo en información sensorial, sino en mediciones del estado interno del robot. Este módulo permite responder cuestionamientos como el modo de visión utilizado por el jugador, la cantidad de energía disponible, la velocidad experimentada, etc.

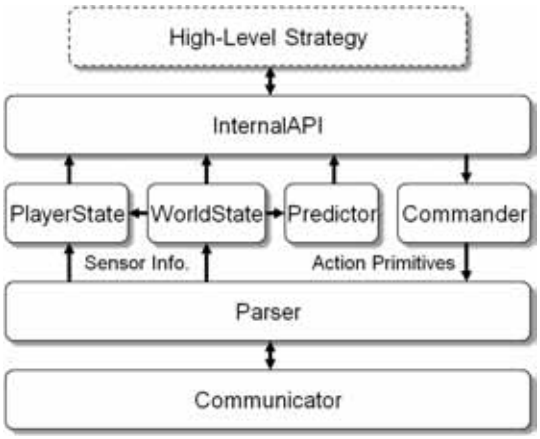


Figura 4: Estructura interna de la clase base `Player`.

- *Predictor*. Este elemento incluye algoritmos de regresión que ayudan a predecir la posición del balón y de los agentes vecinos. Para ello, se mantiene un histórico de las posiciones absolutas donde han sido observados esos elementos. Note que la predicción no es necesariamente exacta debido al ruido incluido en la información sensorial y a la escala de tiempo discreta usada por el servidor.
- *Commander*. Este elemento decide la mejor forma de ejecutar los comandos emitidos por la estrategia de alto nivel conforme el estado interno del agente y el estado de la cancha en ese instante. Se han implementado comandos de bajo y alto nivel. Los comandos de bajo nivel corresponden a ordenes implementadas directamente en el *Soccer Server* como `kick` y `turn`. Los comandos de alto nivel incluyen acciones como 'interceptar el balón', 'pasar el balón al compañero más cercano', y otras que dependen de cálculos más sofisticados (*e.g.*, la aceleración y dirección del agente, la potencia y dirección de la patada).
- *InternalAPI*. Este elemento resume toda la funcionalidad ofrecida por los módulos inferiores en un conjunto de llamadas que están al alcance de cualquier estrategia de alto nivel.

Dentro de la clase base, la estrategia de alto nivel no está definida y es justamente donde los programadores deben centrar su mayor esfuerzo al momento de extender esta clase base. La estrategia de alto nivel puede ser extremadamente simple como en los ejemplos mostrados en las próximas secciones, o incluir tecnologías propias de IA como redes neuronales (RNA), inteligencia de enjambres [6], etc.

Coach

Este componente al igual que `Player` contiene varios elementos que ayudan a implementar las estrategias de

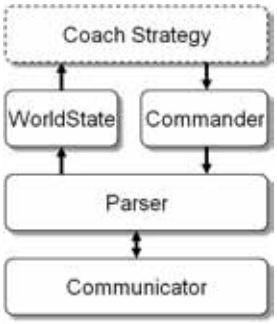


Figura 5: Estructura interna de la clase base `Coach`.

control y colaboración a nivel de equipo. Como puede observarse en la figura 5, esta clase es una adaptación simplificada de `Player`, ya que no se requiere un predictor de movimientos ni se tiene acceso al estado interno de los jugadores. Adicionalmente, se ha eliminado el elemento concentrador de llamadas `InternalAPI` debido a que normalmente la estrategia del entrenador accede a un subconjunto bastante reducido de los métodos y campos existentes en `WorldState` y `Commander` (*e.g.*, el entrenador sólo puede emitir comandos `say` para comunicarse con sus jugadores [5]).

Implementación en Java

La infraestructura propuesta en la sección anterior no depende directamente de ninguna característica del lenguaje de programación utilizado. Sin embargo, debido a que Java es un lenguaje orientado a objetos, multiplataforma, completamente portable y con excelente soporte al uso de interfaces de usuario gráficas, Java fue la primera opción para la implementación de nuestra infraestructura.

Todo el desarrollo de la nueva infraestructura se basó en la utilización de *OpenJDK* 1.6.0 a través de *NetBeans* 6.7.1. Además, para la implementación del módulo `Parser` se usó *JavaCC* (versión 4.1), un generador de análisis sumamente popular en aplicaciones Java.

El mapeo entre la estructura original de la propuesta y las clases Java implementadas es prácticamente directo. Sin embargo, entre los aspectos más sobresalientes que tuvieron que definirse durante la fase de implementación podemos mencionar:

- La estrategia de control de alto nivel debe ser implementada a través del método `strategyCycle` que es invocado al final de cada ciclo de comunicación.
- La clase `InternalAPI` incluye 2 campos principales (`field` y `player`) a través de los cuales se ofrece acceso a todos los métodos públicos implementados por `WorldState`, `Predictor`, `PlayerState` y `Commander`.
- La implementación de `Predictor` únicamente reserva espacio para las últimas 5 ubicaciones en las que han sido observados los jugadores y el balón.

```
import jplayer.*;

public class myTeam extends Team {
  public myTeam(String name, String host, int port) {
    super(name, host, port, 4); //team with 4 players
  }

  public Player getPlayer(int number) {
    switch (number) {
      case 1: return new myPlayer();
      case 2:
      case 3:
      case 4: return new otherPlayer();
    }
  }

  public static void main(String[] args) {
    Team t = new myTeam(args[0], "localhost", 6000);
    t.connectAll();
  }
}
```

Figura 6: Código Java extendiendo la clase `Team`.

```
import jplayer.*;

public class myPlayer extends Player {
  public myPlayer() {
    super();
  }

  public void strategyCycle() {
    //this should be the high-level strategy
    FieldItem ball = field.getBall();
    if (ball.getDistance() < 0.5)
      player.kickToGoal();
    else
      player.interceptBall();
  }
}
```

Figura 7: Código Java extendiendo la clase `Player`.

- La implementación de `Parser` soporta todos los protocolos de *Soccer Server* desde la versión 4 hasta la versión 13.
- En el caso particular de la clase `Coach`, ésta accede a los métodos públicos implementados por `WorldState` y `Commander` mediante los campos `field` y `coach`, respectivamente.

De acuerdo a lo expresado, la figura 6 muestra un ejemplo de como crear un equipo de fútbol mediante la extensión de la clase `Team` en Java. Puede observarse, que después de configurar cada uno de los parámetros principales, el código asigna los agentes de control de cada jugador conforme su número de identificación. Si el equipo tiene un entrenador, su número de identificación sería el 0.

De forma similar, la figura 7 presenta un ejemplo de como extender la clase `Player` para crear un agente de control para uno o varios jugadores. Como se observa, la estrategia de control debe incluirse dentro del método `strategyCycle` haciendo uso de los campos heredados `field` y `player`. En el ejemplo presentado, el jugador intenta siempre acercarse al balón, y en caso de conseguir su objetivo (*i.e.*, distancia < 0.5), patea en la dirección del gol contrario.

Finalmente, la figura 8 muestra un ejemplo de como extender la clase `Coach` de manera a crear un entrenador

```
import jplayer.*;

public class myCoach extends Coach {
  public myCoach() {
    super();
  }

  public void strategyCycle() {
    //this should be the high-level strategy
    if (field.getStatus() != field.PLAY_ON)
      coach.say("Go to initial position")
  }
}
```

Figura 8: Código Java extendiendo la clase `Coach`.

para el equipo. En el ejemplo presentado, el entrenador es sumamente simple y únicamente genera un mensaje cada vez que el juego se interrumpe por cualquier motivo. Note también la posibilidad de acceso a los campos heredados `field` y `coach`.

Evaluación

De forma a evaluar las características de la infraestructura propuesta, se han creado jugadores individuales y equipos completos con estrategias de juego simples. Estos elementos serán colocados en situaciones controladas para analizar la facilidad de uso y poder de acción de nuestra infraestructura.

Todos los experimentos fueron realizados en un computador *Pentium Dual Core* a 3.4 GHz ejecutando Linux 2.6.31 (Fedora 12) con *OpenJDK* 1.6.0. También fueron instalados los paquetes *Soccer Server* 14.0.2 y *Soccer Server Monitor* 14.0.1.

Arquero vs. Goleador

Este experimento confronta un agente atacante (con características goleadoras) contra un arquero. El atacante intenta 100 veces marcar un gol pateando desde posiciones aleatorias ubicadas entre 25 y 30 unidades del arco rival. Del otro lado, el arquero, hace su mejor esfuerzo por agarrar el balón. Este experimento muestra la robustez y eficiencia de los métodos de alto y bajo nivel ofrecidos por la infraestructura. En el caso del arquero se usa principalmente 'interceptar el balón', mientras que el atacante simplemente invoca 'patear hacia el arco rival'.

Los resultados del experimento son presentados en la tabla . Como se puede ver, el arquero intercepta el balón el 61 % de las veces. Si bien el atacante escoge el mejor ángulo de disparo para hacer el gol, los goles no ocurren tan frecuentemente. De hecho, 5 % de las veces el balón sale desviado. Considerando el indeterminismo introducido por el *Soccer Server*, creemos que estos números son bastante representativos de un comportamiento 'normal' en partidos de fútbol reales.

Pases del Balón

Para evaluar la capacidad de coordinación entre varios agentes usando los métodos de alto y bajo nivel ofrecidos por nuestra infraestructura se ha construido un equipo de 4 jugadores que intenta pasar el balón entre ellos. Para dificultar su tarea, un agente contrario trata de interceptar el balón, lo cual limita las posibilidades de pase dentro del equipo de agentes cooperantes.

Los resultados de este experimento son mostrados en la tabla . Después de 100 intentos de pase, casi 9 de cada 10 tuvieron suceso. Note que la estrategia de alto nivel no busca solamente realizar un pase, sino también mantener el balón lejos del agente contrario, y desde el punto de vista del agente receptor, inclusive la captura del balón fue realizada con éxito la mayoría de las veces.

Partido de fútbol

Si bien las evaluaciones anteriores ya presentan resultados interesantes, no hay mejor indicación de que tan buena es una infraestructura de desarrollo de Agentes RoboCup que la construcción de un equipo de fútbol completo y enfrentarlo en un partido 11 contra 11. Obviamente, como las estrategias de alto nivel no son el enfoque principal de este trabajo, se implementaron mecanismos de control simples donde cada jugador intenta mantenerse en una zona asignada previamente, capturar cuando sea posible el balón, y pasarlo a un compañero mejor posicionado. Adicionalmente, el arquero tiene una zona de cobertura más reducida y su prioridad es interceptar el balón. Por otro lado, los atacantes priorizan el patear hacia el arco contrario cuando es factible.

Al enfrentarse 2 equipos basados en las mismas estrategias de control simple, se percibió un equilibrio en el juego que no deja entrever mayores conclusiones. Quizás, esta no es la mejor forma de evaluar un equipo de agentes, pero algunos trabajos futuros mencionados en la última sección de este artículo nos permitirán realizar mejores evaluaciones del desempeño de un equipo basado en la infraestructura aquí propuesta. No obstante, es importante mencionar que durante el partido entre estos 2 equipos, se consume en media 20 % del tiempo de CPU.

Trabajos Relacionados

Los primeros intentos por ofrecer bibliotecas para usarlas en la construcción de agentes RoboCup fueron normalmente la liberación de partes del código fuente de equipos ya existentes. Uno de los equipos que más suceso tuvo en este sentido fue *CMUnited* ganador de RoboCup 1998 y 1999 [7]. El problema en este caso es que el código incluye poca o ninguna documentación y su funcionalidad está estrechamente ligada a la estructura del equipo original.

Comportamiento final	**Número**
El arquero atrapa el balón	61
El atacante marca un gol	34
El balón abandona la cancha	5
Total	**100**

Tabla 1: Arquero vs. Atacante.

Comportamiento final	Número
El pase es realizado con suceso	88
El atacante intercepta el balón	5
El balón abandona la cancha	7
Total	**100**

Tabla 2: Pases del balón.

Surge entonces la necesidad de bibliotecas bien estructuradas y documentadas para que cualquier programador pueda utilizarlas [8]. Ejemplos de este tipo de bibliotecas son *Libsclient* y *RoboLog*. *Libsclient* es una biblioteca de funciones en C que provee funcionalidades básicas a los clientes ROBOCUP. Por otro lado, *RoboLog* es una biblioteca Prolog construida sobre C++ [9], lo que facilita la utilización de inferencia lógica en la programación de los agentes ROBOCUP.

Conforme aumenta la funcionalidad de estas bibliotecas, también aumenta su tamaño, y pronto aparece la necesidad de utilizar el paradigma de orientación a objetos. Este cambio facilita el reuso de código y extiende la modularidad de las bibliotecas. Ejemplos de esta tendencia son *RoboSoc* y *Atan*. *RoboSoc* es implementado en C++ y esta orientado al desarrollo de agentes con propósitos educativos [10]. En cambio, *Atan* es parte del proyecto *VSOC* que pretende construir un equipo ROBOCUP donde cada jugador basa su control en el uso de RNA [11]. *Atan* está basado en el lenguaje Java.

Al igual que varios trabajos previos, esta infraestructura nace de la necesidad de crear un equipo ROBOCUP orientado al estudio de la inteligencia de enjambres [6]. Al percibir las falencias de las plataformas de desarrollo existentes, nuestra meta fue ofrecer funcionalidades de alto nivel a más de las básicas ya existentes en esos otros ambientes. Además, se hizo énfasis en la modularidad del código para que las estrategias de control de alto nivel puedan inclusive reemplazar parte del código interno con funcionalidades distintas o implementaciones optimizadas de las ya existentes.

Finalmente, nuestra infraestructura busca ofrecer soporte a diversos tipos de estrategias de control de una manera bastante general. Si bien existen propuestas para usar IA a través de RNA, algoritmos genéticos o inteligencia de enjambres [12, 13, 14], existen otras que combinan principalmente algoritmos de programación convencional con ciertas rutinas de IA [15, 16, 17].

Conclusiones

Este trabajo demuestra la factibilidad de implementar un equipo ROBOCUP flexible y colaborativo con pocas líneas de código. Es así que la infraestructura propuesta ayudará a que la *Liga de Simulación* pueda ser utilizada fácilmente en la enseñanza de IA mediante estrategias PBL, mejorando el entendimiento de los diversos conceptos y aplicaciones asociados a IA. La flexibilidad y modularidad incluida en nuestra infraestructura permite abordar los problemas inherentes a ROBOCUP con diversos grados de profundidad, permitiendo tanto el uso de reglas `if-else` simples como quizás esquemas de control adaptable. Por otro lado, la facilidad de usar comunicación auditiva entre los agentes y la posibilidad de incluir un entrenador, abren nuevas áreas de experimentación para el estudio de la colaboración en sistemas multi-agente.

En un futuro cercano, pretendemos hacer algunas mejoras y extensiones a nuestra infraestructura. Entre las principales podemos mencionar:

1. El desarrollo de estrategias de control de alto nivel basadas en técnicas típicamente asociadas a IA.
2. El desarrollo de un sistema de entrenamiento automático basado en el comportamiento de equipos ganadores, muy útil al trabajar con RNA.
3. La adaptación de una serie de experimentos que puedan ser usados como laboratorio para la enseñanza de IA en la USFQ.

Referencias

[1] Berliner, H. J. 1975. “Chess as problem solving: the development of a tactics analyzer.” PhD thesis Carnegie Mellon University Pittsburgh, PA, USA.

[2] Kitano, H., Asada, M., Kuniyoshi, Y., Noda, I., and Osawa, E. 1997. “RoboCup: The robot world cup initiative.” In W. Lewis Johnson and Barbara Hayes-Roth, (ed.), Proceedings of the First International Conference on Autonomous Agents, New York, NY: ACM Press. 340–347.

[3] Noda, I., Matsubara, H., Hiraki, K., and Frank, I. 1998. “Soccer Server: A tool for research on multi-agent systems.” *Applied Artificial Intelligence*. 12, 233–250.

[4] Kok, J. R., Vlassis, N., and Groen, F. 2003. “UvA Trilearn 2003 – team description.” In D. Polani, B. Browning, A. Bonarini, and K. Yoshida, (ed.), Proceedings of RoboCup 2003 International Symposium, Padua, Italy: Springer-Verlag.

[5] Chen, M., Dorer, K., Foroughi, E., Heintz, F., Huang, Z., Kapetanakis, S., Kostiadis, K., Kummeneje, J., Murray, J., Noda, I., Obst, O., Riley, P., Steffens, T., Wang, Y., and Yin, X. 2003. “RoboCup Soccer Server – User Manual.” Technical Report 7.07. The RoboCup Federation.

[6] Carrera, E. V. 2006. “Applying Collaborative Intelligence to RoboCup.” In Proceedings of the 32nd Latin-American Conference on Informatics. Santiago, Chile.

[7] Stone, P., Riley, P., and Veloso, M. 2000. “CMUnited-99: RoboCup-99 simulator world champion team.” *AI Magazine*. 21, 33–40.

[8] Tambe, M. 1997. “Towards Flexible TeamWork.” *Journal of Artificial Intelligence Research*. 7, 83–124.

[9] Murray, J., Obst, O., and Stolzenburg, F. 2000. “Robolog koblenz.” In RoboCup-99: Robot Soccer World Cup III London, UK: Springer-Verlag. 628–631.

[10] Heintz, F. 2000. “Robosoc a system for developing robocup agents for educational use.” Master’s thesis Department of Computer and Information Science, Linkoping University Linkoping, Sweden.

[11] Qasem, A., Wagner, W., and Woll, R. April 2010. Atan Project. http://atan1.sourceforge.net/.

[12] Aronsson, J. 2003. "Genetic Programming of Multi-agent Systems in the RoboCup Domain." Master's thesis Department of Computer Science, Lund University-Lund, Sweden.

[13] Kutsenok, A. 2004. Swarm AI: "A solution to soccer" Master's thesis Department of Computer Science, Rose-Hulman Institute of Technology. Terre Haute, IN.

[14] Browne, K., McCune, J., Trost, A., Evans, D., and Brogan, D. 2002. volume **2377** of Lecture Notes in Computer Science. Springer. Berlin, Germany. 499–502.

[15] Kok, J. R., Vlassis, N., and Groen, F. 2004. "UvA Trilearn 2004 – team description." In D. Nardi, M. Riedmiller, and C. Sammut, (ed.), Proceedings of RoboCup 2004 International Symposium, Lisbon, Portugal: Springer-Verlag.

[16] Gutmann, J.-S., Hatzack, W., Herrmann, I., Nebel, B., Rittinger, F., Topor, A., and Weigel, T. 2000. "The CS Freiburg Team – playing robotic soccer based on an explicit world model." *Artificial Intelligence Magazine*. 21, 37–46.

[17] Noda, I. and Stone, P. 2003. "The RoboCup Soccer Server and CMUnited Clients: Implemented Infrastructure for MAS Research." *Autonomous Agents and Multi-Agent Systems*. 7, 101–120.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
ARTÍCULO/ARTICLE SECCIÓN/SECTION C

Estudio de la co-digestión anaeróbica de desechos orgánicos agroindustriales

Daniela Almeida[1*], Diego A. Regalado[2], María J. Ampudia[1]

[1]*Colegio de Ciencias e Ingeniería - El Politécnico, Universidad San Francisco de Quito*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
[2]*Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
**Autor principal/Corresponding author, e-mail: dalmeida@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: A. Hidrobo, Dr.
Recibido/Received: 01/29/2010. Aceptado/Accepted: 02/25/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 05/21/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

The results of the study of anaerobic co-digestion of agro-industrial organic waste and animal manure are presented in this work. The experiments are divided in two stages. In the first stage the optimal ratio between vegetable waste and animal manure is studied in batch reactors. Once the results of the optimal mixture are obtained, the research of the anaerobic co-digestion continues in semi-continuous operating reactor. In this reactor, the main operating parameters can be controlled. The daily biogas production and the consumption of the buffering solution are monitored in function of the hydraulic residence time (TRH) and the daily organic load in the feed. It can be observed that the reactor operation is stable at TRH greater than 10 days and organic loads up to 4,0 kg_{DQO}/m^3d. A yield of de 100 $kg_{DQO}/m^3_{reactor}$ is achieved, while the specific biogas production obtained is of 0,31 $m^3_{biogas}/kg_{DQO,feed}$. When the TRH is reduced below 10 days and the organic load is increased simultaneously, the digester enters an unstable operation regime and it tends to acidify. This indicates that the methanogenesis is the limiting step in the process.

Keywords. biogas, anaerobic digestion, co-digestion, agro-industrial waste.

Resumen

En este trabajo se presentan los resultados de la co-digestión anaeróbica de desechos orgánicos agroindustriales y animales. Para esto se han realizado experimentos en dos etapas. En la primera etapa se estudia la mezcla óptima entre desecho vegetal y animal en reactores discontinuos. Obtenidos los resultados de la mezcla óptima, se prosigue con la investigación de la co-digestión en un reactor de régimen semi-continuo. En este reactor se controlan los principales parámetros operativos y se monitorean la producción de biogás y el consumo de solución amortiguadora de pH, en función del tiempo de residencia hidráulico (TRH) y de la carga orgánica diaria en la alimentación. Se puede observar que el biodigestor opera en condiciones estables a TRH mayores a 10 días y cargas orgánicas de hasta 4,0 kg_{DQO}/m^3d. El rendimiento alcanzado es de 100 $kg_{DQO}/m^3_{reactor}$. La producción específica de biogás es de 0,31 $m^3_{biogas}/kg_{DQO,alimentado}$. Al reducir el TRH por debajo de los 10 días y simultáneamente aumentar la carga orgánica diaria, la operación del biodigestor es inestable y tiende a acidificarse, lo cual indica que bajo estas condiciones, la metanogénesis es el paso limitante en el proceso de digestión.

Palabras Clave. biogás, biodigestión anaeróbica, co-digestión, desechos agroindustriales.

Introducción

El manejo adecuado de los desechos orgánicos agroindustriales es uno de los retos tecnológicos en la actualidad. Debido a su naturaleza, la descomposición de los desechos orgánicos conlleva la formación de lixiviados, líquidos que en caso de entrar en contacto pueden contaminar aguas subterráneas, y gases de efecto invernadero, como dióxido de carbono y metano [1, 2]. Por esta razón es de suma importancia que la disposición final de desechos orgánicos considere los procesos de degradación de los mismos.

Por otro lado, con la co-digestión de los desechos orgánicos vegetales, éstos pueden ser transformados en una fuente de energía renovable: el biogás. La biomasa obtiene su valor energético de la energía solar [3, 4]. Mediante la fotosíntesis las plantas convierten CO_2 y agua

ISSN 1390-5384

en cadenas de carbono. Estas cadenas de carbono liberan la energía acumulada al momento de romperse los enlaces para volver a convertirse en moléculas más simples como CO_2, vapor de agua, metano u otras. Estas reacciones pueden llevarse a cabo por procesos físico-químicos como en una combustión rica en oxígeno o en una pirólisis, una reacción en ausencia de oxígeno. Estos procesos son comunes cuando la biomasa de la que se dispone es seca. Si la biomasa original contiene un alto porcentaje de humedad, los procesos biológicos son energéticamente más eficientes, ya que no se necesita eliminar el agua de los desechos antes de poder ser aprovechados energéticamente [3]. Al igual que en los procesos físico-químicos mencionados anteriormente, los procesos biológicos también se pueden diferenciar de acuerdo a la presencia o ausencia de oxígeno. Cuando la biomasa tiene contacto con oxígeno se habla de procesos aeróbicos y los productos principales son CO_2 y materia orgánica no degradable, conocida como humus o compost. Si la degradación se lleva a cabo en ausencia de oxígeno, el proceso se conoce como anaeróbico. Los principales productos en este caso son biogás, un gas combustible formado por una mezcla de CO_2 y CH_4, y biol, un lodo constituido por materia orgánica no degradable anaeróbicamente y rico en nutrientes [5, 6].

Los desechos orgánicos vegetales son considerados materias primas secundarias, ya que no son cultivados o producidos específicamente para ser utilizados energéticamente, sino que son los residuos de otro proceso productivo. Debido al origen de la materia prima para este proceso, la utilización energética de esta biomasa no afecta a la seguridad alimentaria y no compite con los cultivos existentes. Por lo tanto, esta es una fuente de energía renovable de segunda generación [7, 8].

En este proyecto se investiga un posible tratamiento para los desechos orgánicos agroindustriales con un alto contenido de humedad. Por esta razón se decidió utilizar un proceso biológico anaeróbico para su degradación. Como productos se obtienen biogás y biol. El biogás tiene un alto contenido energético y es utilizado para producir energía térmica o eléctrica, y mejorar el balance energético del proceso en general. El biol es un fertilizante orgánico rico en nutrientes y microelementos, que puede ser recirculado al inicio de la cadena de producción de la materia prima orgánica.

Los resultados de la investigación de la co-digestión anaeróbica de desechos orgánicos agroindustriales con estiércol animal están divididos en dos etapas. En el primer paso se investiga la mezcla óptima entre el material orgánico vegetal y animal para la biodigestión. Estos experimentos se realizan en reactores por lotes. En el segundo paso se opera un biodigestor de régimen semi-continuo durante 120 días para maximizar la producción específica de biogás con respecto a la carga orgánica alimentada diariamente al reactor y el tiempo de residencia hidráulico.

Metodología

Equipos para la biodigestión anaeróbica

Los experimentos para determinar la mezcla óptima entre el material orgánico animal y vegetal se efectuan en régimen discontinuo. Los digestores utilizados durante estos ensayos son kitasatos dispuestos sobre una plancha de calentamiento (thermolyne nuova S18425), lo que permite mantener constante la temperatura de operación elegida de $35 \pm 2\ ^{\circ}C$. Las mantas cuentan además con un sistema de agitación magnética que induce la homogeneización de la mezcla a digerir.

Los reactores se encuentran cerrados en la parte superior con un tapón de goma con un orificio central, en el que se introduce un termómetro para el monitoreo de la temperatura. Una manguera plástica conecta la tubuladura lateral del digestor con la de un kitasato de igual capacidad, el cual funciona como dispositivo de almacenamiento del biogás. Este kitasato está conectado a su vez a una probeta graduada. Todo el sistema está herméticamente cerrado y contiene una solución ácida (H_2SO_4 0,05 M), que evita la absorción de CO_2. El gas generado durante el proceso se mide por desplazamiento de la solución del kitasato a la probeta.

Para los experimentos realizados en régimen semi-continuo se dispone de un reactor de 3 litros con control automático, modelo Cole Parmer Fermentation Systems KH-29207-00. Este modelo cuenta con sistemas de agitación continua; alimentación y muestreo semi-continuo, controladores de temperatura, pH y nivel, además de un sistema de medición volumétrica del biogás generado por desplazamiento de agua.

El sistema de agitación consta de agitador, motor eléctrico y controlador de revoluciones. El sistema de alimentación y muestreo consiste de un tubo de alimentación hacia la mezcla reactiva, una válvula de regulación de flujo y un pistón neumático. La mezcla a alimentarse se coloca en el pistón, y éste a su vez se adapta a la válvula de regulación. Una vez abierta la válvula, el pistón empuja la mezcla a través de la manguera y el tubo de alimentación. Este último deposita la alimentación dentro de la mezcla. Para la extracción de la muestra, se coloca el pistón vacío en la válvula de control y se succiona la muestra que pasa hacia la manguera, y finalmente se colecta en el pistón.

Los sistemas de control de temperatura, pH y nivel consisten en los respectivos sensores, elementos de control final y controlador automático. La temperatura se mide mediante un RTD y se controla con un sistema de control automático marca ThermoWorks. El calentamiento se realiza con una hornilla eléctrica en un baño de agua. El control de pH se realiza con un sensor de pH. El sistema de control marca Oaklon 800 series mantiene el pH entre los límites de 6,0 y 8,0. El elemento de control final está compuesto por bombas peristálticas conectadas a soluciones de hidróxido de sodio 1 M y ácido cítrico 1

M. Al registrar un parámetro inferior o superior, el controlador activa la bomba respectiva. Este tipo de bomba permite alimentar pequeñas cantidades de solución, la cual se mezcla en el reactor y provoca el incremento o disminución deseada en el pH. El nivel se controla por medio de un sensor de conductividad. Si el nivel del líquido o de las espumas alcanza el nivel máximo, se prende una alarma en el controlador marca Cole Parmer modelo 01973.

El gas generado se mide por desplazamiento de la solución ácida análogo a los reactores por lotes descritos anteriormente. El gas generado se extrae del reactor por un sistema de mangueras conectadas similar al de alimentación y muestreo.

Parámetros controlados durante la operación de los biodigestores

Durante los experimentos se debe mantener un registro diario de la agitación, la temperatura en el reactor, el pH promedio, el consumo de soluciones reguladoras de pH, la carga orgánica alimentada, el tiempo de residencia y la producción de biogás. El control de estas variables permite mantener un ambiente apropiado para el desarrollo de bacterias metanogénicas, y su consecuente capacidad de generación de biogás [9, 10].

La agitación es proporcional a la capacidad de asimilación del reactor [11]. La agitación promueve el mezclado en el reactor, lo que facilita el acceso a los nutrientes por parte de los microorganismos. Además, es un factor primordial en el control del pH, pues evita la formación de microambientes dentro del reactor [9].

La temperatura y la tasa de generación de biogás son directamente proporcionales [10]. Esto quiere decir, que a mayor temperatura, mayor capacidad de generación. Como regla general, la tasa de generación de metano se duplica por cada 10 ^{o}C de incremento en la temperatura de operación [9]. Por motivos de requerimiento energético, este experimento se opera en rango mesofílico entre 30 y 40 ^{o}C, en lugar de un rango termofílico que ocurre entre 50 y 60 ^{o}C.

Debido a las bajas tasas de crecimiento de las bacterias metanogénicas, se requiere que el proceso anaeróbico opere en las condiciones más favorables para ellas. Para conseguir estas condiciones de operación se utiliza el sistema de control automático de pH para mantener el rango óptimo que se encuentra entre 6 y 8 [11].

La baja tasa de crecimiento de las bacterias anaeróbicas para una determinada cantidad de substrato resulta en requerimientos nutricionales más bajos comparados con las bacterias aeróbicas [12]. Debido a esto, la cantidad de materia orgánica que se alimenta al reactor se convierte en un parámetro de control fundamental. Este parámetro, conocido como carga orgánica diaria, está expresado como la cantidad de demanda química de oxígeno (DQO) en la alimentación con respecto al volumen de reacción y día kg_{DQO}/m^3d. Sin embargo, los límites en la capacidad de asimilación de carga varían dependiendo del control que se mantenga de las otras variables de control.

El tiempo de residencia hidraúlico (TRH) de la mezcla reactiva está estrechamente relacionado a la carga orgánica diaria. Durante la operación del biodigestor se reduce gradualmente el tiempo de residencia de la mezcla reactiva en el reactor.

Finalmente, la producción de biogás también se controla diariamente como el desplazamiento de agua generado por la acumulación de biogás en el sistema hermético.

Durante la operación del biodigestor se desea mantener constante a los parámetros operativos como son agitación, temperatura y pH. Mientras tanto las variables que se desean optimizar varían a lo largo de los experimentos, como son maximizar la carga orgánica diaria y minimizar el tiempo de residencia hidraúlico. La respuesta del sistema frente a estos cambios se expresa en forma de producción de biogás y consumo de NaOH, variables que deben ser registradas diriamente para evaluar el rendimiento y la estabilidad del proceso de digestión anaeróbica.

Métodos de caracterización

Los métodos de caracterización que se realizan para analizar la mezcla reactiva y de la alimentación son la demanda química de oxígeno (DQO), sólidos totales (TS), y sólidos orgánicos totales (oTS).

La DQO se determina por dos métodos diferentes: el método analítico 5220 de acuerdo al libro de *Standard Methods* [13], y el método colorimétrico con viales *Test´n Tube*, de acuerdo al procedimiento de Hach [14]. Con estos análisis, se calculan los valores de carga orgánica a ser alimentados diariamente y se determina la capacidad de degradación de la materia orgánica en el reactor.

Los análisis de TS y oTS se realizan diariamente a las muestras extraídas del reactor según los métodos descritos en [13]. Esto permite mantener un registro de la acumulación de sólidos y la capacidad de los microorganismos para transformar la materia orgánica en biogás.

Resultados y Discusión

Resultados de la biodigestión anaeróbica en el proceso discontinuo

Para la determinación de la mezcla óptima entre materia orgánica vegetal y animal se utilizan los reactores en lotes. La mezcla a digerir contiene agua y el material orgánico animal y vegetal. Como inóculo se utilizan lodos provenientes de otros reactores anaeróbicos en funcionamiento. La variación de la proporción entre la materia orgánica vegetal y animal permite establecer la mezcla más adecuada para la biodigestión anaeróbica, tomando en cuenta la cantidad de biogás generada en

un tiempo de residencia de 21 días de acuerdo al método GB_{21} (DIN 38414 Teil 8) [15]. La cantidad de agua y de inóculo utilizados se mantienen constantes en todos los ensayos.

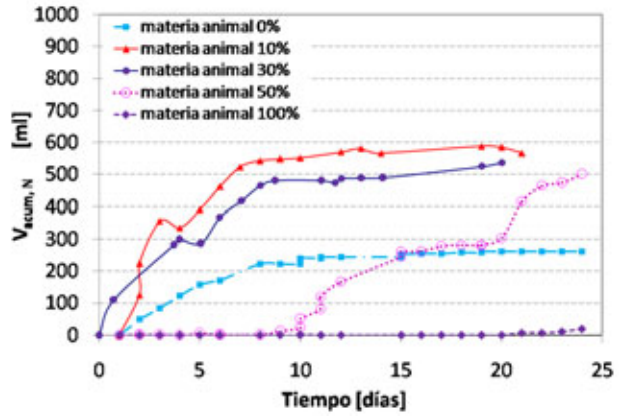


Figura 1: Volumen normado de biogás producido a distintas concentraciones de desecho animal y vegetal.

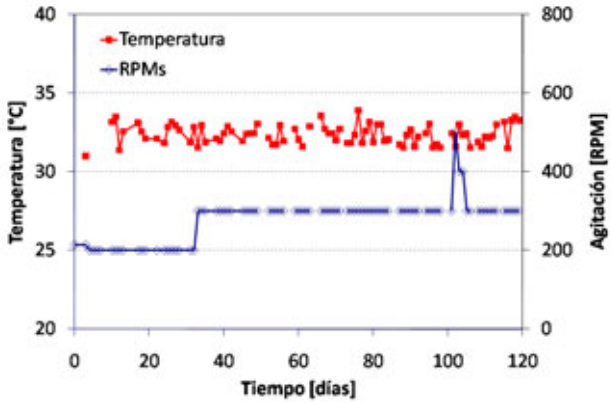


Figura 2: Transcurso de la temperatura y la agitación durante los 120 días de operación del reactor semi-continuo.

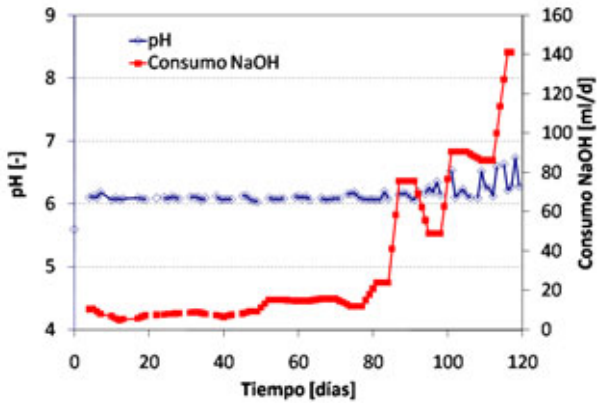


Figura 3: Valores de pH y consumo de NaOH durante los 120 días de operación del reactor semi-continuo.

El biogás producido depende del tipo de sustrato a digerir, así como de las condiciones de operación del proceso. Distintas cargas orgánicas y composiciones generan distintos volúmenes de biogás. Por ello se probaron diferentes relaciones del desecho animal y vegetal. Como se observa en la Figura 1, al utilizar solo el material animal, la producción de gas es casi nula, puesto que no existe materia orgánica fácilmente digerible, ya que por sí es un producto final del metabolismo biológico. Al usar el material vegetal en un 100 %, hay una producción considerable de gas pues el desecho vegetal proporciona una fuente importante de carga orgánica. Sin embargo, se puede observar un aumento significativo en la producción de biogás en los experimentos en los cuales se combinaron ambos sustratos. De estos ensayos se determina que la relación óptima entre el material animal y vegetal es de 1 a 9. Esto se debe a que el desecho vegetal aporta la carga orgánica necesaria para la digestión, mientras que el material animal proporciona alcalinidad al sistema, indispensable para controlar el pH del proceso, uno de los parámetros de operación más importantes. Puesto que durante estos experimentos no hay ningún control del pH, el aporte de ambos desechos define la capacidad *buffer* del sistema.

Resultados de la biodigestión anaerobia en el proceso semi-continuo

Los resultados de la operación del biodigestor semi-continuo se dividen en tres conjuntos: parámetros de control operativos, variables de optimización y variables de respuesta del sistema. Los tres grupos de variables están estrechamente interrelacionados, como se presenta a continuación.

Como se observa en la Figura 2, durante el tiempo de operación del biodigestor, la temperatura se mantiene en un valor promedio de 33 ± 2 °C. La agitación durante los primeros 30 días de operación es de 200 rpm. Posteriormente, se la incrementa a 300 rpm para combatir la formación de espumas.

En la Figura 3 se observa que el pH se mantiene en un promedio de 6,1 durante los primeros 100 días de operación. A partir de entonces, las medidas empiezan a desviarse de la media y alcanzan un máximo de 6,7 en el día 118. Este súbito incremento en la desviación del pH se debe al incremento en la cantidad de solución amortiguadora añadida al reactor. Se puede observar que durante los primeros 90 días de operación se mantienen valores inferiores a los 20 ml/día. Esta cantidad aumenta considerablemente durante los últimos 30 días de operación hasta alcanzar un valor máximo de 140 ml NaOH/día.

A su vez, el incremento en el consumo de solución amortiguadora se debe a la reducción del tiempo de residencia hidráulico (TRH) y al incremento de la carga orgánica alimentada, como se observa en la Figura 4. El TRH se mantiene por encima de los 10 días durante los primeros 80 días de operación. A partir de esta fecha, se

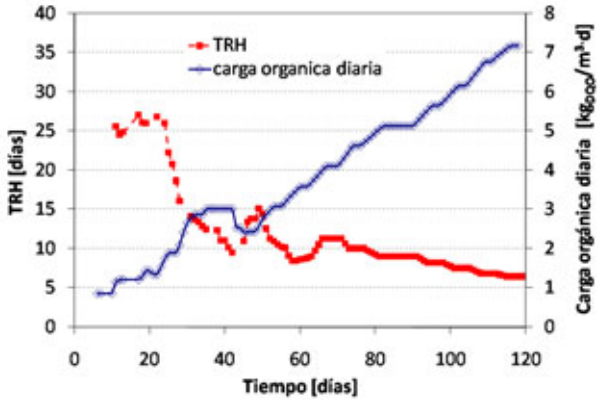


Figura 4: Tiempo de residencia hidráulico y carga orgánica diaria alimentada al reactor.

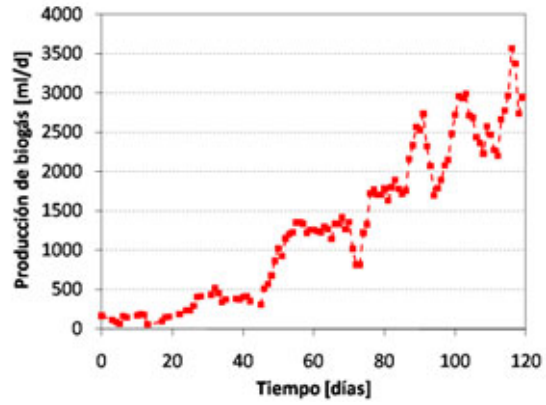


Figura 5: Producción diaria promedio de biogás.

reduce semanalmente hasta alcanzar un tiempo de 6,4 días en la última semana. Paralelamente a la reducción del TRH, se incrementa la carga orgánica alimentada. En la primera semana no se alimentó el reactor hasta que se establezcan condiciones anaeróbicas en el reactor. Luego se incrementa semanalmente la carga en 0,68 kg_{DQO}/m^3d hasta alcanzar un valor de 3,0 kg_{DQO}/m^3d alrededor del día 40. Después de una pequeña reducción en la carga por problemas operacionales, se continúa incrementando la carga orgánica alimentada en intervalos de 0,48 kg_{DQO}/m^3d hasta alcanzar un máximo de 7,0 kg_{DQO}/m^3d.

Como se observa en la Figura 5, durante los primeros 80 días de operación la generación de biogás mantiene promedios semanales inferiores a los 1500 ml/día. Esta capacidad incrementa de manera significativa durante los días posteriores, alcanzando promedios cercanos a los 3500 ml/día.

Al realizar el balance de masa durante la operación del digestor de operación semi-continua se obtiene la producción específica de biogás y la remoción específica de DQO en función de la carga orgánica diaria. En la Figura 6 se puede observar la remoción de DQO en función de la carga orgánica diaria, la cual alcanza un máximo de 100 $kg_{DQO}/m^3_{reactor}$ para una carga orgánica de 4 kg_{DQO}/m^3d.

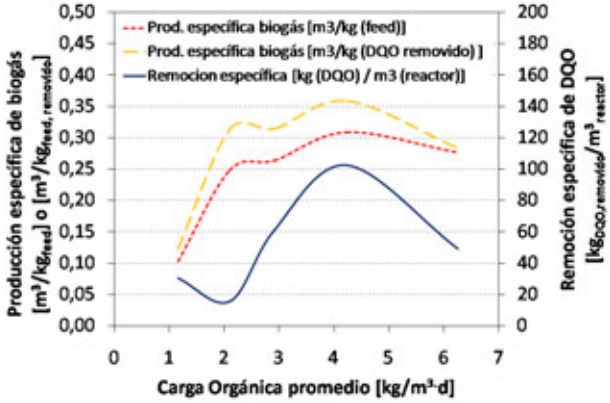


Figura 6: Producción específica de biogás y remoción de DQO en función de la carga orgánica diaria.

También podemos observar que en este mismo rango de carga orgánica se alcanza la máxima producción específica de biogás de 0,31 $m^3_{biogas}/kg_{DQO,alimentado}$ ó 0,38 $m^3_{biogas}/kg_{DQO,removido}$. Con un contenido de metano en el biogás entre el 60 % y el 65 % se obtiene una producción de metano de 0,23 $m^3_{CH_4}/kg_{DQO,removido}$. Este valor representa el 66 % del valor teórico de 0,35 $m^3_{CH_4}/kg_{DQO,removido}$.

Conclusiones

En este trabajo se ha investigado la co-digestión anaeróbica de desechos orgánicos vegetales y animales. Para esto se trabaja en dos etapas. En la primera etapa se estudia la relación óptima entre desecho animal y vegetal con respecto al máximo potencial de producción de biogás en reactores por lotes. Estos resultados se aplican en la segunda etapa para investigar el comportamiento del proceso de biodigestión frente a un incremento continuo en la carga orgánica alimentada y una reducción simultánea del tiempo de residencia hidráulico. Se puede observar que para cargas orgánicas de 4 kg_{DQO}/m^3d y tiempos de residencia mayores a 10 días, el proceso es estable, con una producción específica de biogás de 0,38 $m^3_{biogas}/kg_{DQO,removido}$. Al seguir aumentando la carga orgánica diaria y reducir el tiempo de residencia hidráulico, el biodigestor muestra un comportamiento inestable, el cual se refleja en un alto consumo de NaOH para mantener el pH en el rango deseado y una reducción en la producción específica de biogás, así como de la remoción específica de DQO. Esto indica que cargas orgánicas mayores a 4 kg_{DQO}/m^3d ocasionan en este caso un desbalance entre la producción de ácidos volátiles en la etapa acetogénica, y la producción de metano en la etapa metanogénica. Adicionalmente, se observa que la producción específica de biogás se encontró por debajo del valor teórico con 0.23 $m^3_{CH_4}/\ kg_{DQO,removido}$.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad San Francisco de Quito por los fondos entregados al proyecto a través

de *Small Grants 2008* y a la Empresa EcoFroz por el interés en el estudio de factibilidad de la biodigestión anaeróbica de desechos orgánicos.

Referencias

[1] Sanderson, J., Hettiaratchi, P., Hunte, C., Hurtado, O., and Kerller, A. 2008. "Methane balance of a bioreactor landfill in latin america." *Journal of the Air & Waste Management Association*. 58, 620-628.

[2] Intergovernmental Panel on Climate Change; 2001. "Technical summary in climate change 2001: The scientific basis."

[3] Edelman, W. 2007. "Die rolle von biogas in der zukünftigen energieversorgung." *DGE; Proceedings: Biomethan in Erdgasqualität, Dessau.*

[4] Yokoyama, S., Jonouchi, K., and Imou, K. 2008. "Energy production from marine biomass: Fuel cell power generation driven by methane produced from seaweed." *International Journal of Applied Science, Engineering and Technology.* 4.3, Academic OneFile: 168-175.

[5] Uemura, S., Ohashi, A., Harada, H., Tomozawa, T. H. T., Ohara, T., Ojima, R., and Ishida, T. 2008. "Production of biologically safe digested manure for land application by a full scale biogas plant with heat-inactivation." *Waste Management & Research*. 26, 256-260.

[6] Möller, K. 2009. "Influence of different manuring systems with and without biogas digestion on soil or-ganic matter and nitrogen inputs, flows and budgets in organic cropping systems." *Nutr. Cycl. Agroecosyst*. 84, 179-202.

[7] Schenk, P. M., Thomas-Hall, S. R., Stephens, E., Marx, U. C., Mussnug, J. H., Posten, C., Kruse, O., and Hankamer, B. 2008. "Second generation biofuels: High-efficiency microalgae." *Bioenerg. Res.* 1, 20-43.

[8] Scharlemann, J. P. W. and Laurance, W. F. 2008. "How green are biofuels." *Science*. 319, 43-44.

[9] Droste, R. L. 1997. *"Anaerobic water treatment. Theory and practice of water and wastewater treatment"*, John Wiley & Sons.

[10] Tchobanoglous, G., Burton, F., and Stensel, H. D. 2003. *"Fundamentals of bio-logical treatment. Wastewater engineering. Treatment and reuse"*, Mc Graw Hill.

[11] Zehnder, A. J., Ingvorsen, K., and Marti, T. 1982 "Microbiology of methanogen bacteria" In D. E. Hughes, D. A. Stafford, B. I. Wheatley, W. Baader, G. Lettinga, E. J. Nyns, and W. Verstraeten, (ed.), Anaerobic Digestion, 45-68.

[12] Stefanie, J. W., Elferink, O., Visser, A., Hulshoff, L., and Stares, A. J. M. 1994. "Sulfate reduction in methanogenic reactors." *Federation of Europe and Microbiological Societies*.

[13] American Public Health Association. 1998. "Standard methods for the examination of water and wastewater."

[14] Hach 2007. "DR/890, datalogging colorimeter handbook." Procedures manual. Hach Company.

[15] DEV S8., 1985. "Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser-, und Schlammuntersuchung." Schlamm und Sedimente (Gruppe S); DIN 38414 Teil 8: Bestimmung des Faulverhaltens (S8); Beuth Verlag GmbH; Berlin. Con modificaciones: AbfAblV, Anhang 4, Nr. 2.6.4-2.6.11.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
ARTÍCULO/ARTICLE SECCIÓN/SECTION C

Desarrollo de carbones activados magnéticos para la recuperación de oro en soluciones de cianuro

Gustavo Muñoz Rivadeneira[1*]

[1]*Colegio de Ciencias e Ingeniería - El Politécnico, Universidad San Francisco de Quito*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
[*]*Autor principal/Corresponding author, e-mail: gmunoz@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: A. Hidrobo, Dr.
Recibido/Received: 01/09/2010. Aceptado/Accepted: 04/28/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 06/10/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

Activated Carbons owe its adsorptive properties to their highly developed porous structure. As a result, activated carbons have extensive specific surface areas. Currently, granular activated carbons produced from coconut shells are widely used for gold recovery from alkaline cyanide solutions. Magnetic activated carbons (MACs) for gold recovery, synthesized from sources different that the traditional ones, have been developed at the University of Utah, mixing a carbon source with a magnetic precursor, and putting the mixture under controlled conditions of temperature and gaseous phase composition. This document contains fundamental aspects and preliminary experimental results during the development of magnetic activated carbons.

Keywords. Activated carbons, magnetic, gold recovery.

Resumen

El carbón activado debe sus propiedades adsorptivas a su estructura porosa altamente desarrollada. Como resultado, éstos generalmente exhiben una elevada área superficial específica. En la actualidad, carbones activados granulares producidos a partir de cuescos de coco son ampliamente utilizados para la recuperación de oro disuelto en soluciones alcalinas de cianuro. Carbones activados magnéticos (MACs) para recuperación de oro, producidos de fuentes diferentes a las tradicionales, han sido desarrollados en la Universidad de Utah mezclando una fuente de carbono con un precursor magnético, y sometiendo la mezcla a condiciones controladas de temperatura y composición de gases oxidantes. En este documento se presentan los fundamentos y resultados experimentales iniciales en el desarrollo de los carbones activados magnéticos.

Palabras Clave. Carbón activado, área superficial, magnético, recuperación de oro.

Introducción

Carbón activado es un nombre genérico que se utiliza para identificar a compuestos polímericos complejos con gran capacidad de adsorción, en donde el carbono es el elemento en mayor abundancia. Las características adsorptivas del carbón activado se deben a su estructura porosa altamente desarrollada, su extensa área superficial, y a los grupos funcionales generados durante el proceso de activación [1].

Los Estados Unidos de Norteamérica es el principal productor de carbón activado en el mundo, con 190 000 toneladas métricas en 1999 [2]. La demanda de carbón activado en los Estados Unidos, Europa, y Japón se ha incrementado en una tasa del 6 % anual durante las últimas dos décadas y se espera que el consumo de carbón activado aumente, principalmente en el campo del tratamiento de aguas [3, 4].

Se puede producir carbón activado de una gran variedad de materias primas. Entre ellas se tiene huesos, carbón mineral, carbón vegetal, madera, cuescos de nueces, cuescos de coco, y semillas de frutas, entre otras [5]. De entre las diversas maneras de producción, el proceso en dos etapas de pirólisis y gasificación es el preferido para generar carbón activado para la recuperación de oro disuelto en soluciones alcalinas de cianuro.

La pirólisis de la materia prima, también conocida como carbonización, se lleva a cabo en una atmósfera inerte a temperaturas entre 700 y 1100 K. El producto formado en el proceso se conoce simplemente como carbón. Durante la pirólisis, la mayoría de los componentes volátiles son removidos como gases, con la pérdi-

ISSN 1390-5384

da de parte del carbono en forma de gases tales como metano (CH_4), ácido acético (CH_3COOH), monóxido de carbono (CO), y dióxido de carbono (CO_2), principalmente. El carbono se reagrupa en unidades cristalográficas organizadas, conocidas como cristales grafíticos elementales o microcristales. El arreglo de estos microcristales es altamente irregular, quedando intersticios libres entre cristales. Alquitranes que se forman durante el proceso de pirólisis tienden a llenar y bloquear estos intersticios. Los productos carbonáceos producidos durante la pirólisis tienen una reducida area superficial específica, y baja capacidad de adsorción [6, 7].

Posterior a la pirólisis viene el proceso de gasificación, también conocido como activación, durante el cual se genera la extensa microporosidad característica del carbón activado. La gasificación del carbón se realiza poniendo en contacto el producto carbonáceo obtenido en la pirólisis (carbono) con un gas oxidante a temperaturas entre 1100 y 1300 K. Las reacciones químicas de gasificación con vapor de agua, dióxido de carbono, y oxígeno como gases oxidantes son, respectivamente:

$$C + H_2O \Leftrightarrow CO + H_2 \quad (1)$$

$$C + CO_2 \Leftrightarrow 2CO \quad (2)$$

$$C + O_2 \Leftrightarrow CO_2 \quad (3)$$

Se ha determinado que las las reacciones de gasificación en donde la especie oxidante es agua o dióxido de carbono son endotérmicas, mientras que la gasificación del carbono con oxígeno resulta en una reacción altamente exotérmica [8]. En condiciones prácticas de gasificación a una temperatura sobre los 1100 K, la reacción del carbono con el oxígeno es alrededor de 100 veces más rápida que las reacciones del carbono con vapor de agua o dióxido de carbono. Esto conduce a una reacción controlada por difusión con un excesivo consumo de carbono localizado en la superficie, y como resultado se produce un mínimo desarrollo de porosidad en el carbón resultante. Por estas razones, la activación con oxígeno no es utilizada industrialmente [6].

En ciertos casos los procesos de pirólisis y gasificación de un material carbonáceo se los puede realizar simultáneamente. Generalmente, los carbones activados tienen áreas superficiales específicas de 800 a 1500 m^2/g, con poros con un tamaño promedio de 0.5 a 20 nm. Las propiedades físicoquímicas de los carbones activados son altamente dependientes de la materia prima, y de las condiciones operativas de pirólisis y gasificación [5]. La $Au(CN)_2^-$ 1 muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido de la superficie pulida de un gránulo de carbón activado comercial utilizado en la recuperación de oro.

La IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) ha clasificado el tamaño de poro para los carbones activados como sigue: Microporos aquellos que

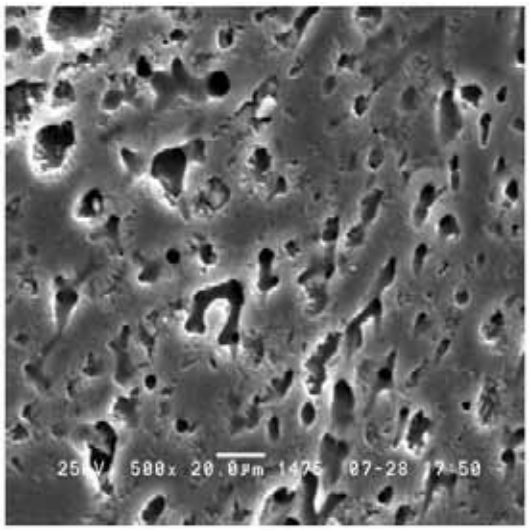


Figura 1: Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido de la superficie pulida de un gránulo de carbón activado comercial utilizado en la recuperación de oro.

tienen aberturas menores a 2 nm, mesoporos tienen aberturas entre 2 y 50 nm, y los macroporos tienen aberturas que exceden los 50 nm. La abertura de un poro se define como la distancia entre las paredes de un poro que tiene la forma de una ranura, o el radio de un poro en forma cilíndrica [9]. Los microporos contribuyen en la mayor parte a la superficie interna de un carbón activado, y la mayor parte del fenómeno de adsorción ocurre en los microporos. Los mesoporos y macroporos son importantes en la estructura de un carbón activado ya que sirve como conductos para el transporte de las especies hacia los microporos. Los macroporos generalmente exhiben bajas áreas superficiales. A pesar de que la superficie de los macroporos no contribuye significativamente al área superficial específica del carbón activado, éstos pueden retener importantes cantidades de líquido, debido al gran volumen vacío que representan [10].

Metodología

Recuperación de oro con Carbón Activado.

El carbón activado ha encontrado una aplicación importante en la metalurgia extractiva del oro. Durante 1999, la cantidad de carbón activado adquirido por la industria en los Estados Unidos y el resto del mundo es estimado en 4000 y 7000 toneladas métricas, lo que representan ventas en el orden de 8 y 14 millones de dólares respectivamente [11]. Los métodos convencionales de recuperación de oro comprenden la trituración y molienda de la mena aurífera, seguido de la disolución de oro en una solución oxigenada y alcalina de cianuro. Las reacciones quimicas que rigen el proceso de disolucion de oro son:

$$2Au + 4CN^- + 2H_2O + O_2 \Leftrightarrow 2Au(CN)_2^- + H_2O_2 + 2OH^- \quad (4)$$

$$2Au + 4CN^- + 2H_2O_2 \Leftrightarrow 2Au(CN)_2^- + 2OH^- \quad (5)$$

El oro, disuelto como el complejo $Au(CN)_2^-$ (aurodicianuro), es recuperado de la solución por diferentes métodos que utilizan carbón activado, tales como carbón en pulpa (CIP), carbón en lixiviación (CIL) y carbón en columna (CIC). Los Estados Unidos produjo 340 toneladas métricas de oro de mina en 1998, de las cuales el 78 % fue recuperado utilizando carbón activado [12, 13]. Luego de la separación del carbon activado de la pulpa o de la solución, el complejo auroso $Au(CN)_2^-$ es eluído del carbón activado para posterior precipitación y purificación.

Los circuitos convencionales de recuperación de oro por medio de carbón activado utilizan éste en partículas granulares, las cuales son significativamente de mayor tamaño que la mena molida, de tal manera de poder realizar una efectiva separación del carbon activado cargado con oro de la pulpa, a través de un cribado mecánico. El cribado mecánico es la manera más simple de separararación de sólidos, y se basa únicamente en la diferencia de tamaños de las partículas a separar.

La separación del carbón activado de la pulpa por cribado presenta varios problemas. Las cribas pueden cegarse y romperse debido al uso excesivo, requieren considerable energía para operar, y requieren reemplazo y mantenimiento frecuente. Además, se pueden producir pérdidas por abrasión de carbon con oro adsorbido a la superficie externa. Las pérdidas debido a estos factores pueden ser de alrededor de 50 gramos de carbón por tonelada métrica de mena [12], y las pérdidas acumuladas de carbón fino pueden llegar a niveles en donde se requiere reeemplazar hasta un 20 % anual del carbón fino perdido [14]. Esto representa significativas cantidades de oro adsorbido al carbón activado que no es recuperable por cribado. La Figura 2 muestra el efecto del tamaño de partícula de un carbón activado comercial en la cinética de adsorción de oro. A medida que el carbon activado disminuye de tamaño, se produce un incremento en la cinética de adsorción de oro. A pesar de las ventajas desde el punto de vista cinético que un carbón activado en polvo presenta, éste no se puede utilizar en circuitos convencionales de recuperación de oro, debido a que el carbon activado y la mena en suspensión tendrían tamaños similares, y la separación de éstos por cribado, filtración, o sedimentación no son opciones viables [15].

Carbón Activado Magnético.

El concepto de un carbón activado magnético (MAC, por sus siglas en inglés *Magnetic Activated Carbons*) surge a raíz de los aspectos mencionados en la discusión anterior. Al desarrollar un carbon activado, que además tenga propiedades magnéticas, se esperaría que éste pueda ser fácilmente separado de una solución o suspensión utilizando un separador magnético, inclusive si en la suspensión se tienen concentraciones significativas de sólidos en suspensión. Adicionalmente, al producirse un carbón activado magnético con un tamaño de partícula más pequeño que el carbón activado granular actualmente utilizado en la industria, se espera que el carbón

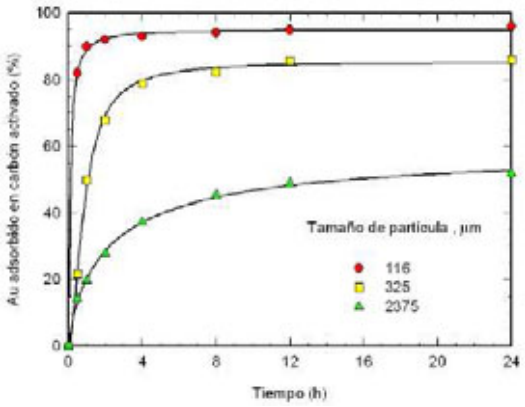


Figura 2: Efecto del tamaño de partícula en la cinética de adsorción de oro en un carbón activado comercial. Condiciones de adsorción: 1 g carbón activado/L solución, 100 mg Au /L solución, 0.01 M NaCN, pH 11, 200 RPM, 298 K.

activado magnético presente un incremento en la cinética de adsorción de oro, al compararlo con el anterior [15].

El uso de carbones activados magnéticos para otras aplicaciones, tales como tratamiento de aguas industriales, puede tener un notable impacto en las operaciones actuales, debido a que no es necesario remover los solidos en suspensión de las corrientes a tratarse con el carbón activado magnético, lo que produce un incremento en el tipo de soluciones o suspensiones a procesarse [15].

La factibilidad de producir un carbon activado magnético se puede explicar utilizando un diagrama de equilibrio para el sistema $Fe - O - C$. Este diagrama es ampliamente conocido, y es extensamente utilizado en el análisis de reacciones gas-sólido que involucran la reducción de menas de hierro para producir hierro metálico.

La Figura 3 muestra el equilibrio entre hierro, oxígeno, y carbón a una atmosfera de presión total, en donde las regiones de predominancia para las especies Fe, FeO, y Fe_3O_4 se encuentran identificadas. El diagrama además incluye la reacción de gasificación del carbono (C) con dióxido de carbono (CO_2) para producir monóxido de carbono (CO) descrita en la Ecuación 2. Analizando el equilibrio de esta reacción en la Figura 3 se puede observar que a temperaturas sobre 1000 K, se favorece la formación de CO, y que a temperaturas superiores a los 1100 K, la conversión de C a CO es mayor al 90 %. Una atmósfera rica en dióxido de carbono favorecerá la gasificación del material carbonáceo. En la Figura 3 también se puede apreciar que en una atmósfera rica en CO_2, el óxido de hierro más estable es la magnetita (Fe_3O_4). Este análisis sugiere que un material carbonáceo en contacto con un óxido de hierro a una temperatura adecuada y bajo una atmósfera rica en CO_2, se encuentra en condiciones óptimas para la gasificación del carbón, y a su vez, se favorece la formación de magnetita como la especie de hierro predominante. Como consecuencia, la síntesis de un carbón activado magnético es termodinamicamente posible.

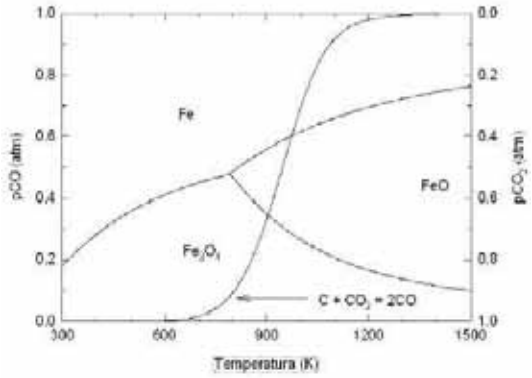


Figura 3: Diagrama de equilibrio para el sistema $\mathbf{Fe - O - C}$, y para la reacción $\mathbf{C + CO_2 = 2CO}$.

Figura 4: Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM) de partículas de MAC-P.

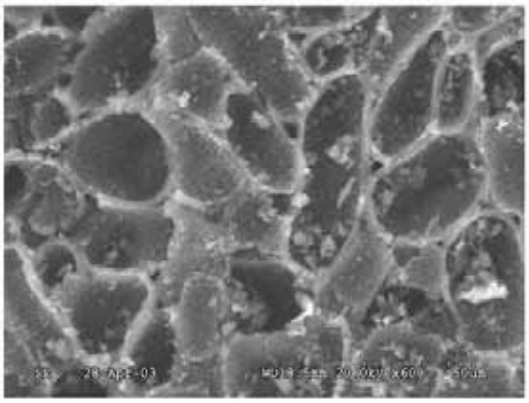


Figura 5: Imagen obtenida por SEM que permite observar la porosidad generada en MAC-P durante el proceso de gasificación.

Síntesis de Carbones Activados Magnéticos.

En la Universidad de Utah se han desarrollado y patentado varios procedimientos para la síntesis de carbones activados magnéticos, mezclando una fuente de carbono con un precursor magnético, y sometiendo la mezcla a condiciones controladas de temperatura y composición de gases oxidantes. Detalles sobre la preparación de éstos y sobre los procedimientos utilizados para su caracterización y evaluación se pueden encontrar en la literatura correspondiente [15, 16, 17, 18, 1].

Se presentan a continuación algunos de los resultados obtenidos con un carbón activado magnético sintetizado a partir de aserrín de pino (fuente de carbono) con un tamaño de partícula entre 250 y 600 μm, e impregnado en una solución de 2.5 g Fe/L solución (Fe como citrato de hierro, precursor magnético). Este carbón activado magnético obtenido de aserrín de pino fue codificado como MAC-P, tiene un grado de activación de 55 % y un contenido de hierro de 5.2 % en peso. El grado de activación de un carbón activado se define como el porcentaje en peso que una muestra de carbón pierde durante el proceso de gasificación. La Figura 4 muestra una imagen de microscopía electronica de barrido de varias partículas de MAC-P. En la Figura 5, se puede apreciar la porosidad generada en una partícula de MAC-P durante el proceso de gasificación.

Resultados y Discusión

Caracterización y Evaluación de MAC

Identificación de la fase magnética.

La Figura 6 muestra un difractograma de rayos X del MAC-P. Para efectos comparativos se incluyó un difractograma de un carbon activado preparado a partir de aserrín de pino sin impregnación de sales de hierro. Este carbón activado fue codificado como CA-P, tiene un grado de activación de 48 %, y no se detectó hierro durante el análisis químico. El difractograma del CA-P es característico de una muestra de carbón activado convencional. Las extensas bandas que se presentan en las regiones 2Θ de 10-30 y 40-50 grados son características de la naturaleza amorfa, no cristalina del carbón activado. En cambio, el difractograma correspondiente a la muestra de MAC-P, presenta además, picos muy definidos en las regiones 2Θ de 35.42°, 56.94°, y 62.51° que son características, en posición e intensidad, de magnetita. Se puede concluir que análisis de difractometría de rayos X confirman la predicción termodinámica que a altas temperaturas (1100 K) y en una atmósfera rica en CO_2, la especie de hierro formada será magnetita. Hematita, maghemita, hierro elemental u otras especies de hierro no fueron detectadas durante el análisis de la muestra MAC-P, al menos dentro de los límites de detección del difractómetro de rayos X.

Área superficial específica y distribución de porosidad.

La Figura 7 muestra isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno para el MAC-P. Con propósitos de comparación, se presenta además una isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno de un carbón activado granular comercial, utilizado en la industria, el cual ha sido previamente molido a un tamaño de partícula similar al del MAC-P, esto es, 250-600 μm, y se lo llamó CC. La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno correspondiente al carbón activado comerial, CC, es de tipo I, característica de fenómenos de quimisorción o de fisisorción en materiales microporosos, como es el caso de carbones activados. La mayoría de la adsorción de nitró-

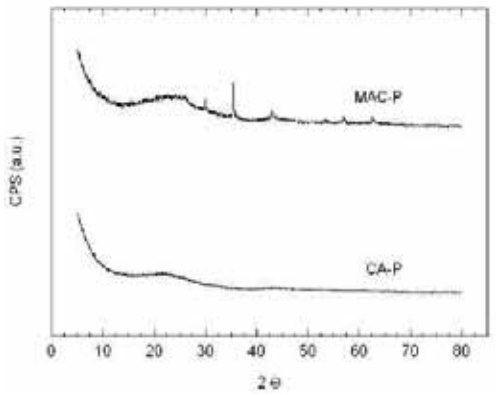


Figura 6: Difractogramas de rayos X para MAC-P y CA-P.

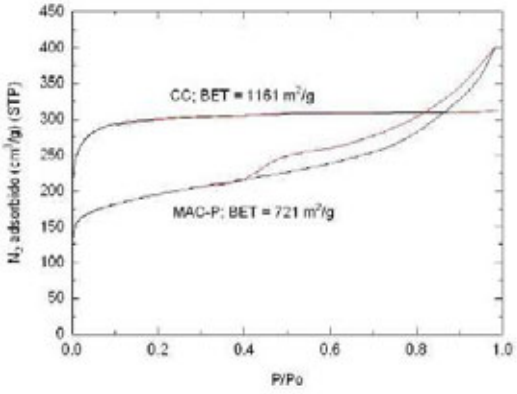


Figura 7: Isotermas de adsorción-desorción para MAC-P y CC utilizando N_2 como adsorbato en un baño de nitrógeno líquido a 77.35 K.

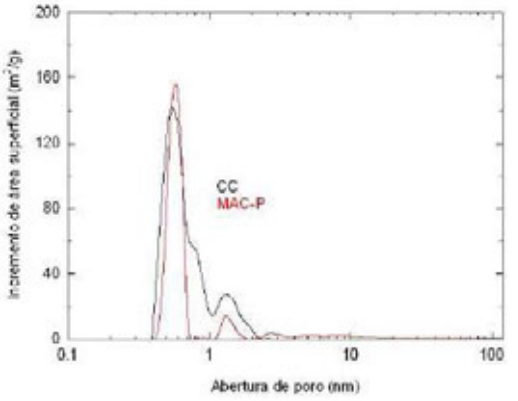


Figura 8: Incremento de área superficial vs. distribución de tamaño de poro para CC y MAC-P.

geno ocurre a bajas presiones relativas (P/Po <0,01), para posteriormente alcanzar la plataforma. Es importante notar que la curva de desorción no muestra histéresis, lo que indica que el mecanismo de desorción es igual al mecanismo de adsorción. El área superficial específica fue calculada por medio de la ecuación BET en 1161 m^2/g para el CC. La isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno para el MAC-P muestra un comportamiento diferente. Se puede apreciar que hay una considerable adsorción de nitrógeno a bajas presiones relativas, (P/Po <0.01), pero a moderadas y altas presiones relativas, la adsorción de nitrógeno continúa, sin formar una plataforma, como en el caso del CC. Este fenómeno se debe a la presencia de mesoporos y macroporos adicional a la microporosidad característica de carbones activados. Además la isoterma correpondiente al MAC-P muestra histéresis, esto es una indicación que el proceso de condensación de nitrógeno durante la adsorción sigue un mecanismo distinto al proceso de evaporación durante la desorción. Numerosos investigadores han sugerido que esto se debe a la presencia de mesoporos que poseen aberturas estrechas, las cuales se amplían a medida que el poro crece en longitud.

La Figura 8 presenta curvas de incremento de área superficial específica vs. distribución de tamaño de poro para MAC-P y CC. La muestra de carbón activado comercial, CC, muestra una distribución bimodal de porosidad. La mayoría del área superficial está dada por los poros en la región entre 0.4-1 nm, y por poros en una segunda región con tamaños entre 1-3 nm. En el caso del MAC-P, una distribución trimodal de la porosidad es evidente. La primera región abarca poros en el rango 0.4-1 nm, que es en donde la mayoría del área superficial del MAC-P es generada. La segunda región está localizada entre 1-2 nm, y la tercera región está 2.3-58 nm, correspondiente a mesoporosidad.

La Figura 9 muestra curvas de incremento de volumen de poro vs. distribución de tamaño de poro. El gráfico que correponde a CC sugiere que la porosidad está dada por microporos, en el rango de 0.4-3 nm. La curva para MAC-P muestra claramente la presencia de mesoporos. Estos resultados estan en concordancia con las formas de las curvas de las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno presentadas en la Figura 7.

Cinética de adsorción de oro.

La Figura 10 muestra el porcentaje de oro adsorbido, en carbones activados analizados, de una solución inicial con 10 mg Au/L solución, 0.01 M NaCN, y pH 10. La solución fue agitada a 200 RPM, a temperatura ambiente (293 K). Por motivos de comparación, se incluyó el carbón activado comercial con su tamaño de partícula original (1180-3350 μm). Se puede apreciar claramente que el carbón activado granular tiene la cinética de adsorción más lenta. Luego de una hora de adsorción, menos del 3 % del oro disuelto ha sido adsorbido por el carbon activado granular. En el caso de los carbones activados CC y MAC-P éstos presentan cinéticas de adsorción de oro más rápidas debido a su menor tamaño de partícula. Los dos carbones activados finos remueven más del 70 % del oro en solución durante los primeros 10 minutos

La velocidad inicial de adsorción de oro, R, para CC-granular, con un tamaño de partícula de 1180-3350 μm fue calculado en 0.12 (mg/Au/g C)/min. El mismo carbón, luego de ser molido a un tamaño de partícula de 250-600 μm, esto es, una reducción de 5 veces su tamaño original, tiene un valor R de 1.87 (mg Au/g C)min.

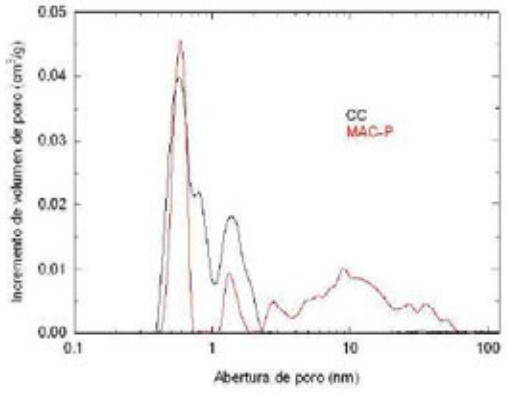


Figura 9: Incremento de volumen de poro vs.distribución de tamaño de poro para CC y MAC-P

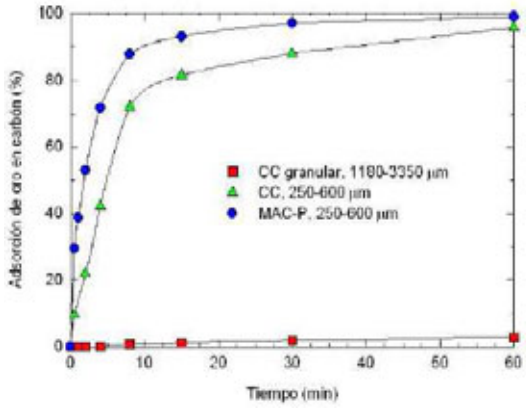


Figura 10: Adsorción de oro de CC-granular, CC y MAC-P. Condiciones de adsorción: 1 g carbón activado/L solución, 10 mg Au/L solución, 0.01 M NaCN, pH 10, 200 RPM, 293 K.

Esto representa un aumento en 16 veces en la velocidad de adsorción de oro. MAC-P presenta un valor de R de 7.12 (mg Au/g C)min. Esto representa un incremento en la velocidad de adsorción de oro de 59, cuando se compara con CC-granular.

Conclusiones

Carbones activados magnéticos han sido producidos mezclando un precursor magnético (citrato de hierro) con una fuente de carbono (aserrín de pino), y sometiendo la mezcla a condiciones controladas de temperatura y composición de gases oxidantes. Análisis de difractometría de rayos X sugieren que la magnetita ($\mathrm{Fe_3O_4}$) es la especie magnética predominante en los carbones activados magnéticos. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno y gráficos de distribución de tamaño de poro con respecto a incremento de área superficial e incremento de volumen de poro muestran que un carbón activado convencional utilizado industrialmente en la recuperación de oro es básicamente microporoso. MAC-P contiene mesoporos, además de microporos. Las curvas de adsorción de oro revelan que MAC-P y el CC presentan mayores velocidadees de adsorción de oro con respecto al CC-granular, debido al reducido tamaño de partícula que ellos exhiben. Se ha logrado obtener recuperaciones aceptables de los MAC, por sobre el 98 %, utilizando un separador magnético en húmedo de alta intensidad (WHIMS).

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por el proyecto S1001-069 de la Universidad de Utah "*Removal of Metal Ions and Complexes from Aqueous Streams using Powdered Magnetic Activated Carbon*" al cual el autor expresa su reconocimiento.

Referencias

[1] Miller, J.D., Muñoz, G.A., y Duyvesteyn, S. 2004. "Design and synthesis of powdered magnetic activated carbons for aurodicyanide anion adsorption from alkaline cyanide leaching solutions, Anion Separations: Fundamentals and Applications". B.A. Moyer, and R.J. Singh, eds., Kluwer Academic/Plenium Publishers. New York, NY. 277-292.

[2] Silverberg, P. 1999. "Activated carbon, for the 'hole' cleanup job". *Chemical Engineering.* 33-37.

[3] Freedonia Group. 1998. "Activated Carbon to 2002", Estudio 1065.

[4] Roskill Consulting Group. 1998. "The Economics of Activated Carbon."

[5] Jankowska, J., Swiatkoski, A., y Choma, J. 1991. "Active carbon." Ellis Horwood, Inglaterra.

[6] Wigmans T. 1989. "Industrial aspects of production and use of activated carbons." *Carbon.* 27, 13-22.

[7] Swiatowki,. J. 1999. "Industrial carbon absorbents, in: Adsorption and its Application in Industry and Environment Protection." *Studies in Surface Science and Catalysis*. 120A, 69-94.

[8] Muñoz, G.A. 2006. "Magnetic Activated Carbon for Gold Adsorption form Alkaline Cyanide Solution." Ph.D. Dissertation, The University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA, 370

[9] Bansal, R.C., Donnet, J.B., y Stoeckli, F. 1988. "Active Carbon." Marcel Dekker, Inc., New York.

[10] Rodríguez-Reinoso F. 1991. "Controlled gasification of carbon and pore structure development" en: Fundamental Issues of Carbon Gasification Reactivity. Lahaye J., and Ehrburger P., eds., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 533-571.

[11] Faulkner, W. 2000. "PACCO International." Comunicación personal.

[12] Marsden, J., y House, I. 1992. "The chemistry of gold extraction." Ellis Horwood, Cornwall.

[13] US Geological Survey. 2000. "Mineral Commodity Summaries." Febrero.

[14] American Norit Company. 1989. Inc Norit®, RO 3515 Bulletin, 8.

[15] Miller, J.D., Muñoz G.A, y Duyvesteyn S. 2001. "Magnetic activated carbon particles for adsorption of solutes from solution." Patente Provisional U2975.1P.

[16] Duyvesteyn, S., Muñoz, G.A., y Miller, J.D. 2002. “Magnetic activated carbon Ű an old product with a new future, Hydrometallurgy.” TMS Annual Meeting. Seattle, Washington.

[17] Muñoz, G.A., Duyvesteyn, S., y Miller J.D. 2002. “Gold recovery from cyanide leaching solutions by powdered magnetic activated carbons.” Proceedings of the 26th International Precious Metals Conference, IPMI. Miami, Florida.

[18] Muñoz, G.A., Duyvesteyn, S., y Miller, J.D. 2003. “Características estructurales y efecto de la distribución de porosidad en la adsorción de oro en carbones activados magnéticos.” Memorias del Seminario Internacional de Metalurgia, Minería y Medio Ambiente. Quito. 71-82.

AVANCES
EN CIENCIAS E INGENIERÍAS
ARTÍCULO/ARTICLE SECCIÓN/SECTION C

EOT sub-nanométrico y degradación de la movilidad: ¿hacia un límite físico con las técnicas de fabricación modernas?

Lionel Trojman[1*], Luigi Pantisano[2], José Bustamante[1], Santiago Navarro[1]

[1] *Colegio de Ciencias e Ingeniería - El Politécnico, Universidad San Francisco de Quito.*
Diego de Robles y Vía Interoceánica, Quito, Ecuador
[2] *Interuniversity MicroElectronic Center, IMEC.*
Kapeldreef 75, B-3001, Leuven, Belgium
[*] *Autor principal/Corresponding author, e-mail: ltrojman@usfq.edu.ec*

Editado por/Edited by: R. Játiva, M.Sc.
Recibido/Received: 03/17/2010. Aceptado/Accepted: 04/29/2010.
Publicado en línea/Published on Web: 05/23/2010. Impreso/Printed: 06/01/2010.

Abstract

In this article we investigate the major problem of the micro/nano-electronic: How to reduce the Equivalent Oxide Thickness (EOT) in the sub-nanometric range and improving the MOSFET performance? To reduce the EOT it is necessary that the semiconductor industry introduce the high-κ material as the Hafnium (Hf) in the dielectric layer. However the Hf produces a reduction of the mobility and therefore a reduction of the MOSFET speed. We explain through a simple semi-empirical model this mobility degradation in order to familiarize the reader with the concept of mobility for the high-κ MOSFET. Afterward we focus on two optimized processing methods for the EOT reduction yielding the best gate stack quality. These processing methods are the Fully-Silicide (FuSi) gate with HfSiON dielectric and the Metal Gate with HfO_2 which are both "gate first" based integration scheme. The important results we found is that first we can obtain a sub-1nm EOT in the both cases although it was thought impossible to make it with high thermal budget process such as the FuSi method. Second, the mobility degradation is very similar in the both case in spite of the very different chemistries we use to form the gate stack. We conclude that the modern deposition technique does not allow controlling the dielectric quality as of 0.8 nm and we suggest using the "gate last" based integration scheme to improve further the gate stack quality.

Keywords. Microelectronics, MOSFET, high-κ, sub-1nm EOT, mobility, Coulombic interaction.

Resumen

En este artículo investigamos un problema mayor de la microelectrónica moderna. Para reducir el EOT y aumentar el desempeño del MOSFET, la industria tiene que introducir el material high-κ, como el Hf. Pero eso genera una degradación de la movilidad y una pérdida de la rapidez de los dispositivos. Explicamos esta degradación con un modelo muy sencillo para familiarizar al lector con el concepto de movilidad. Después nos enfocamos en dos procesamientos optimizados (Fully-Silicid con HfSiON y Metal Gate con HfO_2) para reducir el EOT y causar un mínimo de defectos en el film. Un resultado muy importante es que podemos lograr un EOT sub-nanométrico en los dos casos ya que esto fue considerado imposible con el FuSi/HfSiON. Otro resultado importante es que en los dos casos la degradación de la movilidad es muy parecida a pesar de que los dos procesamientos generan una pila de compuerta de naturaleza química muy diferente. Concluimos que con las técnicas de deposición moderna no se controla la calidad del dieléctrico a partir de 0.8 nm y sugerimos cambiar el esquema de integración con un "gate last".

Palabras Clave. Microelectrónica, MOSFET, high-κ, EOT sub-nanométrico, movilidad, interacciones Coulómbicas.

Introducción

Hace más de 50 años que los dispositivos del estado sólido han revolucionado las sociedades humanas en casi cualquier aspecto de la vida cotidiana. La computadora y el teléfono celular son simplemente dos ejemplos de su impacto. En medio de todos los dispositivos, el MOSFET [1] es el dispositivo que ha jugado el rol protagónico en las tecnologías modernas (memoria, aplicación lógica etc.) por medio de los circuitos integrados

ISSN 1390-5384

[2] y gracias a el "scaling" o la miniaturización [3, 4]. Sin embargo, la reducción de las dimensiones verticales, o de la "Equivalent Oxide Thickness (EOT)", del MOSFET hecho con Si/SiO_2 o Si/SiON, se acerca de 1nm lo que impone un límite físico que no permite garantizar el desempeño de los MOSFET de la generación a venir. Los principales problemas son la degradación de la capacitancia y el aumento de la corriente de la compuerta ("Gate") [5]. De este modo la solución más realista conduce a cambiar el SiO_2 o SiON por un material llamado de "alta constante dieléctrica". Nos referiremos a ellos como materiales de high-κ. Entre todos los materiales high-κ, el dióxido de hafnio (HfO_2) esta considerado como la mejor opción [5]. En el MOSFET con high-κ la estructura vertical (o gate stack) es de tipo multi-capas. Tenemos una capa de Interfacial Oxide Thickness de IOT = 0.4-1 nm hecha con SiO_2 debajo de un capa de material high-κ (1-4 nm de HfO_2) y de un compuerta hecha con metal (TiN o TaN) como lo muestra Tsai *et al.* [6]. Con este tipo de estructura podemos alcanzar un EOT = 0.8 nm, con una densidad de corriente de compuerta $J_G = 1A/cm^2$, lo que es menor en un factor 3 al MOSFET con SiO_2 puro [5]. Pero Ragnarsson el al. [7] encontraron también una degradación de la movilidad de los portadores con los MOSFET high-κ cuando reducimos su EOT. Esta degradación se explica por una reducción del efecto de apantallamiento que a su vez disminuye las interacciones entre los portadores de carga y los defectos eléctricos contenidos en la capa high-κ o a las interfaces de la capa de high-κ [8]. La densidad de estos defectos depende del método de procesamiento. Por ejemplo podemos usar menos Hf para tener menos defectos [9] pero eso va a reducir el valor de la constante dieléctrica (κ) y en teoría reducir la posibilidad de obtener un EOT fino (1nm) [5]. En este artículo hacemos una investigación de métodos de procesamiento optimizados, y comparamos el máximo de movilidad que podemos lograr para un EOT sub-nanométrico en cada caso. Para empezar vamos a explicar la degradación de la movilidad por medio de las interacciones Coulómbicas con un nuevo y sencillo modelo semi-empírico. Después vamos a detallar dos métodos de procesamiento optimizados para el material high-κ y basados en el esquema más usado en la industria, llamado "gate first/last" o "gate first". El primer método es el "Fully Silicide (FuSi)" con HfSiON (o Fusi/HfSiON) que se realiza a alta temperatura (1000 °C). El segundo, "Metal Gate (MG)" con HfO_2 (o MG/HfO_2) se puede realizar a baja temperatura. Finalmente vamos a comparar las dos tecnologías y encontrar que llegamos a una límite físico de reducción de EOT también con el Hafnio y que eso no depende del tipo de procesamiento.

Metodología

Método Procesamiento de los dispositivos

Lo dispositivos high-κ que vamos a estudiar están hechos con las tecnologías descritas a continuación. Los wafers están hechos de Si con dopaje tipo *p*, de 200 mm de diametro, cortado en el plano (100) y los transistores son integrados en la dirección $\langle 110 \rangle$ con el método llamado "self-aligned".

En el caso del FuSi, preparamos el wafer con el "In-Situ-Steam-Generation (ISSG)" [10] para hacer crecer una capa de 0.4-0.5 nm de SiO_2. Después eso depositamos una capa de $HfSiO_X$ por medio de "Metal Organic Chemical Vapor Deposition (MOCVD)" [11] (con 60 % de Hf) a 650 °C. El nitrogenó es introducido por medio de un "Decoupled Plasma Nitridation (DPN)" y de un "Post Nitradation Annealing (PNA)" a 900 °C con O_2 [12]. Una capa de Poly-Si (100 nm) es depositada sobre la capa de HfSiON con "Chemical Vapor Deposition (CVD)" a 700 °C. Después de esta operación la uniones "Source/Drain (S/D)" son activadas con un Spike Annealing (1000 °C, 1s). Una vez que los contactos están hechos, una capa de Ni es depositada sobre la compuerta y con dos "Rapid Thermal Processing (RTP)" formamos una compuerta hecha de NiSi o FuSi [13]. El caso del MG, la preparación de la superficie del wafer se hace con un IMEC clean o IMEC'04 [14]. El HfO_2 se deposita con "Atomic Layer Deposition (ALD o ALCVD^{TM})" (1.8 a 3 nm, 300 °C)[15] y también la compuerta TaN/TiN (12 nm/100 nm) [16] con PVD a temperatura ambiente. Antes de formar la compuerta aplicamos un "Degas" sea a T=350 °C o a T=450 °C [17] para reducir la concentración de H_2O. La activación de las uniones se hace posteriormente con el método "Solid Phase Epitaxial regrowth (SPER)" (650 °C, 1min)[18] o con el método Spike. El procesamiento MG corresponde a un esquema de integración llamado "gate first" y el FuSi, "gate first/last"[19]. En los dos casos la capa de high-κ se deposita posteriormente a la activación de las uniones para satisfechar los requisitos de la industria de la microelectronica. En este estudio nos enfocamos sólo sobre los n-MOS (los portadores de carga son electrones).

Método de caracterización eléctrica

En este trabajo el método descrito en [20] que consiste en extraer la movilidad con la característica de la corriente (I-V) y la medición de la capacitancia (C-V). Para el C-V usamos el método llamado "Split-CV", ya sea básico [21] o avanzado ("RF Split CV" [22]).

Los efectos de las resistencias en serie están corregidos con la Ecuación 1:

$$R_{CH} = \frac{V_{DS}}{I_{DS}} - R_S \qquad (1)$$

donde $I_{DS}[A]$ es la corriente fuente-a-drenaje, $V_{DS} = 50mV$ la caída de potencial entre la fuente y el drenaje $R_{CH}[\Omega - cm]$ es la resistencia del canal o intrínseca y R_S es la resistencia en serie o parasítica.

La movilidad efectiva se ha obtenido por medio de la siguiente Ecuación:

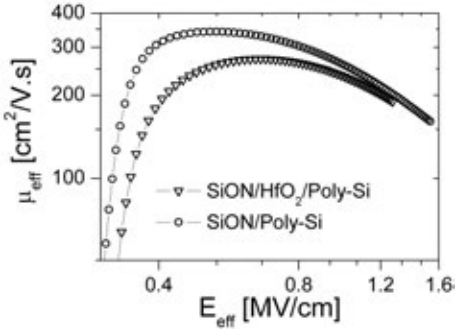


Figura 1: Ejemplo de extracción de la movilidad y comparación de la movilidad entre un dispositivo de tipo high-κ y SiON.

$$\mu_{eff}(V_G) = \frac{L}{W}\frac{I_{DS}(V_G)}{V_{DS}}\frac{1}{Q_S(V_G)} \qquad (2)$$

donde $Q_S = qN_S[C/cm^2]$ es la carga de inversión ($q = 1{,}6021 \times 10^{-19}C$ es la carga de Coulomb) , $L[cm]$ la longitud y $W[cm]$ el ancho del canal. La carga de inversión se deduce de la capacitancia en regimen de inversión medida con el método Split-CV.

La extracción del campo efectivo se ha obtenido con la Ecuación 3 [20]:

$$E_{eff}(V_G) = \frac{Q_{DEP} + \eta Q_S}{\epsilon_{Si}} \qquad (3)$$

donde ϵ_{Si} es la permitividad dielectrica del Si ($\approx 1{,}04 \times 10^{-12}F/cm$), Q_{DEP} es la carga de agotamiento, y η describe la contribución de la Q_S en el campo eléctrico efectivo o vertical [20]. Un ejemplo de la extracción de la movilidad está dado en la Figura 1. Las explicaciones de la degradación están dadas en el párrafo siguiente.

La extracción de la IOT se ha hecho con los datos de la C-V, para los dispositivos HfO_2. En el caso del MG/HfO_2 el valor nominal es muy diferente del valor real debido a un recrecimiento con la temperatura de la activación de las uniones [23, 17]. La ecuación para la IOT es:

$$IOT = EOT - (\frac{\epsilon_{SiO_2}}{\epsilon_{h\kappa}}.t_{h\kappa}) \qquad (4)$$

donde la permitividad relativa del SiO_2 es 3.9 (ϵ_{SiO_2}) y 20 para el HfO_2 ($\epsilon_{h\kappa}$) [24]. El espesor físico de la capa high-κ es $t_{h\kappa}[nm]$. El EOT se ha obtenido con el algoritmo de "fitting" desarollado por Hauser *et al.* [25]

Resultados y Discusión

Evidencia de las interacciónes Coulómbicas

Como lo explicamos en la introducción, la degradación de la movilidad (Figura 1) viene de una interacción entre los portadores de carga y los defectos eléctricos de la capa de HfO_2. En la Figura 2 se muestra la movilidad de un dispositivo high-κ con capa de SiON de 2-1.5 nm con menos de una mono-capa de HfO_2 (5 ciclos con ALD) [26]. De esta manera podemos considerar que las colisiones producidas por "Remote Phonons Scattering (RPS)" [27] son muy débiles en comparación de las colisiones producidad por "Remote Coulomb Scattering (RCS)" o interacciónes con defectos eléctricos producidos por la capa de high-κ. Recordemos que las colisiones de los portadores de carga en el MOSFET dependen del campo vertical o campo efectivo en régimen óhmico. Las interacciónes en campo débil son de naturaleza Coulómbica de tal manera que el efecto de los defectos del high-κ debería observarse sólo en campo débil.

Basado en la regla de Matthiessen y de las ecuaciones semi-empirícas de cada intereacción [28] podemos dar una descripción más detallada de las interacciones en campo débil (Figura 2a). Pero decidimos proponer también un nuevo modelo semi-empirico más adecuado a nuestro caso. De este modo las interacciones tanto de los RCS y las impurezas ionizada como de los defectos en la interface Si/SiO_2 están descritos con solo una ecuación:

$$\mu_C^* = a_1' N_S^{\delta'}.T \qquad (5)$$

donde a_1' y δ' son constantes empirícas, $T[K]$ es la temperatura.

En esta ecuación los dos tipos de interacción Coulómbica (RCS y defectos de interface) son descritos como una reducción del efecto de apantallamiento de la carga inversa del canal del MOSFET. Así obtenemos un modelo de la movilidad efectiva más preciso (Figura 2b). La comparación entre un dispositivo de Si/SiO_2 y Si/SiO_2/HfO_2 (Figura 1) muestra que la movilidad en campo débil es más alta cuando no hay Hf en la pila de compuerta del MOSFET. En consecuencia el tiempo entre dos colisiones de los portadores de carga es más largo cuando no hay Hf. Este fénomeno nos conduce a conlcuir que se produce un aumento en las interacciónes en campo débil debido a los defectos eléctricos producido por la capa de HfO_2.

La reducción de los defectos Coulómbicos depende del método de deposición del high-κ como lo vamos a mostrar en los párrafos siguientes.

El compromiso Hf/EOT

El uso del Hf es positivo para reducir el EOT y mantener un nivel de corriente de compuerta suficientemente bajo en relación con las especificación de la ITRS [29]. Pero al mismo tiempo encontramos una degradación de la movilidad, negativa para la rapidez de funcionamiento del MOSFET. El problema de la degradación es causado físicamente por la reducción del tiempo de colisión de los portadores como lo explicamos en el párrafo pasado. Para reducir los defectos eléctricos de la capa de Hf podemos sea reducir la cantidad de Hf o modificar el método de procesamiento en términos de temperatura.

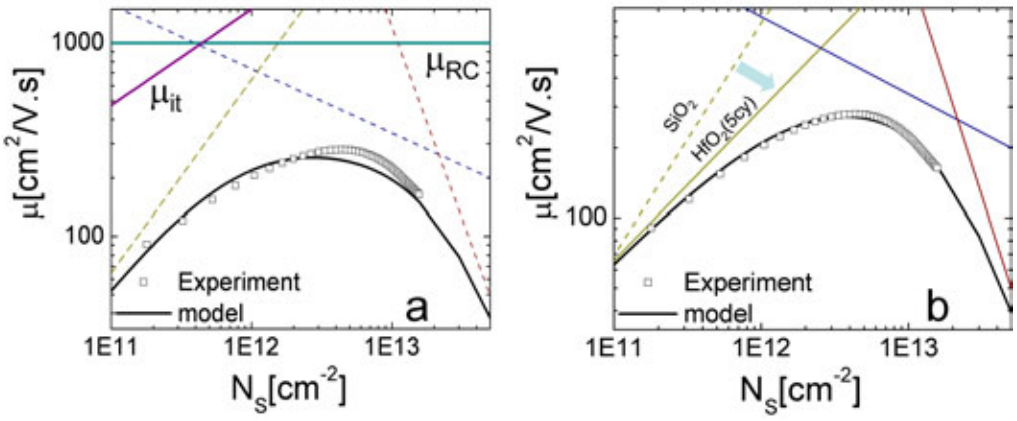


Figura 2: La movilidad para diferentes tipos de interacciones: Coulómbicas en campo débil, phonones en campo medio y rugosidad de interface en campo fuerte de acuerdo con [20]. Las interacciones con defectos de interface están dada por μ_{it} y con defectos dentro la pila high-κ o RCS por μ_{RC}. De acuerdo con la Ec. 2 el campo es proporcional a la densidad de la carga de inversión N_S. En a, las interacciones están descritas con un modelo complicado y no permite obtener una buena descripción de la movilidad efectiva. En b usamos un modelo más sencillo (Ec. 5) y obtenemos una mejor precisión para la descripcion de la movilidad efectiva.

En el caso de un dispositivo de puro HfO_2, el control de la temperatura y de la concentración de H_2O (con la temperatura del "Degas"), es muy importante para reducir la cantidad de defectos [17] y obtener un EOT más fina. De hecho una temperatura demasiado alta (≥ 650 °C) genera una recristalización de la capa de HfO_2 [30]. Pero la temperatura y la concentración de H_2O (gas precursor de ALD) también genera un recrecimiento del espesor de la capa de SiO_2 (IOT) que reduce una parte la posibilidad de tener un EOT fino [23] y de otra parte la calidad de la interface SiO_2/HfO_2 [17], sobre todo para T≥ 900 °C [31]. En un trabajo anterior [17] concluimos que un dispositivo con HfO_2 tiene que ser procesado a una temperatura menor o igual a 650 °C y con una concentración de H_2O muy baja. La Tabla 1 sintetiza este resultado.

En el caso del HfO_2 el recrecimiento del SiO_2 hace aumentar el EOT . Entonces el procesamiento que tiene un menor "thermal budget" y con un "Degas" a T=450 °C será preferido. Por esta razón tenemos que usar una activación de unión de tipo SPER que trabaja a 650 °C en lugar de un Spike. No obstante la reducción de la capa de SiO_2 genera más interacción entre los portadores de carga y los defectos eléctricos en la interface SiO_2/HfO_2 y dentro la capa de HfO_2. Además los esquemas de integración usados en industria moderna necesitan una activación de tipo Spike (mejor calidad de las uniones S/D).

La otra opción es de disminuir la cantidad de Hf y usar una capa high-κ hecha con una aleación de HfSiON en su lugar. La ventaja de esta aleación es que el N permite que la capa tenga una estabilidad con respecto a la temperatura cerca del SiO_2. Pero el valor κ del HfSiON (≈ 12) es inferior al HfO_2 (≈ 20). Eso significa que no podemos alcanzar EOT del mismo espesor con los dos tipos de materiales high-κ en teoría; los EOT más finos se han observado con dispositivos hechos de HfO_2 (EOT ≈0.8 nm) [23, 6]. Sin embargo si usamos condiciones de PNA en las cuales la presión parcial de O_2 es más baja (ver Tabla 2) obtenemos un dispositivo

Thermal Budget Degas	**SPER 450 °C**	**SPER 350 °C**	**Spike 450 °C**
peak μ $[cm^2/V.s]$	260	250	240
$N_{ot}[10^{12}cm^{-2}]$ (PIV)	1.2	1.3	1.6
$N_{bulk}[10^{10}cm^{-2}.cy^{-1}]$ (CP)	0.8	0.87	1

Tabla 1: Lista de la densidad de defectos en la pila TiN/TaN/HfO_2 extracta con dos tecnicas, "(Pulse-IV (PIV)" y "Charge Pumping (CP)" y del pico de la movilidad efectiva por dispositivos con la misma IOT y EOT. La mejor movilidad esta en correlación con la menor densidad de defetos (SPER+450 °C).

HfSiON con una compuerta de FuSi que tenga una EOT ≈0.8 nm (Figura 3a). La concentración de N permite aumentar el valor del κ del HfSiON [12] así que podemos alcanzar un EOT muy fino también con este tipo de procesamiento (alta temepratura o "high thermal budget"). Tenemos que tomar también en cuenta el efecto del N en la capa de SiO_2. De acuerdo con [32] el N impide un recrecimiento de la IOT debido a su propiedad de reducción. No obstante el N puede contaminar la capa de interface y generar un material más cerca del SiON que del SiO_2. El SiON tiene un valor de $k \approx 7$ que es más alta que para el SiO_2 y eso contribuye seguramente a reducir el EOT. La reducción de la presión parcial de O_2 durante el PNA, ayuda también a una mejor introducción del N en la pila de la compuerta como lo indica la concentración proveída por la medición "X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)" (Figura 3a).

El aumento de N genera también una degradación de la movilidad como lo muestra la Figura 3b, tal como se ha reportado en [33]. Se supone que el N genera interacción Coulómbica con los portadores de carga en el canal y este efecto se vuelve más importante cuando el N se encuentra cerca del la interface Si/SiO_2. En un dispositivo con EOT≈0.8 nm, el experimento XPS muestra también un perfil de N más cerca de la interface (Figura 4) sugiriendo una penetración más importante del N

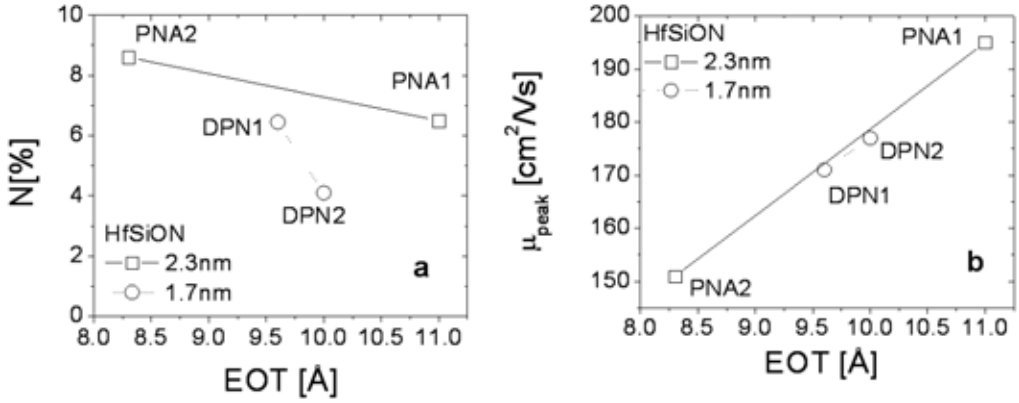


Figura 3: a muestra la correlación entre la reducción del EOT y el aumento de la concentración de N. A partir de 8 % de N se obtiene un valor de κ suficiente alta para alcanzar una EOT de 0.8 nm usando una interfaz de SiO_2 con una activación de las uniones de 1000 °C. b muestra la caída de movilidad que está en correllacion con la reduccion de EOT debido a un aumento de la concentracion de N.

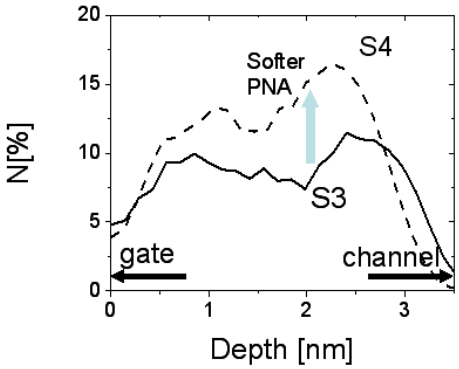


Figura 4: Perfil de N para el dispositivo con el mayor espesor de HfSiON. Se oberva un pico de N en la dirección del canal, sugiriendo una concentración más importante cerca del canal de inversión. Este pico es más importante para el dispositivo que tiene la menor movilidad y la más alta concentración de N.

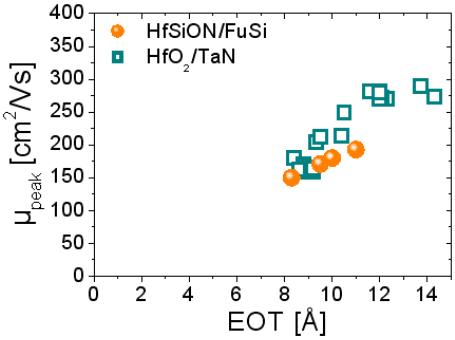


Figura 5: El pico de movilidad efectiva se reduce con la reducción del EOT en cualquier procesamiento. Obtenemos un EOT sub-nanométrico con un procesamiento hecho con un "thermal budget" alto o estandar.

en la capa interfacial y la interfaz.

Podemos concluir que con cualquiera de los procesamientos optimizados es posible alcanzar un EOT subnanométrico. Ante este resultado surge una pregunta: ¿es el efecto sobre la movilidad el mismo en los dos casos?

Compromiso EOT/Movilidad por varios procesamientos optimizados

En ésta última parte intentamos comparar la movilidad entre los dos tipos de dispositivos estudiados en los párrafos precedentes: FuSi/HfSiON y MG/HfO_2.

En términos de EOT encontramos una movilidad muy parecida (difiere de 15 %) para el mismo EOT (Figura 5). Tenemos que indicar que el método de extracción usado para los dispositivos FuSi fue más preciso que para los dispositivos MG, y que el dopaje del canal para los MG no fue tan precisamente controlado como en el caso de los dispositivos FuSi. De hecho para los dispositivos FuSi usamos el método de RF-split CV en el que no hay impresiciones por corrientes de fuga a traves la compuerta. Entonces esta diferencia se debe probablemente a un error de medición. Bajo el punto de vista físico tenemos que mostrar la movilidad en función de la IOT (o espesor de la capa de SiO_2). La razón es que los efectos Coulómbicos de los defectos disminuyen con el aumento del efecto de apantallamiento. Este efecto de apantallamiento proviene de una parte de los átomos de metal en la compuerta (Ni, Ta y Ti) y de otra parte con el espesor del IOT [27]. Tenemos que comparar los efectos de las cargas (defectos) que degradan la movilidad en función de los efectos de apantallamiento. Entre FuSi y MG la magnitud del apantallamiento es igual como lo hemos mostrado en [34]. Si comparamos con la misma IOT podemos deducir cual dispositivo o procesamiento genera más defectos debido a la concentración de Hf o de N. En la Figura 6, podemos ver que los dispositivos realizados con un procesamiento optimizado de tipo MG (con TaN/TiN) o de tipo FuSi (NiSi) siguen la misma tendencia y en consecuencia obedecen a la misma variación del IOT o del efecto de apantallamiento.

Podemos suponer que los efectos de carga son independientes del procesamiento usado. La reducción del EOT con N por el HfSiON genera una densidad de defectos igual a la de un dispositivo HfO_2 que tiene por naturaleza más defectos. Para concluir esta parte podemos decir que la reducción de escala por medio de un procesamiento optimizado particular (que sea de bajo/alto presupuesto térmico o "thermal budget" y con alta/baja

Samples	IL[nm]	HfSiON[nm]	DPN	PNA	EOT [Å]
S1	0.5	1.7	DPN2	PNA1	10
S2	0.5	1.7	DPN1	PNA1	9.5
S3	0.5	2.3	DPN1	PNA1	11
S4	0.5	2.3	DPN1	PNA2	8.3

Tabla 2: Diferentes parámetros de procesamientos para las muestras usadas en este esdudio. DPN1: potencia de RF es $1750\mathrm{W}$, presión $8\mathrm{mT}$, $\mathrm{f} = 10\mathrm{kHz}$, $\mathrm{DC} = 20\,\%$ y la duración $20\mathrm{s}$, DPN2 es más suave que DPN1, es decir con menor DC (5 %). PNA1: T=900 °C durante 15 s bajo $\mathrm{O_2}$ a presión cercana a 0.5 T. PNA2 es más suave que PNA1 es decir con menor $\mathrm{O_2}$ presión (0.1 % de 0.5 T).

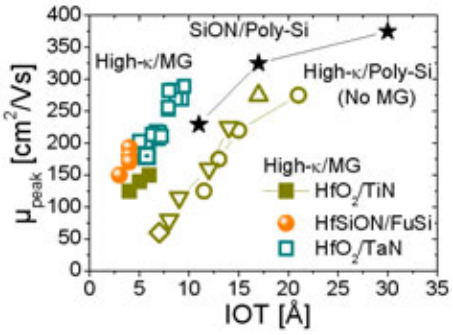


Figura 6: La redución del IOT enseña como se reduce el efecto de apantallamiento. La redución del pico de la movilidad se explica como una reducción de este efecto y es universal para cualquier tipo de dieléctrico. Obtenemos la misma tendencia entre los dos procesamientos (FuSi o MG) sugiriendo que para un EOT menor de 1nm la densidad de defecto en el film no está controlada. Los datos de la movilidad para los dispositivos con compuerta de Poly-Si y TiN (únicamente) [7].

concentración de N) no tiene efecto sobre el desempeño de la movilidad y del EOT del MOSFET. En otras palabras, bajo 1nm no es posible controlar la calidad de materiales de interfaces o de las capas de materiales high-κ y SiON. En consecuencia no podemos controlar el desempeño del MOSFET a esta escala con las técnicas de deposición que son la más usadas en industria (ALD, MOCVD, Nitradation etc.) con un esquema de integración de tipo "gate first". Podemos pensar ahora a cambiar de esquema de integración y usar un procesamiento "gate last" como lo impulsó INTEL [35] y/u orientar las investigación hacia otro material como el Zr.

Conclusiones

En este estudio, hemos enfocado nuestra atención en el impacto de los defectos eléctricos debido a los materiales high-κ sobre la movilidad. Dada la simplicidad del modelo semi-empírico que hemos utilizado, podemos entender adecuadamente la degradación de la movilidad. De todos los métodos de procesamientos de materiales high-κ hemos elegido dos de los más optimizados y adecuados para el Hf: el MG/HfO_2 con activación de unión de tipo SPER y el FuSi/HfSiON con DPN+PNA. En dispositivos de tipo MG/HfO_2, si el "thermal budget" es bajo podemos alcanzar un EOT ≈0.8 nm gracias a la valor κ del HfO_2 y a la reducción del recrecimiento de IOT. Pero el problema surge también del HfO_2 que genera una interface de mala calidad con el SiO_2 además de defectos dentro el Hf. Aunque la temperatura queda dentro del limite de recristalización, la reducción del IOT, que disminuye el efecto de apantallamiento, puede explicar la caída de la movilidad cuando alcanzamos un EOT ≈0.8 nm. Con dispositivos hechos con FuSi/HfSiON, la estabilidad es mucho mejor así que el problema de defectos eléctricos debería ser menos importante. No obstante, el uso de condiciones de nitridación optimizada permite alcanzar un dispositivo con EOT ≈0.8 nm y con un "thermal budget" alto o estándar (Spike) lo que fue considerado imposible con HfSiON en el pasado. Pero el uso exagerado del N para reducir el EOT puede generar un cambio de la naturaleza de la pila HfSiON/SiO_2. De hecho el SiO_2 se vuelve probablemente SiON y el HfSiON se encuentra con un valor de κ mucho más alto de lo que conocemos. Solo una caracterización física ("High Resolution-Transmission Electronic Microscopy", "Fourier Transform Infra-Red" y "Elastic Recoil Detection Analisys") podría aclarar esta modificación de la naturaleza de la pila del dispositivo; para esto es necesario usar instrumentos con una precisión de 0.3-0.5 nm. Entonces, reducir el EOT a escala nanometrica resulta en una degradación de la movilidad que perjudica al funcionamiento del MOSFET como lo hemos mostrado.

Finalmente hemos comparado la movilidad de los dos dispositivos con la variación del IOT y resultó que con un método ó con el otro no podemos controlar la degradación de la movilidad, es decir la calidad de las interfaces materiales bajo 1 nm con las muy usadas técnicas de procesamiento (ALD y MOCVD) con el esquema de integración donde la deposición del high-κ es anterior a la activación de las uniones ("gate first"). Entonces la optimización del procesamiento para reducir el EOT no es compatible con el desempeño de la movilidad para los dispositivos high-κ hechos con Hf. Las industrias pueden usar un "thermal budget" estándar (1050 °C) para lograr el mismo desempeño que un dispositivo con un procesamiento más "exótico", es decir con una activación de unión de tipo SPER que daña la calidad y la resistividad de las uniones (control del desempeño de los MOSFET de canal corto $\approx 50 - 30$ nm) [36]. Por otro lado, si queremos aumentar la movilidad por el medio de la calidad del film para los MOSFET con EOT subnanométrico tenemos que investigar otro tipo de esquema de integración como el "gate last" o investigar otro material como el Zr.

Agradecimientos

Los autores agradecen al AMSIMEC, donde se realizaron los experiemtos, y L.-Å. Ragnarsson y A. Rothschild en IMEC por su valiosa ayuda y por haber permitido usar sus muestras.

Referencias

[1] Arns, R. G. 1998. "The other transistor: early history of the mosfet." *Engineering Sciences Educational Journal*. 233–240.

[2] Kilby, J. S. 1976. "Applied the miniaturized electronic circuits." *IEEE Transaction of Electron Devices*. 23, 648–654.

[3] Moore, G. 1965. "Cramming more components onto integrated circuits." *Electronics Magazine*.

[4] Dennard, R. H., Gaensslen, F. H., Yu, H.-N., Rideout, V. L., Bassous, E., and Leblanc, A. R. 1974. "Design of ion-implanted mosfet's with very small physical dimensions." *IEEE Journal of Solid-State Circuits*. SC-9, n. 5.

[5] Wilk, G. D., Wallace, R. M., and Anthony J. M. 2001. "High-κ gate dielectrics: current status and materials properties considerations." *Journal of Applied Physic*. 89, 5243–5275.

[6] Tsai, W., Ragnarsson, L.-A., Chen, P. J., Onsia, B., Carter, R., Cartier, E., Young, E., Green, M., Caymax, M., Gendt, S. D., and Heyns, M. 2003. "Comparison of sub 1 nm TiN/HfO_2 with Poly-Si/HfO_2 gate stacks using scaled chemical oxide interfaces." *International Symposium on VLSI Technology.*

[7] Ragnarsson, L.-A., Pantisano, L., Kaushik, V., Saito, S.-I., Shimamoto, Y., Gendt, S. D., and Heyns, M. 2003. "The impact of sub-monolayers of HfO_2 on the device performance of high-κ based transistors." *IEEE International Electron Devices Meeting (IEDM)*.

[8] Hiratani, M., Saito, S.-I., Shimamoto, Y., and Torii, K. 2001. "Effective electron mobility reduced by remote charge scattering in high-κ gate stacks." *Japanese Journal of Applield Physic (JJAP)*. 41, 4521–4522.

[9] Kirsch, P. D., Quevedo-Lopez, M. A., Krishnan, S. A., Lee, B. H., Pant, G., Kim, M. J., Wallace, R. M., and Gnade, B. E. 2006. "Relationship of HfO2 Material Properties and Transistor Performance." IEEE International Symposium on VLSI technology, Honolulu, HI, USA, 1-2.

[10] Langenbuch, M., Bottini, R., Vitali, M., and Ghidini, G. 2005. "In situ steam generation (issg) versus standard steam technology: impact on oxide reliability." *Microelectronics and Reliability*. 45, 875–878.

[11] Shi, X. 2006. "Development of 300mm MOCVD $HfSiO_x$ process?" *ECS Transactions*, **3**.

[12] Rothschild, A., Shi, X., Everaert, J., Kerner, C., Chiarella, T., Hoffmann, T., Vrancken, C., Shickova, A., Yoshinao, H., Mitsuhashi, R., Niwa, M., Lauwers, A., Veloso, A., Kittl, J., Absil, P., and Biesemans, S. 2007. "Achieving 9ps unloaded ring oscillator delay infusi/hfsion with 0.8 nm EOT." *Symposium on VLSI Technology*. 198–199.

[13] Kittl, J., Veloso, A., Lauwers, A., Anil, G., Demeurisse, C., Kubicek, S., Niwa, M., Dale, M. J. H. V., Richard, O., Pawlak, M. A., Jurczak, M., Vrancken, C., Chiarell, T., Brus, S., Maex, K., and Biesemans, S. 2005. "Scalability of Ni-FuSi gate processes: phase and V_t control to 30nm gate length" *IEEE International Symposium on VLSI technology.*

[14] Smedt, F. D., Vinckier, C., Cornelissen, I., Gendt, S. D., and Heyns, M. 2000. "A detailed study on the growth of thin oxide layers on silicon ozonated solutions." *Journal of the Electrochemical Society*. 147(3), 1124–1129.

[15] Kim, Y., Tuominen, M., Raaijmakers, I., deBlank, R., Wilhelm, R., and Haukka, S. 2000. "Initial stage of the ultra-thin oxide growth in water vapor on Si<100>surface" *Electrochemical and Solid State Letters*, 3, 346.

[16] Yamamoto, W. D., Aoulaiche, M., Houssa, M., Gendt, S. D., Horii, S., Asai, M., Sano, A., Hayashi, S., and Niwa, M. 2006. "Electrical and physical characterization of remote plasma oxidized HfO_2 gate dielectrics." *IEEE Transactions on Electron Devices*. 53, 1153–1157.

[17] Trojman, L., Ragnarsson, L.-A., O'Sullivan, B. J., Rosmeulen, M., Kaushik, V., Groeseneken, G. G., Maes, H., Gendt, S. D., and Heyns, M. 2007. "High-κ metal gate mosfet's: impact of extrinsic process condition on the gate stack quality - a mobility study." *IEEE Transactions on Electron Devices*. 54, 497–507.

[18] Severi, S., Anil, K. G., Pawlak, J. B., Duffy, R., Henson, K., Lindsay, R., Lauwers, A., Veloso, A., Marneffe, J. F. D., Ramos, J., Camillo-Castillo, R. A., Eyben, P., Dachs, C., Vandervorst, W., Jurczak, M., Biesemans, S., and Meyer, K. D. 2004. "Diffusion-less junctions and super halo profiles for pmos transistors formed by sper andfusi gate in 45 nm physical gate length devices." *IEEE International Electron Devices Meeting (IEDM)*. 99–102.

[19] Hoffmann, T., Veloso, A., Lauwers, A., Yu, H., Tigelaar, H., Dal, M. V., Chiarella, T., Kerner, C., Kauerauf, T., Shickova, A., Mitsuhashi, R., Satoru, I., Niwa, M., Rothschild, A., Froment, B., Ramos, J., Nackaerts, A., Rosmeulen, M., Brus, S., Vrancken, C., Absil, P. P., Jurczak, M., Biesemans, S., and Kittl, J. A. 2004. "Ni-basedfusi gates: Cmos integration for 45nm node and beyond." *IEEE International Electron Devices Meeting (IEDM)*.

[20] Takagi, S.-I., Toriumi, A., Iwase, M., , and Tango, H. 1994. "On the universality of the inversion layer mobility in Si MOSFET's: Part I - Effects of substrate impurity concentration."*IEEE Transactions on Electron Devices*. 41, 2357-2362.

[21] Sodini, C. G., Ekstedt, T. W., and Moll, J. L. 1982. "Transistor charge accumulation and mobility in thin dielectric MOS." *Solid State Electronic*. 25, 833–841.

[22] San Andrés, E. S., Pantisano, L., Ramos, J., Severi, S., Trojman, L., Gendt, S. D., and Groeseneken, G. 2006. "RF Split capacitance-voltage measurements of short-channel and leaky MOSFET devices." *IEEE Electron Device Letters*. 27, 772–774.

[23] Ragnarsson, L.-A., Severi, S., Trojman, L., Brunco, D. P., Johnson, K. D., Delabie, A., Schram, T., Tsai, W., Groeseneken, G., Meyer, K. D., Gendt, S. D., and

Heyns, M. 2006. "Electrical characteristics of 8 Å EOT HfO_2/TaN low thermal-budget n-channel FETs with solid-phase epitaxially regrown junctions." *IEEE Transactions on Electron Devices* 53, 1657-1668.

[24] Crag, R., Chowdhury, N. A., Bashkaran, M., Swain, P. K., and Misra, D. 2004. "Eletrical characteristics of thermally evaporated HfO_2." *Journal of the Electrochemical Society*. 151, 215–219.

[25] Hauser, J. R. and Ahmed, K. 1998. "Characterization of ultra thin oxides using c-v and i-v measurements." *In proceeding Characterization and Metrology for ULSI Technology*. 235.

[26] Trojman, L., Ragnarsson, L.-A., Pantisano, L., Lujan, G. S., Houssa, M., Schram, T., Cubaynes, F., Schaekers, M., Ammel, A. V., Groeseneken, G., Gendt, S. D., and Heyns, M. 2005. "Effect of the dielectric thickness and the metal deposition technique on the moblilty for HfO_2/TaN n-MOS devices." *Microelectronic Engineering* 80, 86–89.

[27] Fischetti, M. V., Neumayer, D., and Cartier, E. November 2001. "Effective electron mobility in si inversion layers in metal-oxide-semiconductor systems with a high-κ insulator: The role of remote phonon scattering." *Journal of Applied Physics*. 90, 4587–4608.

[28] Jeon, D. S. and Burk, D. E. 1989. "MOSFET electron inversion layer mobilities - a physically based semi-empirical model for a wide temperature range." *IEEE Transactions on Electron Devices*. 36, 1456–1463.

[29] "The International Technology Roadmap for Semiconductors." www.itrs.org

[30] Garros, X., Besson, P., Reimbold, G., and Boulanger, F. 2008. "Impact of the crystallinity of high-κ oxides on v_t instabilities of nmos devices assessed by physical and electrical measurements." *IEEE International Reliability Physic Symposium*. 330–334.

[31] Lysaght, P. S., Foran, B., Bersuker, G., Chen, P. J., Murto, R. W., and Huff, H. R. February 2003. "Physicochemical properties of the HfO_2 in response to rapid thermal anneal." *Applied Physic Letters*. 82, 1266–1268.

[32] Schram, T., Ragnarsson, L.-A., Lujan, G., Deweerd, W., Chen, J., Tsai, W., Lander, R., Benson, K., Hooker, J., Vertommen, J., Meyer, K. D., Gendt, S. D., and Heyns, M. 2005. "Performance improvement of self-aligned HfO_2/TaN and SiON/TaN n-MOS transistor." *Microelectronic Reliability*. 45, 779–782.

[33] Garros, X., Casse, M., Reimbold, G., Rafik, M., Martin, F., Andrieu, F., Cosnier, V., and Boulange, F. 2009. "Performance and reliability of advanced high-κ/metal gate stacks." *Microelectronic Engineering*. 86, 1609–1614.

[34] Pantisano, L., Trojman, L., Severi, S., Andres, E. S., Kerner, C., Veloso, A., Ferain, I., Hoffman, T., Groeseneken, G., and Gendt, S. D. 2007. "Line width dependent mobility in high-κ - a comparative performance study betweenfusi and tin." *In proceeding of International Symposium on VLSI Technology, Systems, and Applications (VLSI-TSA)*.

[35] Mistry, K., Allen, C., Auth, C., Beattie, B., Bergstrom, D., Bost, M., Brazier, M., Buehler, M., Cappellani, A., Chau, R., Choi, C.-H., Ding, G., Fischer, K., Ghani, T., Grover, R., Han, W., Hanken, D., Hattendorf, M., He, J., Hicks, J., Huessner, R., Ingerly, D., Jain, P., James, R., Jong, L., Joshi, S., Kenyon, C., Kuhn, K., Lee, K., Liu, H., Maiz, J., Mclntyre, B., Moon, P., Neirynck, J., Pae, S., Parker, C., Parsons, D., Prasad, C., Pipes, L., Prince, M., Ranade, P., Reynolds, T., Sandford, J., Shifren, L., Sebastian, J., Seiple, J., Simon, D., , and Sivakumar, S. 2007. "A 45nm logic technology with high-κ+metal gate transistors, strained silicon, 9 cu interconnect layers, 193nm dry patterning, and 100 % pb-free packaging." *IEEE International Electron Devices Meeting(IEDM)*. 247–250.

[36] Trojman, L., Pantisano, L., Dehan, M., Ferain, I., Severi, S., Maes, H. E., and Groeseneken, G. 2009. "Velocity and Mobility Investigation in 1nm-EOT HfSiON on Si (110) and (100) Does the Dielectric Quality Matter?" *IEEE Transactions on Electron Devices*. 56, 3009–3018.