

Editorial

El reino de Liliput versus el reino animalia

En abril de este año llegó la fecha en la que, bajo el patrocinio de la OMS, debían destruirse los stocks de viruela (variola virus) guardados en laboratorios especiales de los Estados Unidos y Rusia. A raíz de la controversia que estalló entre científicos de distintos países a favor o en contra de esa resolución, una periodista me preguntó mi opinión al respecto. Mi respuesta fue negativa, es decir, no estoy de acuerdo en destruir los stocks, y luego agregué: de todos modos los virus son indestructibles. Quizás fue una respuesta muy tajante pero vista la situación del mundo de los virus en retrospectiva no parece una opinión descabellada. Cuando ocurrió la destrucción de las torres gemelas en Nueva York en 2001, inmediatamente, la idea de que el virus de viruela pudiera usarse como agente bioterrorista se estableció con firmeza entre las autoridades sanitarias y de defensa del país del Norte. Tal es así que es el único país que sigue fabricando la vacuna contra la viruela casi al nivel de toneladas. Recordemos que la vacuna conocida como vaccinia tiene su origen en la viruela de las vacas y que se trata de una vacuna atenuada (a virus vivo) no exenta de efectos secundarios administrada, por ejemplo, a individuos inmuno suprimidos.

Sin pensar en una guerra bacteriológica utópica, mi respuesta se basó en el comportamiento de los virus en la naturaleza más allá de la participación consciente del hombre en su proliferación. El virus variola y sus dos variantes: la mayor y la menor, el de vaccinia (vacuna) y la viruela de los monos llamada también del simio pertenecen a la familia Poxviridae y comparten antígenos en su estructura. Esta característica es la que permitió vacunar a millones de personas contra la viruela con el virus vaccinia y lograr erradicarla del mundo y en especial de los países africanos, evento que ocurrió en Somalia en 1977 cuando se registró el último caso de viruela. Una vez erradicada la enfermedad se dejó de vacunar en la mayoría de los países y con referencia al África esto ocurrió en 1980.

Volviendo a mi expresión: los virus son **indestructibles** me gustaría agregar que además son **impredecibles**, como lo muestra la historia de la viruela que no he terminado de contar. En septiembre de 2010 aparece en un diario español un título impactante: " La viruela vuelve a África 30 años después" el título basado en un estudio publicado en la revista PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences) en el que se consigna que la viruela de los simios ha saltado del mono a los hombres, a los que enferma con una viruela de carácter más leve que la conocida. Aparece especialmente en niños no vacunados, ya que la aplicación de la vaccinia protegía también contra la viruela de los monos. Es un caso similar al VIH, que son virus ocultos en algún nicho ecológico como los monos selváticos y que de pronto se convierten en pesadilla para los humanos.

Así, está ocurriendo con la viruela del simio ya que no sólo el número de casos aumentó notoriamente en los países africanos sino que apareció también en otros países. En 2003 se detectó en EE UU una variante del virus que saltó el Atlántico con los perritos de las praderas, llamados también marmotas, vendidos como mascotas. Noventa personas resultaron

infectadas, aunque por fortuna el virus resultó ser poco virulento: sólo entre el 1% y el 10% de los casos resultó mortal. Como pasa ahora en el Congo, los más afectados fueron los jóvenes que no recibieron la vacuna por haberse suspendido la vacunación cuando se declaró erradicada la enfermedad.

Cuánto tiempo pasará hasta que el poxvirus del simio adquiera mayor virulencia al pasar de humano a humano, ¿volveremos a tener la antigua viruela que dejaba cicatrices de por vida y mataba al 30% de los infectados durante una epidemia? Por ahora no lo sabemos, la inquietud está latente.

Las bacterias también nos acechan

No han pasado todavía dos meses desde que se desató el pánico en varios países de Europa por la aparición de casos severos de infección por la bacteria *E.coli* enterohemorrágica conocida como ECEH. La enfermedad que produce esta bacteria, muy difundida en nuestro país por los brotes que causa en los niños, se conoce como síndrome urémico hemolítico y causa daños severos a los riñones y puede conducir a la muerte. El mayor número de casos se registró en Alemania incluyendo numerosas muertes. Pero el brote se extendió a otros países como Bélgica, Suecia, Gran Bretaña, Austria, República Checa, Dinamarca, Francia, Holanda, Noruega, España, Suiza, Estados Unidos y Singapur. La enfermedad causó además de casos clínicos, grandes pérdidas económicas ya que se tardó un tiempo relativamente largo para identificar la fuente de infección que resultó ser la ingesta de vegetales cultivados en el sur de Alemania mientras que al principio de su aparición se culparon a los lotes de pepinos originarios de España. Fuentes médicas informaron que se trataba de una cepa de *E. coli*, que normalmente es una bacteria inofensiva, pero la aislada de las heces de los enfermos era una especie rara y resistente a los antibióticos. Este tipo de bacteria tiene la capacidad de adherirse a las paredes intestinales desde donde bombea toxinas que provocan, entre otros síntomas, severas diarreas sanguinolentas.

Cuando Fleming descubrió la penicilina, se inició una era esperanzadora que prometía la cura contra todas las enfermedades de origen bacteriano a la que contribuyeron muchos científicos que se pusieron a la búsqueda de nuevos antibióticos. Lamentablemente, la plasticidad de los genomas de los microorganismos para mutar a formas resistentes empujadas por el uso y abuso de los antibióticos desembocó en la triste actualidad en la que han resurgido enfermedades como por ejemplo la tuberculosis, que ponen nuevamente en riesgo la salud humana. El poder patógeno de las bacterias es una realidad preocupante si se considera el hecho de que las enfermedades infecciosas contraídas en hospitales están entre las principales causas de defunción y morbilidad de los pacientes. El domingo pasado pude leer en el diario La Nación una editorial en la que se consignan los datos obtenidos por el infectólogo Ricardo Durlach sobre un estudio realizado sobre 4249 pacientes internados. De todos ellos el 11,3 % se infectó con bacterias prevalentes en el hospital (generalmente multirresistentes) y sobre 1229 pacientes operados se comprobó que el 10,2 % desarrolló una infección adquirida en el quirófano!

Es necesario aclarar que las infecciones hospitalarias no son sólo privilegio de nuestro país ocurren también en los denominados países del primer mundo aunque quizás con menor incidencia.

El reino de Liliput

Jonathan Swift volcó su gran imaginación en las aventuras de Gulliver al que un día hizo naufragar y arribar al reino de Liliput habitado por seres pequeños de unos 15 cm de altura que capturaron a Gulliver. Uno se pregunta cómo estos seres tan pequeños pudieron atar y paralizar a Gulliver que medía por lo menos doce veces más. La respuesta es simple eran muchos y actuaron cooperativamente. Como una metáfora esta situación ideada por el escritor irlandés en 1726 es que asocio el reino de Liliput con las bacterias, los virus y otros microorganismos no visibles al ojo desnudo. El hombre ha luchado por permanecer en la tierra a través de millones de años. Pero los microorganismos también y muchas veces a expensas de los humanos que le sirven de sustento. Esos seres microscópicos se han adaptado a condiciones extremas de vida como la temperatura, la salinidad, es el caso de las arqueas. Los científicos han sabido aprovechar las propiedades de ésta últimas en sus experimentos moleculares, pero qué pasa con las eubacterias (bacterias verdaderas) y los virus. La evolución ha favorecido a los humanos con un sistema inmune eficiente en combatir a cualquier intruso pequeño, pero no siempre lo logra ya sea porque no tiene una buena respuesta inmunitaria, o por que los viajes internacionales nos conectan en breves horas con pasajeros infectados con microorganismos exóticos para los que no tenemos defensas.

Es un hecho incontrovertible que ambos reinos: el de Liliput y el de animalia quieren perdurar a través de los siglos mientras exista el planeta tierra. Sin embargo en esa batalla entre ambos parecería que a pesar de todos los adelantos de la Ciencia los liliputenses están ganando la batalla. Habrá que preguntarse cuánto de esto que ocurre no se debe a que los hombres con sus conductas se auto sabotean.

Dra. Celia E.Coto

Directora de Química Viva



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 10, Agosto 2011

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Editorial

Alberto Kornblihtt, nuevo miembro de la Academia de Ciencias de EEUU

QuímicaViva felicita al Dr Alberto Kornblihtt por su reciente designación como miembro de la Academia de Ciencias de Estados Unidos, en merecido reconocimiento a su prolífica labor en el campo de la Biología Molecular.

Kornblihtt es investigador superior del Conicet en el Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (Ifibyne) del Conicet y en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, donde además de sus labores de investigación de alto impacto en la comunidad científica, lleva a cabo una amplia labor docente, interviniendo en la formación de científicos desde sus primeros pasos. El Dr. Kornblihtt es un científico que no solamente se destaca dentro del laboratorio y como docente, sino que participa activamente en tareas de difusión, acercando la ciencia de avanzada a toda la comunidad.

Nos sumamos al resto de la comunidad científico-educativa para felicitar a quien es desde hace varios años uno de los científicos más destacados de la región.

Links a notas sobre el tema en diversos medios periodísticos:

[Página de la FCEN](#)
[Diario La Nación](#)
[Diario Clarín](#)
[Diario Página 12](#)
[Diario de ciencias](#)

Comité editorial
Revista Electrónica Química Viva



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva
Número 2, año 10, Agosto 2011
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Elucidación estructural de proteínas en solución por RMN

Oscar Millet.

Unidad de Biología estructural, CICbioGUNE, Parque Tecnológico de Vizcaya, Ed. 800, 48160

Derio, España.

e-mail: omillet@cicbiogune.es

Recibido y aceptado el 08/07/2011

Abstract

Protein structure determination is a key step for a better understanding of molecular biology at molecular level as well as in drug development. In this context, NMR constitutes a powerful technique, provided that certain conditions apply to the sample. Moreover, pulse sequence versatility allows using NMR for studying protein-ligand interactions and biomolecular dynamics. The strengths and weaknesses of the application of NMR to protein structure elucidation are briefly discussed in the present review.

Key words: *protein structure- NMR- protein-ligand interaction*

Introducción

La aplicación de la química en la biología constituyó, a principios del siglo XX, el principal detonante de la exploración de la estructura de la materia biológica. Sin embargo, hubo que esperar al desarrollo de diferentes técnicas espectroscópicas, y no fue hasta mediados de los años cincuenta que Perutz y Kendrew obtuvieron la estructura cristalográfica de la mioglobina de esperma de ballena, la primera estructura tridimensional de una proteína (1). En la misma década, Watson y Crick interpretaron correctamente los datos cristalográficos proporcionados por Rosalind Franklin y pasaron a la historia por descubrir la doble hélice del ADN (2). Desde entonces la importancia de la biología estructural no ha parado de crecer y hoy la elucidación de la arquitectura molecular es fundamental para la comprensión de los procesos biológicos así como en el diseño de fármacos. Sin embargo, a pesar del esfuerzo invertido, la estructura de biomacromoléculas sigue siendo una tarea que se puede considerar de difícil a imposible, dependiendo del sistema de estudio. Los trabajos de Ernst y Wüthrich, ambos de nacionalidad Suiza y ambos premio Nobel, han revolucionado la resonancia magnética nuclear (RMN) adecuándola para el estudio de sistemas biológicos (3, 4). Actualmente la RMN permite, en casos favorables, obtener la estructura tridimensional de proteínas, ácidos ribonucleicos y fragmentos de ADN (5, 6). En la presente actualización se discutirá el proceso de elucidación estructural por RMN, haciendo especial énfasis en los últimos desarrollos de la técnica así como en las ventajas y las limitaciones de la misma.

Conceptos básicos de RMN

En presencia de un campo magnético permanente se produce un desdoblamiento de niveles energéticos de los núcleos atómicos debido al efecto Zeeman. Las poblaciones de equilibrio de dichos niveles pueden alterarse mediante pulsos de radiofrecuencia. La resonancia magnética nuclear consiste en la medida de la señal que se produce en el retorno del sistema al equilibrio. Estas mediciones proporcionan información de la distribución de niveles cuánticos que, en grado último, son una expresión de la constitución de la materia. El observable más común en RMN se denomina desplazamiento químico que, de manera simplificada, equivale a la posición que cada señal ocupa en el espectro. El desplazamiento químico es muy importante porque permite diferenciar por el tipo de núcleo observado (carbono, protón, nitrógeno,...), por las características químicas del núcleo bajo consideración (protones alifáticos, aromáticos,...) y por el entorno local de cada núcleo (protón rodeado de protones frente a un protón cercano a carbonos). Así, el desplazamiento químico constituye un exquisito descriptor de la estructura de la materia y por ello la RMN, tras ser inventada por los físicos, ha interesado a químicos primero y después a biólogos (7).

Los átomos que están unidos por enlaces producen un desdoblamiento de señales en el espectro debido al acoplamiento escalar entre los núcleos involucrados. Este desdoblamiento puede aumentar la complejidad del espectro porque incrementa el número de señales (de hecho hay métodos para eliminar este efecto) pero proporciona una valiosa fuente de información para establecer la topología química de la molécula. El acoplamiento escalar ha permitido diseñar la espectroscopía multidimensional en la que los desplazamientos químicos de un tipo de núcleos (p. ej. protón) se comparan con los de otro núcleo (p. ej. carbono) en un espectro bidimensional en el que tan solo aparece una señal en el plano protón/nitrógeno en aquellas coordenadas que haya un par de núcleos que están acoplados escalarmente. Un segundo tipo de efecto (el acoplamiento dipolar) es proporcional al ángulo que forma el espín nuclear con el eje principal del campo magnético externo y también es susceptible de proporcionar información estructural. El problema es que, debido al movimiento de la molécula que se produce en solución, todas las orientaciones son equiprobables y la componente neta de dicho acoplamiento se promedia a cero. Hace algunos años, Tjandra y Bax utilizaron bicelas lipídicas para orientar a las moléculas en solución con lo que se reintroducía el acoplamiento dipolar sin perjuicio del resto de propiedades espectrales (8, 9). Este procedimiento se ha demostrado muy exitoso y ha conllevado la aparición de un número elevado de medios orientadores diferentes.

Quizás el observable más importante en RMN es el efecto nuclear Overhauser (el denominado NOE) que consiste en la medida de la una velocidad de relajación cruzada entre dos núcleos. Es relevante porque esta información proporciona una estimación de la distancia más corta entre los dos núcleos involucrados, independientemente de que estén unidos por enlaces o no.

RMN de proteínas en solución

Debido a que la diferencia de niveles anteriormente citada es energéticamente muy pequeña, la RMN es una técnica muy insensible. Esto implica que hay que trabajar con concentraciones elevadas de proteína y, dado que la evolución no ha diseñado a estas moléculas para tal fin, fenómenos de agregación y/o precipitación ocurren con relativa frecuencia. Las casas comerciales que fabrican los imanes de resonancia son conscientes de este problema y el estudio de biomoléculas es el motor para que estas compañías diseñen imanes y dispositivos cada vez más potentes. Un ejemplo exitoso de esta investigación lo constituyen las sondas criogénicas que aumentan mucho la sensibilidad del equipo con la subsiguiente reducción en la concentración efectiva de proteína en la muestra.

No todos los isótopos nucleares son sensibles al fenómeno de la RMN. De hecho, de los átomos más importantes que constituyen a las proteínas (hidrógeno, carbono, nitrógeno y oxígeno) tan solo el protón presenta desdoblamiento de niveles energéticos en presencia de un campo magnético y es casi 100% el constituyente de los núcleos de hidrógeno. En el caso del carbono y del nitrógeno, los isótopos activos son el C13 y N15 que presentan abundancias naturales del 1,2% y 0,1% respectivamente. Así, para "activar" estos núcleos para ser estudiados por RMN, se acostumbra a preparar muestras marcadas en las que se enriquecen en estos isótopos nucleares. Esto se puede conseguir mediante técnicas de biotecnología en las que las fuentes de carbono y nitrógeno están controladas (10). Por último, el oxígeno no presenta buenas propiedades espectroscópicas y no se suele estudiar en RMN biomolecular. Los diferentes experimentos de RMN específicamente diseñados para proteínas se han diseñado a partir de las características químicas de las mismas. El experimento más importante que se aplica es el HSQC (del inglés heteronuclear single quantum correlation). Este experimento correlaciona los núcleos de protón que se encuentran a un enlace de un núcleo de nitrógeno. En el caso de las proteínas esta situación se da una vez para cada aminoácido (en su enlace peptídico). Así, en el espectro HSQC de una proteína aparecerá una señal por cada aminoácido y este experimento constituye un verdadero "carné de identidad" de la proteína. Contando el número de señales en el espectro ya sabemos cuantos aminoácidos tiene la proteína, aunque esta sería una información que se puede obtener de manera mucho menos costosa mediante otras técnicas. Más interesante es la información que proporciona la posición de las señales en el espectro. Tal y como se muestra en la Figura 1, las proteínas que están desplegadas muestran una dispersión de señales muy pobres, sobretudo en la dimensión de protón y que contrasta con la diversidad de desplazamientos químicos que se observan en una proteína con estructura terciaria (o cuaternaria). Esto es así porque la conformación plegada añade una contribución adicional al desplazamiento químico que permite dispersar aún más las señales.

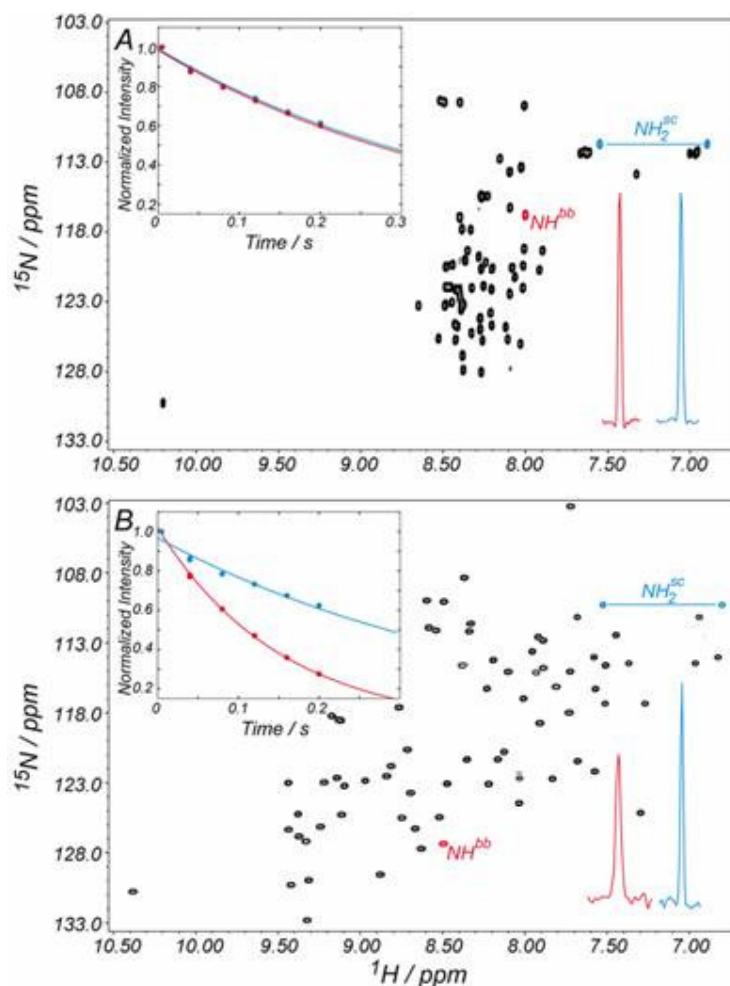


Figura 1: Espectro HSQC de una proteína en condiciones de desplegamiento (arriba) y en condiciones que favorecen el plegamiento de la misma (abajo).

Asignación espectral

Con el fin de proceder a la elucidación estructural, la primera tarea que se debe realizar es la asignación de los espectros de RMN. Dicho de otra manera, se deben identificar cada una de las señales del espectro (p. ej. el de la Figura 1) con los correspondientes aminoácidos de la secuencia de la proteína. Para ello se utiliza nuevamente el acoplamiento escalar y se registran una serie de experimentos que nos relacionan los núcleos que están conectados por enlaces. Algunos de estos experimentos nos dan información acerca de la naturaleza del residuo (p. ej. si el carbono alfa pertenece a una leucina o a una prolina). Otros experimentos nos permiten establecer la conectividad con el aminoácido precedente para así encajar las piezas (aminoácidos) en el rompecabezas (la secuencia). En principio debiera ser posible obtener la información de la asignación de la totalidad de señales en el espectro. Sin embargo, en la práctica se suele asignar entre un 85% y un 98% de las mismas, debido a problemas de solapamiento de señales y/o de desaparición de las mismas por otros fenómenos (relajación, intercambio, etc...).

El tamaño de la proteína es una variable importante a la hora de abordar la asignación espectral. Obviamente la complejidad del proceso aumenta linealmente con el número de aminoácidos implicados pero quizás más importante es que la probabilidad de que dos señales compartan desplazamiento químico (solapamiento de señales) aumenta también. Finalmente existe un tercer problema derivado del aumento del peso molecular de la molécula que es el del ensanchamiento de la señal debido a un movimiento más lento de la molécula en la solución. Como la integral de la señal depende solo del número de núcleos implicados (que no cambia), un ensanchamiento de señal inevitablemente va acompañado de una disminución de la relación señal/ruido. Este fenómeno ha limitado el tamaño máximo de moléculas que se podían utilizar hasta 15-20 KDa. El ingenioso desarrollo de un método de compensación de mecanismos de relajación (denominado TROSY) ha permitido resolver este problema en gran parte y, actualmente se puede trabajar más o menos rutinariamente con proteínas de hasta 40 kDa (11, 12). El laboratorio de Lewis Kay (Toronto) ostenta la proteína más grande jamás resuelta por RMN, la malato sintasa G de 82 kDa (13, 14).

Medida de observables

Tal y como se ha indicado anteriormente, el NOE constituye el principal observable en la determinación de la estructura de proteínas por RMN. En general se considera que todos los pares de núcleos que se encuentren a una distancia igual o inferior a 5 Å son susceptibles de producir un NOE. Dichos NOES se detectan en un experimento multidimensional denominado NOESY en el que un determinado NOE aparece como un pico de cruce situado en las coordenadas de los desplazamientos químicos de los dos núcleos implicados. En principio, la intensidad del pico es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia y, de esta relación, se debieran establecer disposiciones espaciales más o menos exactas. El problema es que las proteínas no son entidades estáticas y esta distancia está en constante fluctuación. El movimiento de los núcleos contribuye con otros términos de la ecuación de una manera mucho menos predecible, haciendo que la extracción de distancias exactas a partir de los NOEs no sea posible. Sin embargo, la intensidad del NOE se utiliza como un indicador cualitativo acerca de la cercanía (o lejanía) de los dos núcleos que lo generan. El acoplamiento escalar también proporciona información estructural (además de la componente topológica ya mencionada anteriormente). El acoplamiento a tres enlaces es función del ángulo diedro que lo conforma. Los elementos de estructura secundaria adoptan posiciones específicas en el ángulo diedro (típicamente representadas en el diagrama de Ramachandran). Así, la medida de los acoplamientos escalares a tres enlaces es útil para el refinamiento de la estructura (vide infra).

Igualmente, los acoplamientos dipolares convenientemente reintroducidos con ayuda de un medio orientador proporcionan una valiosa información estructural. Este observable está especialmente indicado para obtener información a larga distancia (por ejemplo la orientación de dos dominios diferentes de una misma proteína) (15), dado que es muy complementaria a la obtenida con el NOE.

Finalmente, el propio desplazamiento químico contiene una contribución conformacional y ayuda en el proceso de refinado de la estructura. Además, cabe destacar que se pueden utilizar otros observables como las restricciones paramagnéticas que también contienen información estructural.

Calculo de la estructura

El conjunto de restricciones experimentales medidas (ver apartado anterior) se utiliza para establecer un modelo computacional que es consistente con todos los datos. Para ello se utiliza la mecánica molecular modulada en presencia de un campo de fuerzas (16). Inicialmente se parte de una conformación de la proteína totalmente extendida. El programa de modelado va probando las diferentes conformaciones hasta encontrar una que satisfaga las siguientes condiciones: i) cumpla con los preceptos del campo de fuerzas impuesto (en términos de ángulos y distancias) y ii) ponga en acuerdo al mayor número posible de restricciones experimentales. Para ello el programa explora el espacio conformacional mediante un método denominado simulated annealing que se asemeja a los ciclos de frío (poco movimiento) y calor (mucho movimiento) en el proceso de forja de un metal. Al final se obtiene una batería de estructuras que minimizan las restricciones experimentales (que contienen el menor número de violaciones) y que se considera el modelo refinado. A diferencia de otras técnicas, en RMN no se considera únicamente una estructura sino que se representan varias de ellas (ver Figura 2) con energías similares para ver la calidad de los datos experimentales: cuanto mayor sea el número de restricciones experimentales utilizadas, más parecidas van a ser estas estructuras (equivalente a mayor resolución).

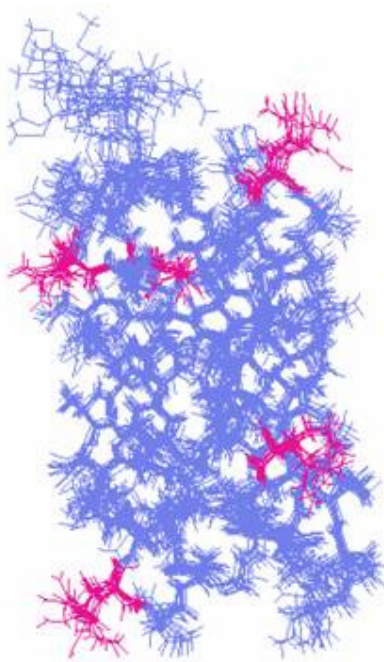


Figura 2: superposición de las diez estructuras de más baja energía para el dominio de unión a IgG de la proteína L de *streptococcus magnus*.

Consideraciones finales

Tal y como se ha descrito en la presente actualización, la RMN constituye una poderosa técnica para la elucidación estructural de proteínas siempre que la muestra cumpla una serie de propiedades y con la ventaja de que proporciona información en solución. Es de remarcar que la RMN es una técnica muy versátil y que permite realizar estudios de caracterización de la dinámica de proteínas y de sus interacciones con otros ligandos y efectores proteicos. Por todo ello, la RMN ocupa un lugar central en la biología estructural moderna.

Referencias

1. Kendrew J, Perutz MF (1957) X-ray studies of compounds of biological interest *Annu Rev Biochem* 26: 327-372.
2. Watson J, Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid *Nature* 171: 737-738.
3. Ernst RR (1992) Nobel Lecture. Nuclear magnetic resonance Fourier transform spectroscopy *Biosci Rep* 12: 143-187.
4. Wuthrich K (1989) Determination of three-dimensional protein structures in solution by nuclear magnetic resonance: an overview *Methods in enzymology* 177: 125-131.
5. Tugarinov V, Hwang PM, Kay LE (2004) Nuclear magnetic resonance spectroscopy of high-molecular-weight proteins *Annu Rev Biochem* 73: 107-146.

6. Shajani ZVarani G (2007) NMR studies of dynamics in RNA and DNA by ^{13}C relaxation *Biopolymers* 86: 348-359.
7. Ernst RR (1987) Methodology of magnetic resonance imaging *Quarterly reviews of biophysics* 19: 183-220.
8. Tjandra NBax A (1997) Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium *Science (New York, N.Y.)* 278: 1111-1114.
9. Tjandra N, Omichinski JG, Gronenborn AM, Clore GMBax A (1997) Use of dipolar ^1H - ^{15}N and ^1H - ^{13}C couplings in the structure determination of magnetically oriented macromolecules in solution *Nature structural biology* 4: 732-738.
10. Goto NKKay LE (2000) New developments in isotope labeling strategies for protein solution NMR spectroscopy *Current opinion in structural biology* 10: 585-592.
11. Pervushin K, Riek R, Wider GWuthrich K (1997) Attenuated T_2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 12366-12371.
12. Riek R, Pervushin KWuthrich K (2000) TROSY and CRINEPT: NMR with large molecular and supramolecular structures in solution *Trends Biochem Sci* 25: 462-468.
13. Grishaev A, Tugarinov V, Kay LE, Trehwella JBax A (2008) Refined solution structure of the 82-kDa enzyme malate synthase G from joint NMR and synchrotron SAXS restraints *Journal of biomolecular NMR* 40: 95-106.
14. Tugarinov V, Choy WY, Orekhov VYKay LE (2005) Solution NMR-derived global fold of a monomeric 82-kDa enzyme *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 622-627.
15. Millet O, Hudson RPKay LE (2003) The energetic cost of domain reorientation in maltose-binding protein as studied by NMR and fluorescence spectroscopy *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 12700-12705.
16. Lopez-Mendez BGuntert P (2006) Automated protein structure determination from NMR spectra *Journal of the American Chemical Society* 128: 13112-13122.

Metales, ambiente y las sociedades tecnológicas:

¿hacia dónde nos dirigimos?

Anita Zalts

Área Química, Instituto de Ciencias, Universidad Nacional de General Sarmiento,

J.M. Gutiérrez 1150 (B1613GSX) Los Polvorines, Provincia de Buenos Aires, Argentina

e-mail: azalts@ungs.edu.ar

Recibido el 12/07/2011 - Aceptado el 20/07/2011

Resumen

Los metales han sido usados a lo largo de gran parte de la historia humana en la fabricación de herramientas, armas, maquinarias y joyas, entre otros usos. La actividad minera responsable de la obtención de muchos de estos metales ha traído como consecuencia una modificación en la distribución y un incremento en la movilización de los metales en el ambiente. Numerosas aplicaciones tecnológicas más recientes en la industria, medicina, microelectrónica, nanotecnología, por ejemplo, han incrementado nuestra exposición a nuevas formas químicas de los metales. A pesar de que los metales no pueden ser creados ni destruidos, las formas en que se presentan en el ambiente pueden ser modificadas, alterando su biodisponibilidad y toxicidad. En el medio acuoso, la biodisponibilidad está regulada por la capacidad complejante del medio, fundamentalmente debida a ligandos orgánicos, ya sea antrópicos o naturales.

Palabras clave: metales, ambiente, sociedades tecnológicas, recursos naturales, materia orgánica disuelta, biodisponibilidad, especiación, capacidad complejante, nanotecnología.

Metals, environment and technological societies:

¿Where are we going?

Abstract

Metals have been used throughout most of human history to make tools, weapons, machinery, jewelry, among other uses. Many of these metals were obtained through mining and smelting activities, increasing

their distribution and mobility throughout the environment. More recent technological applications in industry, medicine, microelectronics, nanotechnology and other uses have further increased our exposure to new chemical forms. Although metals can neither be created nor destroyed, their forms may be changed, thereby altering their biological availability and toxicity. Bioavailability in aquatic systems is modulated by its complexing capacity towards organic ligands, either from synthetic or natural sources.

Key words: metals, environment, technological societies, natural resources, dissolved organic matter, bioavailability, speciation, complexing capacity, nanotechnology.

Introducción

Los seres humanos somos grandes modificadores de nuestro planeta: nuestros instintos nos llevan a transformar nuestro entorno en la búsqueda de mejores condiciones de vida. Las sociedades tecnológicas en las que vivimos, caracterizadas por el uso intensivo de materiales, están asociadas a un requerimiento creciente de los mismos debido al aumento de la población mundial, y por lo tanto, al incremento en la producción de bienes y prestación de servicios. Esta situación acarrea una serie de consecuencias entre las cuales probablemente las más acuciantes resultan ser la escasez de los recursos naturales y el impacto ambiental asociado a la obtención de materiales, su uso y/o los residuos generados. Entre los recursos naturales críticos para el desarrollo de nuestras sociedades se encuentran, por ejemplo, los metales.

Los metales

Los metales están presentes en el ambiente desde que se formó el planeta: no pueden crearse ni destruirse. La vida surgió y se desarrolló en un entorno donde seguramente los metales actuaron como catalizadores de reacciones que contribuyeron a formar nuestro mundo tal como lo conocemos. Es más, muchos de ellos resultan esenciales para diversos procesos biológicos. Ante esta situación es lícito preguntarnos ¿por qué nos preocupa la presencia de metales en el ambiente, si siempre estuvieron allí? Si bien la cantidad total de los metales es invariante en la Tierra, éstos pueden presentarse bajo la forma de diferentes especies químicas, modificando su reactividad y solubilidad, con lo que se afecta la disponibilidad para los organismos, su actividad, y por lo tanto la toxicidad. Los sistemas biológicos requieren de una variedad importante de metales, pero las cantidades suelen ser a nivel traza (como por ejemplo en el caso del cobre o cinc, entre otros) o son componentes importantes en las células, como el caso del sodio, calcio o potasio; sin embargo, cantidades superiores resultan tóxicas. La exposición a los

metales puede tener serias consecuencias toxicológicas, dependiendo del tipo de metal, la forma de exposición (ingesta de agua, alimentos, medicinas, inhalación, absorción dérmica), la forma en la que se encuentre el metal (en estado metálico, en solución, asociado a ligandos, como material particulado, en fase vapor o amalgamado, por ejemplo); de la dosis, la duración y la frecuencia de la exposición. Esto es particularmente importante debido a que además de casos de intoxicación aguda, la mayoría de los metales ejercen efectos mucho más sutiles, crónicos, produciendo daños a largo plazo, por lo que la relación causa-efecto es mucho más difícil de detectar.

Si nos preocupa la presencia de las formas más biodisponibles y potencialmente más tóxicas de los metales es porque el accionar humano ha incidido en su especiación. En la naturaleza, los metales mayoritariamente se encuentran en la litósfera formando parte de minerales de baja solubilidad. Enormes cantidades de estos minerales son extraídas y transformadas en metal, tal como vemos en la Tabla 1 que reúne información sobre la producción mundial anual de algunos de ellos (1). Estos datos además permiten observar el incremento continuo y sostenido que ha tenido su producción durante el siglo XX, tendencia que se mantiene en la primera década del siglo XXI. Las actividades mineras para obtener y purificar los metales, la fabricación de objetos, y el posterior uso y/o descarte de los mismos, ha modificando la distribución de los metales en el ambiente, pues es claro que a lo largo de la historia, grandes cantidades de metal han pasado de la litósfera a la antropósfera.

Tabla I: Producción mundial anual (en toneladas) de algunos metales seleccionados. (Fuente: United States Geological Survey). Se indica la producción cada diez años; en la referencia se pueden consultar la información completa.

<i>año</i>	<i>Aluminio (toneladas/año)</i>	<i>Cobre (toneladas/año)</i>	<i>Hierro y acero (toneladas/año)</i>	<i>Cinc (toneladas/año)</i>
1900	6.800	495.000	No hay datos	479.000
1910	45.000	858.000	66.500.000	810.000
1920	121.000	959.000	61.300.000	682.000
1930	272.000	1.610.000	80.200.000	1.260.000
1940	787.000	2.400.000	110.000.000	1.470.000
1950	1.490.000	2.380.000	134.000.000	2.150.000
1960	4.490.000	3.940.000	259.000.000	3.090.000

1970	9.650.000	5.900.000	431.000.000	5.460.000
1980	15.400.000	7.200.000	514.000.000	5.950.000
1990	19.300.000	9.200.000	531.000.000	7.150.000
2000	24.300.000	13.200.000	573.000.000	8.777.000
2007	37.900.000	15.400.000	947.000.000	11.000.000

La demanda de metales siempre ha estado vinculada con los servicios que prestan a la población los productos que los contengan. Actualmente estos servicios se han expandido y prácticamente no existe ámbito de actividad humana que no requiera metales: vivienda, transporte, suministro de energía, producción y conservación de alimentos, comunicaciones, salud, etc.). Los metales han sido usados durante la mayor parte de la historia humana para fabricar por ejemplo, utensilios, herramientas, maquinarias, armas, joyas. Además de los hallazgos arqueológicos y los registros históricos que muestran el empleo de los metales en diversas épocas, existen evidencias geoquímicas de su uso. Como consecuencia de actividades tales como la minería, combustión de carbón y combustibles fósiles, la producción pirometalúrgica de hierro y otras aleaciones no ferrosas, se produce la liberación de metales a la atmósfera. Los sedimentos, ya sean hielos permanentes o sedimentos lacustres, responden rápidamente a los cambios ambientales y guardan registro de las transformaciones, por lo que pueden ser utilizados para reconstruir estas historias. Los sedimentos del lago Liangzhi han permitido reconstruir 7000 años de uso de metales en la zona central de China. Se observó, por ejemplo, un incremento continuo en las concentraciones de Cu, Ni, Pb y Zn a partir de aproximadamente el año 3000 A.C., indicando el comienzo de la Edad de Bronce en la China Antigua (2). Estudios que comprenden análisis estratigráficos de los metales en columnas de hielos de glaciares y zonas polares, muestran que en Europa la actividad metalúrgica ha estado presente desde hace unos tres mil años (3). Se observaron correlaciones entre las concentraciones de metales halladas en los hielos a diferentes profundidades con hechos históricos, no sólo tan evidentes como los cambios tecnológicos que comenzaron con la Revolución Industrial, sino que, por ejemplo, se identificaron picos de actividad metalúrgica durante el Imperio Romano (4), época en la que se llegó a producir grandes cantidades de metal, en particular plomo (80.000 a 100.000 toneladas/año), cobre (15.000 toneladas/año), cinc (10.000 toneladas/año) para usos militares y civiles tales como la fabricación de armas y la acuñación de monedas. Por otra parte, los estudios de la composición química y de la relación isotópica de $^{206}\text{Pb}/^{207}\text{Pb}$ de los sedimentos lacustres de la zona de Morococha, en los Andes Centrales del Perú, ha permitido reconstruir el desarrollo de la actividad metalúrgica en esta región. Se determinó que el inicio de la metalurgia del cobre y sus aleaciones en esta zona data de aproximadamente el año 1000, correspondiendo a la última etapa de la

cultura Wari. Durante el imperio incaico (aproximadamente entre el año 1450 y la conquista española en 1533) se incrementó el trabajo con cobre, estaño y bronce, aunque el mayor interés se orientó hacia la producción de plata. Esta actividad se incrementó en la época colonial, por la demanda europea de este metal (5). Son cada vez más numerosos los estudios que combinan observaciones arqueológicas con determinaciones químicas para interpretar, cuantificar y datar costumbres y tecnologías de diversos pueblos. En nuestro país por ejemplo, podemos citar los estudios realizados en las Lagunas de Yala (Jujuy), donde se analizaron los cambios climáticos y las condiciones de vida de los habitantes del lugar durante los últimos 2000 años. En este caso, las evidencias de la expansión de las actividades mineras locales son relativamente recientes, correspondiendo al siglo XX (6). La minería en la Argentina ha tenido una expansión importante en los últimos 20 años. Este incremento ha tenido eco en la sociedad debido a los problemas de la contaminación ambiental asociada a esta actividad. En 1990 la producción de oro y de cobre, que era de 900 kg y 300 toneladas, respectivamente, pasó en el año 2009 a 47.000 kg de oro y 143.000 toneladas de cobre, quedando como tercer productor de oro de América Latina después de Perú y Brasil. La producción primaria de aluminio en la planta de Aluar Aluminio Argentino en el 2009 fue de unas 410.000 toneladas. Por otra parte la Argentina es el segundo productor mundial de boro y el cuarto productor de litio y estroncio (7). Desde el punto de vista tecnológico, la producción de litio es estratégica ya que es un elemento clave en la fabricación de baterías para autos híbridos y eléctricos.

Estamos acostumbrados a que los metales se obtengan a partir de depósitos minerales en reservas vírgenes. Sin embargo, teniendo en cuenta la magnitud de la producción mundial de metales, es claro que cada vez será más pronunciada la disminución de las reservas en la litósfera. En el futuro, probablemente las reservas naturales remanentes resulten inadecuadas para su explotación por tener un muy bajo contenido de metal, o por estar ubicadas en sitios inaccesibles. Actualmente, en EEUU, la cantidad de cobre en uso en diversos productos, el que se encuentra como residuo o descarte, y el que se estima presente en reservorios minerales es muy similar (8). Otro ejemplo interesante es el del cinc, un metal cuyo uso se ha ido incrementando desde fines del siglo XIX. Aproximadamente un 50% de este metal se emplea en la producción de aceros galvanizados, donde mediante un recubrimiento con una delgada capa de cinc se los protege de la corrosión. Otro 25% del cinc se destina a la producción de bronce, latones y otras aleaciones usadas en la fabricación de motores, equipos de refrigeración, autos, y chapas para techos, entre otros productos. Las reservas mundiales de cinc se estiman en 140Tg (1Tg = 10^9 kg), encontrándose los mayores depósitos en Canadá, Australia, Perú, México, Polonia y Rusia. Se ha estimado que estas reservas alcanzarán para unos 20-30 años, considerando los depósitos identificados y el consumo anual de este metal (9). Teniendo en cuenta que el requerimiento de materiales

experimenta un incremento continuo asociado al aumento de la población, las reservas no tradicionales de metales, tales como los materiales o productos en uso, los almacenados, o descartados a lo largo de los años por empresas e individuos serán fundamentales como fuentes de metal en las próximas décadas. Estamos entrando en una época de transición en la que pasaremos de depender exclusivamente de las reservas vírgenes a una dependencia casi total del metal reciclado.

El empleo extendido de metales en la industria, la agricultura, y en infinidad de objetos de uso cotidiano, ha incrementado nuestra exposición a ellos: no sólo involucran a aquellos trabajadores cuyas actividades están relacionadas con los metales, sino que afecta a toda la sociedad ya sea como consumidores de productos o por la contaminación ambiental. Por otra parte, las estadísticas recogidas por las Naciones Unidas muestran un claro incremento de las poblaciones urbanas en detrimento de las rurales (10).

Desde un punto de vista ambiental y de la salud, las actividades desarrolladas en las ciudades producen emisiones de contaminantes diversos, tanto metálicos como de sustancias orgánicas, transformando al ambiente urbano en uno particularmente susceptible a la degradación y contaminación. Entre las principales fuentes de emisión de metales que encontramos en un ambiente urbano podemos mencionar las vinculadas con el tránsito automotor (uso de combustibles fósiles, desgaste de neumáticos y otras partes de los automóviles, pérdidas de aceite, etc.), actividades industriales, disposición de residuos (incineración y rellenos sanitarios), y la corrosión de materiales empleados en la construcción. En general, los metales en las ciudades provienen de emisiones a la atmósfera, que luego tienden a adherirse a material particulado, que se depositará a su vez sobre el suelo y las aguas. La dispersión y distribución de los metales dependerá notablemente del tamaño de las partículas ya que sedimentarán o se relocalizarán por acción de los vientos, lluvias y escorrentía superficial (11). En el pasado, los estudios de la presencia de metales en suelos y aguas de ambientes urbanos estaban en general limitados a metales de reconocida relevancia ambiental: el plomo, usado como antidetonante en los combustibles y como pigmento en la fabricación de pinturas fue uno de los más estudiados, junto con metales tales como cadmio, cobre, mercurio y cinc. Con la eliminación del plomo de la formulación de las naftas y pinturas, y el reemplazo de las cañerías de plomo por otros materiales, la atención migró hacia otros metales, cuya presencia en el ambiente aparece vinculada al desarrollo tecnológico. Así, por ejemplo, desde que se incorporaron los convertidores catalíticos en los automóviles para transformar productos de la combustión incompleta en los motores (hidrocarburos, CO y óxidos de nitrógeno) en sustancias menos tóxicas, entraron en juego los elementos del grupo del platino, fundamentalmente Pt, Pd y Rh, usados como catalizadores de estas reacciones. La presencia de estos elementos se analiza en la atmósfera urbana para monitorear la calidad del aire. Por ejemplo, las concentraciones medidas en muestras de material

particulado (PM_{10}) recogidas en aire de diversos puntos de la ciudad de Buenos Aires durante una campaña en 2006 resultaron entre 2,3 y 47,7 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ para el Pt y entre 0,3 y 16,8 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$ para el Rh (12), valores por debajo de los considerados peligrosos, pero considerablemente superiores a los de una atmósfera rural. Otro claro ejemplo del aumento en la variedad de materiales requeridos por las sociedades tecnológicas es la industria electrónica: los circuitos electrónicos fabricados en la década de 1980 contenían 11 elementos, mientras que los del año 2000 hacían uso de unos 60 elementos (13), en tecnologías que se vuelven obsoletas cada vez más rápido, generando un nuevo tipo de residuos: la basura electrónica. Por lo tanto, además del incremento continuo del volumen de metales extraídos, aparece un nuevo factor de complejidad debido al aumento en la diversidad de materiales requeridos y utilizados. De los más de 80 elementos clasificados como metales o metaloides, sólo se ha caracterizado la toxicidad en seres humanos de unos 30. Por supuesto, los estudios sobre la toxicidad de los elementos menos frecuentes irán en aumento en la medida en que la exposición a los mismos se incremente con el uso en nuevas aplicaciones tecnológicas tales como síntesis de drogas, microelectrónica, nanotecnología u otras tecnologías emergentes. Por sus propiedades físicas y químicas únicas, el uso de las tierras raras (La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu e Y) presenta un incremento continuo en aplicaciones tecnológicas. Por ejemplo, el escandio es un ingrediente invaluable en las celdas de combustible sólidas y en aleaciones de aluminio; el neodimio es imprescindible en la fabricación de imanes permanentes, el ytrio se emplea en semiconductores y en la tecnología láser. Las innovaciones tecnológicas influyen en la demanda de las tierras raras (14); en la medida en que su consumo aumente, seguramente comenzarán a interesar sus aspectos toxicológicos y el monitoreo de su presencia en el ambiente.

La escasez de agua

Al pensar en la escasez de agua, probablemente lo primero que venga a nuestras mentes sean imágenes de sequías, intensificadas por el cambio climático global. Sin embargo, y en particular para quienes habitamos en ciudades situadas sobre las márgenes de ríos caudalosos, probablemente éstas sean imágenes de problemas lejanos y no tomemos plena conciencia de que estamos enfrentando una seria crisis debida al enorme incremento del consumo de agua. En cada área donde exista un uso intensivo del agua – agricultura, industrias, grandes ciudades – la demanda de agua aumenta sin cesar. El consumo global del agua se triplicó entre 1950 y 1992 (4340 km^3 anuales) (15) y continúa aumentando. Durante décadas la respuesta a la mayor demanda de agua ha sido extraer más agua subterránea, construir más embalses para controlar las inundaciones y sequías, obtener más energía eléctrica, más agua para riego

y las actividades productivas, más agua potable... Sin embargo existen límites a este suministro de agua en constante expansión, que comienzan a hacerse cada vez más visibles: el agua subterránea se agota, los lagos disminuyen su superficie, desaparecen humedales, las aguas están contaminadas...

Cubrir las necesidades de agua de la población enfrentando límites en su disponibilidad, ya sean de carácter económico, ecológico y/o político, nos está obligando a desarrollar una nueva relación con el agua y su uso. Históricamente, hemos manejado al agua como un recurso inagotable, más que a un sistema altamente complejo y vulnerable que sustenta la vida en el planeta. Hoy en día es fundamental que busquemos formas más eficientes de usar y cuidar el agua. La presencia de metales en el agua es uno de los aspectos que deben ser considerados.

Los metales y el agua: biodisponibilidad

Los sistemas naturales presentan una gran complejidad: lo habitual es encontrar minerales en contacto con una fase acuosa y otra gaseosa, siendo raro el sistema que no incluya una porción de biosfera. El manejo de las reservas naturales requiere conocer y poder modelar el comportamiento de los metales ecológicamente activos como para poner en marcha procesos de restauración a largo plazo de estos sistemas. Las decisiones de manejo de los mismos dependen de preguntas clave que involucran entornos químicamente complejos en las interfases agua – material geológico – biota.

Se sabe desde hace décadas que la materia orgánica disuelta (MOD) en el agua influye en los ciclos biogeoquímicos de los metales, al modificar el destino y transporte de los mismos en el medio acuático. En las aguas, los metales tienden a presentarse formando complejos con la materia orgánica, con ligandos inorgánicos, así como con ligandos de origen antropogénico. Una de las ideas directrices en el estudio de la toxicidad de los metales en el medio acuático es que la forma de metal libre (acuocomplejo) o la que aparece formando complejos débiles con ligandos inorgánicos, es biodisponible, y por ende, representa la fracción tóxica. Si bien aún queda mucho por investigar en estos sistemas naturales, es sabido que las sustancias húmicas tienen un rol muy importante en la especiación de los metales, sobre todo por su abundancia. Las sustancias húmicas poseen estructuras complejas no repetitivas, conteniendo grupos funcionales carboxilo y fenoles que pueden actuar como ligandos fuertes o moderados de metales. Las constantes de estabilidad de los ligandos inorgánicos (Cl^- , HCO_3^- , OH^- , SO_4^{2-} , por ejemplo) son menores, formando complejos lábiles. La MOD, en cambio, posee un amplio rango de masas molares, con solubilidades y reactividades variables. Las constantes de estabilidad de los complejos formados por la materia orgánica y los metales pueden agruparse en dos grandes familias: una

asociada a los carboxilos, cuyos pKas están alrededor de 3,8 -4,4 y otra a grupos fenólicos de pKas alrededor de 8,6 – 7,9. Por lo tanto, a pesar de la heterogeneidad de las estructuras, el enlace con los protones y los metales se modela teniendo en cuenta estas familias claramente distinguibles. Uno de los modelos más utilizados para predecir la toxicidad de los metales en el medio acuático es el modelo de ligando biótico (MLB). Este modelo permite calcular la fracción de metal que no está asociada a la MOD (biodisponible) teniendo en cuenta el pH, la concentración de la MOD y la dureza del agua (16). Como consecuencia de esta capacidad de interactuar con los metales, la materia orgánica presente en las aguas con frecuencia controla la especiación de los metales, altera la carga superficial de las partículas, se adsorbe sobre las superficies minerales alterando las reacciones de disolución, precipitación, redox y fotoquímicas (17). La materia orgánica también tiene un rol fundamental en la cinética de reacciones ambientalmente importantes. A pesar de que el modelo de ligando biótico es utilizado frecuentemente con fines regulatorios, se debe tener en cuenta de que se trata de un estimador que no tiene en cuenta las características particulares de la materia orgánica, ni la presencia de ligandos antropogénicos que pueden conducir a una elevada movilización de los metales en aguas que sufran un fuerte impacto por las actividades humanas, subestimando la capacidad complejante del medio (18). Si bien la mayoría de los modelos de interacción de los metales con el medio acuático se basan en parámetros termodinámicos, existen también modelos más complejos que contemplan los procesos hidrodinámicos, de transporte difusivo y aspectos cinéticos, definiendo una especiación dinámica en las interfases (19). Dado que los sistemas vivos interactúan con los metales, resulta de interés evaluar el comportamiento de especies acuáticas por ser las que sufren una mayor exposición por estar en constante contacto con aguas conteniendo metales. El estudio de las interacciones de superficies bacterianas con metales resulta particularmente importante por la posibilidad de retener (20), liberar (21) o transformar (22, 23) los metales presentes en el agua y sedimentos. La capacidad complejante de un sistema, definida a través de la concentración de ligandos y de las constantes de estabilidad, es un parámetro de utilidad al evaluar las diferentes formas químicas en las cuales se pueden encontrar los metales en el medio acuático (24, 25), así como la aplicabilidad de sistemas de biotratamiento de efluentes que contengan metales (26, 27).

Nanopartículas

Las nanopartículas se pueden definir como materiales que poseen al menos dos dimensiones entre 1 y 100 nm. Estos materiales poseen propiedades únicas y reactividades elevadas que no se observan en materiales de la misma composición, pero de mayor tamaño de partículas, o en las especies solubles. Las propiedades específicas de las nanopartículas se relacionan con su gran superficie específica, y por lo

tanto, con la gran cantidad de átomos ubicados en la superficie del material y con la elevada proporción de imperfecciones en la estructura cristalina en relación a la superficie expuesta. Si bien asociamos el concepto de nanopartículas a avances tecnológicos, las nanopartículas son componentes naturales presentes en el agua, aire y suelo debido a numerosos procesos biológicos y geológicos como las erupciones volcánicas. Por ejemplo, hay registros de la presencia de nanopartículas en hielos polares de 10.000 años de antigüedad, probablemente provenientes de procesos de combustión que llegaron hasta estas áreas por deposición desde la atmósfera. Por otra parte, muchas entidades biológicas tales como proteínas, ácidos nucleicos, virus, material de degradación que comprende a los ácidos húmicos y ácidos fúlvicos caen dentro de la categoría de nanopartículas. Si bien la cantidad y diversidad de las nanopartículas de origen natural es muy grande, el tremendo impulso comercial de los últimos años ha hecho que se multiplique la aparición de nanopartículas sintéticas, producidas por la industria de la nanotecnología, en rápida expansión. ¿Por qué nos preocupan estas nanopartículas sintéticas, si vivimos en un entorno donde abundan materiales naturales cuyas dimensiones son las de las nanopartículas? Las partículas nanométricas naturales en general tienen tiempos de vida cortos en el ambiente, ya que desaparecen por disolución o por formación de aglomerados mayores. En cambio, las nanopartículas sintéticas fueron diseñadas para ser persistentes, ya sea a través del uso de recubrimientos o por agentes fijadores; además pueden contener compuestos en formas estructurales que no existen naturalmente y cuya interacción con los seres vivos puede ser diferente a la que se conoce para otras formas químicas. La producción y usos cada vez más amplios y difundidos de este tipo de materiales (Tabla II) sin dudas causará la liberación de nanopartículas al ambiente, donde podrán interactuar con los componentes bióticos y abióticos de los ecosistemas. A pesar de los innegables beneficios de incluir nanopartículas en la formulación de productos de consumo, pueden generar nuevos riesgos ambientales (28).

Tabla II: Algunas aplicaciones comerciales de ejemplos de nanopartículas sintéticas basadas en metales y óxidos metálicos (29).

Óxidos metálicos	TiO ₂	Cosmética: productos de cuidado de la piel, protectores solares En celdas solares, pinturas y recubrimientos En sistemas de tratamientos de efluentes:
	Al ₂ O ₃	Pulido de material óptico, cosméticos, textiles

	ZnO	En productos para el cuidado de la piel: protectores solares, productos demaquillantes, desodorantes. Recubrimientos de botellas, pulido de superficies.
	CeO ₂	Como catalizador en combustibles diesel para mejorar la calidad de las emisiones; en sensores de gases, celdas solares, en aplicaciones metalúrgicas y fabricación de vidrios y cerámicas.
Quantum dots	metales o semiconductores (CdSe, InP, ZnSe, por ejemplo)	En medicina: imágenes y terapias dirigidas; en celdas solares y fotovoltaicas, tintas de seguridad, telecomunicaciones.
Metales	Fe ⁰	Tratamiento de aguas, sedimentos y suelos para eliminar nitratos y contaminantes orgánicos, plaguicidas bifenilos policlorados (PCBs).
	Ag ⁰	Como bactericida en textiles, apósitos para heridas, juguetes, filtros de aire, pastas dentales, productos para bebés, máquinas lavadoras y aspiradoras.
	Au ⁰ coloidal	En terapias para ciertos tumores, marcadores inmunocitoquímicos, Como catalizador En tintas y películas flexibles y conductoras

Las nanopartículas son sintetizadas para alguna aplicación particular; la búsqueda de ciertas propiedades fisicoquímicas (tales como la solubilidad, transparencia, color, conductividad eléctrica, capacidad catalítica, reactividad, capacidad de permanecer dispersas o de formar aglomerados, por ejemplo) dependerán de su composición, tamaño y de su estructura superficial. Esta flexibilidad que torna tan interesantes a las nanopartículas desde el punto de vista de su aplicación, también es el origen de la preocupación por sus posibles efectos sobre el ambiente y la salud. En vista del incremento de la producción, uso y descarte de materiales nanoparticulados, aumentará la exposición a los mismos. La evaluación de los riesgos que ello implica a la salud humana y al ambiente requiere conocer y comprender su comportamiento para estimar sus potenciales efectos ecotoxicológicos. Es fundamental poder estimar la liberación y destino de las nanopartículas en el ambiente, su toxicidad, así como generar materiales de referencia y definir protocolos de análisis y ensayos de toxicidad que tengan en cuenta las

particularidades de estos materiales. Aunque en la literatura científica comienzan a aparecer estudios de este tipo, la información aún es muy fragmentaria e insuficiente. La Comunidad Europea ha recomendado que toda evaluación se realice caso a caso (30), ya que aún no existen pruebas representativas ni posibles generalizaciones, ni siquiera dentro del estudio de un tipo de nanomaterial en particular. Tampoco está claro si los ensayos ecotoxicológicos habitualmente empleados para sustancias en disolución son aplicables a los materiales nanoparticulados, ni existen protocolos estandarizados para definir, por ejemplo, la dispersión de estas partículas; no está definido si se requieren ensayos específicos según las nanopartículas estén aglomeradas o dispersas, ya que pueden existir diferencias (eco) toxicológicas según la relación superficie /masa, características de las superficies y cantidad de impurezas, todas características dependientes del proceso de producción específico (31). Por otra parte, en el medio acuático, las nanopartículas interactúan con la materia orgánica disuelta, modulando su reactividad. Es esencial que se avance en el estudio de estas interacciones con la MOD y de su influencia en el transporte, transformaciones, biodisponibilidad y toxicidad de los nanomateriales para comprender su comportamiento en el ambiente.

Conclusiones

Los avances tecnológicos y el aumento de la población influyen en nuestra relación con el entorno. Los metales son una evidencia sumamente interesante de cómo estamos transformando el medio en el cual vivimos: por una parte, las reservas de los metales de uso extendido se están agotando en la litósfera, y no está lejos el momento en que la única alternativa de disponer de materia prima será el reciclado de los metales en uso. También es evidente que los nuevos desarrollos tecnológicos introducen nuevos interrogantes, tanto científicos, sociales como políticos. Las especies a estudiar en monitoreos de aire, agua y/o suelo van variando a medida que se introducen nuevas tecnologías que emplean una mayor variedad de elementos en sus productos; las reservas de metales tales como el litio y las tierras raras cobran valor estratégico; es necesario desarrollar más y mejores sistemas de tratamiento de efluentes y residuos y sistemas de producción más limpios. Los seres humanos y la biota en general estamos expuestos cada vez más a sustancias cuyas características toxicológicas son poco conocidas, tales como las tierras raras, o los materiales nanoparticulados. Las actividades humanas alteran el entorno, y los estudios sobre la movilidad, transporte, reactividad y destino final de los metales, que fueron extraídos de su ambiente mineral para entrar en la antroposfera, son fundamentales para entender los riesgos a los que estamos expuestos. Hace poco ha sido sugerida la noción de Antropoceno (32), como una nueva era geológica, que describe la época actual de cambios globales complejos en los cuales los seres humanos

somos protagonistas activos, modificando la Tierra en una escala comparable con algunos eventos del pasado del planeta. Si bien estos autores se refieren fundamentalmente al aumento de la población mundial, el uso de combustibles fósiles que permitió la mecanización iniciada por la Revolución Industrial, la alteración del paisaje por las megaciudades, la extinción de especies y el calentamiento global para definir el Antropoceno, los cambios irreversibles introducidos por el uso exhaustivo de metales no son ajenos a esta idea.

Referencias

- (1) Datos extraídos de: <http://minerals.usgs.gov/minerals/index.html>, accesado el 29/6/11.
- (2) Lee, C.S.L., Qi, S., Zhang, G., Luo, C., Z. L.Y.L. y Li, X., **2008**. Seven thousand years of records on the mining and utilization of metals from lake sediments in Central China. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 4732-4738 .
- (3) Nriagu, J.O., **1996**. A history of global metal pollution. *Science*, 272, 223-224.
- (4) Hong, S.; Candelone, J.-P.; Patterson, C. C.; Boutron, C. F., **1996**. History of ancient copper smelting pollution during roman and medieval times recorded in Greenland ice. *Science*, 272 (5259), 246- 249.
- (5) Cooke, C., M.B. Abbott, A.P. Wolfe y J.L. Kittlesona, **2007**. A Millennium of Metallurgy Recorded by Lake Sediments from Morococha, Peruvian Andes. *Environ. Sci. Technol.*, 41, 3469-3474.
- (6) Lupo, L.C., Bianchi, M.M., Aráoz, E., Grau, R., Lucas, C., Kern, R., Camacho, M., Tanner, W., Grosjean, M., **2006**. Climate and human impact during the past 2000 years as recorded in the Lagunas de Yala, Jujuy, northwestern Argentina. *Quaternary International*, 158, , 30-40.
- (7) <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/country/2009/myb3-2009-ar.pdf>, **2009**. USGS Minerals Yearbook **2009**, Argentina (advance release); accesado el 29/6/2011.
- (8) Gordon, R.B., M. Bertram, T.E. Graedel, **2006**. Metal stocks and sustainability. *PNAS*, January 31, 103 (5), 1209–1214.
- (9) Harper, E.M., M. Bertram, T.E. Graedel, **2006**. The contemporary Latin America and the Caribbean zinc cycle: One year stocks and flows. *Resources, Conservation and Recycling*, 47, 82–100.

(10) United Nations; World Development Indicators. United Nations Population Division, Washington, D.C., **2001**.

(11) Wong, C.S.C., Li, X., Thornton, I., **2006**. Urban environmental geochemistry of trace metals. *Environmental Pollution*, 142, 1-16.

(12) Bocca, B., S. Caimi, P. Smichowski, D. Gómez y S. Caroli, **2006**. Monitoring Pt and Rh in urban aerosols from Buenos Aires, Argentina. *Science of the Total Environment*, 358, 255– 264

(13) Johnson, J., E. M. Harper, R. Lifset y T. E. Graedel, **2007**. Dining at the Periodic Table: Metals Concentrations as They Relate to Recycling. *Environ. Sci. Technol.*, 41, 1759-1765

(14) Xiaoyue Du y T. E. Graedel, **2011**. Global In-Use Stocks of the Rare Earth Elements: A First Estimate. *Environ. Sci. Technol.*, 45, 4096–4101 4096–4101 .

(15) Postel, Sandra, **1992**. Water Scarcity. *Environ. Sci. Technol.*, 26(12), 2332-2333.

(16) Di Toro, D.M., H.E. Allen, H.L. Bergman, J.S. Meyer, P.R. Paquin, R.C. Santore; **2001**. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. I. Technical Basis. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(10), 2383-2396.

(17) Aiken, G.R., H. Hsu-Kim, J.N. Ryan, **2011**. [Influence of Dissolved Organic Matter on the Environmental Fate of Metals, Nanoparticles, and Colloids](#). *Environ. Sci. Technol.*, 45, 3196–3201 3196–3201 .

(18) Baken, S., F. Degryse, L. Verheyen, R. Merckx y E. Smolders, **2011**. Metal complexation properties of freshwater dissolved organic matter are explained by its aromaticity and by anthropogenic ligands. *Environ. Sci. Technol*, 45, 2584-2590 2584-2590 .

(19) Buffle, J., Z. Zhang y K. Startchev, **2007**. Metal flux and dynamic speciation at (bio)interfaces. Part I: Critical evaluation and compilation of physicochemical parameters for complexes with simple ligands and fulvic/humic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 41, 7609-7620 7609-7620 .

(20) Méndez, N., S.A.M. Ramírez, H.M. Ceretti, A. Zalts, R. Candal, D.L. Vullo, **2011**. *Pseudomonas veronii* 2E surface interactions with Zn(II) and Cd(II); *Global J. Environ. Sci. Technol.*, 1: 3, 1-9.

- (21) Falco, L., C. Pogliani, G. Curutchet, E. Donati, **2003**. [A comparison of bioleaching of covellite using pure cultures of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* or a mixed culture of *Leptospirillum ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans*](#). *Hydrometallurgy*, 71 (1-2), 31-36.
- (22) Garavaglia, L., S.B. Cerdeira, D.L. Vullo, [Chromium \(VI\) biotransformation by \$\beta\$ - and \$\gamma\$ -Proteobacteria from natural polluted environments: A combined biological and chemical treatment for industrial wastes](#), *Journal of Hazardous Materials*, 175 (1-3), **2010**, 104-110;
- (23) Gargarello, R.M., D. Di Gregorio, H. Huck, J.Fernandez Niello, G. Curutchet; [Reduction of uranium \(VI\) by *Acidithiobacillus thiooxidans* and *Acidithiobacillus ferrooxidans*](#), *Hydrometallurgy*, 104 (3-4), **2010**, 529-532;
- (24) Hoffmann, S. R., M.M. Schafer, D.E. Armstrong; Strong colloidal and dissolved organic ligands binding copper and zinc in rivers; *Environ. Sci. Technol.*, 41, **2007**, 6996-7002 6996-7002 ;
- (25) Yang, B., C.M.G. van den Berg, Metal complexation by humic substances in seawater; *Environ. Sci. Technol.*, 43, **2009**, 7192-7197 7192-7197 .
- (26) Ceretti, H.M., D.L. Vullo, A. Zalts y S. Ramírez, Effect of bacterial growth on the complexing capacity of a culture medium supplemented with cadmium(II), *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2010**, 26:847–853;
- (27) Daniel, M. A., L. Garavaglia, M. Barrionuevo, G. Sosa, N. Méndez, S. Cerdeira, H. Ceretti, S. Ramírez, R. Candal, A. Zalts, D.L. Vullo; Tratamiento biológico de efluentes industriales con contenido de metales: factores a tener en cuenta para un diseño eficiente, *Química Viva (QV)* **2009**; 2: 1-20 (20 páginas). Recuperable de <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar>
- (28) Bhatt, I. y B. N. Tripathi, Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment, *Chemosphere*, 82, **2011**, 308–317.
- (29) <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>, accesado 1/7/2011.
- (30) SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. Risk assessment of products of nanotechnologies. Scientific committee on emerging and newly identified health risks; 2009. Opinion adopted 19 January 2009. http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/

[scenih_r_o_023.pdf](#), (Accesado 10/07/2011).

(31) Aschberger, K., Ch. Micheletti, B. Sokull-Klüttgen, F.M. Christensen; Analysis of currently available data for characterizing the risk of engineered nanomaterials to the environment and human health — Lessons learned from four case studies, *Environment International*, 37, **2011**, 1143–1156.

(32) Zalasiewicz, J., M. Williams, W. Sreffen y P. Crutzen; The New World of the Anthropocene, *Environ. Sci. Technol.* **2010**, 44, 2228–2231.

 **Química Viva**

ISSN 1666-7948 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **Química Viva**

Número 2, año 10, Agosto 2011

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Recetas para obtener una señalización específica y una transducción eficiente: Compartimentalización de la señalización

Dr. Martin M. Edreira

INGEBI-UBA-CONICET

Laboratorio de Biología y Genética Molecular de Trypanosomas
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

Adjunct Research Instructor

Department of Pharmacology and Chemical Biology

School of Medicine - University of Pittsburgh

medreira@yahoo.com

Recibido el 12/07/2011

Aceptado el 15/07/2011

Resumen

En oposición al viejo dogma de la libre difusión del AMPc dentro de la célula, hoy en día resultados experimentales avalan la existencia de microdominios de AMPc, mantenidos por barreras físicas y difusión restringida del nucleótido. La compartimentalización de la señal es debida fundamentalmente a la familia de proteínas de anclaje AKAP. Originalmente descritas como proteínas de anclaje de PKA, las AKAPs tienen la capacidad de orquestar el ensamblado de complejos multiproteicos con otras proteínas involucradas en la vía de señalización del AMPc, como ser ACs, PDEs y Epac. La presencia de las PDE en estos microdominios de señalización es de fundamental importancia debido a que restringen la libre difusión del mensajero y limitan su disponibilidad. De esta manera, la compartimentalización regula la localización, duración y amplitud de la señal, requisitos esenciales para una eficiente transducción del estímulo.

Abstract

In opposition to the old dogma of the free diffusion of cAMP within the cell, today, experimental results support the existence of microdomains of cAMP, maintained by physical barriers and restricted diffusion of the nucleotide. Compartmentalization of the signal is mainly due to the family of anchor proteins AKAP. Originally described as proteins anchoring PKA, the AKAPs have the ability to orchestrate the assembly of multiprotein complexes with other proteins involved in the cAMP signaling pathway, such as ACs, PDEs and Epac. The presence of PDEs in these signaling microdomains is of fundamental importance because they restrict the free diffusion of the messenger and limit its availability. Thus, compartmentalization regulates the

location, duration and amplitude of the signal, essential requirements for an efficient transduction of the stimulus.

El AMPc como segundo mensajero

A 50 años de su descubrimiento por Rall y Sutherland [1, 2], el detalle de los mecanismos que gobiernan la transducción de señales mediada por el AMPc (adenosina monofosfato-3',5' cíclico) se encuentra todavía en expansión. El AMPc ha sido implicado como mensajero secundario en una gran variedad de procesos biológicos entre ellos metabolismo, expresión génica, proliferación, diferenciación y apoptosis [3-5]. La unión a receptores de membrana asociados a proteínas G (GPCR) de ligandos tan diversos como hormonas, neurotransmisores y agentes odorantes [6, 7], promueve la activación de proteínas G que estimulan la producción de AMPc por parte de varias isoformas de adenilil ciclasas (AC) [8] (Figuras 1A y B). El aumento de estos niveles intracelulares de AMPc es negativamente regulado a través de su hidrólisis a 5'-AMP por fosfodiesterasas (PDE) [9], una familia de enzimas multigénicas que juegan un importante rol en la transducción de la señal, al limitar la disponibilidad del nucleótido cíclico (Figuras 1A y B).

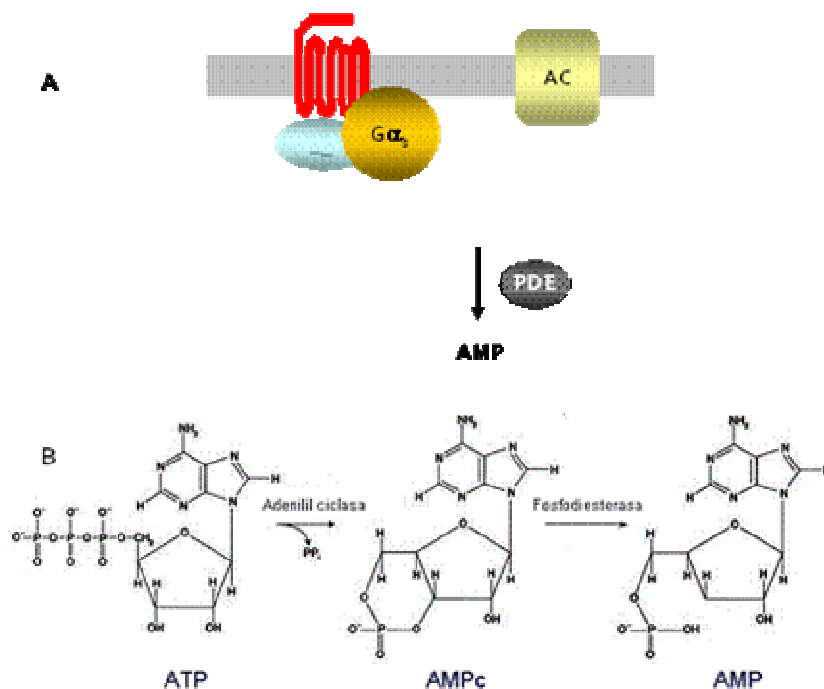


Figura 1. Síntesis y Degradación de AMPc

Efectores del AMPc

La quinasa dependiente de AMPc (PKA) fue identificada a fines de la década del 60 [10] y representó durante mucho tiempo el único blanco conocido para AMPc en células de mamífero [11]. En su estado inactivo, PKA es una holoenzima tetramérica compuesta por dos subunidades regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C), de las cuales se han logrado identificar $C\beta, \alpha, RII\beta$ y varias subunidades C ($C\alpha, RII\beta, RII\alpha$ varias subunidades R (RI). La unión de dos moléculas de AMPc a las subunidades regulatorias y C resulta en la liberación de las subunidades catalíticas, las cuales poseen varios blancos celulares [4] (figura 2). En los últimos 15 años se han identificado nuevos efectores del AMPc, como los canales catiónicos dependientes de AMPc (CNG) [12] y la proteína intercambiadora dependiente de AMPc (Epac) [13] (figura 2).

Identificados originalmente en fotoreceptores de retina y neuronas olfatorias, los canales catiónicos dependientes de nucleótido, son canales no selectivos compuestos por heterotetrámeros de dos o tres tipos de subunidades distintas (4 subunidades de tipo A y 3 de tipo B) que poseen sitios de unión a nucleótido [12].

Existen 2 isoformas de Epac, Epac1 y Epac2 [14], ambas poseen dominios de reconocimiento capaces de unir una molécula de AMPc, induciendo cambios conformacionales que llevan a la exposición del sitio catalítico, con el consecuente reconocimiento y activación de GTPasas de la familia de Ras, Rap1 y Rap2 [14, 15] (fig. 2).

Dependiendo del tipo celular, expresión de isoformas y localización, dos de los efectores del AMPc, PKA y Epac, pueden actuar de manera independiente, tener funciones opuestas o converger sinérgicamente en la regulación de una función celular específica [16].

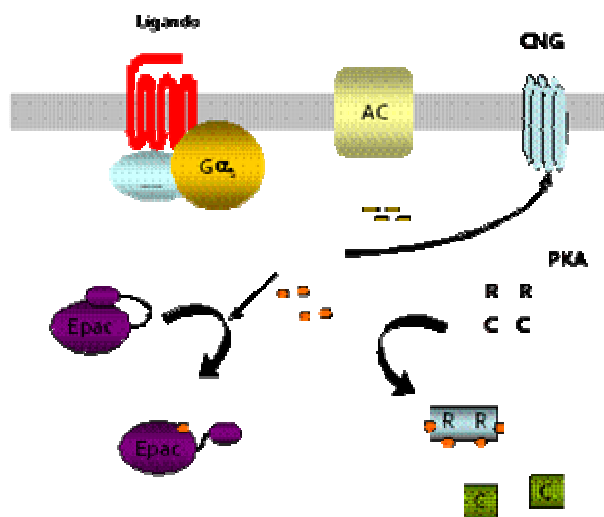


Figura 2. Efectores del AMPc.

Compartimentalización de la señal mediada por AMPc

Una gran diversidad de ligandos posee la capacidad de inducir la producción de un solo tipo de mensajero secundario, el cual a través de la activación de un limitado número de efectores logra una precisa regulación de funciones celulares específicas [3-5, 11]. Surge entonces la pregunta: ¿Cuál es el mecanismo a través del cual un único mensajero logra una señal intracelular específica que produce solo la respuesta celular apropiada? En oposición al concepto original de la libre difusión del AMPc dentro de la célula [17], que llevaría a la activación no selectiva de efectores, existen pruebas experimentales que indicarían que la difusión del AMPc se encuentra restringida [18, 19]. La compartimentalización espacial de proteínas que producen, son blanco y degradan AMPc, explicaría la gran especificidad y eficiencia de transducción. En esta compartimentalización son de fundamental importancia interacciones proteicas entre efectores y moléculas de anclaje, que serán la base de la formación de microdominios subcelulares que regularán la localización, duración y amplitud de la señal. Las principales proteínas de anclaje que organizan la compartimentalización de complejos multiprotéicos y coordinan una respuesta localizada y específica, son las proteínas de anclaje de quinasa A (AKAP) [20].

Localización de Isoformas de PKA

Identificadas originalmente por co-purificación con la subunidad regulatoria de PKA [21], las AKAPs tienen la capacidad de localizar PKA en distintos compartimientos subcelulares (tabla 1) [20]. Ha sido demostrado que distintas isoformas de PKA (PKA-RI y PKA-RII) presentan funciones biológicas no redundantes, al poseer propiedades bioquímicas y localización subcelular diferencial [21]. En ensayos con cardiomiocitos, empleando la Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia (FRET), fue comprobado que la localización subcelular de las isoformas de PKA se debe su interacción con diferentes isoformas de AKAPs, y que distintos "pools" de AMPc permiten modular la fosforilación de un subconjunto específico de blancos de PKA [22].

Formación de Microdominios

En la actualidad, la familia de proteínas AKAP cuenta con 43 miembros, los cuales se encuentran invariablemente asociados a membranas o fracciones celulares particuladas (tabla 1). Su caracterización ha permitido establecer que no solo la sublocalización de las isoformas de PKA esta determinada por AKAPs, sino que éstas, además, tienen la capacidad de conformar una plataforma de ensamblaje para otros componentes protéicos involucrados en la señalización mediada por AMPc.

La primera línea de acción en la respuesta mediada por AMPc son los receptores de membrana acoplados a proteína G. En células HEK, se ha demostrado que AKAP5 y AKAP12 interaccionan con el receptor β 2-adrenérgico [23], mientras que receptores β 1-adrenérgicos, por su parte, interaccionan con AKAP79 y PKA forman un complejo ternario involucrado en el reciclado y resensibilización del receptor [24].

Asimismo, isoformas de la AC han sido identificadas formando parte de complejos con AKAPs, entre ellos AKAP79, mAkap y Yotiao [25]. En cerebro y corazón de rata, Yotiao interacciona específicamente con las isoformas 1, 2, 3 y 9 de la AC, observándose una regulación negativa de la isoforma 2 [26]. Por su parte, mAkap recluta a la AC5 [27] que a su vez interacciona a través de su N terminal con proteínas G heteroméricas [28]. Como se mencionara anteriormente, la degradación del AMPc se realiza exclusivamente a través de las PDEs. La localización subcelular de estas enzimas, en proximidad a las ACs encargadas de la síntesis del AMPc, es de vital importancia en la compartimentalización de la señal, ya que las PDE serán las encargadas de restringir la libre difusión del nucleótido. En concordancia con lo observado para las isoformas de PKA, se demostró que isoformas de PDE se localizan en distintos compartimientos y que esta localización diferencial es determinante para la compartimentalización de la señalización mediada por AMPc [29]. En ensayos de FRET se observó que la estimulación de receptores β -adrenérgicos generan múltiples microdominios con elevadas concentraciones de AMPc que activan específicamente un subconjunto de moléculas de PKA ancladas a través AKAPs a túbulos T, y que la difusión del nucleótido fue efectivamente regulada por PDEs [30]. Sumado a esto, ha sido demostrada la participación de PDEs en complejos formados por PKA-AKAP. En cardiomiocitos, PDE4D3 interacciona con mAkap-PKAII [31]. Por su parte, AKAP450 colocaliza a PKA y PDE4D3 en el centrosoma de células de Sertoli [32]. Y en linfocitos T, donde AMPc esta involucrado en activación, PDE4A interacciona con AKAP149, AKAP95 y MTG; y PDE7A con MTG [33].

Microdominios con un mayor nivel de complejidad se observaron con el ensamblado de complejos multiproteicos como el formado en células HEK por AC8, PDE4, PKA y AKAP [34, 35]. Otro macrocomplejo ensamblado por AKAPs incluyó a mAkap, PKA, PDE4D3 y a un segundo efector del AMPc, Epac1. En este caso, se observó que la activación de ERK5, que forma parte del complejo por interacción con PDE4D3, puede fosforilar e inhibir a la PDE, llevando a un aumento en la concentración de AMPc (figura 3A). Al mismo tiempo, PDE4D3 recluta a Epac, que a través de Rap1, modula negativamente la activación de ERK5 (figura 3B). Además, se comprobó que la fosforilación dependiente de PKA lleva a la disminución de los niveles locales de AMPc, a través de la activación de PDE4D3 (figura 3C)[36].

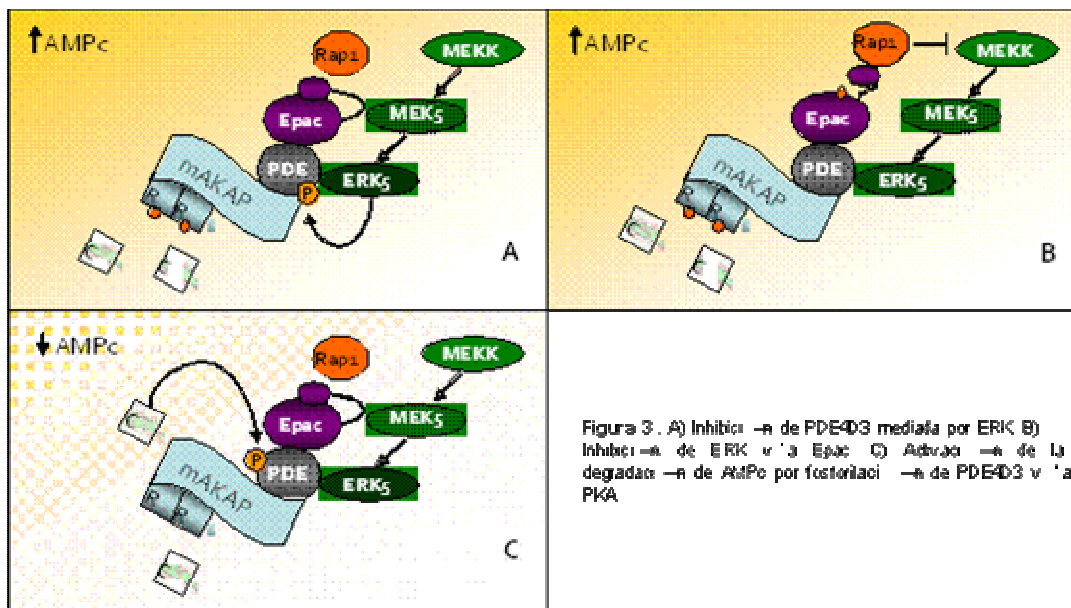


Figura 3. A) Inhibición de PDE4B3 mediada por ERK B) Inhibición de ERK y de Epac C) Activación de la degradación de AMPc por fosforilación de PDE4B3 y de PKA

Recientemente, los grupos de Altschuler [37] y Bos [38], demostraron que Epac1 interacciona a través de su N terminal con miembros de la familia de proteínas ezrin-radixin-moesin (ERM). Al igual que ocurriera con el complejo formado por mAKAP, radixin tiene la capacidad de colocalizar PKA y Epac en un mismo microdominio, y coordinar la activación de ambos efectores del AMPc. Se observó que la deslocalización de Epac de este microdominio resultó en la inhibición de la proliferación mediada por TSH en células de tiroides de rata [37] y la adhesión en células Jurkat [38]. Sumado a esto, fue demostrada la localización de AC activas en los clusters formados por PKA y Epac [37].

La proliferación mediada por TSH de células de tiroides es un modelo clásico de modulación por AMPc. En el mismo, PKA y Epac actúan sinérgicamente para mediar los efectos mitogénicos del AMPc. Ambas vías convergen en la GTPasa Rap1b, a través de la fosforilación mediada por PKA en la serina 179 de Rap1b y el intercambio GDP/GTP inducido por Epac. Activación y fosforilación resultaron ser requisitos excluyentes para obtener una respuesta mitogénica completa [39]. De esta forma, el efecto mitogénico mediado por el AMPc resulta ser un claro ejemplo donde el ensamblado de microdominios conteniendo todos los componentes de esta respuesta, podría explicar la eficiencia y especificidad en la transducción de la señal (figura 4).

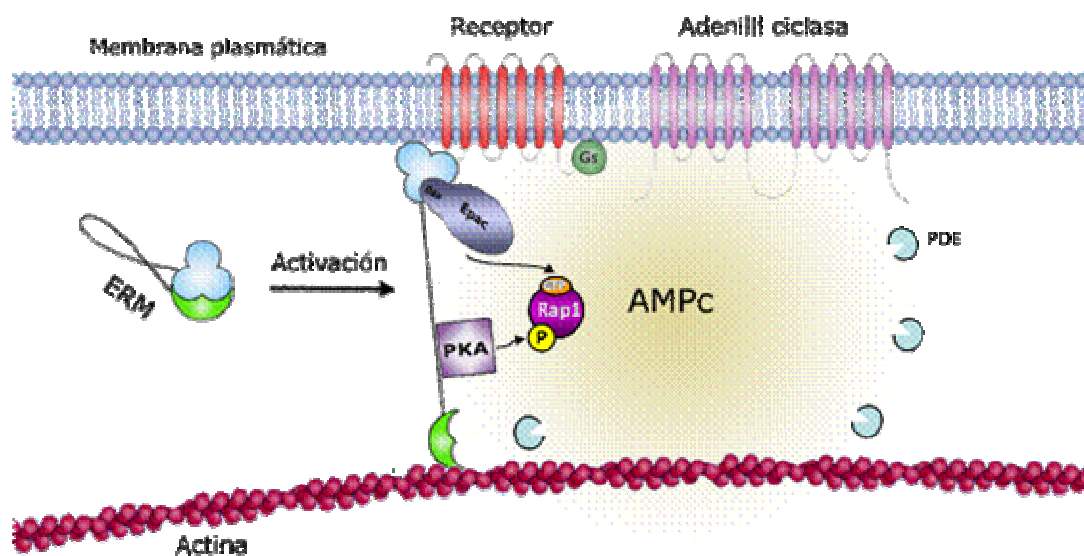


Figura 4. Microdominio involucrado en la proliferación de células de tiroides de rata. Radixin, proteína puente entre la membrana plasmática y el citoesqueleto, recluta a los dos efectores del AMPc, PKA y Epac, los cuales colocan con AC activas. El aumento de los niveles de AMPc por estimulación local por TSH lleva a la activación (vía Epac) y fosforilación (vía PKA) de Rap1b, eventos estrictamente requeridos para transducir una completa señal proliferativa. Adaptado de Hochbaum, D., et al., Radixin assembles cAMP effectors Epac and PKA into a functional cAMP compartment: role in cAMP-dependent cell proliferation. *J Biol Chem*, 2011. 286(1): p. 859-66.

Conclusión

El desarrollo de nuevas tecnologías que permiten el estudio de interacciones entre proteínas y su localización subcelular, ha permitido obtener pruebas experimentales como para establecer el concepto de la compartimentalización de la señal como mecanismo de transducción sobre el viejo dogma de la libre difusión del AMPc. Hoy en día, está claro que una señal intracelular específica y eficiente, que produzca una apropiada respuesta celular estará mediada por microdominios del AMPc que contengan la mayor cantidad de los componentes de la vía.

Tabla 1. Nomenclatura y localización subcelular de variantes de splicing, isoformas y ortólogos de AKAPs, y moléculas asociadas.

AKAP	Moléculas Asociadas		Localización
AKAP-Lbc Brx proto-Lbc Onco-Lbc AKAP13	PKD PKC η Rho	14-3-3 LC3 α -Catulin	Citoesqueleto Actina Citoplasma
AKAP18 ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) AKAP15 AKAP7	CaV1.1/1.2 PLB PDE4D	AQP2 NaV1.2a 5'-AMP	Membrana Plasmática Citosólico y Nuclear
AKAP79 AKAP150 AKAP75 AKAP5	PKC GluR1 mGluR1/5 AC5/6 KCNQ2 Kir2.1 TRPV1 IQGAP1	β 1-AR SAP97 PSD-95 PP2B CaV1.2 ASIC1a/2a NMDAR	Membrana Plasmática Densidades Postsinápticas
mAKAP AKAP100 AKAP6	PDE4D3 Nesprin-1 α Epac PDK1 Siah2	VHL RyR NCX MEK/ERK5 AC5 HIF-1 α	Envoltura Nuclear Reticulo Sarcoplasmático
Gravin (α, β, γ) AKAP250 AKAP12	PKC β 2-AR CyclinD		Membrana miristoilada Citoesqueleto
D-AKAP1 AKAP84 S-AKAP84 AKAP121 AKAP140 AKAP149 AKAP1	PP1 PTPD1 Lamin B PDE7A	AMY-1 HIV-1 RT mRNA RSK1 PP2Ac	Mitocondria Reticulo Endoplasmático
CG-NAP Yotiao Hyperion AKAP350 AKAP450 AKAP120 AKAP9	PP1 NMDAR KCNQ1 IP3R PKC ϵ	CK1 PDE4D3 PKN GCP2/3 CLIC PP2A	Centrosoma Golgi Membrana Plasmática
Rab32	Varp CD44 ICAM-1/2 RhoGDI	S100P Wwox	Miofilamentos
Myospryn	Desmin Dysbindin Dystrophin		Preilación N-terminal

Pericentrin	PKC	Tubulin	Centrosoma
MAP2 A,B,C,D	Tubulin F-actin Src	Grb2 Myosin VIIa Fyn CaV1.2	Microtubulos
AKAP220 AKAP11	PP1 GSK3 β	GABACR AQP2	Vesiculas
Ezrin AKAP78 EZR	CFTR EBP50 NHERF	FAK Merlin	Citoesqueleto Actina
AKAP95 AKAP8	Condensin PDE7A AMY-1p68 RNA	helicase MCM2	Matris Nuclear

Adaptado de Welch, E.J., B.W. Jones, and J.D. Scott, Networking with AKAPs. *Molecular Interventions*. 10(2): p. 86-97.

Referencias

1. Rall, T.W. and E.W. Sutherland, FORMATION OF A CYCLIC ADENINE RIBONUCLEOTIDE BY TISSUE PARTICLES. *J. Biol. Chem.*, 1958. 232(2): p. 1065-1076.
2. Sutherland, E.W. and T.W. Rall, FRACTIONATION AND CHARACTERIZATION OF A CYCLIC ADENINE RIBONUCLEOTIDE FORMED BY TISSUE PARTICLES. *J. Biol. Chem.*, 1958. 232(2): p. 1077-1092.
3. Sutherland, E.W., Studies on the mechanism of hormone action. *Science*, 1972. 177(47): p. 401-8.
4. Tasken, K. and E.M. Aandahl, Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. *Physiol. Rev.*, 2004. 84(1): p. 137-167.
5. Borland, G., B.O. Smith, and S.J. Yarwood, EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP. *British Journal of Pharmacology*, 2009. 158(1): p. 70-86.
6. Robinson, G.A., R.W. Butcher, and E.W. Sutherland, Cyclic AMP. *Annual Review of Biochemistry*, 1968. 37(1): p. 149-174.
7. Kato, A. and K. Touhara, Mammalian olfactory receptors: pharmacology, G protein coupling and desensitization. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2009. 66(23): p. 3743-3753.
8. Hanoune, J. and N. Defer, REGULATION AND ROLE OF ADENYLYL CYCLASE ISOFORMS. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2001. 41(1): p. 145-174.
9. Keravis, T.L., C., Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases (PDE) and Peptide Motifs. *Current Pharmaceutical Design*. 16: p. 1114-1125.
10. Walsh, D.A., J.P. Perkins, and E.G. Krebs, An Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependant Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle. *J. Biol. Chem.*, 1968. 243(13): p. 3763-3765.

11. Francis, S.H. and J.D. Corbin, Cyclic Nucleotide-Dependent Protein Kinases: Intracellular Receptors for cAMP and cGMP Action. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 1999. 36(4): p. 275-328.
12. Kaupp, U.B. and R. Seifert, Cyclic Nucleotide-Gated Ion Channels. *Physiol. Rev.*, 2002. 82(3): p. 769-824.
13. de Rooij, J., et al., Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*, 1998. 396(6710): p. 474-7.
14. Bos, J.L., Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends in Biochemical Sciences*, 2006. 31(12): p. 680-686.
15. Brock, M., et al., Conformational analysis of Epac activation using amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J Biol Chem*, 2007. 282(44): p. 32256-63.
16. Cheng, X., et al., Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2008. 40(7): p. 651-662.
17. Levitzki, A., From epinephrine to cyclic AMP. *Science*, 1988. 241(4867): p. 800-806.
18. Zaccolo, M., P. Magalhães, and T. Pozzan, Compartmentalisation of cAMP and Ca²⁺ signals. *Current Opinion in Cell Biology*, 2002. 14(2): p. 160-166.
19. Karpen JW, R.T., Resolution of cAMP Signals in Three-Dimensional Microdomains Using Novel, Real-Time Sensors. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 2004. 47: p. 1-5.
20. Welch, E.J., B.W. Jones, and J.D. Scott, Networking with AKAPs. *Molecular Interventions*. 10(2): p. 86-97.
21. Theurkauf, W.E. and R.B. Vallee, Molecular characterization of the cAMP-dependent protein kinase bound to microtubule-associated protein 2. *Journal of Biological Chemistry*, 1982. 257(6): p. 3284-3290.
22. Di Benedetto, G., et al., Protein Kinase A Type I and Type II Define Distinct Intracellular Signaling Compartments. *Circ Res*, 2008. 103(8): p. 836-844.
23. Tao, J. and C. Malbon, G-protein-coupled receptor-associated A-kinase anchoring proteins AKAP5 and AKAP12: differential signaling to MAPK and GPCR recycling. *Journal of Molecular Signaling*, 2008. 3(1): p. 19.
24. Gardner, L.A., et al., AKAP79-mediated Targeting of the Cyclic AMP-dependent Protein Kinase to the β_1 -Adrenergic Receptor Promotes Recycling and Functional Resensitization of the Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. 281(44): p. 33537-33553.
25. Dessauer, C.W., Adenylyl Cyclase-A-kinase Anchoring Protein Complexes: The Next Dimension in cAMP Signaling. *Molecular Pharmacology*, 2009. 76(5): p. 935-941.
26. Piggott, L.A., et al., The A-kinase anchoring protein Yotiao binds and regulates adenylyl cyclase in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. 105(37): p. 13835-13840.
27. Kapiloff, M.S., et al., An Adenylyl Cyclase-mAKAP β Signaling Complex Regulates cAMP Levels in Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. 284(35): p. 23540-23546.
28. Sadana, R., N. Dascal, and C.W. Dessauer, N Terminus of Type 5 Adenylyl Cyclase Scaffolds Gs Heterotrimer. *Molecular Pharmacology*, 2009. 76(6): p. 1256-1264.

29. Mongillo, M., et al., Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Analysis of cAMP Dynamics in Live Neonatal Rat Cardiac Myocytes Reveals Distinct Functions of Compartmentalized Phosphodiesterases. *Circulation Research*, 2004. 95(1): p. 67-75.
30. Zaccolo, M. and T. Pozzan, Discrete Microdomains with High Concentration of cAMP in Stimulated Rat Neonatal Cardiac Myocytes. *Science*, 2002. 295(5560): p. 1711-1715.
31. Dodge, K.L., et al., mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *EMBO J*, 2001. 20(8): p. 1921-1930.
32. Tasken, K.A., et al., Phosphodiesterase 4D and Protein Kinase A Type II Constitute a Signaling Unit in the Centrosomal Area. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. 276(25): p. 21999-22002.
33. Asirvatham, A.L., et al., A-Kinase Anchoring Proteins Interact with Phosphodiesterases in T Lymphocyte Cell Lines. *The Journal of Immunology*, 2004. 173(8): p. 4806-4814.
34. Willoughby D, C.D., Use of single-cell imaging techniques to assess the regulation of cAMP dynamics. *Biochem Soc Trans.*, 2006. 34: p. 468-71.
35. Martin AC, C.D., Layers of organization of cAMP microdomains in a simple cell. *Biochem Soc Trans.* , 2006. 34: p. 480-483.
36. Dodge-Kafka, K.L., et al., The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature*, 2005. 437(7058): p. 574-578.
37. Hochbaum, D., et al., Radixin assembles cAMP effectors Epac and PKA into a functional cAMP compartment: role in cAMP-dependent cell proliferation. *J Biol Chem*, 2011. 286(1): p. 859-66.
38. Gloerich, M., et al., Spatial regulation of cyclic AMP-Epac1 signaling in cell adhesion by ERM proteins. *Mol Cell Biol*, 2010. 30(22): p. 5421-31.
39. Hochbaum, D., et al., Epac, in synergy with cAMP-dependent protein kinase (PKA), is required for cAMP-mediated mitogenesis. *J Biol Chem*, 2008. 283(8): p. 4464-8.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 10, Agosto 2011

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción Emerging contaminants: effects and removal treatments

García-Gómez C.^{1*}, Gortáres-Moroyoqui P.¹ y Drogui P.²

¹*Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro, Cd. Obregón, Sonora, C.P. 85000, México*

²*Institut national de la recherche scientifique (INRS-Eau Terre et Environnement), Université du Québec, 490 rue de la Couronne, Québec, QC, G1K 9A9, Canada*

**Autor de correspondencia. E-mail: celestino.garcia@itson.edu.mx*

Recibido el 06/07/2011

Aceptado el 12/07/2011

Resumen

La presencia de contaminantes emergentes o recientemente identificados en nuestros recursos hídricos es motivo de preocupación para la salud y seguridad en el ambiente. Las plantas convencionales de tratamiento de aguas residuales o para uso potable no están diseñadas para eliminar estos tipos de contaminantes. Estos contaminantes emergentes comprenden los productos farmacéuticos, del cuidado personal, surfactantes, aditivos industriales, plastificantes, plaguicidas y una gran variedad de compuestos químicos que aunque se encuentran en bajas concentraciones son capaces de alterar las funciones endocrinas, es por esa razón que han llegado a ser en la actualidad un serio problema. El uso de carbón activado, oxidación y reactores membranales se postulan como los tratamientos más eficientes para la remoción de los contaminantes emergentes los cuales siguen sin estar regulados y monitoreados por la mayoría de los países. Este artículo revisa los efectos que generan los contaminantes emergentes y además se discute los tratamientos para removerlos del medio acuático y contribuir a la solución de esta problemática medioambiental.

Palabras clave: *contaminantes emergentes, tratamiento de aguas, procesos convencionales, procesos avanzados, procesos combinados.*

Abstract

The presence of emerging or newly identified contaminants in our water resources is a concern for the health and safety in the environment. Conventional wastewater treatment plants or for potable use are not designed to eliminate these types of contaminants. These emerging contaminants include pharmaceuticals, personal care, surfactants, industrial additives, plasticizers, pesticides and a variety of chemical compounds that are even in low concentrations can alter endocrine functions, it is for this reason they have come to currently be a serious problem. The use of activated carbon, oxidation and membrane reactors are postulated as the most effective treatments for the removal of emerging contaminants which are still not regulated and monitored by most countries. This article reviews the effects generated by emerging

contaminants and also discusses the treatments to remove these contaminants from the aquatic environment and thus contribute to the solution of this environmental problem.

Keywords: *emerging contaminants, water treatment, conventional processes, advanced processes, combined processes.*

Introducción

Con el desarrollo de la tecnología se han producido muchos compuestos químicos sintéticos, lo que ha generado un incremento en el número de contaminantes que son considerados un potencial amenazador para el ambiente y todo organismo vivo. Hoy en día se habla de contaminantes emergentes y se refiere a productos farmacéuticos, del cuidado personal, surfactantes, aditivos industriales, plastificantes, plaguicidas y una gran variedad de compuestos químicos que alteran las funciones endocrinas. Estos compuestos se encuentran en bajas concentraciones (generalmente en partes por millón o partes por trillón) y la mayoría siguen sin estar regulados o reglamentados por la mayoría de los países (Kuster *et al.*, 2008).

Una de las principales fuentes de contaminantes emergentes son las aguas residuales que no reciben ningún tratamiento y los efluentes de plantas tratadoras de aguas, las cuales no están diseñadas para tratar este tipo de sustancias, por lo que una alta proporción de estos compuestos y sus metabolitos no sufren ningún cambio y entran con una gran toxicidad al medio acuático, como acuíferos y sistemas marinos entre otros (Dougherty *et al.*, 2010).

Los contaminantes emergentes son de gran interés científico, ya que sus emisiones en el medio ambiente puede aumentar la presencia de bacterias resistentes (Daughton *et al.*, 1999), además debido a sus propiedades físico-químicas (alta solubilidad en agua y poco biodegradable) son capaces de llegar a cualquier medio natural y representar un grave riesgo para el consumo de agua potable (Janssens *et al.*, 1997; Knepper *et al.*, 1999).

En este artículo se revisan los efectos en la salud que pueden generar los contaminantes emergentes y de igual manera se discuten las alternativas propuestas para la eliminación de estos compuestos contenidos en aguas residuales.

Efectos de los contaminantes emergentes

Los compuestos emergentes presentan efectos significativos alterando al sistema endocrino y bloqueando o perturbando las funciones hormonales, afectan a la salud de los seres humanos y de especies animales aun cuando se encuentran en tan bajas concentraciones. Para el caso del compuesto bisfenol A el cual es utilizado en la fabricación de resinas epoxicas y plásticos policarbonatos (para empaques de alimentos y agua) ha manifestado efectos estrogénicos en ratas (Dodds *et al.*, 1998) y hormonales que aumentan el riesgo de cáncer de mama en humanos (Krishnan *et al.*, 1993), además se ha reportado que actúa como un antiandrógeno causando efectos secundarios feminizadores en hombres (Sohoni *et al.*, 1998). Los ftalatos o ésteres de ftalato utilizados como plastificantes en plásticos como PVC, han provocado complicaciones en embarazos (IEH, 2005). De igual manera se ha

reportado que el diclofenaco afecta a los tejidos de las branquias y de riñones en peces de agua dulce, lo que sugiere un posible riesgo para este tipo de poblaciones (Hoeger *et al.*, 2005). Asimismo pesticidas como Dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) ha causado efectos hormonales provocando adelgazamiento en la cascara de huevo de diferentes especies, daños en la función reproductiva en el hombre y cambios de comportamiento en humanos (Colborn *et al.*, 1995). Otro pesticida como el Penconazol es un fungicida que puede afectar la tiroides, próstata y tamaño de testículos (McKinney *et al.*, 1994). También la exposición a compuestos organoclorados como DDT y bifenilos policlorados (PCBs) ha impactado en la reproducción y la función inmune de focas causando disminución de la población (Damstra *et al.*, 2002). Por su lado, antibióticos como penicilina, sulfonamidas y tetraciclinas causan resistencia en patógenos bacterianos (Witte *et al.*, 1998). Aunque estos contaminantes los encontramos en muy bajas concentraciones sus efectos son significativos, por lo que es necesario implementar adecuados diseños de tratamientos de aguas para su eficiente remoción.

Remoción de contaminantes emergentes

A lo largo de la historia las plantas de tratamiento de aguas residuales han sido diseñadas para la eliminación de materia orgánica y ciertos tipos de contaminantes, especialmente los que se especifican en las normas oficiales. Sin embargo, el estudio de nuevos contaminantes como los emergentes, los cuales poseen una amplia gama de propiedades químicas, requieren de tratamientos avanzados para una segura incorporación de las aguas residuales al medio ambiente.

Tratamientos fisicoquímicos

Diferentes tratamientos fisicoquímicos como coagulación, flotación y cloración se han utilizado para eliminar contaminantes emergentes en aguas residuales. En un estudio realizado a nivel laboratorio utilizando diversos tratamientos (coagulación/flotación, suavización con cal, ozonación, cloración y adsorción con carbón activado granular (CAG)) se analizó la eliminación de 30 diferentes compuestos farmacéuticos, no se obtuvo una remoción significativa (<20%) con los procesos de coagulación/flotación ni suavización con cal, pero si un buen resultado con carbón activado granular y oxidación por ozono y cloración (>90%) (Westerhoff *et al.*, 2005). Estos resultados concuerdan con Adams *et al.* (2002), donde compuestos farmacéuticos (carbadox, sulfadimetoxina, trimetoprim) no fueron removidos utilizando coagulantes como sulfato de aluminio y sulfato férrico. De igual manera en otros estudios, la coagulación resultó ineficiente para la eliminación de diclofenaco, carba, azepina, ibuprofeno y ketoprofeno (Petrovic *et al.*, 2003; Vieno *et al.*, 2006).

Otras investigaciones concuerdan que procesos de adsorción por carbón activado y tratamientos de oxidación son efectivos para remover contaminantes emergentes (Filale *et al.*, 2004; Westerhoff *et al.*, 2005) y esto se debe a las interacciones hidrofóbicas con los compuestos orgánicos polares (Ying *et al.*, 2004), aunque diversas causas reducen el alcance de la separación por carbón activado, como la competencia por sitios activos en la superficie

y/o el bloqueo de los poros con otras partículas, sin embargo, resulta ser el adsorbente más eficaz, especialmente para aguas residuales que contienen materia orgánica refractaria y compuestos no biodegradables. Schafer et al. (2003) utilizó CAG y obtuvo la remoción de más del 90 % con varios compuestos emergentes. Otro estudio comparó coagulación y adsorción por carbón activado para eliminar estrógenos donde se afirma que este último proceso resultó el más eficiente logrando una remoción mayor al 90%, incluso mejor que un sistema de nanofiltración por membranas (Bodzek *et al.*, 2006)

Por otro lado los procesos de oxidación por ozono y cloración resultan ser una buena alternativa, sin embargo, al reaccionar con diferentes químicos se pueden generar subproductos de efectos desconocidos. Estos procesos se recomiendan para una baja carga de carbono orgánico disuelto (COD) ya que este parámetro representa una fuerte influencia en el proceso (Huber *et al.*, 2006). Los procesos de oxidación por ozono se caracterizan por el ataque directo de ozono sobre los compuestos e/o indirectamente por la generación de radicales hidroxilo (OH•), los cuales se caracterizan por un gran potencial de oxidación lo que representa una buena alternativa para el tratamiento de contaminantes (Trujillo *et al.*, 2010). Aunque los sólidos suspendidos (SS) incrementan la demanda de ozono, la influencia en general es menor, ya que en un tratamiento dado, una dosis de 5 mg/l es suficiente para altas concentraciones de SS (Huber *et al.*, 2005).

Procesos biológicos

Tratamientos convencionales como sistemas de lodos activados o filtros biológicos percoladores pueden rápidamente convertir diversos compuestos orgánicos en biomasa que posteriormente por medio de clarificadores pueden ser separados. Sin embargo no sucede lo mismo con moléculas como los emergentes. En un agua residual de una planta tratadora en Suiza se encontraron compuestos como diclofenaco, naproxeno y Carbamazepina, con una eficiencia de remoción de un 69, 45 y 7% respectivamente (Tixier *et al.*, 2003). También se realizó la degradación de pesticidas (isoproturon, terbutilazina, mecoprop y metamitrona) a nivel laboratorio, donde se alcanzó casi el 100% de remoción, pero con un largo tiempo de adaptación de los lodos activados. En una planta de tratamiento de aguas residuales convencional esto representa una desventaja ya que la utilización de plaguicidas es realizada durante un corto periodo y cuando el lodo activado recibe una carga de estos contaminantes no se encuentra aclimatado para una remoción satisfactoria (Nitscheke *et al.*, 1999). Un largo período de aclimatación (alrededor de 4 meses) se observó a nivel laboratorio en reactores batch para la eliminación del plaguicida 2,4-D, donde se obtuvo prácticamente una completa eliminación (>99%) (Mangat *et al.*, 1999). En otro estudio se estimó que cerca del 60-65% de compuestos nonilfenolicos, que contenía un efluente de una planta tratadora de agua, no sufrieron transformación y fueron descargados al ambiente, donde 19% representaban derivados caboxilatados, 11% de nonilfenol etoxilado lipofílico (NP₁EO) y Nonilfenol dietoxilado (NP₂EO), 25% de nonilfenol (NP) y 8% como nonilfenol etoxilado (NPEO) (Ahel *et al.*, 1994).

Procesos avanzados

Los tratamientos biológicos se han catalogado como la tecnología más viable en el tratamiento de aguas residuales, sin embargo, solo generan una remoción parcial de contaminantes emergentes los cuales en la mayoría son descargados en los efluentes de las plantas tratadoras. Es por esta razón que hoy en día se busca tecnología más eficiente no solo para el tratamiento de aguas residuales, sino también para agua de consumo. En los últimos años se han estudiado sistemas membranales ya sea biológicos (MBRs) o no biológicos (osmosis inversa, ultrafiltración y nanofiltración) y procesos de oxidación avanzada (POA), estos sistemas son considerados como los más apropiados para remover concentraciones traza de contaminantes emergentes.

Los reactores biológicos de membrana (MBR) son considerados como una mejora al tratamiento microbiológico de aguas residuales, sin embargo debido a cuestiones económicas es limitada su aplicación como en plantas tratadoras de aguas industriales o municipales. Estos sistemas presentan considerables ventajas a los tratamientos biológicos convencionales debido a que se genera una baja carga de lodo en términos de DBO, lo que hace que las bacterias se vean obligadas a mineralizar los compuestos orgánicos de poca biodegradabilidad, además el largo tiempo de vida del lodo da a las bacterias tiempo suficiente para adaptarse al tratamiento de sustancias resistentes (Cote *et al.*, 1997). En un estudio se logró remover más del 90% de nonilfenol y bisfenol utilizando tres unidades de MBRs y una unidad externa de ultrafiltración seguida de una absorción por medio de carbón activado granular (CAG), este sistema fue implementado para un agua residual proveniente de una planta de lixiviados de residuos vegetales (Wintgens *et al.*, 2002), en este mismo trabajo también se sugirió como alternativa, un módulo de membrana de nanofiltración seguido del tratamiento de MBRs donde se logró la retención del 70% de estos compuestos emergentes.

Por otro lado se han utilizado procesos de oxidación avanzados (POA) como ozono con peróxido de hidrogeno (O_3/H_2O_2) para tratar ibuprofeno y diclofenaco, aquí se logró la eliminación de las del 90% de estos compuestos (Zwiener *et al.*, 2000). También carbamazepina fue eliminada por completo por un sistema solar combinado de fotocátalisis con TiO_2/H_2O_2 y O_3 (Andreozzi *et al.*, 2002). De igual manera se ha utilizado O_3 con UV para tratar fragancias, metabolitos reguladores líquidos, bloqueadores y estrógenos (Ternes *et al.*, 2003). Usando un reactor a nivel laboratorio se evaluó la eficiencia de un tratamiento con ozono en la degradación de metabolitos NPEO donde el ácido acético nonilfenol (NPE_1C) fue completamente mineralizado, NP en un 80% y en un 50% el NP_1EO en tan solo 6 minutos de tratamiento en todos los casos (Ike *et al.*, 2003).

Tratamientos combinados

Los procesos avanzados se postulan como buena opción para el tratamiento de contaminantes emergentes sin embargo la desventaja se presenta en cuanto a un alto costo comparado con los procesos biológicos, sin embargo, el uso de un proceso avanzado utilizándolo como pre-tratamiento o post-tratamiento puede mejorar la biodegradabilidad de

aguas residuales o lograr una casi completa remoción respectivamente. Se han reportado diversas investigaciones que contemplan la combinación de procesos de oxidación con biológicos, resaltando su gran potencial ante el problema del tratamiento de aguas contaminadas difíciles o imposibles de remover por procesos convencionales fisicoquímicos/biológicos y con el prometedor objetivo de reutilizar esa agua y contribuir con el cuidado medioambiental (Gogate y Pandit, 2004; Mantzavinos y Psillakis, 2004).

Para el tratamiento de penicilina se ha implementado ozonación y perozonación ($O_3+H_2O_2$) a diferentes concentraciones antes de someter un efluente a un tratamiento biológico de lodos activados, el resultado de esta investigación ha sido la remoción del 83% de DQO no biodegradable (Arslan *et al.*, 2004). De igual manera se realizó un tratamiento satisfactorio de sustancias estrógenas en un proceso combinado de ozonación y reactor de lecho móvil después de haberse sometido a un tratamiento convencional de lodos activados (Gunnarsson *et al.*, 2009). Para el tratamiento de un común precursor farmacéutico como es el α -metilfenilglicina se ha utilizado un proceso de foto-fenton adicionado con H_2O_2 como pre-tratamiento a un reactor de biomasa inmovilizada (IBR) lográndose eliminar hasta el 95% del COT del cual el 33% corresponde al sistema de oxidación avanzada y el 62% al tratamiento biológico. En este mismo sistema combinado también se estudió la remoción de ácido nalidíxico (perteneciente al grupo de los Quinolonas) lográndolo remover totalmente en tan solo 190 minutos (Sirtori *et al.*, 2009).

La degradación de 4-clorofenol a una concentración inicial de 400 mg/l se realizó en un sistema de fotocatalisis heterogénea utilizando TiO_2 en suspensión como pre-tratamiento a un sistema biológico anaerobio de lodos activados realizado en matraces Erlenmeyer de 250 ml. Al final del tratamiento combinado se logró una completa mineralización del contaminante (Goel *et al.*, 2010). Una mezcla de cinco pesticidas: metomil, dimetoato, oxamil, cimoxalin y pirimetanil fue mineralizada en un sistema combinado de oxidación avanzada y biológico. Se utilizó un sistema solar de oxidación por fotocatalisis con TiO_2 y foto-fenton en reactores parabólicos compuestos para alcanzar la biodegradabilidad de un agua residual en un reactor de biomasa inmovilizada (IBR), aquí se logró una mineralización de más del 90 % de cada pesticida y una completa nitrificación (Oller *et al.*, 2007). Recientemente se ha integrado a nivel laboratorio un MBR y un fotoreactor con TiO_2 para degradar carbamazepina (CBZ) en donde la mayor parte de la demanda química de oxígeno (DQO) fue eliminada por el MBR y la oxidación fotocatalítica fue capaz de degradar por completo el CBZ (Laera *et al.*, 2011).

Conclusión

Hoy en día los contaminantes emergentes siguen siendo ignorados y además de no ser monitoreados. Sus efectos adversos en la vida acuática y humana han sido reportados en diversas investigaciones, es por eso que el impacto sobre la salud y medio ambiente ha promovido el estudio de estos contaminantes y sus posibles opciones de remoción con nuevos sistemas de tratamiento de aguas residuales. Diversos tratamientos han sido aplicados para la eliminación de estos contaminantes; como adsorción por carbón activado, procesos de

oxidación (ozono y peróxido de hidrógeno), coagulación/flotación, procesos biológicos como lodos activados y filtración por membranas. Los procesos por medio de carbón activado y membranales han demostrado ser los más eficientes para la remoción de contaminantes emergentes. Así también son varias las investigaciones que demuestran el gran potencial de los sistemas avanzados para la remoción de contaminantes emergentes, los cuales son principalmente utilizados como un pre y/o post tratamiento para obtener un agua con mayor biodegradabilidad. Desafortunadamente la mayoría de las plantas tratadoras de aguas no cuentan con estos tipos de sistemas por lo que estos contaminantes emergentes están siendo arrojados al ambiente, es por eso la importancia de implementar diversas tecnologías para lograr un buen tratamiento de estos compuesto y una mejora al medio ambiente.

Referencias

- Adams C, Wang Y, Loftin K y Meyer M, 2002. Removal of antibiotics from surface and distilled water in conventional water treatment process. *J. Env. Eng.* 128: 253-260.
- Andreozzi R, Marotta R, Pinto G y Pollio A, 2002. Carbamazepine in water: persistence in the environment, ozonation treatment and preliminary assessment on algal toxicity. *Water Res.* 36: 2869.
- Ahel M, Giger W y Koch M, 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment-I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Res.* 28: 1131-1142.
- Arslan I, Dogruel S, Baykal E y Gerone G, 2004. Combined chemical and biological oxidation of penicillin formulation effluent. *Journal of Environment Manager* 73 (2):155-163.
- Bodzek M y Dudziak M, 2006. Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes, *Desalination*, 198: 24-32.
- Colborn T, 2002. Pesticides-how research has succeeded and failed to translate science into policy: endocrinological effects of wildlife. *Env. Health Perspective* 103: 81-86.
- Cote P., Buisson H., C. Pound, G. Arakaki, 1997. Immersed membrane activated sludge for the reuse of municipal wastewater *Desalination* 113: 189-196.
- Damstra T, Barlow S, Kavlock R y Van Der Kraak G, 2005. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors, An assessment prepared by an expert group on behalf of the World Health Organization, the International Labour Organisation, and the United Nations Environment Programme, International Programme on Chemical Safety.
- Daughton C. y Ternes A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ. Health Perspect.* 107: 907-937.
- Dodds E y Lawson W, 1938. Molecular structure in relation to estrogenic activity compounds without a phenanthrene nucleus. *Proc., Royal Society London B*, 125: 222-232.
- Dougherty J, Swarzenski P, Dinicola R, Reinhard M, 2010. Occurrence of herbicides and pharmaceutical and personal care products in surface water and groundwater around Liberty Bay, Puget Sound, Washington. *J Environ Qual.* 39: 1173-80.

- Filale Y, Tyagi R, Surampalli R, Barata C y Riva M, 2004. Endocrine-disrupting compounds in wastewater, sludge-treatment processes, and receiving waters: Overview, Practice Periodical of Hazardous, Toxic and Radioactive Waste Management ASCE, 8(1): 39-56.
- Goel M, Chovelon M, Ferronato C, Bayard R y Steekrishnan T, 2010. The remediation of wastewater containing 4-chlorophenol using integrated photocatalytic and biological treatment. *Journal of Photochemical Photobiology B*, 98 (1): 1-6.
- Gogate P. y A. Pandit (2004), A review of imperative technologies for wastewater treatment II: hybrid methods. *Advances Environmental Research* 8 (3-4): 553-97.
- Gunnarsson L, Adolfsson M, Björlenius B, Rutgersson C, Förlin L y Larsson D, 2009. Comparison of six different sewage treatment processes - reduction of estrogenic substances and effects on gene expression in exposed male fish. *Science Total Environmental*. 407 (19): 5235-5242.
- Hoeger B, Kollner B, Dietrich D y Hitzfeld B, 2005. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquat Toxicol* 75:53-64.
- Huber M, Gobel A, Joss A, Hermann N, Löffler D, Mcardell A, Siegrist H, Ternes T y Gunten U, 2005. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: A pilot study. *Environ. Sci. Technol.* 39 4290-4299.
- IEH, 2005. Environmental oestrogens: consequences to human health and wildlife, Inst. Env. Health, Leicester, UK.
- Ike F, Asano M, Belkade F, Tsunoi S, Tanakas M y Fujita M, 2002. Degradation of biotransformation products of nonylphenol ethoxylates by ozonation and UV/TiO₂ treatment. *Water Sci. Technol.* 46: 127-132.
- Janssens I, Tanghe T, Verstraete W, 1997. Development of a risk assessment approach for evaluating wastewater reuse standards for agriculture. *Water Sci. Technol.* 35: 12.
- Knepper T, Sacher F, Lange F, Brauch H, Karrenbrock F, Roeden O, Linder K, 1999. Detection of polar organic substances relevant for drinking water. *Waste Management* 19 (2): 77-99.
- Krishnan A, Starhis P, Permuth S, Tokes L y Feldman D., 1993. Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flask during autoclaving. *Endocrine* 132: 2279-2286.
- Kuster M, Alda M, Hernando M, Petrovic M, Martín A, Barceló D, 2008. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *J Hydrol.* 358:112-23.
- Laera G, Chong M, Jin B y Lopez A, 2011. An integrated MBR-TiO₂ photocatalysis process for the removal of Carbamazepine from simulated pharmaceutical industrial effluent. *Bioresource Technology.* 102: 7012-7015.
- Mangat S y Elefsiniotis P, 1999. Biodegradation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in sequencing batch reactors. *Water Res.* 33: 861-867.

- Mantzavinos D y E Psillakis, 2004. Enhancement of biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pre-treatment. *Chemical Technology Biotechnology* 79: 431-454.
- McKinney J y Waller C, 1994. Polychlorinated biphenyls as hormonally active structural analogues. *Env. Health Perspective* 102: 290-297.
- Nitscheke L, Wilk A, Schussler W, Metzner G y Lind G, 1999. Biodegradation in laboratory activated sludge plants and aquatic toxicity of herbicides. *Chemosphere* 39: 2313-2323.
- Oller I, Malato S, Sánchez J, Maldonado M y Gassó R, 2007. Detoxification of wastewater containing five common pesticides by solar AOPs-biological coupled system. *Catalysis Today* 129: 69-78.
- Petrovic M, Diaz A, Ventura F y Barcelo D, 2003. Occurrence and removal of estrogenic short chain ethoxy nonylphenolic compound and their halogenated derivatives during drinking water production. *Env. Sci. Technol.* 27: 4442-4448.
- Petrovic M, Gonzales S y Barcelo D, 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water, *Trends Anal. Chem.*, 22 (10): 685-696.
- Schafer A, Nghiem L y Waite T, 2003. Removal of the natural hormone estrone from solution using nanofiltration and reverse osmosis. *Environ. Sci. Technol.* 37: 182-188.
- Sirtori C, Zapata A, Oller I, Gernjak W, Agüera A y Malato S, 2009. Decontamination industrial pharmaceutical wastewater by combining solar photo-Fenton and biological treatment. *Water Reserch* 43: 661-668.
- Sohoni P y Sumpter J, 1998. Several environmental estrogen are also endrogens. *J. Endocrinol.* 158: 327-339.
- Ternes T., Stuber J., Herrmann N., McDowell D., Ried A., Kampmann M. y Teiser B., 2003. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater? *Water Res.* 37: 1976-1983.
- Tixier C, Singer H, Ollers S, Muller S, 2003. Occurrence and Fate of Carbamazepine, Clofibric Acid, Diclofenac, Ibuprofen, Ketoprofen, and Naproxen in Surface Waters. *Environ. Sci. Technol.* 37: 1061-1068.
- Trujillo M, García C, Hinojosa J y Castellón Barraza F, 2010. Evaluación de compositos TiO₂/clinoptilolita en la fotodegradación del tinte MV-2B en un reactor-concentrador solar cpc. *Revista mexicana de ingeniería química* 9(2): 139-149.
- Vieno N, Tuhkanen T y Kronberg L, 2006. Removal of pharmacuitcals in drinking water treatment: effect of chemical coagulation. *Env. Technol.*, 27:183-192.
- Ying G, Kookana R y Waite T, 2004. Endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in reclaimed water in Australia, Australian Water Conservation Reuse Research Program.
- Westerhoff P, Yoon Y, Snyder S. y Wert E, 2005. Fate of endocrine-disrupter, pharmaceuticals and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment process, *Env. Sci. Technol.* 39: 6649-6663.
- Wintgens T., Gellenkemper M. y Melin T, 2002. Endocrine disrupter removal from wastewater using membrane bioreactor and nanofiltration technology. *Desalination* 146: 387-391.

Witte W, 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, 279: 966-997.

Zwiener C y Frimmel F, 2000. Oxidative treatment of pharmaceuticals in water. *Water Res.* 34: 1881-1897.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 10, Agosto 2011

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Comparación entre dos biomodelos murinos en el ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea.

Daniel Francisco Arencibia Arrebola^{*e}, Luis Alfredo Rosario Fernández^{**}, Yolanda Emilia Suárez Fernández^{***}, Alexis Vidal Novoa^{****}.

*Instituto Finlay, Vicepresidencia de Investigaciones, Calle 17 e/ 198 y 200, Atabey, Municipio Playa, Apartado Postal 16017, Ciudad de La Habana, Cuba.

**Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, U.H), Calle 222 e/ 25 y 27, Reparto La Coronela, Municipio La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba.

***Universidad Agraria de la Habana (UNAH), San José a carretera Tapaste, Municipio San José, Provincia Habana, Cuba.

****Facultad de Biología (U.H), Avenida 25 e/ H y J, Vedado, Municipio Plaza de la Revolución, Ciudad de la Habana, Cuba.

^eE-mail : darencibia@finlay.edu.cu

Recibido el 04/04/2011 - Aceptado el 03/05/2011

Resumen:

El ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas (AC) en médula ósea permite registrar *in vivo* la capacidad de las sustancias químicas de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas. En este artículo tuvimos como objetivo realizar una comparación entre dos biomodelos murinos en el ensayo de micronúcleos y AC en células de la médula ósea, teniendo en cuenta la frecuencia basal e inducida con ciclofosfamida (CF). Se utilizaron diez animales/sexo/grupo/especie, las especies evaluadas fueron ratones BALB/c y ratas Sprague Dawley (SD). Estos fueron tratados durante 14 días. Se formaron cuatro grupos uno no fue inoculado, dos controles se inocularon con sustancias vehículo y un control positivo fue inoculado con CF 50 mg/kg por vía i.p. Pasado este tiempo se obtuvieron las células de la médula ósea y se procesaron para obtener micronúcleos y metafases analizables. En el ensayo de micronúcleos el biomodelo ideal fue el ratón BALB/c, teniendo en cuenta los valores más bajos de micronúcleos espontáneos y los valores más altos inducidos, siendo más susceptibles que las ratas SD a la CF. Por su parte en el ensayo AC el mejor biomodelo experimental en cuanto a los índices espontáneos fueron los ratones BALB/c, experimentando un menor número de células con aberraciones, pero las ratas SD demostraron ser más susceptibles a la CF, induciendo mayor número de aberraciones cromosómicas. Este estudio permitirá utilizar el mejor biomodelo murino en ensayos de genotoxicidad y antigenotoxicidad, aplicable a productos naturales, fármacos, vacunas, desinfectantes y otros.

Palabras clave: Ensayo de micronúcleos, ensayo de aberraciones cromosómicas, ADN, ratones BALB/c, ratas Sprague Dawley.

Comparison between two murine biomodels in the micronuclei and chromosomal aberration assay in bone marrow cell.

Abstract:

Micronuclei and chromosomal aberration assay in bone marrow cell allow registering *in vivo* the capacity of the chemical substances to induce chromosomal ruptures or to interfere the chromosomes metaphases migration during the mitosis of the somatic cells. The aim of this work was to compare between two murine biomodels in the micronuclei and chromosomal aberration (CA) assay in bone marrow cell reporting the basal and induced frequency indexes with cyclophosphamide. Ten animal/sex/group/species were used; the evaluated species were BALB/c mice and Sprague Dawley (SD) rats. These were administered during 14 days. Four groups were formed: a non administered group, two controls with vehicle and a positive control administered with CF 50 mg/kg by i.p way. Past this time the cells of the bone marrow were obtained and they were processed to obtain micronuclei and metaphases to be analyzed. In the micronuclei assay the ideal biomodel was the BALB/c mice, keeping in mind the lowest values in spontaneous micronuclei and the higher values induced. The results obtained indicated that BALB/c mice are more susceptible than the SD rats to the CF mutagen. On the other hand, in the CA assay the best experimental biomodel with lowest spontaneous indexes was the mice BALB/c, which experienced a smaller number of cells with aberrations, but the SD rats demonstrated to be more susceptible to the CF, inducing a great number of chromosomal aberrations. This study will allow to choose the best murine biomodel in these genotoxicity and antigenotoxicity assay, applicable to natural products, drugs, vaccine, disinfectant and others.

Keywords: Micronuclei assay, chromosomal aberration assay, DNA, BALB/c mice, Sprague Dawley rats.

Introducción

La gran cantidad de nuevos productos que son anualmente lanzados al mercado dificulta su total evaluación empleando ensayos en roedores por ser estas pruebas muy largas y costosas. Ello orienta a la utilización de ensayos a corto plazo los cuales, informan en poco tiempo acerca de la actividad mutagénica de dichas sustancias y en algunos casos brindan información suficiente para establecer los niveles de seguridad para el hombre (1,2). En estos ensayos de genotoxicidad se emplea un gran número de sistemas biológicos dentro de los cuales se encuentran: virus, bacterias, hongos, cultivos de células eucariotas, plantas, insectos y mamíferos. Se han propuesto más de 200 ensayos de genotoxicidad, de los cuales se ha obtenido mucha información importante (3).

El ensayo de micronúcleos y de aberraciones cromosómicas de médula ósea de roedores, son ensayos incluidos actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos obligatorios exigidos por las agencias reguladoras (ICH), (4,5) ambos ensayos son fácilmente reproducibles y brindan información clara sobre la proliferación celular en médula ósea (5,6).

Estos sistemas permiten registrar *in vivo* la capacidad de las sustancias químicas de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas (6).

Para la evaluación de nuevos productos es necesario conocer la frecuencia basal de aparición de cada uno de los fenómenos que estudia la toxicología genética, para entonces de esta forma corroborar la existencia o no de un efecto mutagénico y en que medida se manifiesta, además al ser estas pruebas tan decisivas en la evolución positiva o negativa de un nuevo producto de índoles diversas es necesario buscar el biomodelo animal ideal.

Por lo cual se hace necesario que estos biomodelos expresen la menor frecuencia de aparición de micronúcleos y aberraciones cromosómicas en células en constante formación como son las células de la médula ósea como parámetro medible del daño genotóxico. Esto permitirá detectar, con el mínimo margen de error, la actividad genotóxica de una sustancia química o agente complejo en el material genético. Al utilizarse en nuestros días diferentes especies indistintamente es necesario conocer el biomodelo ideal a partir de obtener resultados de índices espontáneos bajos e inducidos altos.

A partir de esta problemática surge la necesidad de realizar una comparación en cuanto a la frecuencia basal e inducida con ciclofosfamida (CF), de micronúcleos de eritrocitos de médula ósea y de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea igualmente entre ratones BALB/c y ratas Sprague Dawley (SD) de ambos sexos. Para de esta forma identificar el mejor biomodelo murino experimentalmente, lo cual pudiera aplicarse en estudios de otros fármacos o agentes no explorados en relación al efecto genotóxico.

Destacando que utilizamos para este estudio solo ratones de la línea BALB/c sobre la base de los resultados de nuestras investigaciones donde obtuvimos que esta línea es la más eficiente en este ensayo. Tomando en consideración la baja frecuencia espontánea de micronúcleos en médula ósea encontrada en ratones adultos de esta línea en ambos sexos; así como la alta sensibilidad a sustancias mutagénicas como la CF (7-9).

Materiales y Métodos

- Animales.

Se utilizaron ratas SD adultos jóvenes de ambos sexos (6-8 semanas), cuyo peso corporal oscilaba entre 180-200 g al término de la cuarentena. De igual forma se incluyeron ratones adultos jóvenes de ambos sexos de la línea BALB/c con una edad de 6-7 semanas, cuyo peso corporal oscilaba entre 25 y 30 g. Ambas especies se mantuvieron en condiciones controladas: temperatura ($23 \pm 2^\circ$ C), humedad relativa ($60 \% \pm 10 \%$) y ciclos de luz-oscuridad de 12 h. El acceso al agua y al alimento (pienso estándar para cada especie suministrado por el CENPALAB), fue *ad libitum*. Estas características fueron comunes para todos los grupos experimentales evaluados en este ensayo. Durante todo el proceso experimental se respetaron los principios éticos establecidos para la investigación con animales de laboratorio (10).

- Administración y dosificación.

Grupos experimentales incluidos.

En todos los grupos experimentales, la sustancia se administraba en el horario de 10:30-11:30 a.m, y las concentraciones se ajustaron semanalmente en función del aumento del peso corporal. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de 10 animales/sexo/especie. En el grupo experimental 1 utilizamos animales no tratados como control negativo. A estos animales se les realizaba la técnica de entubación gástrica para que estuvieran expuestos a las mismas condiciones de manejo que los demás grupos, durante un periodo de 14 días.

En el grupo experimental 2 utilizamos el tween 65 al 2 %, siendo el vehículo más utilizado en la mayoría de las preparaciones de sustancias oleosas, útil como agente tensoactivo; (11,12) en el grupo experimental 3 utilizamos el NaCl al 0,9 %, útil como disolvente de la mayoría de las sustancias a preparar (13,14), ambas sustancias fueron administradas por vía oral a 2 ml/kg durante un periodo de 14 días, preparadas 2 horas antes de la administración.

En el grupo experimental 4 utilizamos como control positivo la CF, en dosis de 50 mg/kg, por vía i.p, (Ledoxina®, Lemri, S.A.), la cual se diluyó en disolución salina (NaCl) al 0,9 % (15). La disolución se administró inmediatamente después de ser preparada, administrada a los animales a las 48 horas y luego a las 24 horas antes del sacrificio programado a la misma dosis antes descrita a razón de 10 ml/kg (16).

- Observaciones clínicas.

Se realizaron dos observaciones clínicas diarias, en el horario comprendido entre las 8:30-10:30 a.m y en el horario de la tarde 3:00-4:30 p.m. Durante cada observación se tuvo en cuenta el estado clínico general del animal, lo cual incluyó la palpación para la detección de lesiones, posibles afectaciones respiratorias, del sistema nervioso, cardiovascular, gastrointestinal, estado de la piel, pelo, coloración de las mucosas y ojos.

- Eutanasia.

Todos los animales fueron eutanizados bajo atmósfera de éter hasta la pérdida total de los reflejos, en el caso de los grupos experimentales 1, 2 y 3 el sacrificio fue 24 h después de la última administración pasados los 14 días, en el caso del grupo experimental 4 tratado con CF, la eutanasia se realizó 24 horas después de la segunda administración del mutágeno, haciendo coincidir el día de la eutanasia en todos los casos (17).

- Exámenes realizados.

Ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratas.

Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó por flujo con 4 ml de suero bovino fetal (18). La médula así obtenida se centrifugó a 1 000 r.p.m. por 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizó un frotis del botón celular en láminas portaobjetos. Después de montadas las láminas (mínimo: 2/animal) se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posteriormente se fijaron en metanol absoluto durante 5 minutos, para su posterior tinción en Giemsa al 5% durante 12-15 minutos. Las láminas fueron codificadas, el análisis se realizó por tres observadores independientes y las observaciones fueron realizadas "a ciegas". Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromatófilos (EP) y normocromatófilos (EN) en 2 000 células/animal. Además, se calculó la frecuencia de EP portadores de

micronúcleos (MN-EP) en 2 000 EP/animal, según los requisitos establecidos (18-20). Posteriormente se calculó el índice de citotoxicidad dado por la relación de EP/EN de la población total de eritrocitos y el número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN en cada grupo.

Ensayo de aberraciones cromosómicas in vivo.

En el horario de la mañana (2 horas antes del sacrificio), la división celular en metafase se detuvo utilizando colchicina (6 mg/kg, vía i.p). Un fémur de cada animal fue extraído y la cavidad medular se lavó con 3 mL de suero bovino fetal (SBF). La suspensión celular se centrifugó, eliminándose el sobrenadante (18,19). Después de un tratamiento hipotónico de las células del botón con KCL (0,075 M), se realizó una segunda centrifugación. El botón celular se fijó en una mezcla de metanol-ácido acético glacial (3:1) durante 15 minutos. Se realizaron 3 fijaciones con centrifugaciones sucesivas, y se extendieron en láminas húmedas con enfriamiento previo. Las láminas se secaron al aire y se tiñeron con solución de Giemsa al 10 % durante 30-35 min. Se contabilizaron 100 metafases por animal, determinándose el número de células con aberraciones estructurales (rupturas e intercambios cromosómicos y cromatídicos) y frecuencia de gaps (21,22). También se calculó el índice mitótico IM % (porcentaje de metafases en 1 000 células leíbles) y el número de células con poliploidía en 1 000 células leíbles (21,22), todas las determinaciones fueron leídas por dos observadores, para luego establecer un promedio entre ambas.

- Análisis estadístico.

Se procedió a verificar los supuestos para realizar el análisis de varianza en las variables continuas frecuencia de EP portadores de micronúcleos, índice de citotoxicidad (EP/EN) y el índice mitótico, los resultados obtenidos están distribuidos normalmente (normalidad, según el test de Kolmogorov-Smirnov), existe dependencia entre las observaciones y presentan homogeneidad de varianzas (test de Levene) (17). Por lo cual se analizaron con el uso de esta prueba, siendo el nivel de significación establecido de $\alpha = 0.05$. Las variables categóricas (número total de MN, número de EP con 1 MN, 2 MN y >2 MN, número de células con aberraciones que incluye (de rupturas e intercambios cromosómicos y cromatídicos), frecuencia de gaps, así como el número de células con poliploidía), se analizaron mediante la prueba de Chi-cuadrado, el nivel de significación establecido fue de $\alpha = 0.01$ (17). Todos los análisis se realizaron empleando el Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), versión 6.

Resultados y Discusión

En este estudio no se observaron síntomas clínicos indicativos de toxicidad en ninguno de los grupos experimentales, siendo válido estos resultados para ambas especies. Demostrando que se logró inducir toxicidad a nivel de ADN pero no sistémico.

En la tabla 1 observamos los resultados del ensayo de micronúcleos al comparar los índices espontáneos e inducidos en ambas especies evaluadas. Se corroboró que el índice de citotoxicidad endógeno en ratones BALB/c se encuentra en el rango entre 1,15-1,19, y el inducido esta en el orden entre 0,85-0,87. Para el caso del índice de genotoxicidad se observa que el valor basal del % de EP con MN en esta línea de ratones se encuentra entre 0,13-0,18%, para un total de MN observados entre 19-26. Para el caso de la inducción genotoxicidad con CF este índice experimento un ascenso que difiere de forma significativa con los grupos controles, estando en el rango con valores desde 1,65-1,82%, induciendo la formación de un número total de MN que van desde 233-258. Los resultados encontrados en esta línea de ratón tanto basales como inducidos concuerdan con los encontrados por nuestro grupo de trabajo al evaluar la CF y la bleomicina, ambas drogas genotóxicas con diferentes diseños de tratamiento (15).

Tabla 1. Comparación de la frecuencia basal e inducida de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea entre ratas SD y ratones BALB/c de ambos sexos.

Grupo	n	EP/EN ^d	MN-EP (%) ^d	MN ^D
Ratones BALB/c				
Machos				
Control negativo	10	1,18 ± 0,01a	0,16 ± 0,03a	23a
Sustancia vehículo 1	10	1,16 ± 0,04a	0,18 ± 0,04a	26a
Sustancia vehículo 2	10	1,19 ± 0,05	0,18 ± 0,04a	25a
Control positivo (CF) ^a	10	0,87 ± 0,03*a	1,82 ± 0,89*a	258*a
Hembras				
Control negativo	10	1,15 ± 0,05a	0,13 ± 0,04a	19a
Sustancia vehículo 1	10	1,17 ± 0,02a	0,14 ± 0,07a	20a
Sustancia vehículo 2	10	1,19 ± 0,04	0,17 ± 0,08	24
Control positivo (CF) ^a	10	0,85 ± 0,02*a	1,65 ± 0,77*a	233*a
Ratas Sprague Dawley				
Machos				
Control negativo	10	1,20 ± 0,03	0,19 ± 0,05	27
Sustancia vehículo 1	10	1,19 ± 0,04	0,21 ± 0,02	30
Sustancia vehículo 2	10	1,18 ± 0,06	0,15 ± 0,06	22
Control positivo (CF) ^a	10	0,90 ± 0,03*	1,68 ± 0,92*	241*
Hembras				
Control negativo	10	1,19 ± 0,06	0,22 ± 0,01	32
Sustancia vehículo 1	10	1,21 ± 0,02	0,20 ± 0,02	29
Sustancia vehículo 2	10	1,18 ± 0,04	0,17 ± 0,05	25
Control positivo (CF) ^a	10	0,89 ± 0,04*	1,74 ± 1,03*	250*

CF (Ciclofosfamida).^a Administración por vía ip. (^dDeterminaciones en 2 000 células/animal, *p<0.05 comparación con el control, ANOVA, **X** media; **DE** desviación estándar, para las dos series experimentales). (^DDeterminaciones en 2 000 EP/animal, *p<0.01 (comparación con el control, Prueba no paramétrica de χ^2 , para las dos series experimentales). **a** p<0.05 (Difiere al comparar entre especies teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, utilizando la misma prueba estadística.

Por otro lado igualmente con los resultados observados en la tabla 1 al evaluar en este mismo ensayo ratas SD de ambos sexos, se corroboraron los índices espontáneos presentes en esta especie teniendo en cuenta el índice de citotoxicidad encontrándose entre 1,18-1,21 y el índice de genotoxicidad observándose que se encuentran entre 0,15-0,22 (23). Para el caso de los resultados inducidos con la CF clastógeno químico, se corroboró que esta mutágeno es capaz de inducir citotoxicidad en esta especie de ratas con valores que van desde 0,89-0,90 e

inducir a su vez genotoxicidad con valores entre 1,68-1,74 con la formación de 241-250 MN totales (23).

Al comparar ambas especies en este ensayo encontramos que la línea de ratones BALB/c constituye el biomodelo ideal, teniendo en cuenta los valores más bajos de micronúcleos espontáneos encontrados y los valores más altos inducidos, siendo más susceptibles que las ratas SD a la CF, estos resultados difirieron significativamente entre especies. Los ratones BALB/c también fueron la mejor línea de ratones al ser comparados con ratones NMRI, OF-1 y C57BL/6/cenp en este ensayo (7-9). Demostrando que mediante el mecanismo de formación endógena de micronúcleos en eritrocitos de médula ósea los ratones BALB/c son mucho más estable genéticamente que las ratas SD, siendo un fuerte factor predominante en este estudio el hecho de que está línea de ratón es isogénica, obteniendo bajas tasas de variaciones genéticas y epigenéticas entre individuos.

En la tabla 2 se encuentran los resultados del ensayo de aberraciones cromosómicas. Para el caso de los ratones BALB/c los resultados básales del número de células con aberraciones se encuentran entre 7-10, resultado bastante bajo que concuerdan con los obtenidos por nuestro grupo de trabajo (16,22, 24). Igualmente fueron encontrados resultados bajos de células con poliploidía con valores entre 0-1. El índice mitótico basal fue bastante alto experimentando valores desde 4,98-5,98%. Además el número de metafases con aberraciones cromosómicas estructurales de tipo Gaps fue entre 2-6 (24).

Tabla 2. Resultados de la comparación de la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea entre ratas SD y ratones BALB/c de ambos sexos.

Grupos	IM (%) ^a	Células con Poliploidía ^b	Gaps ^b	# de Células con aberraciones ^b
Ratones BALB/c				
Machos				
Control Negativo	5,65 ± 0,56a	1	4	7a
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	3,89 ± 0,24*a	14**a	47**a	175**a
Sustancia Vehículo 1	5,49 ± 0,53a	0	6	8a
Sustancia Vehículo 2	5,86 ± 0,20a	0a	7a	10a
Hembras				
Control Negativo	5,98 ± 0,22a	1	6	8a
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	3,93 ± 0,84*a	18**a	44**a	192**a
Sustancia Vehículo 1	4,98 ± 0,79	0a	5	8a
Sustancia Vehículo 2	5,12 ± 0,63	1	2a	9a
Ratas Sprague Dawley				
Machos				
Control Negativo	4,93 ± 0,09	2	6	17
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	3,58 ± 0,43*	23**	62**	220**
Sustancia Vehículo 1	5,12 ± 0,18	2	7	18
Sustancia Vehículo 2	5,29 ± 0,25	3	4	23
Hembras				
Control Negativo	4,81 ± 0,10	1	5	18
Ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p)	3,40 ± 0,26*	28**	69**	246**
Sustancia Vehículo 1	4,97 ± 0,21	3	8	19
Sustancia Vehículo 2	5,19 ± 0,32	1	6	20

^aX ± D.E, De un total de 10 000 células/grupo/serie para un total de 20 000 células evaluadas, *p<0.05; ANOVA.

^b **p<0.01; prueba no paramétrica χ^2 . Comparación contra el control negativo para ambas pruebas en cada especie.

a p<0.05 (Difiere al comparar entre especies teniendo en cuenta la misma variable en el mismo grupo experimental, utilizando la misma prueba estadística.

Ahora realizando un análisis de estas mismas variables pero inducidas con la administración de CF vía I.P encontramos que este mutágeno indujo la formación de 175-192

células con aberraciones, considerado entonces como un potente inductor de aberraciones de tipo estructural (16,21, 22,24). El número de células con poliploidía encontradas estuvo en el orden de entre 14-18 y el índice mitótico experimento un descenso significativo al compararlo con los controles estando en el rango de entre 3,89-3,93%. Por su parte la inducción de metafases con aberraciones de tipo Gaps difirió con los valores espontáneos encontrados estando entre 44-47 (16, 21, 22, 24).

En ratas SD se obtuvieron un total de 17-23 células totales con aberraciones y de 4-8 metafases con aberraciones de tipo Gaps, ambos valores de tipo basal. Los valores basales de células con poliploidías se encuentran entre 1-3 y el índice mitótico entre 4,81-5,29, Estos valores espontáneos difirieron significativamente con los obtenidos por la CF, además concuerdan con los obtenidos por nuestro grupo de trabajo en investigaciones realizadas con anterioridad, lo cual valida la repetitividad y eficiencia de esta prueba (21) a partir de nuestra experiencia. La CF indujo entre 220-246 células totales con aberraciones esta especie de rata. Además el rango de células con aberraciones Gaps fue entre 62-69. Así mismo el número de células con poliploidía estuvo en el orden de 23-28 células y el índice mitótico experimento igualmente un marcado descenso al compararlo con los controles estando entre 3,40-3,58% (21).

Los resultados de la comparación entre ambas especies en el ensayo de AC arrojaron que el mejor biomodelo experimental en cuanto a los índices espontáneos fueron los ratones BALB/c, experimentado un menor número de células con aberraciones, aberraciones de tipo Gaps, además un menor número de células con poliploidía y un mayor porcentaje de células en metafase (índice mitótico). Por otro lado las ratas SD demostraron ser más susceptibles a la CF, la cual indujo en las ratas mayor número de células con aberraciones, mayor frecuencia de células con aberraciones tipo Gaps, y un número mayor de células con poliploidía. De igual forma la CF indujo en ratas SD un menor porcentaje de células en metafases. Pudiera entonces utilizarse ratas SD en este ensayo para determinar actividad genotóxica de nuevos fármacos que induzcan daño al ADN por efecto alquilante, como clastógeno químico (25,26), permitiendo determinar el mecanismo de daño de nuevas drogas. Además de mimetizar en gran medida el efecto de esta droga en el hombre por ser las ratas SD una especie totalmente heterogénea.

Conclusiones

En el ensayo de micronúcleos el biomodelo ideal fue el ratón BALB/c, teniendo en cuenta los valores más bajos de micronúcleos espontáneos y los valores más altos inducidos, siendo más susceptibles que las ratas SD a la CF. Por su parte en el ensayo AC el mejor biomodelo experimental en cuanto a los índices espontáneos fueron los ratones BALB/c, experimentado un menor número de células con aberraciones, pero las ratas SD demostraron ser más susceptibles a la CF, la cual indujo mayor número de aberraciones.

Referencias Bibliográficas

1. Mortelmans K, Rupa D, 2004. Current in genetic Toxicology Testing for Microbiologist. *Advances in Applied Microbiology* 56:379-397.
2. Mortelmans K, Zeiger E, 2000. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. *Mut. Res* 455:29-60.
3. García L, Sureiro RA, Garrido MJ. Rápida detección de compuestos mutagénicos directos en *Salmonella typhimurium* TA 100 aplicando una técnica de impedancia eléctrica. En: Xa Reunión Científica de la Sociedad Española de Mutagénesis Ambiental, 2000, 109-110.
4. Cox SH, Ann M. *Product Safety Evaluation Handbook: Genetic Toxicology Testing*. Second Edition, Revised and Expanded. Research Triangle Park, North Carolina, 1999, 178-179.
5. Schmid W, 1975. The micronucleus assay validation. *Mutation Research* 24:9-11.
6. Alamone MF, 1994. Bone Marrow Micronucleus Assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frecuencies. *Environ Mol Mutag* 23:239-240.
7. Arencibia, DF, Rosario LA, 2010. El ratón como biomodelo en los ensayos de genotoxicidad, resumen de resultados finales del estudio, dos años de experiencias, Instituto Finlay, Cuba. *Retel* 27(1):1-8.
8. Arencibia DF, Rosario LA, Vidal A, 2010. The mouse as biomodel in genotoxicity assays, two years of experience, Finlay Institute, Cuba. *VaccniMonitor* 19(Suplement 2):245.
9. Arencibia DF, Rosario LA, Vidal A, 2011. The mice as ideal biomodel in the genotoxicity assays, Finlay Institute, Cuba. *Revista Salud Anim* 33(1).
10. CCAC. Canadian Council on Animal Care Guidelines for the use of animals in Psychology. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA (Eds.) Ottawa: Bradda Printing Services Inc, 1997, 155-162.
11. Arruzazabala ML, Mas R, Molina V, 2006. Effects of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. *Drugs in R&D* 7:233-241.
12. Carbajal D, Molina V, Más R, Arruzazabala ML, 2005. Therapeutic effects of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs Exp Clin Res* 31:193-198.
13. Hipler U, Gorning M, Hipler B, Romer W, 2000. Stimulation and scabestrogen-induced inhibition of reactive oxygen species generated by rat sertoli cells. *Arch Androl* 44:147-154.
14. Shayne CG. *Animal Models in toxicology*. In: Published by Shayne C. Gad and Taylor & Francis Group. *Toxicology: Chapter 2 and 3. The Mouse and Rats*. 2nd ed. LLC edition. New York: (U.S.A), 2007, 24-162.
15. Arencibia DF, Vidal A, Rosario LA, Suárez YE, Delgado L, 2011. Biomodelos para la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. *VacciMonitor* 20(1):28-33.

16. Arencibia DF, Rosario LA, Hernández Y, 2010. Comparación en la frecuencia espontánea e inducida de aberraciones cromosómicas en médula ósea de ratones OF-1 y C57BL/6/cenp. Rev Cub de Farm 44(4):503-511.
17. Rossello P, Olivé J, Munuera E, Gonzáles TH, Rodríguez E. Use of trans-resveratrol as a therapeutic agent for the treatment of male infertility and/or subfertility in mammals. (wo/2006/000603). Universidad de Barcelona, España, 2006, 2-3.
18. Arencibia DF, Rosario LA, Morffi J, Curveco D, 2009. Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. Retel 25(3):22-38.
19. Arencibia D.F, Rosario L.A, Morffi J, Curveco D, 2009. Estrategias en las evaluaciones genotóxicas. Retel 23(3):23-40.
20. Arencibia DF, Gutiérrez A, Gámez R, Pardo B, Curveco D, García H, 2009. Evaluación Genotóxica del D-004, extracto del fruto de *Roystonea regia*, mediante el Ensayo de Micronúcleos. Rev Cub Farm 43(2):1-8.
21. Arencibia DF, Rosario LA, 2010. Respuesta de Ratas SD a la administración de ciclofosfamida y bleomicina mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea. Retel 28(1):1-14.
22. Arencibia DF, Gámez R, Gutiérrez A, Mas R, Pardo B, García H, Goicochea E, 2010. Efectos del D-003, mezcla de Ácidos Alifáticos en el ensayo de Aberraciones Cromosómicas *in vivo*. Rev Cub Farm 44(2):213-220.
23. Arencibia DF, Rosario LA, 2010. La rata Sprague Dawley como biomodelo en la inducción de micronúcleos en células de la médula ósea por ciclofosfamida y bleomicina. Retel 29(1):1-15.
24. Arencibia DF, Rosario LA, Curveco D, 2010. Comparación de la respuesta de ratones BALB/c de Ambos sexos a la administración de dos sustancias mutagénicas mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas en células de la médula ósea. Rev Vet Arg 27(269):1-10.
25. Martínez G, Giuliani A, León OS, Pérez G, Núñez AJ, 2001. Effect of Mangifera indica L extract (VIMANG) on proteins and hepatic microsomes peroxidation. Phytotherapy Research 15:581-5.
26. Prieto G, Errecalde C, Trotti N, 1999. Farmacología clínica de los antineoplásicos. Monog Med Vet 19(2):1-8.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 10, Agosto 2011

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Actividad antiplasmodial in vitro de *Calophyllum inophyllum*

Ana M. Mesa-Vanegas, Adriana L. Pabon, Silvia Blair-Trujillo.

Grupo Malaria. Sede de Investigación Universitaria (SIU). Universidad de Antioquia.

* Autor para Correspondencia: Ana María Mesa Vanegas

Grupo Malaria. Sede de Investigación Universitaria (SIU). Universidad de Antioquia. A.A 1226.

Calle 62 N° 52-59, Laboratorio 610-611. Medellín, Colombia.

Tel: (574) 219-64-86 - Fax: (574)219-64-87

anammv@gmail.com

Recibido el 13/05/2011

Aceptado el 17/05/2011

Resumen

Introducción: Debido a la falla terapéutica y a la resistencia de *Plasmodium falciparum* a varios antimaláricos existe la necesidad de buscar nuevos candidatos antimaláricos. Dado sus promisorios resultados químicos y biológicos, el género *Calophyllum* (Guttiferae, Clusiaceae) es de interés en el área de desarrollo de nuevos fármacos por ello, la especie *Calophyllum inophyllum* puede ser una alternativa para el control de la morbi-mortalidad por malaria. En este trabajo se evaluó la actividad antiplasmodial in vitro de extractos y del ácido ursólico obtenidos a partir de hojas de *Calophyllum inophyllum*. Métodos: El material vegetal seco y molido de *C. inophyllum* se extrajo por percolación con solventes de diferente polaridad. A partir de los extractos se aisló mediante procesos cromatográficos, un metabolito mayoritario que fue caracterizado mediante técnicas espectroscópicas de RMN. La actividad antiplasmodial in vitro de las muestras se evaluó en la cepa resistente FCB2 de *P. falciparum* mediante la incorporación de hipoxantina radiomarcada y la detección de la proteína HRP-2. Resultados: Se obtuvieron cuatro extractos de diferente polaridad, se aisló y caracterizó el triterpeno ácido ursólico. Se encontró que los extractos y el ácido ursólico presentan actividad antiplasmodial por ambos métodos, algunos con IC50 de 6,33 µg/mL y 13,34 µg/mL para el extracto de metanol (ExtM) y IC50 de 24,48 µg/mL y 46,28 µg/mL para el ácido ursólico, con los métodos radioisotópico y HRP-2 respectivamente. Conclusiones: Se validó la actividad antiplasmodial del ácido ursólico y del extracto metanólico mediante dos metodologías, sugiriendo la presencia de metabolitos activos contra el parásito, lo que estimula realizar un análisis biodirigido aislando y caracterizando más metabolitos presentes en la planta *C. inophyllum*.

Palabras clave: *P. falciparum* - Clusiaceae - *Calophyllum* - triterpeno - actividad antiplasmodial

Summary

Introduction: Currently, it is necessary to research and development new antimalarial drugs, due to treatment failure and resistance of *P. falciparum* to various antimalarial drugs. The genus *Calophyllum* (Guttiferae, Clusiaceae) is of interest because its promising results of chemical and biological activity, so *Calophyllum inophyllum* could be an alternative for the malaria morbidity and mortality control. This study evaluated antiplasmodial activity in vitro extracts and ursolic acid obtained from the leaves of *Calophyllum inophyllum*. Methods: The dried and pulverized vegetal material was extracted by percolation with different polarity solvents until exhaustion. From the extracts was isolated by chromatographic processes a major metabolite, which was characterized by NMR spectroscopic techniques. In vitro antiplasmodial activity of the samples was evaluated on continuous culture of *P. falciparum* strain FCB2, by HRP-2 and radioisotopic methods. Results: In this paper we obtained four extracts of different polarity, moreover was isolated and characterized a triterpene (C₃₀H₄₈O₃), known as ursolic acid. We found that the extracts and ursolic acid have antiplasmodial activity by two methods evaluated, shown interesting IC₅₀ values: 6,33 µg/mL and 13,34 µg/mL for the methanol extract (ExtM) and 46,28 µg/mL and 24,48 µg/mL for ursolic acid, by HRP-2 and radioisotopic methods, respectively. Conclusions: We report interesting antiplasmodial activity whit ursolic acid and methanol extract by both methods, suggesting the presence of active metabolites against *P. falciparum*, which encourages to carry out a bioguide analysis for isolating and characterization of other metabolites.

Keywords: *P. falciparum* - Clusiaceae - *Calophyllum* - triterpenes - antiplasmodial activity.

Introducción

La malaria es causada por parásitos protozoos, del género *Plasmodium*, que son transmitidos por la hembra del mosquito del género *Anopheles*(1). Desde 1960 se ha informado la aparición y dispersión de la resistencia a los antimaláricos presentado por *P. falciparum* en países de Asia, África y Latinoamérica, lo cual se ha relacionado, principalmente a cambios biológicos en el parásito contribuyendo a la persistencia y letalidad de esta enfermedad, aumentado su prevalencia en los últimos 15 años y disminuyendo la efectividad de los medicamentos en muchos países donde la enfermedad es endémica(2). Todos estos elementos hacen que hoy la malaria sea un problema de Salud Pública a nivel mundial(3). En el año 2007 se registraron 247 millones de casos de malaria en el mundo y aproximadamente un millón de muertes, en su mayoría niños menores de cinco años(4).

Una de las alternativas para el control de las complicaciones y muertes por malaria es la adquisición de quimioterapia efectiva, la cual ha sido posible en gran medida, gracias al descubrimiento de compuestos a partir de las plantas como la quinina, la cual fue obtenida de la planta del género *Cinchona*, siendo el único antimalárico utilizado durante varios siglos y ha sido modelo para sintetizar nuevos análogos antimaláricos como la cloroquina, mefloquina y amodiaquina(5). Igualmente, de la planta *Artemisia annua* (Asteraceae), una hierba china

conocida popularmente en este país como Qing hao y empleada por la medicina tradicional por más de 1000 años, se aisló la artemisinina, a partir de la cual se han preparado derivados hemisintéticos como la dihidroartemisinina, artemeter, arteeter y artesunato de sodio(6); demostrando que los productos naturales juegan un papel significativo en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Por otra parte, la agencia reguladora en fármacos y alimentos de Estados Unidos (FDA) estima o reporta que aproximadamente el 75% de los fármacos para el tratamiento de enfermedades infecciosas tienen origen natural(7).

En la familia Clusiaceae se han aislado compuestos con actividad antiplasmodial, como xantonas y derivados del acilfloroglucinol como por ejemplo en plantas de los géneros *Hypericum*, *Vismia* y *Garcinia*(8). En la misma familia se encuentra el género *Calophyllum* formado por 200 especies y en algunas de ellas se ha reportado la presencia de compuestos de tipo cumarinas, xantonas y triterpenos con actividades antiplasmodial, analgésica, antiviral, antiulcerogénica, anticáncerígena y antibacteriana(9). Por ello, es importante realizar estudios para explorar el potencial uso de las especies de *Calophyllum* hacia la búsqueda de nuevas sustancias que presenten una elevada actividad antiplasmodial. En el tamizaje de las sustancias con actividad antiplasmodial, la utilización inicial de pruebas in vivo presentan restricciones de tipo ético en el uso de animales y elevado costo, y por ello la mayoría de los ensayos iniciales se realizan en cultivos de parásitos in vitro; metodología que permite obtener información confiable con pequeñas cantidades de material biológico, actividad específica sobre el parásito y la posibilidad de evaluar un gran número de muestras(10). Dentro de las técnicas más empleadas para determinar la actividad antiplasmodial in vitro se encuentran el método visual, el micro método radioisotópico(11), los métodos bioquímicos como las pruebas de la lactato deshidrogenasa parasitaria (LDH) y de la proteína rica en Histida II (HRP-2)(12-13), el método fluorométrico y otros métodos particulares que postulan modos de acción como la inhibición de polimerización del grupo Hemo(14). Todos estos métodos determinan la inhibición del crecimiento de los parásitos mediante una medición directa o indirecta cuando éste es sometido a diferentes concentraciones de una muestra problema.

Con base en los hallazgos presentes en el género *Calophyllum* y la necesidad de validar la actividad antiplasmodial, nosotros aislamos y caracterizamos el ácido ursólico a partir de extractos de la planta *C. inophyllum*, evaluamos la actividad antiplasmodial de este compuesto y de cuatro extractos empleando los métodos radioisotópico y HRP-2.

Materiales y métodos

Preparación de extractos y aislamiento del compuesto: Las hojas de *C. inophyllum* se colectaron en el municipio San Alberto, situado en el departamento del Cesar (Colombia), a 200 m.s.n.m (15). Un espécimen de esta planta se encuentra depositado en el Jardín Botánico Joaquín Antonio Uribe de Medellín con Voucher número 7310A. El material vegetal fue secado a temperatura ambiente, posteriormente 1,103 Kg se molieron y se depositaron en un percolador con Hexano (ExtH, 17,64g), diclorometano (ExtD, 30,67g), acetato de etilo (ExtAE,

14,98g) y metanol (ExtM, 82,45g), previamente destilados. Los extractos obtenidos fueron concentrados a presión reducida en un rotaevaporador, se monitorearon por cromatografía de capa delgada con fase estacionaria de Sílica-gel 60 GF254 Merck® empleando diferentes sistemas de elusión y revelando con lámpara ultravioleta UVGL-58 a 254 y 366 nm y revelador universal. El extracto de diclorometano se sometió a cromatografía en columna flash con fase estacionaria de Sílica-gel 60 GF254 Merck® empleando gradientes de concentración hexano: acetato de etilo y acetato de etilo: metanol y realizando un monitoreo continuo mediante cromatografía de capa delgada. Posteriormente, se realizó cromatografía en capa preparativa con fase estacionaria de Sílica-gel 60 GF254 Merck® para purificar un compuesto mayoritario presente en este extracto denominado CLEDJS9 (135 mg).

Análisis espectroscópico: Los espectros infrarrojo (IR) se obtuvieron en un equipo Perkin-Elmer RX/FT-IR system. Para el análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear se utilizó un espectrómetro Bruker (300 y 250 MHz para ¹H), 75 MHz para ¹³C utilizando cloroformo deuterado (CDCl₃) como solvente. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) tomando como referencia el TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Herzios (Hz). Además se realizó espectrometría de masas electrospray con tiempo de vuelo (TOF ESI-MS) en un equipo Nermag-Sidar R-10-10C.

Ensayos de actividad antiplasmodial

Plasmodium falciparum: Los ensayos de actividad antiplasmodial in vitro se realizaron con la cepa cloroquino-resistente FCB-2 de Plasmodium falciparum la cual es mantenida en cultivo continuo con la metodología de Trager & Jensen (1976) modificada en eritrocitos A+. Los cultivos son mantenidos a 37°C en una atmósfera de mezcla de gases de 5% de O₂, 6% de CO₂ y N₂ balanceado .(16)

Evaluación de la actividad antiplasmodial

Método radioisotópico: Para evaluación de la actividad antiplasmodial in vitro de los extractos y del compuesto aislado de la planta *C. inophyllum*, se siguió la metodología descrita por Bravo J et al., 1999, Desjardins R et al., 1979 con algunas modificaciones. Este método realiza una medición indirecta de la actividad metabólica del parásito, por medio de la incorporación de un precursor de ácidos nucleicos marcado radiactivamente, así: de cada extracto y del compuesto se preparó una solución madre de 10 mg/mL, tomando 2 mg de cada uno y 200 µL de DMSO. A partir de esta se tomaron 50 µL y se ajustaron hasta 1000 µL con RPMI completo sin hipoxantina obteniendo una concentración final de 0,5 mg/mL.

Los ensayos de actividad se realizaron en placas de 96 pozos de fondo plano marca Falcon®, se evaluaron siete concentraciones de cada compuesto en un rango entre 100 µg/mL a 1,56µg/mL, cada concentración se evaluó por triplicado y se prepararon a partir de diluciones seriadas de la solución madre de 0,5mg/mL. La concentración de DMSO en la primera dilución fue de 1% que se ha demostrado no ser tóxica para el parásito, en las siguientes diluciones la concentración de DMSO fue menor. Como control de tratamiento se utilizó la cloroquina, que fue evaluada también sobre siete diluciones seriadas en un rango entre 1,94 µg/mL y 0,03 µg/mL (3,75µM y 0,06µM). Como control de crecimiento se empleó medio de cultivo. Se

preparó una suspensión de glóbulos rojos parasitados con un hematocrito del 2% y una parasitemia del 1%. La concentración final de la hipoxantina tritiada por pozo fue de 0,8 $\mu\text{Ci/ml}$. El cultivo con los tratamientos se incubó a 37 °C durante 48 horas en atmósfera de 5% CO_2 , 5% O_2 y nitrógeno. El plato se congeló a -20 °C para provocar la hemólisis de los eritrocitos y al día siguiente se descongeló. Los ácidos nucleicos fueron depositados en un filtro de fibra de vidrio con ayuda de un colector semi-automático y fueron leídos en un contador beta. La lectura se expresó en cpm.

Método HRP-2: se emplearon microplacas de 96 pozos de fondo plano marca Falcon®. Se evaluaron 7 concentraciones dobles seriadas, por duplicado tanto de extractos y el compuesto. Se prepara una solución madre de 2mg/mL en DMSO al 1% y posteriormente se preparan las diluciones dobles seriadas en un rango de 200 $\mu\text{g/mL}$ -3,13 $\mu\text{g/mL}$. Se preparó una suspensión de eritrocitos parasitados con una parasitemia al 0,05% sincronizado en anillos y hematocrito del 1,5%, luego se procedió a distribuir 200 μL de la suspensión de eritrocitos parasitados en cada pozo y posteriormente se adicionaron 25 μL de las concentraciones crecientes de las muestras y como controles de tratamiento 25 μL de agua desionizada esteril. Se incubaron a 37 °C durante 72 h, se realizó un extendido para verificar crecimiento de los parásitos (por microscopía) a las 24h y 72h. Se sometieron los platos a congelación y descongelación por calor a 37°C dos veces para causar hemólisis y luego se almacenaron las cajas a -20°C. Teniendo en cuenta la parasitemia obtenida en los pozos control pasadas las 72h se procedió a diluir con agua destilada los pozos hemolizados para dar una parasitemia de 0.02% en el control. ELISA HRP2: Se cubrieron microplatos de ELISA de 96 pozos con fondo en U y de alta fijación (Greiner Bio-One) con el anticuerpo primario (1 $\mu\text{g/mL}$), se guardaron en bolsa plástica de sello hermético a 4 °C durante 12 h. Se procedió a transferir 100 μL /pozo de la muestra del plato de cultivo a los platos de ELISA, que fueron incubados por 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Posteriormente se diluyo el anticuerpo secundario (MPFG-55P,ICL) a 0,05 $\mu\text{g/mL}$ en una solución de PBS al 2% de BSA y 1% de tween-20, se transfirieron 100 μL a cada pozo, se incubó durante 1h en cámara húmeda y luego se lavó nuevamente por triplicado. Se adicionaron 100 μL /pozo de cromógeno 3,3',5,5-Tetrametilbenzidina (TMB single solution Chromogen/Substrate;Zymed Laboratorios,Inc) durante 10 minutos en la oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 50 μL /pozo de solución de parada (ácido sulfúrico 1M) y se determinó la absorbancia a 450 nm en lector de microplatos Bio-Rad 680. Cuando los parásitos de los pozos sin tratamiento crecieron adecuadamente (control), la absorbancia estuvo entre 0,5-2,0 13.

Las concentraciones inhibitoria 50 ($\text{IC}_{50} \pm \text{IC } 95\%$) fueron calculados para cada compuesto a partir de un modelo de regresión logística no lineal. Se asumió una curva sigmoidea dosis-respuesta con pendiente de Hill (pendiente variable) usando el programa GraphPad Prism 4 for Macintosh versión 4.0b .Los datos fueron analizados y graficados usando GraphPad Prism 4 for Macintosh versión 4.0b (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

Resultados y discusión

Caracterización del compuesto ácido ursólico: Del extracto de diclorometano se aisló un sólido, blanco, amorfo, con un punto de fusión de 265° C y fórmula molecular C₃₀H₄₈O₃, identificado como ácido ursólico (Figura 1).

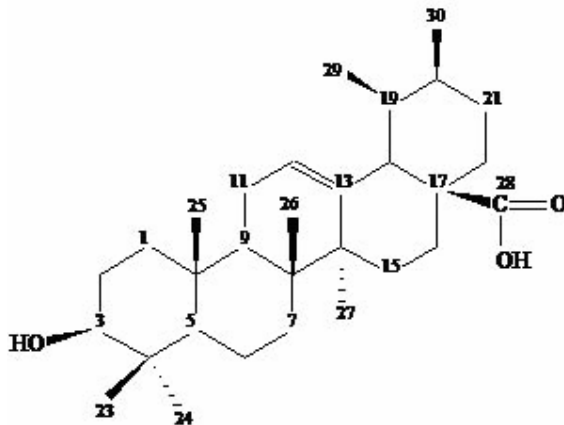


Figura 1: Estructura del ácido ursólico.

Datos espectroscópicos: TOF ESI-MS [M + Na⁺] a m/z 483,2, m/z 479,3, m/z 451,2 (28), m/z 413,2 (38), m/z 393,2 (21), m/z 301,1 (92), m/z 243,2 (58). IR (cm⁻¹) 3440; 2928; 2871; 1691; 1457; 1387; 1253; 1091. ¹H RMN [?] (ppm): 1,61 (m, J= Hz, 1H, H-1); 1,49 (m, J= Hz, 1H, H-2); 3,09 (t, J= 8Hz, 1H, H-3); 0,63 (d, J= 11,3Hz, 1H, H-5); 1,41 (m, H-6); 1,38 (m, H-7); 1,40 (m, H-9); 1,81 (m, H-11); 5,14 (t, J= 3,3Hz, 1H, H-12); 0,93 (m, H-15); 1,56 (m, H-16); 2,09 (d, J= 11,5Hz, 1H H-18); 1,35 (m, H-21); 0,90 (m, H-22); 0,88 (s, 3H, H-23); 0,67 (s, 3H, H-24); 0,82 (s, 3H, H-25); 0,71 (s, 3H, H-26); 0,99 (s, 3H, H-27); 0,76 (d, J= 6,5 Hz, 3H, H-29); 0,85 (d, J= 6,2 Hz, 3H, H-30). ¹³C RMN [?] (ppm) (DEPT 135): 36,7 (C1); 26,7 (C2); 78,7 (C3); 38,5 (C4); 55,1 (C5); 18,1 (C6); 32,9 (C7); 39,3 (C8); 47,4 (C9); 36,8 (C10); 23,1 (C11); 125,3 (C12); 138,0 (C13); 41,9 (C14); 27,9 (C15); 24,1 (C16); 47,5 (C17); 52,7 (C18); 38,7 (C19); 38,9 (C20); 30,5 (C21); 20,9 (C22); 27,8 (C23); 15,4 (C24); 15,2 (C25); 16,7 (C26); 23,3 (C27); 180,4 (C28); 20,9 (C29); 16,8 (C30).

Actividad antiplasmodial de extractos y del ácido ursólico: Realizando las curvas dosis-respuesta y ajustando el comportamiento de los datos a una ecuación polinomial y resolviendo dicha ecuación, se calcularon las IC₅₀, los intervalos de confianza y los coeficientes de correlación para ambos métodos (radioisotópico y método HRP-2) (Tabla 1). Se realizaron además curvas sigmoideas dosis-respuesta con pendiente variable (Véase Grafico 1 y Grafico 2). La CQ presentó una adecuada relación dosis-respuesta y una IC₅₀ de 0,188 µg/mL (0,36µM) por el método HRP-2 y para el radioisotopico de IC₅₀ = 0,089 µg/mL (0,17µM).

Tabla 1. Actividad antiplasmodial de extractos y del ácido ursólico en la cepa FCB-2 de *P. falciparum* utilizando dos métodos.

Inhibición de crecimiento de <i>P. falciparum</i>						
Cepa FCB-2						
Muestra	Método Radioisotópico			Método HRP2		
	IC50 (µg/mL)	Intervalos de Confianza 95%	R ²	IC50 (µg/mL)	Intervalos de Confianza 95%	R ²
ExtH	23,85	18.62 - 30.54	0,98	ND	ND	ND
ExtD	26,89	24.35 - 29.69	0,99	15,82	13.87 - 18.06	0,99
ExtAE	42,5	37.48 - 48.19	0,99	42,99	39.63 - 46.64	0,99
ExtM	6,33	5.871 - 6.820	0,99	13,34	11.12 - 16.01	0,98
Acido Ursólico	24,48	20.57 - 29.13	0,99	46,28	28.94 - 74.00	0,94
CQ	0,089 (0,17*)			0,188 (0,36*)		

CQ= Cloroquina *Unidades micromolar µM

ND = No determinado

Actividad antiplasmodial metodo Radioisotopico

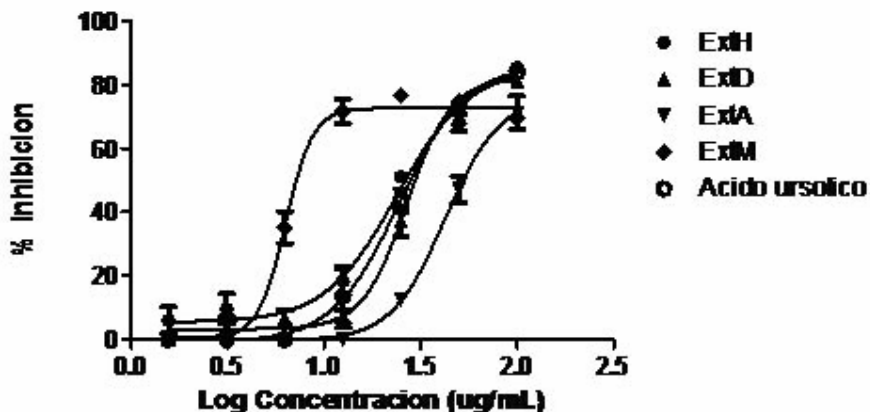


Gráfico 2: Curva sigmoidea dosis-respuesta con pendiente de Hill (pendiente variable), Log Concentración Vs % Inhibición mediante el método HRP-2.

La actividad antiplasmodial de los extractos será clasificada según Jonville M, et al (2008)(21) con modificación hecha por nosotros. En este trabajo se obtuvieron coeficientes de correlación (R^2) estadísticamente significativos para todas las muestras evaluadas encontrándose una relación lineal entre las dos variables cuantitativas analizadas para los cuatro extractos de diferente polaridad y para el ácido ursólico. El extracto metanólico presentó una promisoriosa actividad con IC_{50} entre 6-15 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50} = 6,33 $\mu\text{g/mL}$ 13,34 $\mu\text{g/mL}$ para el método radioisotópico y HRP-2 respectivamente) lo que sugiere la presencia de metabolitos activos. El extracto de diclorometano presentó moderada actividad antiplasmodial (16-30 $\mu\text{g/mL}$) IC_{50} = 26,89 $\mu\text{g/mL}$ en Radioisotópico IC_{50} = 15,82 $\mu\text{g/mL}$ en HRP-2, igualmente para el extracto de Hexano con IC_{50} = 23,85 $\mu\text{g/mL}$ en radioisotópico pese a que no se determinó el valor de IC_{50} por el método HRP-2. El extracto de acetato de etilo presentó baja actividad antiplasmodial (31-50 $\mu\text{g/mL}$). Por otra parte se aisló y caracterizó un compuesto de fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$ de naturaleza triterpénica pentacíclica con esqueleto tipo ursano caracterizado por la orientación ecuatorial (?) del grupo hidroxilo en posición 3 y un grupo carboxilo en posición 28, conocido como ácido ursólico, para este compuesto la actividad antiplasmodial fue moderada actividad antiplasmodial IC_{50} = 24,84 $\mu\text{g/mL}$ en radioisotópico; IC_{50} = 46,28 $\mu\text{g/mL}$ en HRP-2, encontrándose una correlación con los datos reportados en la literatura, el ácido ursólico puede ser empleado como un potencial fármacofo en el diseño de nuevos candidatos antimaláricos, donde las hojas de *C. inophyllum* son una fuente de obtención de este compuesto(17-18). Este tipo de triterpenos y sus derivados han sido reportados con actividad anti-HIV(19) y han presentado citotoxicidad en líneas celulares tumorales(20). Sin embargo, otros compuestos de naturaleza triterpénica pentacíclica de tipo ursano y oleano aislados de *Gardenia saxatilis* como el ácido messagenico A, y ácido

messagenico B, y una mezcla de ácido uncarinico E, ácido 27-O-p-(E)-coumaroiloxioleanolico y ácido 27-O-p-(E)-coumaroiloxiursolico presentaron actividad antiplasmodial $IC_{50} = 1,5; 3,8$ y $2,9 \mu\text{g/mL}$, respectivamente¹⁷. Posiblemente la actividad de este tipo de compuestos sea atribuida al grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo pentacíclico y por la función ácida del carbono 28 además de su distribución espacial⁽¹⁹⁾. Lo anterior nos hace pensar que el ácido ursólico, puede ser empleado como una plantilla estructural para el desarrollo de estudios QSAR (Relación estructura - actividad) con el fin de potenciar su actividad. En lo que respecta a las técnicas empleadas para valorar la actividad antiplasmodial, hay una semejanza con los resultados de IC_{50} obtenidos por ambos métodos excepto para el extracto de hexano (ExtH), esta diferencia posiblemente se deba a su pobre solubilidad en sistemas acuosos. Por otra parte el método radioisotópico es una técnica costosa y emplea material radioactivo, pero por su gran sensibilidad es la técnica más recomendada para el análisis de una muestra problema y el método HRP2 es simple, presenta un impacto ambiental bajo y puede ser empleado para evaluaciones preliminares de muestras complejas como un extracto. Ambas técnicas son validas para determinar la actividad antiplasmodial de tanto de extractos y compuestos de uso natural como de moléculas obtenidas por síntesis.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por el ministerio de agricultura de Colombia proyecto (No. 009-2007-V7552-38-07) y a la Universidad de Antioquia. Al profesor Bruno Figadere de la universidad de París por la realización de los espectros. A la Bacterióloga Eliana Arango por la realización de los ensayos de actividad antiplasmodial con la técnica HRP-2.

Referencias:

1. Botero D, Restrepo M, Parasitosis humanas. 3° edición. Medellín CIB. 1998. 159-201.
2. Robert A, Dechy-Cabaret O, Cazelles J, Benoit-Vical F, Meunier B. Recent Advances in Malaria Chemotherapy. Journal of the chinese chemical society. 2002; 49: 301-10.
3. WHO (World Health Organization) guidelines for the treatment of malaria. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data by Dr P. Olumese, 2006.
4. WHO (World Health Organization) report, 2008 Geneva. Páginas 9-11.
5. Vipani K, Mahajan A, Chibale K. Synthetic medicinal chemistry of selected antimalarial natural products. Bioorganic and medicinal chemistry. 2009; 17: (6), 2236-75
6. Haynes R, Krishna S. Artemisinins: activities and actions. Microbes and infection. 2007; 6: 1339-46.
7. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. Journal Natural Products 2007; 70: 461-77.
8. Hay AE, Helesbeux JJ, Duval O, Labaied M, Grellier P, Richomme P. Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*. Life Sciences. 2004; 75: 3077-79.
9. Noldin V, Buffon ID and Cechinel FV. *Calophyllum* Genus: Chemical and pharmacological importance. Quimica Nova. 2006.29 (3): 549-554.
10. Deharo E, Gautret P, Muñoz V, Sauvain M. Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas. Ciudad, Corporación Iberoamericana CYTED, 2000. Institut de recherche pour le développement IRD, 51-52.
11. Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD and Chulay JD. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1979 ; 16 (6) :710-718.
12. Le Bras J, Deloron P. In vitro study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: evaluation of a new semi-micro test. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. ,1983 : 32 (3) : 447-51.
13. Noeld H. Malaria drug sensitivity testing. <http://malaria.farch.net>. 28 de Septiembre 2009.
14. Parapini S, Basilio N, Pasini E, Egan TJ, Olliaro P, Taramelli D, et al. Standardization of the physicochemical parameters to assess in vitro the α -hematin inhibitory activity of antimalaria drugs. Experimental parasitology. 2000 ; 96 : 249-6.
15. Brand J, (1779). Abril 18/90 Cesar. San Alberto. Indupalma 200 m.s.n.m.
16. Trager-Jensen JB. Human malaria. Parasites in continuous culture. 1976. Science ; 193:673-5.
17. Suksamrarn A, Tanachatchairatana T, Kanokmedhakul S. Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. Journal of Ethnopharmacology. 2003; 88: 275-77.
18. Gnoatto SC, Susplugas S, Vechia L, Ferreira TB, Dassonville-Klimpt A, Zimmer KR, et al. Pharmacomodulation on the 3-acetylursolic acid skeleton: Design, synthesis, and biological evaluation of novel N-{3-[4-(3-aminopropyl)piperazinyl]propyl}-3-O-acetylursolamide derivatives as antimalarial agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 16 ; 2008. Pag 771-782.

- 19.Kuo-Hsiung L, Morriss-Natschke SL. Recent advances in the discovery and development of plant-derived natural products and their analogs as anti-HIV agents. Pure and applied chemistry . 1999; 71 (6):1045-51.
- 20.Ma Chao, Cai Shao, Cui Jing-Rong, Wang R, Peng-Fei Tu, Hattori M, Daneshtalab M. The cytotoxic activity of ursolic acid derivatives. European Journal of Medicinal Chemistry. 2005; 40: 582-89.
- 21.Huber W, Koella JC. A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drug resistance of malaria parasites. Acta Trop 1993; 55, 257-261.
- 22.Jonville MC, Kodja H, Humeau L, Fournel J, De Mol P, Cao M, Angenot L, Frédérick M. Screening of medicinal plants from Reunion Island for antimalarial and cytotoxic activity. Journal of Ethnopharmacology, Volume 120, Issue 3, 8 December 2008, Pages 382-386.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 10, Agosto 2011

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Química en retrospectiva

Parte 1: Origen y evolución

Dr. Esteban L. Ravaschino

Agrofina S.A. Joaquín V.González. 4977. C.A.BA.

e-mail: eravaschino@agrofinas.com.ar

Recibido el 01/07/11

Aceptado el 15/07/11

Resumen

Como toda ciencia básica, la química, en su antigüedad y amplitud, nos inhibe de identificar su origen exacto, tanto asociado a una civilización en particular como en un tiempo determinado. Es que lo que hoy conocemos como química fue gestándose desde los inicios del hombre y creciendo, junto con su saber general, a medida que éste aprendía a manipular los elementos de la naturaleza que lo rodeaba.

En esta sección pretendemos asomarnos brevemente al desarrollo de los acontecimientos que fueron dando lugar a la construcción de esta ciencia, desde los tiempos más remotos en la forma de habilidades adquiridas para manipular algunos componentes de la naturaleza al servicio del hombre, pasando por la alquimia, hasta llegar a su establecimiento como ciencia formal.

A lo largo de este recorrido iremos deteniéndonos en hitos importantes como el descubrimiento de los elementos químicos, distintos compuestos relevantes u otros acontecimientos fundamentales o fundacionales.

Iniciaremos nuestro recorrido en la prehistoria e iremos avanzando cronológicamente a lo largo de las distintas épocas, sin pretender ser exhaustivos pero sí intentando contextualizar los acontecimientos que fueron construyendo esta ciencia.

Palabras clave: química- historia- alquimia

Chemistry in retrospect

Part 1. Origin and evolution

Abstract

Due to its antiquity and extension, Chemistry, alike all basic sciences, unable us to identify its exact origin. Either related with a particular civilization or at a given time. What we know now as Chemistry was brewing since the beginning of the human being history and grew, along with his general knowledge, as man learned to manipulate the elements of the surrounding nature. In this section we intend to peek briefly at the developments that were leading to the construction of this science, from the earliest times in the form of skills acquired to manipulate some components of nature to serve man, passing through alchemy, up to its establishment as a formal science.

Throughout this tour we will stop at important milestones as the discovery of chemical elements, other relevant compounds or other major events.

We will start our journey into the prehistory, going forward chronologically along the ages and trying not to be exhaustive but to contextualize the events that contributed to build this science.

Key words: *Chemistry – Alchemy. History*

La prehistoria

Cuando se habla del dominio del fuego como el inicio de una era, nada puede ser más cierto. Si bien su beneficio inmediato fue la posibilidad de combatir el frío y cocinar los alimentos, facilitando así su digestión y destruyendo posibles contaminaciones bacterianas, también es cierto que se abrió la puerta de acceso a la manipulación química de la naturaleza en general.

Sin embargo, recién unos 10.000 años antes de Cristo el ser humano, fue capaz de desarrollar nuevas habilidades que involucraban cambios físicos y químicos en la materia, promovidos por el calor. Así, en el período neolítico apareció la cerámica y, más tarde, en el período calcolítico, la metalurgia a través de la fundición y manipulación del cobre y posteriormente del bronce. Finalmente, la vidriería surgió antes del 1.000 a.C. Estas técnicas pueden considerarse, junto con la cocción de los alimentos y la elaboración de colorantes y perfumes, como las primeras aplicaciones derivadas de la manipulación intencionada de la naturaleza en beneficio del hombre.

Podemos decir, sin temor a equivocarnos, que en la prehistoria, el aprendizaje de las técnicas antes mencionadas estaba despojado de toda búsqueda de respuestas a preguntas sobre el funcionamiento de la naturaleza, sino que tenían ciertamente un objetivo práctico. Por otro lado, es el momento al que se remonta el descubrimiento de los primeros elementos químicos, casi todos ellos metales (cobre, oro, plata, hierro y estaño) y, probablemente, el carbono en la forma de carbón vegetal. Sin embargo, pasarían siglos hasta que el hombre tomara conciencia de que se hallaba ante elementos químicos en su estado natural.

La antigüedad

Ya en la antigüedad, paralelamente al desarrollo de las habilidades puramente técnicas, existía también un interés por explicar los elementos de la naturaleza y las fuerzas que guiaban los cambios en ellos. Precisamente, el término *elemento* tenía, en sus orígenes, un significado más amplio del que tiene el término *elemento químico* al que hoy estamos tan acostumbrados. Esta transformación, o mejor dicho, evolución del significado del término *elemento* tiene su paralelo en la química. Es por ello interesante intentar dilucidar también los orígenes del término *química*, ya que la aparición de una actividad con identidad propia está indefectiblemente asociada a la necesidad de nombrarla. Esta actividad, estaba asociada en sus orígenes a las artes ocultas u oscuras, ya que a falta de conocimientos en los que basarse, la observación de los cambios ocurridos en ciertos procesos químicos llevó a encontrar como toda explicación la magia y el poder divino. Así es como Plutarco nos refiere

que el término *Chimia*, derivación griega de los términos egipcios *Chema* o *Chemi*, eran utilizados por los últimos para denominar un tipo de suelo compuesto por tierra negra, y también al iris del ojo, como símbolo de lo oscuro y oculto. El término cóptico *Khems* o *Chems* significa oscuro u oculto y, también relacionados a éstas, la palabra árabe *Chema* significa *esconder*. De hecho, los egipcios, reservaban la práctica de estas artes ocultas a ciertos curas, a quienes les estaba prohibido trasmitirlas a nadie, salvo al heredero al trono y a otros sabios en la materia, es decir otros alquimistas. Además de los egipcios, muchas otras sociedades antiguas cultivaban la alquimia de manera similar, como los caldeos, chinos, judíos y algunos pueblos arios de la India. Sin embargo, la tradición entre los alquimistas rezaba que el origen de este arte se encontraba en Egipto y que su fundador había sido Hermes Trismegistus, dios del arte y de la ciencia. Debemos recordar aquí que se trataba de la ciencia de lo oculto y nada tenía que ver con lo que entendemos por ciencia en la actualidad, sino todo lo contrario. La mayoría de los pueblos de la antigüedad tenían una gran incapacidad para ver regularidades en la naturaleza en general y en particular en los procesos de transformaciones químicas. Los estudiosos en la materia dedicaban su tiempo a experimentar y registrar los fenómenos en escritos, muchas veces confusos, atribuyendo lo observado a fuerzas sobrenaturales. O sea, su experimentación era puramente exploratoria y en ningún caso diseñaban sus experimentos para contrastar los resultados obtenidos con alguna teoría elaborada a raíz de la observación.

Los griegos, en cambio, se encontraban en el polo opuesto. La idea de la experimentación de los alquimistas no se conjugaba con la idea de filosofía vigente en la Grecia antigua. Contrariamente a éstos, los primeros filósofos intentaban explicar la naturaleza mediante distintas teorías que elucubraban sin contrastación experimental alguna. Sus teorías sobre la naturaleza eran ejercicios intelectuales que no se sometían a otra prueba más que las críticas de otros filósofos, pero nunca a experimentos para corroborarlas o refutarlas. Llega a ser notable como a través de la pura argumentación filosófica, Demócrito formuló una teoría atómica de la materia de asombrosa similitud a la de Dalton, unos 2.200 años antes. Tomando la idea de su predecesor Leucipo, de que toda materia estaba formada por partículas minúsculas e indivisibles que sólo difieren en tamaño y posición, la expandió y formuló una teoría completa que predicaba que los átomos tienen propiedades de masa, forma y tamaño, y que esas propiedades son las que determinan su comportamiento y apariencia. Más aún, la existencia del mundo y del ser humano tenía su origen en estos átomos y las combinaciones debido a sus propiedades y no en la acción de los dioses ni de fuerzas sobrenaturales. Esto último le valió, como ha pasado innumerables veces en la historia, el rechazo y la censura de la mayoría de los ancianos griegos quienes creían que todos estos hechos estaban determinados por los dioses del Olimpo.

Fuera del atomismo de Demócrito y Leucipo, existían los llamados pluralistas, quienes tomando la cosmología indo-aria basada en la clasificación del mundo físico en cinco elementos asociados a los sentidos humanos: tierra (olor), aire (tacto), agua (gusto), fuego (vista) y éter (oído); afirmaban que el universo estaba compuesto de distintas sustancias

básicas que la componían. Para algunos había una principal y otras secundarias. Para Empédocles eran tierra, aire, agua y fuego, por igual, los elementos básicos que componían el universo todo. Estos elementos se interpenetraban y combinaban en distintas proporciones para formar la materia, tanto animada como inanimada, y las fuerzas que gobernaban las uniones y disociaciones eran Amor y Discordia, respectivamente. A pesar de la carga religiosa de esta teoría, en la que el Amor era representado muchas veces por la diosa Afrodita, podemos ver en ella una similitud con las teorías modernas en las que se explica la interacción entre la materia en términos de fuerzas de atracción (Amor) y repulsión (Discordia). También es cierto que la teoría de que todos los materiales presentes en la naturaleza son combinaciones de cuatro elementos básicos se desprendía de la observación y de una clasificación lógica según ciertas propiedades de la materia, como el calor y la humedad. Esto era mucho más intuitivo que la teoría de Demócrito, derivada de argumentaciones filosóficas. Era razonable, en una época en la que era imposible observar o deducir mediante experimentos el comportamiento de la materia a escala atómica (en el sentido que hoy tiene la palabra), que los elementos básicos de la naturaleza fueran las expresiones máximas de cada una de las cuatro combinaciones de las dos propiedades mencionadas arriba: fuego (seco y caliente), agua (húmedo y frío), aire (húmedo y caliente) y tierra (seco y frío).

Más tarde, cuando ya las ideas atomistas habían sido dejadas completamente de lado, Aristóteles, tomando de Empédocles la clasificación de la materia en los cuatro elementos básicos, elaboró una teoría acerca de la materia en la que postuló que estos cuatro elementos no son, en realidad, los componentes últimos de las sustancias de la naturaleza. La misma está, en cambio, formada por lo que llamó *materia prima*, y los elementos (teóricos dentro de este esquema) representan las cuatro cualidades fundamentales que le confieren las propiedades a la *materia efectiva* dándole las distintas formas particulares a la *materia prima*. A su vez, al tratarse de un cambio de formas y no un cambio esencial, era posible una transformación de la materia mediante la sustitución de una de las cualidades por la opuesta. (Figura 1)

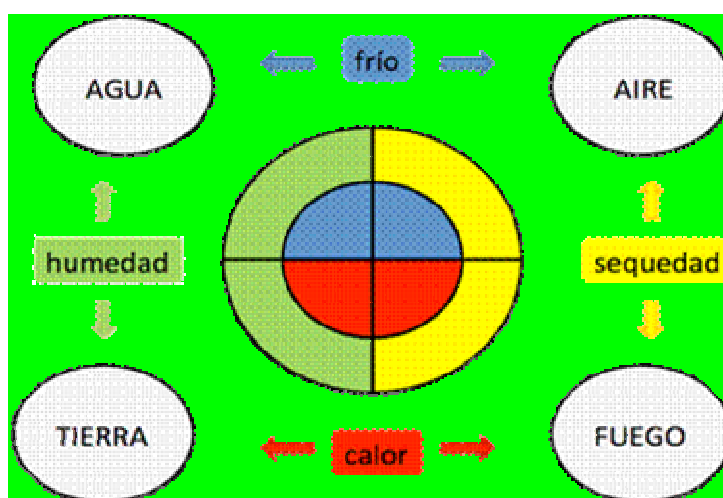


Figura 1. Interconversión de los elementos

Según este esquema, los elementos podían interconvertirse uno en el otro si se cambiaba una de alguna de las cualidades que los definía. Si bien, según Aristóteles, esa interconversión ocurría en raras ocasiones, esta idea bastó para sentar los antecedentes filosóficos de los que los alquimistas llamarían luego la transmutación de los elementos.

Fuera de este mundo, en el mundo celestial, Aristóteles concibió un quinto elemento: el éter. Este elemento, también conocido como quinta esencia, era independiente de los otros cuatro y era la materia de la que estaba formada el eterno e incorruptible mundo celeste.

Las bases de la alquimia

Como dijimos antes, los antiguos filósofos griegos no sometían a pruebas experimentales sus teorías. Fueron los alquimistas, ya en los comienzos de la era cristiana, los que se dedicaron a estudiar y poner en práctica la transmutación de los elementos, si bien esto no implicaba poner a prueba la teoría sino buscar realizar en la práctica lo que se daba por sentado. El interés principal de los alquimistas estaba puesto en la transmutación de los metales y, principalmente los metales básicos en oro.

Esto no le quita importancia a la gran cantidad de experimentación y, en algunos casos, registros que se llevaron a cabo y fueron contribuyendo al saber empírico general. Eran los alquimistas, también, los que aplicaban su pericia química a fines más prácticos que involucraban procesos químicos como la metalurgia, vidriería, perfumería, teñido, etc.

La clasificación y denominación de compuestos químicos se realizaba por sus propiedades físico-químicas cuando se suponía que se estaba en presencia de una sustancia pura. Algunas de estas “sustancias” coincidían con lo que hoy se sabe que son compuestos químicos puros y otras se trataban de mezclas homogéneas identificadas con ciertas características particulares.

Conocimientos químicos de la antigüedad

Elementos y compuestos

Los metales conocidos e identificados desde la antigüedad eran el oro, plata, estaño, hierro, cobre, plomo y mercurio. Las primeras referencias que se conoce de estos elementos provienen del poeta griego Homero (unos nueve siglos antes de la era cristiana). También en la Biblia se ha hecho mención a ellos. Estos metales eran extraídos de minas y, de hecho, la palabra metal deriva del término griego mettalaw, que tiene que ver con el hecho de “ir detrás” de los mismos. Muchos de éstos eran conocidos, como mencionamos antes, desde la prehistoria. Probablemente, la extracción de metales haya comenzado con los que se encontraban en su estado elemental como el oro y el cobre, atrayendo la atención del hombre por su brillo natural.

El desarrollo de procesos químicos en este rubro comenzó con la necesidad de separar los metales puros de los minerales originales en los que se encuentran combinados con otros elementos, mayormente oxígeno y azufre. Es decir que una de las primeras reacciones químicas que se utilizaron en un proceso químico fue la de reducción para generar el metal

puro a partir de sus óxidos o sulfuros respectivos. En este proceso jugaba un papel clave otro elemento: el carbono, cuya fuente era casi exclusivamente el carbón vegetal. El carbón cumplía el doble papel de reductor para completar la reacción de óxidoreducción y el de proporcionar la energía necesaria para que esta se llevara a cabo a través de su combustión.

Se cree que una de los primeros minerales tratados de esa manera fue la Malaquita (carbonato de cobre II) conocida en el Medio Oriente desde el quinto milenio antes de la era cristiana y utilizada, sobre todo por los egipcios, como pintura cosmética. Sin embargo, su nombre deriva se origina en la isla de Chipre (*Cyprus*) de donde lo importaban los romanos quienes lo bautizaron *cyprum*, y posteriormente *cuprum*. En realidad, el cobre se encontraba muy extendido en distintas formas minerales y por eso fue uno de los primeros metales con mayores usos prácticos, como la fabricación de armas y herramientas. La plata, en cambio, se hallaba junto con el plomo en el mineral Galena (sulfuro de plomo II) y el proceso de extracción era un poco más complicado. En éste la plata se podía recuperar como una aleación con plomo por calentamiento, separándose el azufre de la aleación fundida, y luego eliminándolo por mayor calentamiento. La plata pura se podía obtener por un proceso llamado cupelación en la cual se funde la aleación de plata y plomo en un crisol de arcilla, el último es oxidado por la acción de un chorro de aire y se separa de la plata fundida. Este proceso se conoce probablemente desde el tercer milenio antes de la era cristiana y era aplicado también a la purificación de oro, mediante el agregado de plomo al metal impuro. El estaño en su forma pura tiene, en cambio, un origen impreciso. En parte porque no se diferenciaba claramente del plomo y en parte porque se encontraba formando parte del bronce, cuyo componente principal es el cobre. Por otro lado el término *bronce* no refería a una única aleación, sino a una aleación de cobre con distintos metales, además del estaño, como antimonio, arsénico o zinc, metales que no fueron identificados hasta muchos siglos después de su uso en los distintos bronce, que reemplazaron al cobre por su mayor facilidad para moldearlo gracias a su menor punto de fusión. Así es como los romanos consideraban al plomo y al estaño como variedades del mismo metal, llamándolos *plumbum nigrum* y *plumbum candidum*, respectivamente.

El mercurio metálico se conocía en China y en India debido a que se encontraba formando pequeñas gotas en la superficie del mineral llamado cinabarita (sulfuro de mercurio), el cual, al igual que los egipcios, molían y usaban como colorante dado su intenso color rojo. Luego de estos hallazgos, fácilmente se descubrió que el calentamiento favorecía el desprendimiento de este metal líquido o plata líquida (*hydrargyrum*) del mineral de origen.

Si bien el hierro se conocía desde hacía tiempo, gracias a la presencia de meteoritos, su uso no reemplazó al del bronce hasta que no avanzaron las técnicas de fundición, logrando más altas temperaturas unos 1.000 años a.C, en Medio Oriente. La principal razón de esto es el elevado punto de fusión del mismo (1.535 °C) respecto del cobre (1.083 °C) y del bronce (800 -1.000 °C). Por otro lado no se podían obtener buenos filos y los objetos fabricados con el metal puro se oxidaban fácilmente y no eran lo suficientemente duros para funcionar como armas o herramientas. Recién unos siglos más tarde se descubrió que el agregado de carbón al hierro al rojo le confería dureza, aunque no fue hasta entrada la era cristiana, con hornos

más grandes y de mayor temperatura cuando comenzó la producción de acero con hierro de fundición. Así es como rápidamente proliferaron las espadas y dagas de acero que tanto sirvieron a las legiones romanas de los comienzos de la era cristiana.

Además de los óxidos y sulfuros mencionados se conocían una serie de sales y minerales con usos particulares como pigmentos o aditivos para vidrios. El *verdigris* (acetato de cobre II) era fabricado a partir de vino depositado sobre platos de cobre y mayormente utilizado como pigmento por su intenso color verde azulado. Otros pigmentos conocidos eran el plomo blanco (un mineral compuesto por carbonato e hidróxido de plomo II), plomo rojo (tetróxido de plomo, óxido mixto de plomo II y plomo IV), estibinita (sulfuro de antimonio) utilizado para oscurecer cejas y pestañas por su color gris plomo y los sulfuros de arsénico oropimente (sulfuro de arsénico III, color amarillo nacarado) y realgar (sulfuro de arsénico IV, de colores que van del amarillo al rojo), muy utilizados por los romanos. En la manufactura del vidrio eran conocidos la pirolusita (Óxido de Manganeso IV), utilizada por los egipcios en vidriería para decolorar. Como colorantes eran conocidos el carbonato de zinc, de muy diversos colores según su estructura cristalina, azurita (hidroxicarbonato de cobre II) y azul de Egipto (un silicato de cobre II y calcio) para vidrios azules, asbolita (un mineral de cobalto) para azul oscuro, minerales de hierro para el verde y bindehimita (un mineral de plomo y antimonio) para el amarillo. El carbonato de sodio era utilizado para bajar el punto de fusión de la arena a partir de la cual se fabricaba el vidrio. La soda y la potasa (hidróxido de sodio y potasio, respectivamente) eran utilizados también en la manufactura de vidrio, como blanqueadores de ropa y para saponificar grasas y aceites, lo que ya se hacía desde tiempo remotos utilizando cenizas de madera.

En cuanto a elementos no metálicos ya hemos mencionado al carbono y también conocían el azufre, que era subproducto de la reducción de los metales contenidos en minerales azufrados. Uno de los usos que se le conoce es el de desinfectante.

La lista de compuestos orgánicos que se conocían es mucho más reducida. El único ácido que se conocía era el acético, del vinagre, muy utilizado como solvente. El otro compuesto es obviamente el etanol, contenido en las bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación frutal, y precursor del primero.

Operaciones

Una vez más aparecen los egipcios como pioneros en el desarrollo de tecnología en el campo de la química. Se cree que los perfumistas egipcios del segundo milenio antes de la era cristiana desarrollaron las técnicas de destilación, extracción y sublimación. Se sabe que en la época en la que reinaba el Faraón Tutmosis III (1400 a.C.) la cosmética egipcia era más que importante: los perfumes eran a base de aceites y se obtenían directamente por extracción de los aceites frutales, o bien por extracción de las esencias presentes en flores o maderas perfumadas mediante aceites o grasas animales.

Conclusiones

En este breve recorrido desde la prehistoria a los comienzos de la era cristiana hemos dado un vistazo a los orígenes del pensamiento, la experimentación y las aplicaciones tecnológicas de una química en proceso de gestación.

En el próximo capítulo intentaremos adentrarnos en la era de esplendor de la alquimia, indagando los avances y retrocesos, descubrimientos y teorías surgidas antes de que evolucionara en la ciencia que hoy conocemos y llamamos química.

Bibliografía

- *A Short History of Chemistry*, F.P. Venable. D.C. Heath & Co., 1894
- *Panorama general de historia de la ciencia*, El mundo antiguo: Griegos y Romanos, A. Mieli, Espasa-Calpe, 1945.
- *A Short History of Technology*, T.K. Terry and Trevor I. Williams, Dover Publications, Inc., 1993
- *A Brief History of Chemistry*, M. Ridenour, A.W.S.N.A, 2004.
- *Breve historia de la filosofía occidental*, A. Kenny, Paidós, 2006.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 10, Agosto 2011

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar