Química Viva
E-ISSN: 1666-7948
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar
Universidad de Buenos Aires
Argentina

Coto, Celia E.
Final de un ciclo
Química Viva, vol. 12, núm. 3, -diciembre, 2013, pp. 164-166
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86329278001

Cómo citar el artículo
Número completo
Más información del artículo
Página de la revista en redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Editorial

Final de un ciclo

Dra.Celia E.Coto
Directora de QuímicaViva

En el mes de Diciembre de 2002 apareció el primer número de *QuímicaViva,* iniciando así un ciclo que abarca un período de once años consecutivos en el ciberespacio. Durante esta etapa hemos publicado un total de 33 revistas con una periodicidad cuatrimestral y un número extra dedicado a la educación y problemática de la enseñanza de las ciencias exactas.

La sugerencia de iniciar una publicación científica como actividad del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales provino de la Directora del Departamento de aquella época, la Dra. Beatriz Silvia Méndez. La propuesta, aceptada con entusiasmo por algunos docentes investigadores que luego constituyeron el comité editorial, tuvo como actividad fundante elegir un nombre para la publicación. La elección de *QuímicaViva* ha resultado con el transcurrir del tiempo, un verdadero acierto en el sentido que hemos podido publicar un amplio abanico de temas porque la química de los seres vivos incluye no sólo lo que atañe a los seres en sí mismos sino también a su hábitat que es la naturaleza toda.

A partir de Agosto de 2004 disponemos de un sistema de estadísticas que nos ha permitido apreciar cómo ha ido evolucionando el interés en la revista o dicho de otro modo cómo hemos podido trascender en un mundo abigarrado de comunicaciones de todo tipo, aunque la mayoría de ellas sin ningún valor educativo.

Los datos generados por *AWSTATS* son complejos y muy completos, con el fin de arribar a algunas conclusiones sólo hemos considerado aquí algunos de ellos como el número de visitantes, y el porcentaje de ellos que deciden incluir nuestro sitio entre sus favoritos. Partimos de un número de visitantes en el 2004 de 28.398 que se triplicó en 2005, septuplicó en 2006 y que a partir de 2009 alcanzó un valor cercano a los 400.000, valor que se mantuvo e incrementó en 2012 llegando al número de 541.677 visitantes. Realmente son cifras que impresionan, para comprenderlas en su realidad deberíamos observar cuánto tiempo una visita dedica a su incursión por *QViva* y ahí veremos que no todos se detienen a revisar la revista. Si consideramos que hay un promedio de 1,1% de visitantes que se detienen entre 30 y 60 minutos, podemos calcular una cifra aproximada de 5416 lectores por año, un número muy significativo. Un valor similar se puede calcular considerando que alrededor del 50% de los visitantes incorporan la dirección de QViva a su sitio de favoritos.

Nosotros pertenecemos al grupo de revistas de acceso libre de modo que todos nuestros artículos se pueden bajar sin costo en formato pdf. Por esta circunstancia muchos lectores nos han agradecido la posibilidad de incursionar en temas de interés actual con la ventaja que dicha información está escrita en castellano.

Sin embargo, nuestra tarea no ha sido fácil, en especial en lo que se refiere a la publicación de trabajos originales de investigación. Al igual que en la mayoría de los países con un núcleo importante de científicos, en la Argentina se exige que los investigadores publiquen en revistas de alto impacto. *QuímicaViva* no se ha ocupado hasta hoy del tema y a pesar de la visibilidad que tiene un artículo publicado en *QViva* sólo podría ser considerado como antecedente en las carreras de investigación bajo el rubro divulgación ya que carece de dicho factor. No obstante, recibimos habitualmente un gran número de trabajos de países de Latinoamérica y de España. Lamentablemente la tasa de rechazo de muchos de estos trabajos ha sido muy alta. El sistema de evaluación de la revista se basa en solicitar la opinión sobre la calidad del trabajo a un juez experto, y a veces, a dos. Generalmente estos jueces son investigadores de CONICET en los que confiamos sin reservas. En algunas oportunidades nuestras críticas han servido para mejorar sensiblemente la calidad de los trabajos recibidos, en otras oportunidades la pobreza de los contenidos nos ha obligado al rechazo definitivo. Estamos entonces frente a un verdadero nudo gordiano. Mantener un nivel de calidad aceptable de los trabajos publicados y poder disponer de un número significativo de publicaciones. Estando los hacedores de *QViva* inmersos en un centro universitario de alta calificación dentro del campo de la investigación hemos recibido pocos trabajos inéditos aunque sí numerosas actualizaciones. De esta forma muchos se preguntan si *QViva* es una revista de investigación o de divulgación. Creemos que aquí es necesario aclarar que la divulgación tal como es entendida por muchos, tiene como blanco un público lego. Las actualizaciones o revisiones de *QViva* se dirigen a un público que oscila entre investigadores de otras ramas que les interesan conocer temas diferentes, profesores docentes de la escuela secundaria o universitaria que desean actualizarse en temas complejos y de vanguardia y por último estudiantes universitarios que realizan tesis o tesinas y que generalmente no encuentran lecturas específicas en español. Esto último no es una mera suposición es el fruto de la correspondencia recibida de muchos lectores-alumnos agradeciendo la publicación de temas de su interés de escasa propagación.

Si bien originariamente el objetivo de *QViva* fue ser vehículo de nuevos conocimientos científicos, con el tiempo nos pareció importante dedicar espacio de la revista a temas relacionados con la educación en sus niveles secundario y universitario. Así es como muchos profesores han escrito propuestas para aplicar en las prácticas de las diferentes carreras relacionadas con la química. Mientras que en otros casos hemos recibido trabajos que exponen tesis sobre cómo debería ser la educación terciaria. De modo que a nuestro criterio y para resumir hemos realizado una tarea muy eficaz en el campo de la educación no sólo con temas educativos puros sino también mediante las actualizaciones escritas por expertos en un lenguaje comprensible que brindan los últimos conocimientos sobre temas de gran interés, permitiendo a otros docentes, que puedan transmitir dichos conocimientos a sus alumnos.

El próximo año *QuímicaViva* cambiará su dirección y adoptará un formato de Comité editorial y científico acorde con las exigencias del CONICET para formar parte del núcleo de revistas científicas. Lo que finalmente permitirá lograr un factor de impacto. Seguramente, la

participación de numerosas personalidades científicas de otros países y de la Argentina permitirá la jerarquización de QViva

Esta es, la última editorial de este ciclo y no quiero despedirme sin desear que a partir de 2014 se inicie una etapa fructífera de *QuímicaViva* tanto para sus hacedores como para los lectores que se beneficiarán con su contenido.

QuímicaViva
ISSN 1666-7948
www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva
Número 3, año 12, Diciembre 2013
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Química Viva
E-ISSN: 1666-7948
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar
Universidad de Buenos Aires
Argentina

Oubiña, José Raúl
Día mundial de las hepatitis virales: una buena excusa para honrar a un pro-hombre y para reflexionar ...
Química Viva, vol. 12, núm. 3, -diciembre, 2013, pp. 167-177
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86329278002

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Día mundial de las hepatitis virales: una buena excusa para honrar a un pro-hombre y para reflexionar …

José Raúl Oubiña

Prof Regular Titular del Depto. Microbiología, Parasitología e Inmunología Facultad de Medicina - UBA

Investigador Principal del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Instituto de Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM) UBA - CONICET

¿Por qué se eligió al 28 de julio?

El 28 de julio fue instituido en 2010 por la Asamblea Mundial de la Salud como el "Día Mundial de las Hepatitis virales" en homenaje al cumpleaños del descubridor del agente etiológico de la hepatitis B, el Prof. Baruch Samuel Blumberg, Premio Nobel de Medicina o Fisiología de 1976 (Fig. 1).

Figura 1: "Barry" Blumberg, un investigador que supo ensamblar un rompecabezas de datos epidemiológicos aparentemente inconexos estudiando una "inusual" reacción entre el suero de individuos politransfundidos (por ejemplo, leucémicos) y el de un aborigen australiano. Esa reacción fue detectada en ensayos de inmunodifusión doble de Outcherlony al observar una banda de precipitación que se teñía de rojo con azocarmín (¡para visualizar proteínas!) y no con colorantes para lípidos.

El hallazgo inicial lo llevó a publicar en 1965:

A new antigen in leukemia sera

Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S.

Abstract:

The 'Australia Antigen' is found in the sera of some normal individuals from foreign populations. The total absence of the antigen from the sera of normal United States' subjects and its relatively high frequency in acute leukemia suggests that the presence of the antigen maybe of

value in the diagnosis of early acute leukemia. Whether the antigen results from or precedes the leukemia process remains to be seen.

J Am Med Assoc 1965; 191: 541-546.

¿Por qué recibió el Premio Nobel?

Blumberg indagó si ese "antígeno Au" estaba presente también en el suero de hemofílicos y de pacientes con síndrome de Down. Estaba interesado en conocer si era un antígeno heredado que podía preceder a la leucemia…

Para ello hizo un análisis crucial: evaluó comparativamente la frecuencia de dicho antígeno entre pacientes con síndrome de Down al nacer y a edades mayores, así como entre algunos de ellos internados en instituciones con número diverso de pacientes, o bien cuidados en el hogar. Dado que los pacientes con síndrome de Down exhibían diferencias sustantivas en la prevalencia del antígeno según su edad y el grado de conglomeración de las instituciones donde eran atendidos respecto a quienes lo hacían en sus hogares, demostró que dicho antígeno no era heredable (Fig. 2).

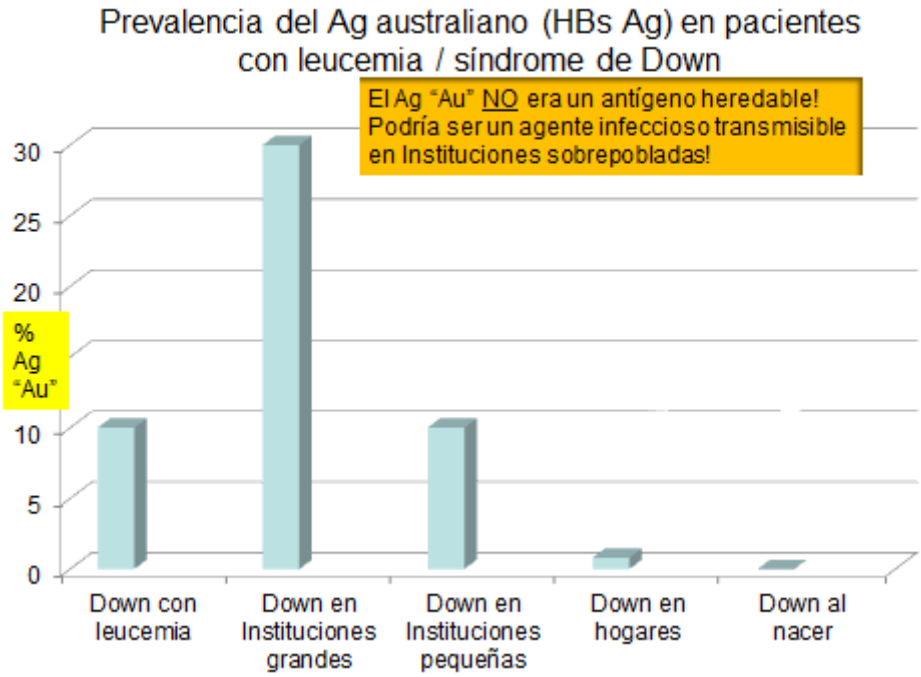


Figura 2: Estudio de prevalencia del antígeno "Au" en diversos grupos poblacionales.

Tiempo más tarde dos eventos inesperados (¡y fortuitos!) lo catapultaron hacia el agente etiológico de la hepatitis B: un paciente con síndrome de Down que no era reactivo en la prueba de inmunodifusión de Outcherlony antes mencionada, devino en "positivo" exhibiendo simultáneamente una suba de las transaminasas hepáticas; y -por si fuera poco- la propia

técnica del laboratorio de Blumberg, Barbara Werner (habitual donante de suero como "control negativo") también observó cómo su propio suero se convertía en reactivo, lo que estuvo asociado concomitantemente a una elevación de las transaminasas hepáticas…

El "asesino serial" - el virus hepatitis B- que usa "armas tan siniestras" como la transmisión sexual o la vía parenteral (por ejemplo con agujas contaminadas) era descubierto a partir de "una pista" - la banda roja teñida con azocarmín- por un "detective" que al mejor estilo de Poirot en una novela de Agatha Christie, lograba un espectacular "caso cerrado". Barry Blumberg, lo había hecho...

El 5 de abril de 2011, a los 85 años de edad este investigador nos dejaba el legado de una tarea titánica que incluiría el desarrollo de la primera vacuna para prevenir la hepatitis B a partir de plasma de individuos persistentemente infectados (purificando partículas subvirales esféricas e inactivando el material con formaldehído). Como el virus homónimo (abreviado: HBV) es capaz de producir cáncer de hígado ¡ésta fue la primera vacuna contra el cáncer!

Desde la historia hasta nuestros días

Hipócrates no podría haber imaginado que algunas de sus enseñanzas serían válidas aún 2500 años más tarde. Muy posiblemente, los cuadros de ictericia entonces descriptos habrían correspondido a las manifestaciones clínicas con que las hepatitis virales se manifiestan en el individuo infectado (Fig. 3).

Figura 3: Hipócrates examinando el hígado de un paciente.

Estas infecciones son causadas por múltiples agentes virales que se clasifican como hepatotrópicos primarios -designados respectivamente, virus hepatitis A (HAV), HBV, virus hepatitis C (HCV), virus hepatitis D (HDV) y virus hepatitis E (HEV)-, o hepatotrópicos secundarios -entre ellos, el virus Epstein-Barr (EBV), el citomegalovirus humano, el virus dengue, el virus fiebre amarilla, el virus herpes simplex, el virus varicela-zóster y el virus sarampión, entre otros. Los virus hepatotrópicos primarios son aquellos que infectan inexorablemente al hígado, pudiendo o no afectar otras células (en el SNC, los riñones, linfocitos, etc.). En contraposición, los virus hepatotrópicos secundarios pueden o no afectar al hígado dentro de un cuadro generalizado.

Los virus hepatotrópicos primarios - a su vez- difieren entre sí por su puerta de entrada habitual, su tendencia eventual a la cronicidad -y consiguientemente su asociación con la cirrosis y el carcinoma hepatocelular-, así como por la disponibilidad de vacunas específicas y de terapéutica (Tabla 1).

Virus	**HAV**	**HEV**	**HBV**	**HCV**	**HDV**
Familia asignada	*Picornaviridae*	*Hepeviridae*	*Hepadnaviridae*	*Flaviviridae*	No asignada
Transmisión principal	Fecal-oral	Fecal-oral (también por transfusiones y trasplantes)	Parenteral, sexual	Parenteral, sexual en HSH coinfectados con HIV	Parenteral
Prevalencia	Alta, variación regional	Regional	Alta, variación regional	Moderada, variación regional	Baja, variación regional
Curso fulminante	La vacunación masiva de la población (virtualmente) erradicó esta forma evolutiva	En embarazada	Raro	Raro	Frecuente
Curso crónico frecuente	No	No habitualmente, (aunque se observa en inmunosuprimidos)	Frecuente	Muy frecuente	Muy frecuente
Oncogenicidad	No	No	Sí	Sí	No
Terapéutica	No	Sí (aunque no la hay aún para la embarazada)	Sí	Sí	Sí
Vacuna	Sí (en calendario nacional de vacunación)	Sí (superó la fase III de ensayos clínicos; se aplica en algunos países)	Sí (en calendario nacional de vacunación)	No	No

Tabla 1: Virus hepatotrópicos primarios. Clasificación, epidemiología, características clínicas y disponibilidad de tratamiento y/o profilaxis activa.

¿Por qué son de importancia médica las hepatitis virales?

Porque como se observa en la Tabla 1, el HBV y el HCV tienen la capacidad de producir frecuentemente infecciones persistentes que pueden durar décadas o aun toda la vida. Esta es la principal causa infecciosa de disfunción hepática crónica, la que puede devenir en cirrosis (una enfermedad que resulta de la tríada "muerte hepatocitaria", "fibrosis" y "regeneración celular") y eventualmente en el carcinoma hepatocelular (Fig. 4).

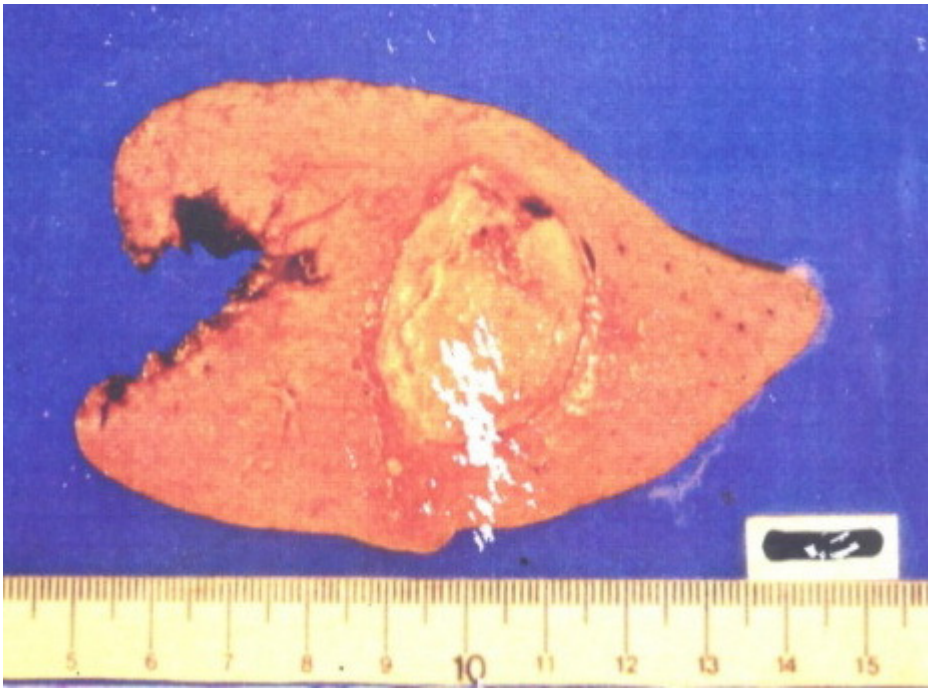


Figura 4: Imagen de un carcinoma hepatocelular resecado de un paciente pediátrico infectado con HBV. Gentileza del Dr. Esteban Mocetti.

Según la OMS (http://www.who.int/campaigns/hepatitis-day/2013/event/en/index.html) existen actualmente unos 240 millones de individuos crónicamente infectados con HBV y unos 150 millones con HCV. Estas cifras son muy superiores a los 35,3 (32,2 - 38,8) millones de personas que se estimó estaban infectadas con HIV a fines de 2012 (http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/index.html).

Se calcula que aproximadamente fallece 1 millón de personas al año a causa de la cirrosis y del carcinoma hepatocelular.

En la Argentina, las infecciones por HBV así como las acontecidas por HCV corresponden -como valor promedio- a los niveles de los países con baja prevalencia, aunque la misma exhibe una marcada variación regional. Se estima que en el país hay aproximadamente entre 600.000 y 800.000 personas infectadas con HCV, pero la mitad lo desconoce ya que es una infección frecuentemente asintomática. En contraposición, nuestro país exhibía hasta 2005 (año de la introducción de la vacunación obligatoria para hepatitis A) una prevalencia alta de infección por HAV. Debido a esta exitosa medida instrumentada por las autoridades de Salud Pública local, la epidemiología de la infección por dicho agente en Argentina está cambiando drásticamente.

¿Qué propone la OMS para controlar las hepatitis virales?

La OMS lanzó la campaña 2013 con el lema "Esto es la hepatitis. Conózcala y afróntela." La campaña hace especial énfasis en que, en general, la hepatitis sigue siendo

desconocida como amenaza sanitaria en gran parte del mundo. Su objetivo es pasar de la etapa de sensibilización a la del compromiso y la acción, con el objeto de afrontar la "epidemia silenciosa" de la hepatitis viral.

Es menester tener en consideración los siguientes elementos: a) son millones las personas que están afectadas por una hepatitis viral; b) aquellos que están infectados crónicamente por HBV y/o por HCV frecuentemente desconocen dicha condición; y c) consiguientemente, -teniendo en cuenta las vías de transmisión de dichos virus- muchos otros millones están expuestos al riesgo de contraer la infección.

Según la OMS, "el Día Mundial contra la Hepatitis ofreció una oportunidad para centrar la atención en medidas específicas tales como:

- fortalecer las actividades de prevención, detección y control de la hepatitis viral y sus enfermedades asociadas;
- aumentar la cobertura vacunal contra la hepatitis B e incorporar la vacuna en los programas nacionales de inmunización;
- coordinar una respuesta mundial contra la hepatitis.

Es menester tener presente que la hepatitis viral puede constituirse en una onerosa carga para los sistemas de salud, dados los elevados costos que implica la institución del tratamiento del cáncer del hígado y la insuficiencia hepática derivada de la cirrosis. En múltiples países la insuficiencia hepática que promueve la hepatitis viral es la principal causa de trasplantes de hígado. Este tratamiento extremo es muy costoso, pudiendo alcanzar cientos de miles de dólares por paciente.

¿Qué se hizo en la Argentina?

Las actividades fueron múltiples y no se circunscribieron al Día Mundial de la Hepatitis. A modo de ejemplos, baste mencionar que en consonancia con los objetivos propuestos por la OMS, en Argentina se desarrolló entre el 2 y el 6 de septiembre pasado la "Semana Nacional de hepatitis B y hepatitis C en las Unidades Centinela para Hepatitis virales" por la cual se promovió el estudio gratuito y sin demora para hepatitis virales en todo el país. Esta actividad fue organizada por el Departamento Virología, Servicio Hepatitis y Gastroenteritis (Laboratorio Nacional de Referencia) INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán.

Más aún, teniendo en cuenta que el 1 de diciembre se celebró el "Día mundial del SIDA" también se llevaron a cabo acciones en el país con el objeto de promover la profilaxis activa para algunas infecciones de transmisión sexual, administrándose las respectivas vacunas para prevenir las enfermedades asociadas al HPV y al HBV, además de proveerse el testeo confidencial, voluntario y gratuito de HIV.

¿Hay perspectivas de un mejor tratamiento de la hepatitis C crónica?

Según el documento final del "Consenso de Hepatitis C 2013" organizado por la Asociación Argentina para el Estudio de las Enfermedades del Hígado (A.A.E.E.H) que se desarrolló entre el 21 y el 23 de noviembre en la Ciudad de Buenos Aires hay nuevas y en extremo promisorias perspectivas terapéuticas para la hepatitis C crónica. La incorporación de los nuevos antivirales de acción directa (A.A.D.) al tratamiento de esta enfermedad ha demostrado que lo hacen más efectivo, necesitándose una menor duración y sin provocar -aparentemente- efectos adversos. Si bien en 2012 se habían confeccionado guías que adicionaban al tratamiento clásico con interferón pegilado y ribavirina, uno de los inhibidores de la proteasa NS3/4A del HCV (boceprevir o telaprevir) como tratamiento de primera línea para el genotipo 1 viral, este tratamiento promovía la curación en aproximadamente un 70% de los pacientes. Dicha tasa, se incrementa a más del 90% con los nuevos A.A.D., aun en poblaciones de pacientes consideradas "difíciles de tratar". Estos antivirales -actualmente en ensayos clínicos I / III- incluyen nuevas drogas inhibidoras de la proteasa NS3/4A (de 1ra., 2da. y 3ra. generación), inhibidores de la RNA polimerasa viral NS5B (análogos de nucleós(t)idos e inhibidores no-nucleosídicos de dicha enzima), inhibidores de la fosfoproteína viral NS5A y agentes dirigidos hacia moléculas del hospedador, tales como los inhibidores de la ciclofilina (un cofactor celular imprescindible para la replicación que interactúa con la polimerasa NS5B y la fosfoproteína NS5A) y los antagonistas del microRNA-122 (un miRNA celular que favorece la replicación viral) (Tabla 2).

Estos nuevos A.A.D. no solo han superado ampliamente las expectativas iniciales, sino que exhiben la promisoria posibilidad de tratar a los pacientes con hepatitis C crónica sin necesidad de co-administración parenteral del interferón (motivo de fallo en la adherencia de los pacientes). Los efectos antivirales parecerían ser pangenotípicos (inhibiendo también al genotipo 1, frecuentemente refractario a la terapéutica clásica) y muchos de los compuestos exhiben una elevada barrera a la resistencia.

Inhibidores de la proteasa viral NS3/4A	**Inhibidores de la fosfoproteína viral NS5A**	**Inhibidores de la polimerasa viral NS5B (nucleosídicos)**
Telaprevir Boceprevir Simeprevir (TMC435) Faldeprevir (BI201335) Danoprevir/r (RG-7227) Vaniprevir (MK-7009) Asunaprevir (BMS-650032) GS-9256 GS-9451 ABT-450/r Sovaprevir (ACH-1625) MK-5172	Daclatasvir (BMS-790052) ABT-267 PPI-461 GS-5885 GSK-2336805 ACH-2928 ACH-3102	Sofosbuvir (GS-7977) Mericitabine (RG-7128) IDX-184 GS-938 GS-6620 TMC-649128
Inhibidores de moléculas celulares		**Inhibidores de la polimerasa NS5B (no nucleosídicos)**
Alisporivir (ciclofilina) SCY-465 (ciclofilina) ANA-773 (TLR-7) Miravirsen (miRNA122)		Tegobuvir (GS-9190) Filibuvir (PF-868554) Setrobuvir (ANA598) BI207127 VX-222 ABT-072 GS-9190 ABT-333 BMS-791325 TMC-647055 VCH-759 GS-9669

Tabla 2: Nuevos A.A.D. en ensayo para el tratamiento de la hepatitis C.

¿Cuáles son los desafíos asociados a las hepatitis virales hoy?

Las hepatitis virales plantean aún hoy múltiples desafíos. A continuación sólo se mencionarán algunos de ellos.

- Hepatitis A
    - ¿Qué rol desempeñarán las mutantes de escape del HAV a la vacuna contra la hepatitis A detectadas en hombres que tienen sexo con hombres (HSH) en la epidemiología de la infección? Emerg Infect Dis 17: 734-7, 2011.
- Hepatitis B
    - ¿Será factible generar una vacuna "terapéutica" para los millones de individuos infectados crónicamente?

- ¿Qué rol desempeñarán las mutantes de escape a la vacuna actualmente utilizada (por ejemplo, Gly145Arg) en el nuevo nicho de una población mundial inmunizada contra la cepa salvaje?
- ¿Se desarrollará alguna formulación terapéutica que pueda erradicar el ADN circular covalente cerrado (ADNccc) que persiste habitualmente en los hepatocitos a pesar de la medicación antiviral hoy utilizada?
- ¿Se conocerán los receptores que permiten el ingreso viral al hepatocito?
- Ante las primeras evidencias que indican que una recombinante D/A del HBV circulante en Argentina exhibe un comportamiento biológico diferente al de las cepas parentales (J Gen Virol 12: 2724-2728, 2013) ¿Cuál es / será el comportamiento biológico de las cepas recombinantes del HBV que (¡sorprendentemente!) constituyen ~30% de los genomas cuya secuencia está depositada en el GenBank)?

- Hepatitis C
  - ¿Se comprenderán las bases inmunológicas que pueden promover la protección frente a la infección viral?
  - ¿Cuál será el rol de las tecnologías de secuenciación de próxima generación (Next Generation Sequencing o NSG) en la comprensión del papel de la dinámica evolutiva de las cuasiespecies minoritarias en la patogénesis de la infección por HCV? (J Gen Virol 93: 1853-1868, 2012).
  - En vista de que no parece por el momento realista intentar el desarrollo de una vacuna que promueva la inmunidad esterilizante, ¿se podrá desarrollar una formulación vacunal que -al menos- evite la infección crónica y la enfermedad? (Nature Med 19: 869-877, 2013).
- Hepatitis D
  - Ante la rara detección del mutantes del RNA del HDV aun en ausencia de respuesta de anticuerpos anti-HDV y -en ciertos caso- también del HBsAg detectable (infección oculta por HBV), ¿Se debería re-evaluar el actual algoritmo diagnostico? (J Clin Virol 54:223-238, 2012)
- Hepatitis E
  - ¿Las infecciones crónicas son privativas del genotipo 3? ¿O pueden acontecer también con los genotipos 1, 2 o 4?
  - Dado que la infección crónica se observa en pacientes trasplantados o con SIDA, ¿existen también infecciones crónicas con un grado "sutil" de inmunocompromiso?

- ¿Cuál es el rol de la respuesta T en la infección?
- Respecto a la vacuna HEV 239: ¿Cuál es la duración de la protección? ¿Previene las infecciones subclínicas? (Lancet 379, 2477- 2488, 2012).

La mera mención de logros recientes en el tratamiento de la hepatitis C, así como de algunos de los desafíos enunciados en el vasto campo de las hepatitis virales, indica claramente los avances alcanzados y las metas que guiarán a la comunidad científica en este tiempo próximo. Sin embargo, el soporte económico por parte de los sectores público y privado es también imprescindible para concretar eficazmente los proyectos de investigación. Se requerirá de la voluntad colectiva y de la sabiduría de la comunidad científica, junto a las agencias de Salud Pública y de la industria farmacéutica para que estos desafíos tengan un desarrollo acorde con lo que la sociedad -en su conjunto- anhela.

Agradecimientos

A la Dra. Norma Planes, quien dictó en el año 1977 una clase de post-grado sobre el HBV tan magistral que indujo a quien escribe a "enamorarse" para siempre de este virus.

A la querida Prof. Dra. Celia Coto por su ejemplo de rectitud moral, honestidad intelectual, y laboriosidad inconmensurable, así como por su inquebrantable y conmovedora confianza en mi persona a lo largo de tantos años.

ISSN 1666-7948
www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva
Número 3, año 12, Diciembre 2013
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Química Viva
E-ISSN: 1666-7948
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar
Universidad de Buenos Aires
Argentina

Lilia Romero, Eder; José Morilla, María
Nanomedicinas: lo esencial es invisible...al microscopio óptico
Química Viva, vol. 12, núm. 3, -diciembre, 2013, pp. 178-214
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86329278003

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Nanomedicinas: lo esencial es invisible…al microscopio óptico

Eder Lilia Romero y María José Morilla.

Programa de Nanomedicinas, Departamento de Ciencia y Tecnologia, Universidad Nacional de Quilmes. eder19lilia@gmail.com

Recibido 1 de octubre de 2013- Aceptado 29 de Octubre de 2013

Resumen

El poder de resolución del microscopio óptico es de unos 200 nm y si tenemos suerte, los nano-objetos más voluminosos apenas se distinguirán como puntos fluorescentes. ¿Podremos, mediante el control de la arquitectura de esos "puntos brillantes", dirigir su acceso a ciertos sectores del cuerpo, donde ejecutarían exitosamente funciones terapéuticas? Por ahora estamos más lejos de lo que creemos en materializar ese ejercicio mental. Sin embargo, de todas las aplicaciones de la Nanotecnología al área de la salud, el campo terapéutico es el más importante. En este artículo nos adentraremos en los fenómenos que explican cómo funcionan los nano-objetos que transportan principios activos hasta los sitios blancos. A partir de allí será posible construir expectativas razonables sobre la irrupción de esta nueva tecnología en el corto futuro. Sus potencialidades y limitaciones son dependientes de nuestra capacidad de diseño racional, de desarrollo industrial y conocimiento de los fenómenos de nanotoxicidad, respectivamente.

Palabras clave: nano-objeto, efecto de incremento de permeación y retención (EPR), nanomedicinas antitumorales

Nanomedicines, the essential is invisible… to the light microscope

Abstract

The resolution power of the optical microscope is nearly 200 nm and if we are lucky, the biggest nano-objects are saw as highly fluorescent dots. How the architecture of these shiny dots be controlled, to target them to specific body sites and successfully exert therapeutic actions? For the moment, we have been unable of meeting such issue. Nonetheless, drug delivery is by far the most important field of all the applications of Nanotechnology in health. In this review, we will address the phenomena underlying the action of nano-objects as drug delivery systems. On that knowledge, it will be possible to build reasonable expectancies to the irruption of these new medicines, in the near future. Potentialities and pitfalls of nanomedicines will depend on our skills for rational design, industrial development and insights gained on the new phenomena of nanotoxicity.

Key words: Nano-objects, Enhanced Permeation and retention (EPR) effect, antitumoral nanomedicines

1. INTRODUCCION

La Nanotecnología irrumpió en la comunidad científica hace más de 50 años [1], como una promesa capaz de resolver retos ingenieriles inabordables para la materia macro o microestructurada. El propósito de esta tecnología es diseñar nano-objetos, estudiar sus propiedades estructurales y luego aplicarlos con múltiples fines. Los nano-objetos se definen como objetos con una (nanoplato), dos (nanotubo) o tres (nanopartícula) dimensiones en la nano-escala de tamaño. La nano-escala posee un límite inferior de 1 nm (excluye a los átomos) y un límite superior difuso que supera los 100 nm cuando los nuevos fenómenos asociados al tamaño del nano-objeto no son de naturaleza cuántica, sino por ejemplo, relativos a sus modalidades de captura y tráfico intracelular. Nanopartículas de idénticas dimensiones, pueden presentar distintas propiedades de acuerdo al material con que se las prepare. Por otro lado, moléculas producidas por síntesis química o biológica y cuya actividad dependa de su estructura primaria (secuencia de átomos o de moléculas), no son considerados nano-objetos. Para bien o mal, desde hace unos 10 años usamos diariamente productos que contienen nano-objetos o superficies nanoestructuradas, a veces sin enterarnos. Otras, la intervención de la Nanotecnología en campos como el de la salud suscita tanto en legos como en la mayoría de los académicos, una expectativa cercana a la idealización. Es que la idea de emplear nano-objetos para resolver exitosamente complejos problemas de salud resulta fascinante. La disciplina en cuestión se conoce como Nanomedicina y emplea nano-objetos diseñados ad-hoc para operar en la interfase entre el tamaño atómico y el celular con fines terapéuticos, profilácticos y de tecnología médica (que incluye ingeniería de tejidos y diagnostico).

No es posible identificar un único tipo de nano-objeto igualmente útil para todos los propósitos. Por lo general, aquellos que se emplean in vitro o ex vivo (como en la mayoría de las técnicas diagnósticas) no siempre pueden administrarse a un ser vivo. Asimismo, en terapéutica y profilaxis los nano-objetos son biodegradables y son aplicados por distintas rutas. La mayoría de las estrategias terapéuticas están basadas en la incorporación de un principio activo (PA) a un determinado nano-objeto. A partir de allí, la farmacocinética, biodistribución y tráfico intracelular del PA se independiza de su estructura química y pasa a depender de la naturaleza estructural del nano-objeto. Por volumen de ventas y patentes, la aplicación más importante de la Nanotecnología en salud es la pertinente al campo terapéutico conocida como nanotecnología farmacéutica [2]. Dicho esto, en este artículo comentaremos los fenómenos que ocurren cuando los nano-objetos (nanopartículas) se administran con fines terapéuticos por ruta endovenosa. A diferencia de la inhalatoria, los fenómenos asociados a la ruta endovenosa están bastante bien conocidos, además de poner en juego la máxima capacidad operativa de los nano-objetos. Por su complejidad, excluiremos referirnos al cruce de la barrera hematoencefalica. Asimismo, no abordaremos la exposición no intencional de nano-objetos no biodegradables, que tiene lugar fundamentalmente por ruta inhalatoria.

2. ¿CÓMO FUNCIONAN LAS NANOMEDICINAS?

2.1 El turbulento viaje de los nano-objetos

Una vez inyectados endovenosamente, los nano-objetos ingresan directamente al corazón, desde cuyo ventrículo derecho -en humanos- son bombeadas a los pulmones a un flujo de 5,6 litros por minuto [3]. Su viaje por sangre venosa continúa hacia los capilares alveolares pulmonares donde se vuelcan a la sangre arterial. Desde allí retornan al corazón, para ser bombeadas en la sangre arterial a cada uno de los órganos corporales. La magnitud de su acceso a los órganos dependerá del volumen de flujo que accede a cada uno. Asimismo durante casi toda su trayectoria, los nano-objetos permanecen confinados al compartimiento vascular. Nano-objetos en el orden de los 100 nm de diámetro (unas 10 veces mayor que el diámetro hidrodinámico de una proteína plasmática como la albúmina, aunque unas 100 veces menor que un glóbulo rojo) no pueden difundir a través del endotelio vascular/capa de músculo liso /membrana basal, ni penetrar los poros de la vasculatura (<6 nm en vénulas post capilares). Más aun, los nano-objetos que pierdan su estabilidad coloidal en circulación y se agreguen, pueden ocluir redes vasculares particularmente angostas, como los capilares pulmonares (entre 2 y 23 mm de diámetro). Al igual que las proteínas plasmáticas, nano-objetos lo suficientemente pequeños pueden atravesar libremente las fenestraciones de entre 100 - 150 nm (alrededor de 107 nm en humano) de los sinusoides hepáticos (vasos de 5 -10 µm diámetro sin membrana basal para acceder al espacio perisinusoidal o espacio de Disse), donde se ubican los cordones de hepatocitos [4, 5]. Pero a diferencia de las proteínas, los nano-objetos son reconocidos como extraños y fagocitados por macrófagos fijos ubicados estratégicamente en la luz de los sinusoides (células de Kupffer). Por su gran volumen, el hígado es el órgano corporal con mayor capacidad de captura global de nano-objetos, aunque el bazo lo supere en tasa de captura por unidad de masa de tejido. Los órganos con vasculatura fenestrada como el hígado, bazo (con anchos sinusoides (5-8 µm) en la vasculatura de pulpa roja, para dejar pasar glóbulos rojos senescentes) y en menor medida, medula ósea, son los únicos donde los nano-objetos pueden extravasar hacia los intersticios tisulares. Claramente es la arquitectura vascular la responsable directa de la biodistribución de nano-objetos inyectados endovenosamente.

Luego de inyectados, además de diluirse y ser arrastrados en el turbulento flujo vascular, los nano-objetos son inmediatamente cubiertos por proteínas plasmáticas. Primeramente ocurre una cobertura inespecífica y transitoria con albúmina, la proteína de mayor concentración (35-40 g/l), que es rápidamente reemplazada por proteínas de menor concentración pero mayor afinidad. Estas últimas (fibronectina, fibrinógeno, proteína C reactiva, inmunoglobulinas, proteínas del complemento C3b y C4b y lipoproteínas entre otras) se conocen como opsoninas, o proteínas plasmáticas para las que los macrófagos expresan receptores en su superficie. Las opsoninas permiten establecer múltiples puntos de contacto entre la superficie de microorganismos o nano-objetos y receptores fagociticos como los de la fracción Fc de anticuerpos plasmáticos (R-Fc), de fosfatidilserina (R-PS) y de ciertas fracciones

del complemento (R-C) en la membrana de macrófagos [6, 7]. Una vez opsonizados tal como si fueran microorganismos, la membrana plasmática del macrófago se extiende alrededor de los nano-objetos, encerrándolos. La vesícula así formada se conoce como fagosoma. El material dentro del fagosoma es procesado en una ruta destructiva, que recibe los contenidos de endosomas y lisosomas y culmina con la eliminación de sus fragmentos hidrolizados. Recientemente ha comenzado a establecerse la lógica entre el patrón y extensión de la opsonización -y por ende de la fagocitosis- con el tamaño, geometría y naturaleza superficial del nano-objeto.

El bajo radio de curvatura de grandes nano-objetos (> 200 nm) facilita la deposición de opsoninas y su posterior agregación (pérdida de estabilidad coloidal) [8]. En general, es la pérdida de estabilidad coloidal la responsable de la captura fagocítica de los nano-objetos [9, 10]. Los nano-objetos de superficie hidrofóbica atraen mayor proporción de lipoproteínas y apolipoproteinas. Las lipoproteínas pueden intercambiar lípidos con liposomas y nanopartículas lipídicas y desestabilizar su estructura [11]. Una interacción de este tipo puede ser responsable del targeting de nano-objetos a células que tengan receptores para apolipoproteínas, como hepatocitos (con receptores para apo E) [12] y sistema nervioso central (con receptores para apo A1, Apo B100, apo E) [13]. En general las superficies negativa o positivamente cargadas, muy hidrofóbicas o irregulares también promoverán la adhesión de proteínas del complemento

Si bien es prácticamente imposible evitar la opsonización, la agregación puede minimizarse modificando la superficie de los nano-objetos. Esto se logra cubriéndolos con un polímero hidrofílico de conformación adecuada, de unas decenas de angstroms de espesor. Para tal fin usualmente se emplea polietilenglicol de peso molecular 2000 (PEG2000), y la estrategia que se conoce como “estabilización estérica” [14]. La estabilización estérica mediante PEG, tiene un rol controvertido ya que además puede ser responsable de toxicidad, como veremos más adelante.

Los nano-objetos estabilizados estéricamente pueden permanecer en circulación por largo tiempo sin ser fagocitados. La evasión temporal de la fagocitosis es el primer paso para que los nano-objetos puedan acceder a tejidos diferentes al hígado, bazo o medula ósea.

2.2 Incremento local de permeación y retención: el efecto EPR

La estabilización estérica de los nano-objetos aumenta sus posibilidades de extravasar en sitios con elevada permeabilidad vascular. Tales sitios están presentes en ciertas patologías, como los tumores sólidos (que constituyen cerca del 85% de los cánceres humanos). En la tabla 1, se muestran ejemplos de diferentes nanomedicinas antitumorales en uso clínico y en ensayos clínicos avanzados. El delivery de nano-objetos desde el sitio de inyección hasta las células tumorales involucra su transporte por circulación sistémica, extravasación y transporte a través del intersticio tumoral.

A partir de un tamaño mínimo, los tumores sólidos comienzan a estimular su propia vascularización [15]. La resultante vasculatura anómala asociada al drenaje linfático defectuoso, son responsables de la acumulación y retención sitio especifica de nano-objetos [16]. Este fenómeno observado en ciertos tumores sólidos, sobre todo aquellos con elevado grado de malignidad, es conocido como efecto de incremento de permeabilidad y retención (enhanced permeability and retention (EPR) effect) o efecto EPR [17, 18].

2.2. i Factores locales responsables del incremento de la permeabilidad vascular

Los tumores sobre-expresan múltiples isoformas del factor de crecimiento endotelial vascular VEGF-idéntico al factor de permeabilidad vascular (VPF) [19, 20]. Los VEGF pertenecen a una familia de mitogenos endoteliales y mediadores de permeabilidad vascular, con diferentes capacidades para interactuar con proteínas de la matriz extracelular [21]. Como resultado, la vasculatura tumoral es heterogénea y no sigue una morfología estándar (arteriolas, capilares y vénulas en una red organizada, de ramificación dicótoma con orden jerárquico) [22]. La vasculatura tumoral es dilatada, sacular y mal alineada, con células endoteliales defectivas y amplias fenestraciones entre 300 y 4700 nm, ausencia de musculo liso o inervación, amplio lumen y sin receptores funcionales para angiotensina II [23-25] (Figura 1). En ella la dirección del flujo sanguíneo puede cambiar abruptamente, cesar o ser errático [26].

Desde hace unos 30 años se sabe que la permeabilidad vascular propia de inflamaciones e inducida por infecciones es gatillada por bradiquinina (BK, quinina), vía activación de una cascada proteolítica [27]. Luego se descubrió que la BK también acompaña procesos carcinomatosos, siendo responsable de la acumulación de fluido pleural y ascítico y de dolor [28]. Además, los tumores sólidos expresan simultáneamente múltiples mediadores inflamatorios como el óxido nítrico (NO) (un mediador de vasodilatación, hipotensión, angiogénesis, proliferación celular y extravasación); prostaglandinas (PGs), sintetizadas por ciclo-oxigenasas (COX)-1 y-2 y peroxinitrito (ONOO-), formado por una rápida reacción entre los radicales superóxido (O2-) y NO y activador de pro-matriz metalproteinasas (MMPs), estas últimas enzimas que degradan la matriz extracelular [29, 30].

Tabla 1. Ejemplos de diferentes nanomedicinas antitumorales en uso clínico y en ensayos clínicos avanzados

Compuesto	Nombre	Indicación	Estatus (año)
Doxorubicina liposomal peguilada	Myocet, Caelyx (Doxil)	Cáncer de ovario y mama, refractarios, Sarcoma de Kaposi asociado a HIV, mieloma múltiple	Aprobado FDA (1995)
Daunorubicina liposomal	Daunoxome	Sarcoma de Kaposi asociado a HIV	Aprobado (1996)
Doxorubicina liposomal no pequilado	Myocet	Cáncer de mama metastásico	Aprobado en Europa y Canada (año)
Vincristina liposomal	Marqibo	Leucemia linfoblástica aguda con cromosoma philadelphia negativo (Ph-)	Aprobado (2012)
Doxorubicina liposomas termosensibles	ThermoDox	Carcinoma hepatocelular	Fase III
Cisplatino liposomal	Lipoplatin	Carcinoma de células no pequeñas de pulmón y pancreático	Fase II y III
Lurtotecan liposomal	OSI-221	Varios	Fase II
Paclitaxel en nanopartículas de albúmina	Abraxane	Cáncer de mama	Aprobado (2005)
L-asparginasa-Peg	Oncaspar	Leucemia aguda linfocítica	Aprobado (1994)
Paclitaxel-Acido poliglutamico	Opaxio	Carcinoma de células no pequeñas de pulmón, de ovario y otros	Fase III
Doxetacel en nanopartículas de albúmina	ABI-008	Cáncer de próstata refractario a hormonas	Fase II
Paclitaxel-micelas poliméricas	NK105	Cáncer de estómago	Fase III
Doxorubicina-micelas poliméricas	NK911	Varios	Fase II completa
Cisplatino-micelas poliméricas	Nanoplatin	Varios	Fase I

Adaptado de Duncan R, Gaspar R (2011) Nanomedicine(s) under the microscope. Molecular Pharmaceutics 8: 2101-2141

2.2. ii Disminución del drenaje linfático

La red de linfáticos remueve macromoléculas y fluido intersticial y es esencial para las funciones inmunes del tejido normal y mantenimiento del balance de fluidos en el intersticio. En los tumores sólidos sin embargo, el drenaje linfático es usualmente defectivo [15, 31]. Los vasos linfáticos son comprimidos por las propias células tumorales [32] y por ende su funcionalidad depende de su localización. Los linfáticos periféricos o en la interfase tumoral son

funcionales, no así los del interior tumoral [33]. La funcionalidad reducida de los linfáticos está asociada a flujo retrógrado, con invasión de células tumorales a vasos linfáticos periféricos y promoción de metástasis dentro del sistema linfático [26, 34, 35].

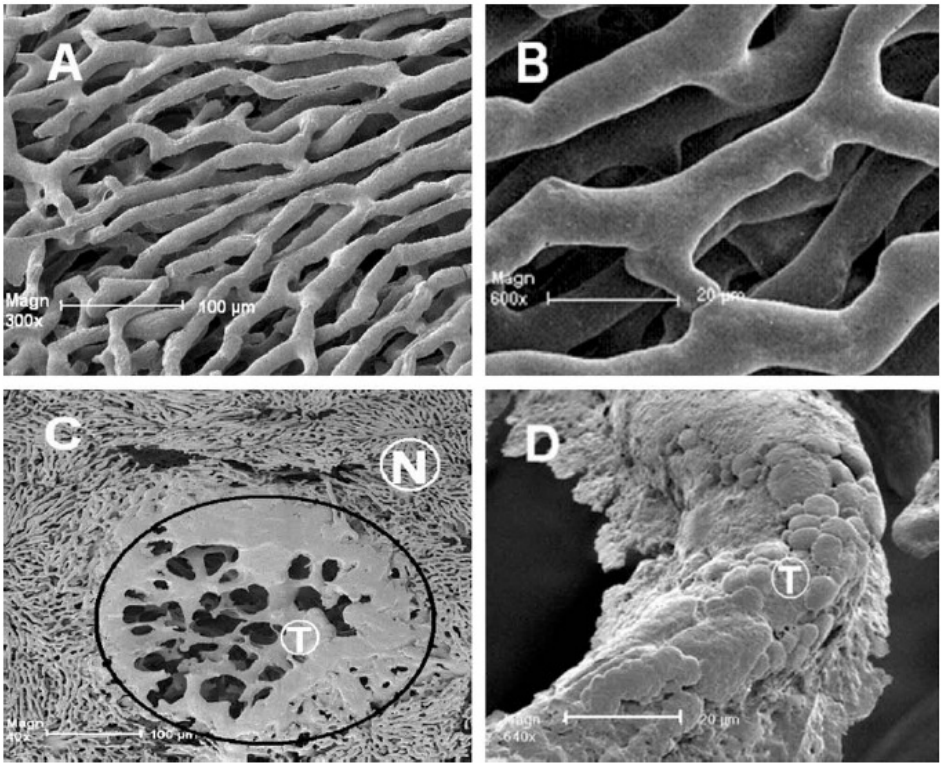


Figura 1. Micrografías de scanning electrónico de capilares sanguíneos normales (A y B) y tumorales hepáticos (C y D). B y D son imágenes ampliadas de la red de capilares de A y C. Mientras no hay pérdida de polímero acrílico en el hígado normal, se observa su extravasación (por efecto EPR) en la vasculatura tumoral (T). N es vasculatura normal. Adaptado de [135]

2.2. iii Los nano-objetos extravasan por convección

Notablemente, en tanto las moléculas de bajo peso molecular difunden uniformemente a través de la vasculatura hacia los tejidos, los nano-objetos únicamente pueden extravasar a través de las fenestraciones por convección [36]. El flujo convectivo depende del gradiente de presión hidrostática entre el espacio intravascular (microvascular pressure, MVP) y el espacio intersticial (interstitial fluid pressure, IFP) y el gradiente de presión osmótica (debido a diferencias en niveles proteicos) [37]. La funcionalidad disminuida de los linfáticos es responsable principal de la elevada IFP, que se opone al gradiente convectivo y a la extravasación de material hacia las células tumorales [38, 39]. Asimismo, la elevada IFP induce un flujo intersticial radial hacia el exterior, de entre 0,1–0,2 µm/s para un tumor aislado de 1 cm [40] y un orden de magnitud menor para uno subcutáneo [41] (Figura 2). Sin embargo, hay autores que consideran controvertido adjudicar la disminución del flujo convectivo a la elevada

IFP [42]. La elevada IFP forzaría la salida de solutos y fluidos hacia la zona de menor presión (el extremo venoso de los capilares) y no hacia el extremo arterial, donde la presión hidrostática derivada del input cardiaco y la resistencia vascular son mucho mayores que en el extremo venoso.

El flujo sanguíneo tumoral depende de la diferencia entre la presión arterial y venosa, la resistencia debido a la arquitectura vascular y la viscosidad sanguínea. En comparación a los tejidos normales, los tumores tienen similar presión arterial pero menor presión venosa [43]. En la microcirculación tumoral, debido a la elevada permeabilidad vascular, el flujo sanguíneo intravascular e intersticial están acoplados. La presencia de macromoléculas en el intersticio es en parte responsable de la elevada viscosidad sanguínea tumoral. El flujo sanguíneo en tumores es en promedio, menor que en tejidos normales [44].

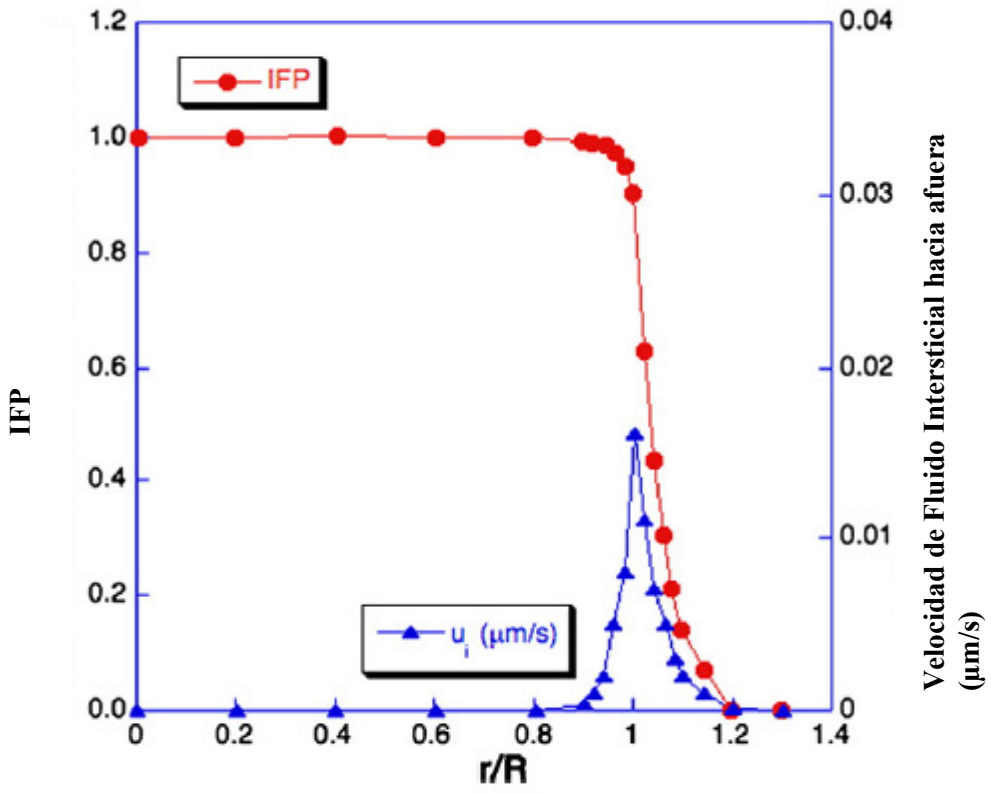


Figura 2. Presión de fluido intersticial (Interstitial fluid pressure, IFP) y velocidad de distribución de un tumor crecido subcutáneamente. El centro y los alrededores del tumor se indican por r/R=0 y r/R=1, respectivamente. IFP (●) es elevada en el interior del tumor y rápidamente decrece en la periferia. Debido al gradiente de presión, se induce un movimiento de fluido intersticial hacia el exterior a aproximadamente 0,02 µm/s (▲). Esta convección hacia afuera, junto con la menor extravasación debido a la elevada IFP, conduce a un acceso insuficiente de agentes terapéuticos [41, 61].

2.2. iv Los nano-objetos difunden con dificultad a través del intersticio

Los tumores sólidos poseen una densa matriz extracelular (MEC), consistente en proteínas fibrosas como colágeno y elastina y polisacáridos como hialuronano y proteoglicanos [45], que dificultan el ingreso de material hacia el interior tumoral. La elevada IFP tumoral sumada al elevado contenido de glicosaminoglicanos (GAG) y colágeno respecto de tejidos normales [46, 47], reduce el flujo convectivo intersticial. Como resultado la difusión es el principal mecanismo de transporte a través del intersticio. La difusión disminuye a medida que aumenta el peso molecular y el diámetro del material [48-50]. Los nano-objetos más pequeños son transportados a mayor distancia y con mayor dispersión en la MEC que los de mayor tamaño, que tienden a localizarse en el espacio peri-vascular [51].

2.3. v Heterogeneidad del efecto EPR

El efecto EPR es heterogéneo y varía sustancialmente no sólo entre pacientes sino también entre los distintos tipos y estadios tumorales [52, 53]. Dentro de un mismo tumor hay grandes diferencias en permeabilidad vascular. En general, los nano-objetos (tamaño promedio de 100 nm) únicamente podrán acercarse sólo a las células de una limitada fracción del volumen tumoral. La mayor parte del tumor apenas permite extravasar estructuras de diámetro entre 4 y 7 nm. La distribución de la vascularización varía con la zona y tamaño tumoral. La densidad vascular decrece desde la periferia hacia el centro, donde se incrementan las distancias intercapilares, que son enormes en términos de difusión de nano-objetos. Por ejemplo, la distancia intercapilar es de unos ~50 µm en regiones vascularizadas de adenocarcinomas mamarios de rata, pero puede llegar a unos ~300 µm en humanos [54]. Los tumores sólidos de gran tamaño (> 1 cm diámetro) poseen tres regiones: (a) necrótica sin vasculatura, (b) semi-necrótica conteniendo capilares, pre-y post-capilares y (c) establemente perfundida, con muchos vasos venosos y pocas arteriolas (2 a 5). En general, la relación región (avascular/bien perfundida) aumenta con el tamaño del tumor, lo que significa que el efecto EPR es mayor en tumores más pequeños. En el interior tumoral, la distribución de nano-objetos sería más heterogénea que la de drogas de bajo PM, debido a que su acceso depende estrictamente de la estructura vascular y de las serias restricciones a la difusión presentadas por el impedimento físico de la MEC sumado a su escaso gradiente difusivo [42].

Por otro lado, la densidad vascular depende del tipo de tumor: los carcinomas renales son muy vascularizados en tanto la densidad de microvasculatura de carcinoma escamoso de cabeza y cuello y en carcinoma de ovario es baja. Asimismo, la densidad vascular en algunos casos está correlacionada con el estadio del tumor, como ocurre con el cáncer de pulmón de células no pequeñas. Otro tipo de tumores, como el carcinoma de células renales, no presentan correlación entre densidad vascular y estadio tumoral. Los tumores metastásicos tienden a presentar mayor densidad de vasculatura respecto de los no metastásicos. Diferentes tipos tumorales secretan cantidades variables de mediadores vasculares e inflamatorios. Por esta razón, la tasa de respuesta del sarcoma de Kaposi (muy vascularizado y productor de

grandes cantidades de VEGF) a la monoterapia con doxorubicina liposomal peguilada (Doxil), supera entre un 25% y un 46% a la combinación estándar del régimen ABV (adriamicina (doxorubicina), bleomicina y vincristina) [55]. La densa MEC propia de la mayoría de los tumores malignos pancreáticos dificulta su irrigación; las células tumorales se alimentan por difusión de nutrientes y oxígeno desde los tejidos adyacentes y no responden bien a los tratamientos basados en el efecto EPR [56].

2.2.v Optimización de la estructura de nano-objetos

Para maximizar la extravasación en los sitios donde existe efecto EPR, los nano-objetos deben circular por el máximo tiempo posible, evadiendo la eliminación renal y la captura fagocitica. A partir de un PM de 40.000, y un diámetro hidrodinámico mínimo de 7 nm [57] (orden de peso y tamaño de proteínas plasmáticas globulares, cuya filtración renal está limitada por la apertura del diafragma de los pies de podocitos [58]) es factible evitar la eliminación renal. La estabilización estérica evitará la eliminación de los nano-objetos por fagocitosis. Empíricamente, se ha identificado un rango de tamaño óptimopara la circulación prolongada, extravasación y difusión de nano-objetos en tumores sólidos que manifiestan el efecto EPR, que oscila entre los 80 y 200 nm de diámetro [59].

El tamaño, PM y estabilización estérica sin embargo, no son los únicos factores relevantes a la hora de lograr una óptima evasión del reconocimiento por el sistema mononuclear fagocítico. Por ejemplo, proteínas plasmáticas como albúmina e IgG (de PM 68.000 y 150.000, respectivamente), se acumulan en tumores que presentan efecto EPR en igual o mayor extensión que el primer agente antitumoral a partir del cual se reveló el efecto EPR, el SMANCS (un conjugado de dos cadenas copolímero estireno y ácido maleico (SMA PM 2.000) y neocarcinostatina (NCS PM 12.000), PM total 16.000). El diseño estructural del SMANCS dista de ser óptimo para acumularse en extensivamente en tumores sólidos; en el tratamiento del carcinoma hepatocelular se lo inyecta directamente en la arteria hepática y no endovenosamente. Por otro lado, la captura hepática de ambas proteínas es sustancialmente menor que la de SMANCS. De hecho, la mayoría de las proteínas plasmáticas desnaturalizadas o con profundas modificaciones estructurales, independientemente de su PM, son eliminadas muy rápidamente por fagocitosis. Esto señala otra deficiencia en el diseño estructural de SMANCS ya que a pesar de su bajo PM, es reconocido como ajeno en virtud de su insuficiente biocompatibilidad.

Es importante señalar que en la inflamación asociada a infecciones, también hay extravasación por convección de material particulado. Sin embargo, el funcionamiento linfático normal impide su retención prolongada. Además, el efecto EPR es “invisible” para moléculas livianas que difunden al tumor para regresar libremente a la circulación sanguínea. Señalemos por ejemplo que pequeñas moléculas hidrosolubles usadas como agentes de contraste en angiografías arteriales, experimentan un targeting pasivo en tumores, donde son retenidas unos pocos minutos. Por el contrario, los nano-objetos que extravasan en tumores no regresan

a circulación, se acumulan gradualmente y quedan retenidos por largo tiempo. Esta cuestión se reportó por primera vez hace casi 30 años en roedores, donde 6 h luego de inyectar endovenosamente Evans blue que forma un complejo con albúmina de 6 nm, comenzó su acumulación selectiva en tumores. También se observó que la acumulación de nano-objetos es inversamente proporcional al tamaño tumoral. Por ejemplo, la acumulación del conjugado copolímero hidroxipropilmetilacrilamida (HPMA)-doxorubicina, decayó de ~20% a 1–5% dosis/g tejido tumoral, al aumentar el tamaño tanto de modelos tumorales de ratón como xenografts humanos. En tanto la concentración plasmática se mantuviera elevada un mínimo de 6 h, hubo un incremento progresivo de la acumulación a lo largo de horas o días. En la clínica, luego de administrar SMANCS en Lipiodol (SMANCS/Lipiodol) localmente vía una infusión en la arteria hepática, se registró una veloz acumulación en el carcinoma hepatocelular en contraste con un muy lento clearance durante semanas. De hecho aun 2–3 meses más tarde el SMANC permaneció a razón de 20–30 µg/g tejido tumoral, una actividad remanente más de 100 veces mayor que la concentración inhibitoria mínima del carcinoma hepatocelular in vitro [59].

2.3. Incremento de la extravasación de nano-objetos

En promedio, tanto los conjugados polímeros-droga como drogas liposomas como Doxil, permiten descargar un 5 % de la dosis administrada sobre tumores que manifiestan el efecto EPR; entretanto, más del 50 % de la dosis culmina en el hígado [60, 61]. Aunque un 5 % es un porcentaje significativamente mayor que el acumulado como PA libre, se describen a continuación una serie de técnicas orientadas a incrementarlo.

2.3.i Modulación del efecto EPR

El incremento de extravasación puede lograrse mediante el aumento de la MVP, la reducción de la IFP y la normalización de la vasculatura tumoral.

Incremento de la MVP mediante Angiotensina II: El músculo liso de la vasculatura normal, responde a mediadores vasculares como BK, acetilcolina, NO y calcio, ayudando a mantener constante el volumen de flujo sanguíneo. La infusión endovenosa de angiotensina-II (AT-II), induce hipertensión sistémica por constricción de la capa de músculo liso. Sin embargo, ante el aumento de presión y flujo, el volumen de flujo sanguíneo permanece constante [62-64]. En contraste, la vasculatura tumoral no puede regular el volumen de flujo sanguíneo, que se incrementa localmente en respuesta a la hipertensión inducida por AT-II [59, 65]. En tumores de roedores, tras elevar la presión sistólica mediante AT-II se observó un incremento de ~2–6 veces en el volumen de flujo sanguíneo tumoral, dependiendo del incremento de presión [62]. Aunque su uso no se ha extendido por lo riesgoso, la hipertensión sistémica inducida por AT II se ha aplicado en la clínica hace ya 30 años, para incrementar la acumulación de drogas de bajo PM (figura 3). Estudios pre-clínicos en ratas mostraron que incrementando la presión sistólica de 100 a 150 mm Hg por 15 minutos, se aumentaba 1,3-3 veces la acumulación de

SMANCS en el tejido tumoral. Además de incrementar el efecto EPR, la vasoconstricción acompañante disminuyó el acceso de SMANCS a riñones y medula ósea. Desde hace 10 años se reportan los beneficios de la administración de SMANCS-Lipiodol a pacientes con tumores sólidos (que incluyeron carcinoma hepatocelular, cáncer metastásico de hígado, cáncer renal, colangiocarcinoma, cáncer pancreático, entre otros) bajo un estado hipertenso inducido por AT-II. Mediante esta estrategia es posible incrementar más de 5 veces la concentración local de droga antitumoral, induciendo un estado hipertenso solo por~20 min [66, 67]. Considerando que las terapias antitumorales se llevan a cabo en o cerca de la máxima dosis tolerable, un aumento de 2-3 veces su concentración intratumoral tendría beneficios terapéuticos; de hecho los tiempos de regresión al 50% de la masa tumoral se acortaron [67]. En contraste, luego de la infusión intraarterial de PA de bajo PM no se observaron mejoras debido a su veloz escape del tumor. No se han publicado datos acerca del empleo de esta técnica para mejorar el delivery de Doxil u otros antitumorales liposomales de mayor diámetro que polímeros terapéuticos.

Incremento de MVP mediante Nitroglicerina. La nitroglicerina (NG) es un agente generador de NO, empleado por más de una centuria en el tratamiento de angina de pecho. En el medio hipóxico (baja pO2) y de pH ligeramente ácido del tejido cardiaco infartado, el NO2– liberado desde NG es convertido a NO, que causa vasodilatación e incremento de flujo sanguíneo. Dado que el medio hipóxico y acídico de los tejidos infartados se asemejaría al de los tumores, se inspeccionó la capacidad de NG para inducir vasodilatación e incremento local de flujo sanguíneo. Esta estrategia incrementó 2 a 3 veces la acumulación de macromoléculas inyectadas endovenosamente (complejo Evans blue/albúmina) en tumores, así como la eficacia tanto de pequeñas moléculas (aclarubicina, PM 812) como de conjugados Zn protoporfirina IX-PEG (PM 110.000). Sin embargo estos resultados se obtuvieron luego de la administración tópica de NG en modelos de tumores subcutáneos [68]. Esta estrategia aún no ha llegado a la clínica. Asimismo, resta inspeccionar el efecto de la administración de donores de NO, por rutas diferentes a la tópica. Finalmente, aún no ha sido testeado su efecto sobre la extravasación de nano-objetos de mayor tamaño, como el Doxil.

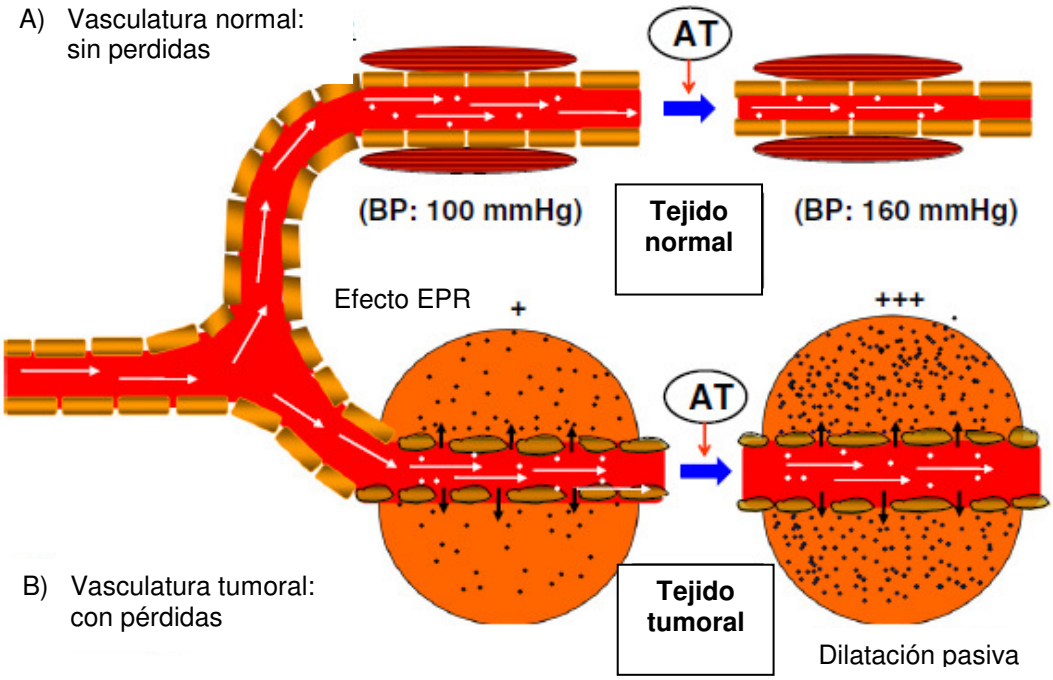


Figura 3. Representación del efecto EPR y su incremento inducido por la hipertensión generada por angiotensina II (AT-II) y el delivery en tejidos normales y tumorales. (A) La vasculatura normal posee una capa de células de músculo liso que se contraen, se cierran las uniones estrechas y se reduce el diámetro del vaso lo que resulta en menor pérdida de contenido. (B) La vasculatura tumoral posee aberturas entre las células endoteliales que se abren aún más al elevarse la presión sanguínea. La hipertensión inducida por AT-II incrementa la acumulación de drogas macromoleculares en el tejido tumoral. Adaptado de [37, 136, 137]

Incremento de MVP mediante Inhibidores de enzima convertidora de angiotensina I (Angiotensin-converting enzyme, ACE). Los inhibidores de ACE se emplean como agentes anti-hipertensivos y son carboxipeptidasas que inhiben la conversión de AT I en ATII. La ATI tiene una secuencia aminoacídica similar a la hallada en el extremo C terminal de la BK. Por lo tanto los inhibidores de ACE potencian la acción local de la BK, el mediador de permeabilidad vascular sobreexpresada en tumores. El inhibidor de ACE enalapril, combinado con hipertensión sistémica inducida por AT-II, incremento al doble el delivery de anticuerpos monoclonales dirigidos contra cáncer gástrico sobre modelos tumorales de ratón [65, 69]. Igual que en el caso anterior, esta estrategia no ha llegado a la clínica y resta testear su eficacia sobre nano-objetos de gran tamaño.

Recientemente se han testeado en roedores otras estrategias orientadas a aumentar el efecto EPR, mediante hemo-oxigenasa 1/ monóxido de carbono, inhibidor de TGF-β, TNF-α.

2.3.ii Incremento del delivery de nano-objetos a través del intersticio tumoral

La difusión de nano-objetos a través del intersticio puede incrementarse mediante a) degradación de la MEC y b) reducción de la IFP. Aunque testeada ampliamente en pre-clínica, la utilidad clínica del empleo de MMP (colagenasas, stromelisinas, gelatinasas y elastasas), hialuronidasa y catepsina C (digesting decorin) para degradar la MEC e incrementar la difusión de nano-objetos voluminosos (de alrededor de 100 nm) es discutible, ya que la digestión de la matriz no expande sustancialmente el espacio intercelular entre células tumorales (unos 20 nm) [70, 71]. Entre otras razones, la degradación de la MEC ha sido gradualmente abandonada porque incrementaría las chances de diseminación tumoral [72]. También en pre-clínica, la degradación enzimática de la MEC se ha empleado para disminuir la IFP. En este ámbito, la IFP se ha disminuido mediante métodos físicos (hipertermia), químicos (agente osmótico manitol) y tratamientos farmacológicos (TNF-α, paclitaxel, radiación). Por ejemplo, la reducción de IFP luego de aplicar hipertermia local sobre tumores subcutáneos, incrementa la extravasación y acumulación de liposomas y vectores génicos administrados endovenosamente (hasta 400 nm) [73, 74]. Esta estrategia sin embargo, no ha llegado a la clínica.

Otra forma de reducir la IFP es induciendo la normalización de la vasculatura tumoral, es decir, inhibiendo el efecto EPR. Pero aunque el empleo de agentes anti-angiogénicos ha permitido incrementar la extravasación de albúmina, la acumulación de estructuras de mayor tamaño como el Doxil no aumentó y su transporte a través del intersticio de tumores xenograft humanos se redujo [75]. En general, la inhibición del efecto EPR mediante inhibidores de VEGF como los anticuerpos monoclonales bevacizumab y ranibizumab puede emplearse como estrategia antitumoral, porque bloquea el acceso de nutrientes y oxigeno; sin embargo la misma dificulta la extravasación de nano-objetos. Hace unos 20 años comenzaron a desarrollarse inhibidores de MMP, capaces de inhibir el efecto EPR [76]. Sin embargo, ninguno tuvo éxito clínico dada su incapacidad para eliminar la totalidad de las células tumorales y su toxicidad a dosis elevadas.

2.3. iii Incremento de la transcitosis: péptidos penetrantes de tumores

Recientemente se ha demostrado en pre-clínica que la co-administración del péptido penetrante en tumores iRGD incrementó la acumulación y el índice terapéutico de diversas estructuras, composiciones y tamaños, tanto de pequeñas moléculas (doxorubicina), como de anticuerpos monoclonales (trastuzumab) y nanopartículas (Abraxane y Doxil), en múltiples modelos tumorales humanos xenograft en ratones [77].

2.4 Utilidad de modelos pre-clínicos

Los macrófagos de ratones inmunocomprometidos producen menos VEGF, lo que conduce a menor densidad vascular [78] y a un menor acceso de nano-objetos al intersticio

tumoral respecto de los inmunocompetentes, que pueden acumular alrededor del doble de nano-objetos que los inmunocomprometidos [79]. Los ratones inmunocompetentes por otro lado, portan tumores murinos y no humanos, lo que complica la interpretación de resultados y su extrapolación. Asimismo, la expresión de VEGF y sus receptores en células tumorales in vitro, es mucho menos variable que en tumores clínicos. Una diferencia sustancial entre los modelos tumorales en animales y tumores humanos es la tasa de progresión. Los animales usualmente desarrollan tumores clínicamente relevantes (>5 mm) una semana después de la inoculación subcutánea de células tumorales, en tanto un volumen tumoral equivalente puede tomar años en crecer humanos. Un tumor de 1 g en un ratón de 30 g es aproximadamente 3% de su peso total. En humanos, un tumor comparable pesaría 2–5 kg, una masa lejos de ser ideal para tratarse con nanomedicinas antitumorales. Además, los tumores implantados subcutáneamente hacen uso de la extensa red vascular cutánea, una condición raramente hallada en tumores humanos. Los tumores animales de rápido desarrollo producen gran cantidad de VEGF y mediadores vasculares. Esta rápida progresión resulta en la sobre-estimación del efecto EPR. Aparentemente, el sitio de implantación del tumor experimental influiría en el efecto EPR. En este complejo contexto, la utilidad como modelo predictivo de monocapas celulares y esferoides, que carecen de vasculatura y por ende de las barreras histológicas a la extravasación de nano-objetos, es mínima.

3. LA COMPLEJIDAD ESTRUCTURAL EN LA NANO-ESCALA

Hasta aquí hemos descripto generalidades relativas a la acción selectiva de los nano-objetos, cuyo funcionamiento luce engañosamente sencillo. Cabe preguntarse entonces, por que es tan lenta la aparición de nuevos productos [80]. Las respuestas son múltiples, pero la principal razón obedece a que la actividad de las nanomedicinas depende estrictamente de la interacción de su arquitectura estructural en la nano-escala con el contexto anátomo-patológico del paciente. Y sucede que la capacidad de controlar la arquitectura de los nano-objetos a escala industrial es limitada, además de ser muy heterogéneos los contextos biológicos. La tecnología actual es capaz de producir en condiciones GMP (Good Manufacturing Practice) únicamente vesículas y nanopartículas con geometrías cuasi esféricas de lípidos (liposomas) o polímeros naturales o sintéticos. Asimismo, las superficies pueden recubrirse con relativa facilidad para su estabilización estérica. Aunque no es posible obtener estructuras de mayor complejidad estructural, este grado de simplicidad aún es muy complejo.

Analicemos la doxorrubicina liposomal peguilada (Doxil/Caelyx), uno de los primeros nanofármacos llegados al mercado. La formulación contiene más del 90% de los 2 mg/mL de clorhidrato de doxorubicina a pH 6.5, encapsulada en una población monomodal de liposomas de 80 nm diámetro hidrodinámico y aproximadamente -13 mV de potencial Z. La bicapa liposomal consiste en 3,19 mg/mL de sal sódica de N-(carbonil-metoxi polietilenglicol 2000)-1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (MPEG-DSPE); 9,58 mg/mL fosfatidil colina de soja hidrogenada (HSPC) y 3,19 mg/mL colesterol. Para mantener la isotonicidad, cada mL de Doxil

contiene 2 mg sulfato de amonio, buffer histidina y sacarosa. La doxorubicina se incorpora al interior liposomal mediante el método de carga activa, para lo que se genera un gradiente de protones al atrapar sulfato de amonio en el interior liposomal. Este gradiente es necesario para que la base débil doxorubicina difunda hacia el interior y quede allí retenida una vez protonada. En este proceso, el ácido débil amonio pierde su protón y el amoniaco resultante se elimina a través de la bicapa. La carga activa es tan eficiente para atrapar doxorubicina, que la droga ingresada supera su solubilidad y forma un precipitado de sulfato de doxorubicina. Los cristales de doxorubicina responsables de la típica forma ovoide del Doxil pueden observarse por cryo-transmission electronic microscopy (cryo-TEM) (Figura 4). Junto con Ambisome (anfotericina liposomal), Doxil es uno de los dos nanofarmacos más antiguos, comercializado en Estados Unidos desde 1996. Pero aunque sus patentes estadounidenses hayan caducado en 2010, el desarrollo de una formulación genérica de Doxil se lleva a cabo con extremada lentitud (Lipodox, aprobado por la Food and Drug Administration, FDA, en 2012/13 pero no por la European Medicines Agency, EMA). La complejidad estructural de la doxorubicina liposomal peguilada es responsable directa de su estabilidad coloidal en circulación, farmacocinética y biodistribución. Su conocimiento permitiría estimar la performance del producto in vivo. Sin embargo tal complejidad es difícil no solo de estimar sino también de reproducir. A diferencia de un fármaco convencional, conocer el origen, naturaleza, pureza, estado cristalino y cantidad de principio activo y excipientes no es suficiente para tener una certeza razonable acerca de la performance in vivo de una nanomedicina [81]. Solo a titulo ilustrativo, mencionaremos sus aspectos estructurales más relevantes: 1) los residuos metoxi-PEG 2000 del PEG-DSPE que deben tener una conformación en cepillo y no de hongo, para proveer máxima protección estérica; 2) constancia de carga eléctrica superficial y potencial Z; 3) adecuado perfil de liberación de la doxorubicina in vitro testeado bajo múltiples condiciones, asegurando el atrapamiento la doxorubicina en el interior liposomal frente a la dilución durante la infusión (10 ml/7000 ml sangre); 4) gradiente de sulfato de amonio estable, ya que es responsable de la permanencia de la doxorubicina en el interior liposomal. Este gradiente es lábil y su disipación implica la liberación de la doxorubicina.

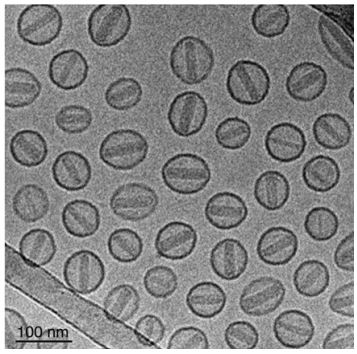


Figura 4. Cryo-TEM de Doxil.

A los efectos de aprobar una formulación genérica de doxorubicina liposomal peguilada, la FDA [82] exige constatar la igualdad de: condiciones internas (volumen, pH y concentración interna de sulfato de amonio, criticas para mantener precipitada a la doxorrubicina); morfología liposomal y cantidad de bicapas (críticas para definir carga de droga, tasa de liberación y potencial activación de complemento); temperatura de transición de fase de bicapas (involucrada en la permeabilidad a la doxorubicina atrapada); tamaño de población liposomal (critica para asegurar el targeting pasivo). Algunos de estos parámetros son sencillos de determinar; pero otros no. Un cálculo hecho sobre la base de la concentración de los componentes de Doxil y tamaño de población liposomal revela que 1 ml de una dispersión comercial contiene 2,3x1014 liposomas, cada uno de los cuales acarrea unas ~10.000 moléculas de doxorubicina, de las cuales más del 95% está precipitadas como cristales en el interior liposomal. La geometría del liposoma influye -entre otras cosas- sobre la activación in vivo del complemento. La técnica de cryo-TEM es en este caso la apropiada para evidenciar las formas ovoides resultantes del precipitado interno de cristales de doxorubicina. Las condiciones internas, como la estabilidad del gradiente disipable o el volumen interno son aún menos sencillos de determinar. La dificultad en predecir la performance in vivo derivadas de la complejidad estructural en la nanoescala enlentece la aprobación por organismos regulatorios y por ende la aplicación.

4. EL TARGETING ACTIVO: LA “BALA MÁGICA” NO ES REAL.

Hace unos 15 años, aparecieron estudios que sugerían que el targeting pasivo podía mejorarse mediante la exhibición superficial de ligandos de receptores selectivamente expresados por las células blanco. Sin embargo el intento de aplicar esta estrategia conocida como targeting activo, para incrementar el delivery de drogas mediante nano-objetos, no ha dado los frutos esperados. Únicamente se ha implementado con relativo éxito en fármacos consistentes en droga unida covalentemente a anticuerpos (ejemplos: Zevalin anti-CD20 90Y-ibritumomab tiuxetan contra linfoma No-Hodgkin), Mylotarg (anti-CD33- ozogamicin-gemtuzumab contra Leucemia, retirado en 2010 del mercado), Ontak (anti-CD25- proteina de fusión toxina difterica-IL2 contra linfoma de células T) y Bexxar (anti-CD20 131I-tositumomab contra linfoma No-Hodgkin).

Existen una serie de cuestionamientos sobre las estrategias de targeting cuya selectividad depende de la interacción ligando-receptor, surgidas tanto de la experimentación in vivo como de la clínica. Uno de ellos se refiere a la oportunidad, cantidad y calidad de la expresión de receptores, que pueda ser transitoria, insuficiente y/o inespecífica [83]. En modelos tumorales de roedores, es indistinguible la acumulación tumoral de albúmina de la de albúmina-folato. La farmacocinética y biodistribución de nanopartículas de ácido poli- láctico-co glicólico (PLGA) no difiere de la de nanopartículas PLGA-folato. La captura hepática (el principal órgano de almacenamiento del exceso de folato) de estos conjugados, explicaría estos resultados. Hasta la fecha, tratamientos pre-clínicos y clínicos con nano-objetos

derivatizados con pequeñas moléculas como galactosamina, transferrina y folato no produjeron resultados satisfactorios [84].

Otro de los cuestionamientos refiere a que la sobre-expresión de receptores en tumores no sucede sincrónicamente y no conduce necesariamente a una mayor acumulación de nano-objetos derivatizados. Las células normales, mucho más numerosas, pueden competir exitosamente frente a las tumorales por la captura (como ocurre con la derivatizacion con folato). Asimismo, la endocitosis mediada por receptores que sigue a la interacción ligando-receptor, aunque veloz, es un proceso saturable [85]; la tasa de reciclaje de receptores en tumores es muy heterogénea, oscilando entre 6-20 h de acuerdo al tipo tumoral [86]. En tanto los receptores de células tumorales tienen gran heterogeneidad en densidad y estructura [87]; la conducta de las células tumorales de un mismo paciente puede variar de acuerdo al estadio de su progresión [88].

Estudios pre-clínicos que emplearon nano-objetos derivatizados con fragmentos de anticuerpos, mostraron que el anticuerpo monoclonal anti-HER2 no media un incremento significativo de acumulación de inmunoliposomas en tumores. Los perfiles farmacocinéticos de liposomas e inmunoliposomas son similares y la acumulación tumoral es la misma para ambos (7-8% de la dosis inyectada/g tejido tumoral), independientemente de la sobre-expresión tumoral de HER2 (figura 5). La presencia de ligandos en liposomas solo incrementa sus oportunidades de binding/internalización de aquellos que se hallan en las vecindades de las células tumorales. Únicamente en ese caso, la internalización de inmunoliposomas por células tumorales que sobre-expresan HER2 fue un orden de magnitud mayor que para liposomas control. Pero como veremos en breve, estos resultados únicamente solo pudieron conseguirse in vitro [89]. Lo mismo sucedió con nanopartículas de poli (DL-láctico) cubiertas con HER2 [90]. Estudios recientes muestran que inmunoliposomas derivatizados con ligandos empleados para targeting al cerebro, no intermedian el acceso al parénquima cerebral in vivo [91].

Por otro lado, se ha reportado que la decoración con ligandos podría incrementar la transcitosis de nanopartículas unos 40–50 µm (3–5 capas celulares) más allá de la vasculatura tumoral, acercándolas al core tumoral [92, 93]. Sin embargo, la dificultad para difundir a través de la MEC tumoral aumenta con el diámetro hidrodinámico de los nano-objetos, como es el caso de aquellos estericamente estabilizados y derivatizados. Finalmente, los nano-objetos derivatizados serían eliminados de circulación mucho más rápidamente que las proteínas nativas o polímeros biocompatibles no modificados, lo que reduce su vida media de circulación y posibilidades de extravasación.

Un tercer cuestionamiento se refiere al hecho de que la incorporación de anticuerpos a la superficie de nano-objetos es un reto estructural que aún no ha podido ser superado a escala industrial. Es extremadamente difícil obtener una población homogénea de nano-objetos recubiertos con anticuerpos carentes de fracción Fc (para evitar su reconocimiento por los R-Fc en células de Kupffer) unidos al extremo del estabilizante estérico.

El cuarto y más importante cuestionamiento, es que la derivatización con ligandos sirve para incrementar la captura de nano-objetos, por células que expresen los correspondientes receptores, pero no incrementa el acceso de nano-objetos a dichas células. In vivo, la cantidad de nano-objetos capturados por un tejido blanco depende primariamente de su posibilidad de extravasar hacia ese tejido desde circulación sistémica. Tal posibilidad es gobernada por los parámetros del targeting pasivo discutidos anteriormente y no por la presencia de ligandos superficiales.

En suma entonces, la identificación de blancos moleculares en células tumorales no garantiza el targeting del nano-objetos derivatizados.

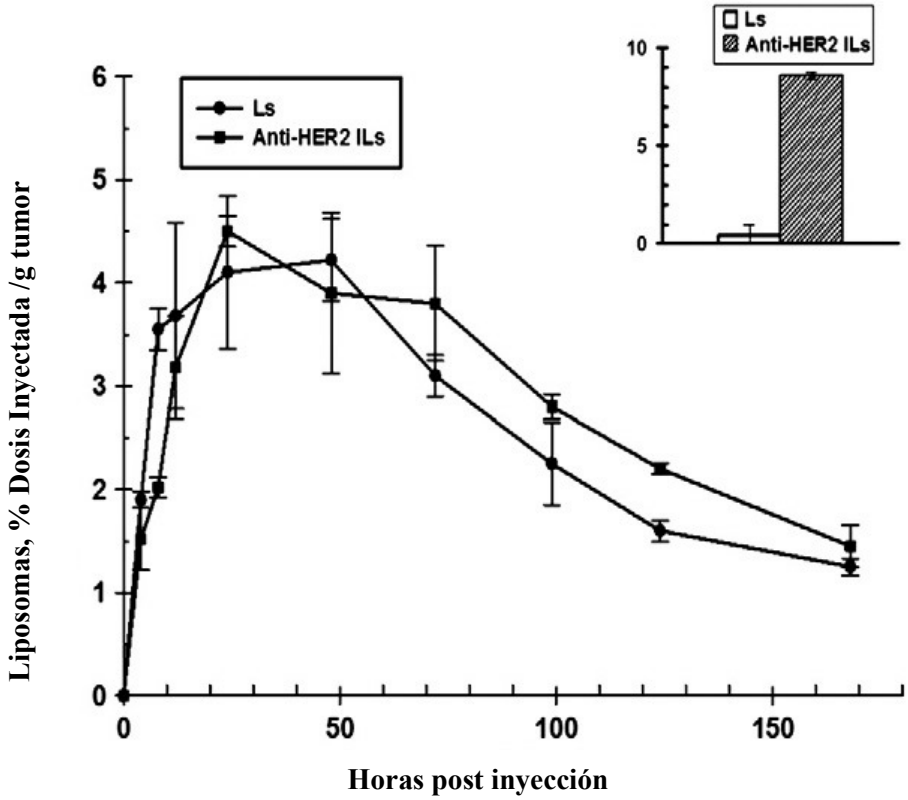


Figura 5. Farmacocinetica tumoral de inmunoliposomas anti-HER2 (Anti-HERs ILs) versus liposomas Peguilados control (Ls) en xenografts de tumor de mama BT-474 implantado s.c. en ratones nude. Inset: captura de immunoliposomes anti-HER2 versus liposomas control (Ls) en células de tumor de mama que sobre-expresan HER2 (SK-Br-3) in vitro. Adaptado de [89].

5. COMENTARIOS ACERCA DE LA EFICACIA

Luego de incorporado en nano-objetos, la farmacocinética de un PA se modifica profundamente. A excepción de las paredes vasculares, hígado, bazo y medula ósea, los nano-objetos fluyen sin tener contacto físico con el resto de los órganos. Asumiendo que el PA permanece retenido en la estructura del nano-objeto, la farmacocinética del PA es indistinguible

de la de su portador. Finalmente, aun existiendo efecto EPR, el hígado colecta la mayoría de los nano-objetos inyectados endovenosamente, por lo general por fagocitosis a cargo de células de Kupffer. Asi, la doxorubicina liposomal peguilada por ejemplo, puede fluir por la vasculatura cardiaca sin que la doxorubicina tenga contacto físico con los cardiomiocitos [95-98]. Estudios representativos que emplearon datos normalizados a un área corporal superficial media de 1,7 m2y un peso promedio de 70 kg, mostraron que Doxil tiene mínima interacción con tejidos sanos, reducido clearance plasmático y menor riesgo de cardiotoxicidad [99]. Inyectada endovenosamente a dosis entre 25 y 50 mg/m2 la doxorubicina liposomal peguilada, permanece en circulación por largo tiempo. Son típicos su mínimo volumen de distribución (en humanos 4L, unas 65 veces menor que la droga libre), gran área bajo la curva plasmática (unas 300 veces mayor que la droga libre), eliminación plasmática bi-exponencial (vidas medias 2 y 45 horas, la mayor parte de la dosis siendo eliminada en la segunda fase) y lento clearance renal (0,1 L/hora vs 45 L /hora para la droga libre). En presencia de efecto EPR, puede acumularse entre 4 a 16 veces más que la forma libre en tumores sólidos. En cambio la doxorubicina en formulación convencional accede uniformemente a todos los tejidos corporales. Además de mielosupresión severa, náuseas, vómitos y efectos mucocutáneos, puede causar fallo cardiaco congestivo irreversible, dada su cardiotoxicidad acumulativa y dosis-dependiente (hasta un máximo de 550 mg/m2) [94]. En su forma nanotecnológica la doxorubicina es más segura y permite administrar mayores dosis acumuladas con menor cardiotoxicidad [100]. Su eficacia sin embargo, no es mayor que la de doxorubicina libre. El acceso de doxorubicina a células tumorales, dependerá de su lenta difusión desde los cristales precipitados en el interior liposomal a través de bicapas poco permeables del Doxil, ya que la corona de PEG impide su endocitosis. Doxil está diseñado para maximizar la retención de doxorubicina en su interior, cuya liberación en circulación conduciría a su distribución uniforme y consiguiente cardiotoxicidad. El control del delicado balance (retención de PA en circulación/liberación sitio específica de PA) sin embargo, es una deuda pendiente. Actualmente se trabaja en la modificación de nano-objetos cuya estructura responda frente a estímulos externos sitio-específicos. Ejemplo de ello son los liposomas termo-sensibles que liberan doxorubicina luego de incrementar su permeabilidad en respuesta a estímulos locales [101]. Pero a pesar de su sencillez conceptual, no se han conseguido estructuras capaces de cumplir satisfactoriamente tal misión; por lo general hay una intensa liberación prematura de PA. Empleando métodos analíticos que permiten no sólo cuantificar el PA en sangre sino también la matriz liposomal y discernir entre PA libre y PA asociado a liposomas, se ha hallado que típicamente luego de 3 h, el 50% de los liposomas permanece circulante pero únicamente el 10% de la doxorubicina es retenida [102]. Recientes estudios muestran que la liberación prematura de PA desde micelas poliméricas podría retardarse mediante el entrecruzamiento de la estructura del core [103, 104].

Los diferentes tipos, estadios y grados tumorales tienen TD muy heterogéneos. De acuerdo al origen tisular por ejemplo, pueden variar entre 506–5378 días (adenomas pituitarios) [105] hasta 12 días (cáncer de estómago) [106]. Pero en tanto la toxicidad dosis-dependiente

es invariante, los tumores de crecimiento veloz, (o de bajo TD) requerirán un aumento proporcional de la dosis de nanomedicinas biodisponibles en el sitio blanco. Teóricamente la amplia ventana terapéutica de las nanomedicinas basadas en el efecto EPR [107] podría ser explotada en la dosificación personalizada para cada paciente. Pero como describimos anteriormente, es difícil controlar la dosificación de nanomedicinas. Por ejemplo, el Doxil se acumula en las vecindades de las células tumorales liberando doxorubicina, que difunde al interior celular en función de su gradiente de concentración, proporcional a su tasa de liberación desde el interior liposomal. Sin embargo, una alta acumulación tumoral de Doxil no significa elevada biodisponibilidad de doxorubicina, ya que su dificultosa liberación y bajo gradiente difusivo pueden resultar en concentración sub-terapéutica. Al margen de este problema, en general las vesículas entre 80-200 nm son lo suficientemente voluminosas como para asociar cantidades importantes de PA. Pero las nanopartículas poliméricas pueden presentar el problema de asociar insuficiente cantidad de PA. Esto ocurrió para las nanopartículas de conjugado polimérico copolímero HPMA-paclitaxel, que asociaron muy baja cantidad de paclitaxel (≤ 10 %) debido a su pequeño tamaño (12-15 nm); esto sumado a la inestabilidad de la unión éster [108, 109] resultó en concentraciones sub-terapéuticas de droga en tejido tumoral, que se evidenció en ensayos clínicos de fase I [110]. La rápida liberación de PA en circulación vía hidrólisis de unión éster, asociada a un tamaño demasiado pequeño fueron los responsables de la veloz filtración renal del conjugado copolímero de bajo PM HPMA-camptotecina además de la toxicidad uretral registrados en ensayos clínicos de fase I, sin que hubiera acumulación vía efecto EPR.

6. COMENTARIOS ACERCA DE LA NANOTOXICIDAD

La descripción detallada de la potencial toxicidad resultante de la interacción entre seres vivos y nano-objetos (nanotoxicidad), excede los términos de este artículo. En general podemos señalar que la interacción con nano-objetos biodegradables y no biopersistentes representan menores riesgos para la salud. La biopersistencia está relacionada con la incapacidad de células fagocíticas para procesar y eliminar el material, lo que conlleva al estrés oxidativo, inflamación crónica, y necrosis o generación de tumores. Asimismo, las rutas de administración tópica y mucosas son menos riesgosas que la parenteral. Los riesgos asociados a la ruta endovenosa surgen aun para nano-objetos biodegradables, y son varios. Por ejemplo, la doxorubicina liposomal peguilada, puede extravasar y acumularse a través de los capilares de la piel de la planta de los pies y de las palmas de las manos. Estas zonas muy vascularizadas, con pequeños capilares sujetos a presión, fricción, microtraumatismos y elevado flujo sanguíneo, favorecen la extravasación y acumulación de nano-objetos de larga vida media de circulación. Este fenómeno está acompañado de toxicidad conocida como eritrodestesia palma-planta y puede ser limitante de su dosis terapéutica [111]. Como comentáramos anteriormente, la mayor parte de los nano-objetos administrados endovenosamente extravasa a través de fenestraciones de sinusoides hepáticos y esplénicos.

Pero mientras las funciones esplénicas pueden ser compensadas por otros órganos del sistema linfático, los daños hepáticos que puedan surgir tras la administración de nanomedicinas antitumorales representan un gran reto por superar. Por ejemplo los nanoconstructos de cis-platino (una droga con dosis limitada por toxicidad renal) tienen menor toxicidad renal a cambio de presentar dosis limitada por toxicidad hepática [112].

La peguilación además, puede ser responsable de la eliminación sanguínea acelerada (accelerated blood clearance, ABC) de nano-objetos estéricamente estabilizados. En el fenómeno ABC, el tiempo de vida media en circulación se acorta para la segunda dosis administrada días más tarde, a causa de la inducción de IgM anti-PEG. Este fenómeno no solo causa captura hepática por opsonización sino eventual activación del complemento (C) [113, 114]. De hecho, la reacción tóxica aguda más importante luego de la administración endovenosa de nano-objetos es el efecto CARPA (Complement Activation Related Pseudo Allergy) [115]. Esta es una reacción de hipersensibilidad mediada por la liberación de factores inflamatorios desde mastocitos, iniciada por la activación del C frente a material nanoparticulado, que no requiere de la presencia de IgE. El distrés cardiopulmonar desencadenado por el efecto CARPA puede ser letal en individuos susceptibles. La activación del C ocurre por adhesión directa de C1q a superficie o a complejos antígeno en superficie-IgG/IgM, o por adhesión de lectina de unión a manosa (MBP)/ficolinas, o por adhesión de C3, sobre superficies. A continuación se desencadenan diferentes cascadas hidrolíticas convergentes en C3 convertasa [116]. La activación del C por vía clásica, de lectinas o alternativa, tiene como consecuencia una mayor eliminación de nano-objetos, ya por mayor fagocitosis luego de la opsonización o por formación del complejo de ataque y lisis sobre estructuras sensibles como las liposomales. El efecto CARPA se ha observado no solo luego de la administración de Taxol (paclitaxel solubilizado en Cremophor EL) y de Taxotere, (Docetaxel, paclitaxel solubilizado en Tween 80), y se cree que las micelas de surfactantes no ionicos polioxietilados Cremophor EL y Tween 80, activadoras de C in vitro, estarían relacionadas con la manifestación del efecto CARPA in vivo. Este efecto también se ha manifestado ante la administración de Doxil y de liposomas que no contienen PEG, como Ambisome. Aún se desconocen las características estructurales de los nano-objetos capaces de gatillar la activación de C, pero han podido establecerse ciertas generalidades que permiten predecir la manifestación del efecto CARPA. Por ejemplo, el C se activa sobre superficies de carga positiva y aunque las cargas negativas o el potencial Z negativo no son gatilladoras per se de activación, la misma es sensible a la topografía superficial de cargas negativas, como ocurre con Doxil, liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) metoxiPEGuilados [117]. También se activa frente a la agregación de nano-objetos. De hecho pequeños cambios en la geometría individual de liposomas, redundan en grandes cambios de superficie total. Por ejemplo, cada dosis terapéutica de Doxil comprende 1013–14 liposomas, lo que representa la infusión de una cantidad de superficie en el orden de los cm2. La detección de morfologías heterogéneas en los viales comerciales de Doxil (elongados, irregulares, agregados), es relevante en términos de activación de C ya que la misma es sensible a la superficie expuesta.

Recientemente se ha demostrado que mínimas variaciones en el radio de curvatura liposomal pueden activar C por la vía clásica (vía unión de IgM) [118]. En este contexto se ha sugerido que la doxorubicina podría contribuir indirectamente a la activación de C al modificar la forma y superficie de los liposomas [119].

La intensidad del efecto CARPA puede ser disminuida reduciendo la velocidad de infusión, diluyendo la concentración liposomal y premedicando con dexametasona. En ciertas ocasiones el fenómeno de taquifilaxis permite la desensibilización previa mediante placebos, como Doxibo (idéntico liposoma pero carente de doxorubicina) en el caso de Doxil.

Los ensayos in vitro, debido a su falta de estandarización y variabilidad, son poco efectivos para predecir activación de C in vivo por nano-objetos. Por otro lado, la reactogenicidad frente a la activación de C es especie dependiente, de acuerdo a: cerdos>perros>humanos>conejos>ratas>ratones. Por lo tanto el modelo animal porcino es el más adecuado para el estudio pre-clínico del efecto CARPA. Claramente, los tumores xenograft humanos implantados subcutáneamente en ratones nude inmunodeficientes, no solo son anatómica y fisiológicamente muy distintos de aquellos que crecen en su entorno nativo (ortotópicos), sino que este tipo de modelo excluye la percepción del efecto CARPA del nanomaterial. A pesar de lo universal de su empleo, los roedores están lejos de proporcionar información predictiva tanto de eficacia terapéutica como de la potencial toxicidad de las nanomedicinas.

7. CONCLUSIONES

Luego de describir los fundamentos de la actividad de las nanomedicinas antitumorales, pueden señalarse los principales aspectos que las diferencian de las formulaciones convencionales que emplean pequeñas drogas hidrofóbicas y de los basados en anticuerpos:

1. La actividad de las nanomedicinas depende de su posibilidad de acceso al sitio blanco, directamente ligada a la anatomía estructural local. Los nano-objetos no se autopropulsionan: su biodistribución depende de fenómenos puramente hidrodinámicos [120].
2. Mientras son pequeños (<2 mm) los tumores se sirven de la vasculatura de tejidos sanos adyacentes. Desarrollar la vasculatura anómala que permita el targeting vía efecto EPR puede tomar entre meses y años [121, 122]. Esto subraya la desventaja de esperar a una evolución del crecimiento tumoral para conseguir cierta selectividad y minimizar toxicidad. La dependencia del efecto EPR significa que los tratamientos más efectivos serian aquellos aplicados en una ventana temporal donde existiera una apropiada arquitectura vascular, con una mínima relación masa (avascular/vascularizada).

3. La dependencia del efecto EPR y su heterogeneidad hace que los estudios pre-clínicos sean poco predictivos de la eficacia de las nanomedicinas. La dificultad para conseguir modelos in vitro e in vivo, que remeden satisfactoriamente la arquitectura vascular tumoral, es uno de los

aspectos críticos para el desarrollo de prototipos de nanomedicinas tumorales cuya actividad depende del efecto EPR. La relevancia clínica del targeting de nano-objetos vía efecto EPR, dada su inusitada variabilidad, queda por demostrar. La exploración del contexto anatomo-patológico de cada paciente, mediante el mismo tipo de nano-objeto que permita tanto diagnóstico por imágenes como tratamiento, podría discernir si la futura medicación será beneficiosa o no [123].

4. La farmacodinamia de las nanomedicinas es única y muy diferente a la de los PA en formulaciones convencionales. La presencia de PA en sangre no es necesariamente PA biodisponible. Para acceder a las células de los tejidos irrigados por la vasculatura, las nanomedicinas deben extravasar y atravesar la matriz extracelular; luego serán capturadas endociticamente o liberarán el PA acarreado en la periferia de las células blanco. Pero las nanomedicinas pueden quedar atrapadas en fenestraciones vasculares o en la matriz extracelular. En el primer caso se detectara PA en sangre, que no está biodisponible. En el segundo caso, solo mediante combinación de marca radiactiva con aislamiento de células, microscopia confocal de fluorescencia con múltiples marcas y/o citometría de flujo es posible distinguir in situ entre PA liberado/ PA asociado a nano-objetos/captura celular de PA libre o asociado a nano-objetos. Por otro lado, la cuantificación del nano-objeto o de PA por separado no significa presencia de nanomedicina, porque el PA puede haberse disociado del nano-objeto.

5. Tanto el precio de las nanomedicinas como su complejidad estructural son muy elevados y la evaluación del costo-beneficio de los tratamientos con nanomedicinas oncológicas está fuera del objetivo de este artículo. Sin embargo, en el año 2006 se comparó la efectividad y costo-beneficio de tratamientos de segunda línea o subsecuentes con topotecan, doxorubicina peguilada liposomal y paclitaxel (tanto monoterapia como en combinación con compuestos de platino), sobre pacientes con cáncer de ovarios avanzado [124]. Se observó claramente que a pesar de no ser más efectivos, los tratamientos con doxorubicina liposomal peguilada fueron menos tóxicos. En tal caso, el menor costo del manejo de efectos adversos (aproximadamente £1,289 menos que topotecan y £4 menos que paclitaxel) contrapesa el elevado costo de la nanomedicina. La próxima generación de nanomedicinas deberá reducir la relación costo /beneficio no sólo disminuyendo la toxicidad sino también incrementando la eficacia. La tecnología actual sin embargo, aún debe resolver la selectividad del delivery de citostáticos, ajustando las dosis al tiempo de duplicación tumoral. Para ello el targeting vía efecto EPR mediante nanomedicinas de larga vida media en circulación, ofrece una solución poco satisfactoria. La peguilación superficial de nano-objetos, impide su captura y subsiguiente procesamiento intracelular, y por lo tanto reduce su oportunidad para ingresar mediante mecanismos que incrementarían la eficacia del delivery. La resolución de esta controversia requiere re-ingenierizar nano-objetos para a) minimizar la complejidad estructural, evitando la decoración superficial con ligandos complejos y b) buscar alternativas a la estabilización estérica con PEG. La vida media de nano-objetos en circulación puede aumentarse saturando la capacidad de captura de las células de Kupffer. Sin embargo dicha saturación no se ha

observado para nano-objetos estéricamente estabilizados hasta dosis de 300 mg/kg. Recientes estudios sugieren que mediante el control de la forma, podría reducirse la fagocitosis de nano-objetos; así su vida media en circulación aumentaría sin necesidad de complejas derivatizaciones. Por ejemplo la fagocitosis se dificulta para aquellos nano-objetos asimétricos cuya relación de ejes mayor/menor sea >10 y de tamaño > 1 µm [125]. Hasta el momento sin embargo, no se han reportado estrategias antitumorales basadas en nano-objetos no fagocitables carentes de la clásica estabilización estérica.

Por otro lado, la imodificación (ingenierización) de los nano-objetos permite controlar su modalidad de captura pinocítica y tráfico intracelular (endocitosis mediada por clatrina, caveolina, por no clatrina/ caveolina o macropinocitosis). Estas rutas permitirían el ingreso de una elevada cantidad de PA/tiempo, así como seleccionar el compartimiento de delivery intracelular de PA, requerida para incrementar expresión o silenciamiento génico, modular respuestas inmunes o evadir mecanismos de resistencia. En pre-clínica, la eficacia de estas estrategias es muy elevada, porque la captura pinocítica requiere de energía, pero es independiente de la difusión (y por lo tanto del gradiente de concentración). Esto significa que la captura pinocítica de pocos nano-objetos transportando elevadas cantidades de PA volcaría sustanciales cantidades de PA a compartimientos selectos del interior celular con extrema eficacia. Una de sus aplicaciones más promisorias de la captura pinocítica es la evasión de las bombas de resistencia a multidrogas [126,127]. Al presente, Abraxane (paclitaxel en nanopartículas de albúmina) es el único tipo de nanomedicina antitumoral que opera luego de ser capturada endocíticamente por células blanco. A diferencia de Doxil, combina una reducción de toxicidad con incremento de eficacia [128]. Actualmente el desarrollo de nanomedicinas que incrementen el índice terapéutico en base a cambios de trafico intracelular de la droga se perfila como extremadamente promisorio, pero se aún se halla en fase pre-clínica fundamentalmente contra agentes infecciosos intracelulares [129-131]. En este marco, recientemente se ha hallado que el control de la geometría y estructura superficial de los nano-objetos permitiría seleccionar la ruta pinocítica de captura y procesamiento [132]. También se ha sugerido que la geometría de los nano-objetos podría gobernar su biodistribución al experimentar diferentes fuerzas hidrodinámicas durante la circulación [133, 134].

La sencillez extrema está llamada a operar como próxima generación de nanomedicinas, pero para acceder a ella todavía hace falta desentrañar la intrincada relación entre forma, tamaño, características superficiales del nano-objeto, hidrodinámica y modalidad de captura/trafico intracelular. La completa biocompatibilidad de los nano-objetos serán los principales retos estructurales para el campo de los nanobiomateriales y sobre todo para la manufactura industrial.

En este artículo hemos dado un brevísimo pantallazo desde la investigación pre-clínica, sobre la engañosa trivialidad detrás del diseño estratégico de nanomedicinas antitumorales basadas en el efecto EPR, la única estrategia conocida hasta el momento, capaz de incrementar la selectividad del delivery de citostáticos. En el mundo desarrollado los consorcios

público-privados, sustentados por una masa crítica de al menos 20 años de investigación previa, apuntan a acelerar la transferencia, es decir a transformar rápidamente conocimiento académico en productos comerciales. Estas acciones, que incluyen activamente los respectivos Ministerios Nacionales de Salud y autoridades regulatorias, se orientan a acelerar el acceso a pruebas clínicas, con fin de asegurar su liderazgo comercial en el campo farmacéutico. Pero en países en desarrollo como la Argentina, nuestra familiaridad para con la nanomedicina es engañosa. Para elaborar un plan estratégico que oriente a varios niveles el desarrollo de nanomedicinas, es condición necesaria pero insuficiente la formación de recursos humanos. Además debe existir la adecuada articulación entre academia e industria, con los organismos de control sanitario y el Ministerio Nacional de Salud. Únicamente así podrá saberse en qué puntos críticos un país en desarrollo como el nuestro, sacaría provecho de desarrollar este tipo de tecnología. ¿Será la nanomedicina un instrumento sofisticado reservado a resolver problemas de salud del Primer Mundo? Está en nosotros responder a esta pregunta que permanece abierta. Dirección a consultar: Asociación Argentina de Nanomedicina (www.nanomed-ar.org.ar)

REFERENCIAS

[1] Feynman RP (1960) There's plenty of room at the bottom. EngSci (CalTech) 23: 22–36

[2] Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf SM, McCullough J (2013) The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. Nanomedicine 9(1):1-14

[3] Bertrand N, Leroux JC(2011) The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective. Journal of Controlled Release 161: 152-163.

[4] Wisse E, Jacobs F, Topal B, Frederik P, De Geest B (2008) The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. Gene Ther. 15 1193–1199

[5] Jacobs F, Wisse E, De Geest B (2010) The role of the sinusoidal cells in hepatocyte-directed gene transfer. Am. J. Pathol. 176:14–21

[6] Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE (2009) Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. Adv. Drug Delivery Rev. 61: 428–437

[7] Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA (2008) Nanoparticle size and surface properties determined the protein corona with possible implications for biological impacts. Proc Natl Acad Sci USA 105:14265–14270

[8] Vonarbourg A, Passirani C, Saulnier P, Simard P, Leroux JC, Benoit J-P (2006) Evaluation of pegylated lipid nanocapsules versus complement system activation and macrophage uptake. J. Biomed. Mater. Res. 78A: 620–628

[9] Walport MJ (2001) Advances in immunology: complement: first of two parts. N. Engl.J. Med. 344: 1058–1066

[10] Monopoli MP, Åberg C, Salvati A, Dawson KA (2012) Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. Nat. Nanotech. 7: 779–786

[11] Allen TM (1981) A study of phospholipid interactions between high-density lipoproteins and small unilamellar vesicles. Biochim. Biophys. Acta 640: 385–397

[12] Rensen PC, Van Dijk MC, Havenaa EC, Bijsterbosch MK, KarKrujit J, Van Berkel TJC (1995) Selective liver targeting of antivirals by recombinant chylomicrons: a new therapeutic approach to hepatitis B. Nat Med 1: 221–225

[13] Kreuter J, Hekmatara T, Dreis S, Vogel T, Gelperina S, Langer K (2007) Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. Journal of Controlled Release 118: 54–58.

[14] Senior J, Delgado C, Fisher D, Tilcock C, Gregoriadis G (1991) Influence of surface hydrophilicity of liposomes on their interaction with plasma protein and clearance from the

circulation: studies with poly(ethylene glycol)-coated vesicles. Biochim. Biophys. Acta 1062: 77–82

[15] Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N. Engl. J. Med. 285: 1182–1186

[16] Berger DP, et al (1995) Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human tumor models of different histologies. Ann. Oncol. 6: 817–825

[17] Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H (2006) Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. Drug Discovery Today 11: 812–818.

[18] Maeda H, WuJ, SawaT, MatsumuraY, HoriK (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. Journal of Controlled Release 65: 271–284

[19] Senger DR, et al (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science 219: 983–985

[20] Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF (1986) A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. Cancer Res. 46 5629–5632

[21] Nagy JA, Chang SH, Dvorak AM, Dvorak HF (2009) Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? Br. J. Cancer 100: 865–869

[22] Herbert SP, Stainier DY (2011) Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12: 551–564

[23] Roberts WG, Palade GE (1997) Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. Cancer Research 57: 765–772

[24] Graves EE, Maity A, Le QT (2010) The tumor microenvironment in non-small-cell lung cancer. Semin. Radiat. Oncol. 20: 156–163

[25] Fang J, Nakamura H, Maeda H (2011) The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. Adv. Drug Deliv. Rev. 63: 136–151

[26] Matsumura Y, Maeda H (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS. Cancer Res. 46: 6387–6392

[27] Maeda H, Yamamoto T (1996) Pathogenic mechanisms induced by microbial proteases in microbial infections. Biol. Chem. 377: 217–226

[28] Matsumura Y, Kimura M, Yamamoto T, Maeda H (1988) Involvement of the kiningenerating cascade and enhanced vascular permeability in tumor tissue. Jpn. J. Cancer Res. 79: 1327–1334

[29] Wu J et al (2001) Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxynitrite and matrix metalloproteinases. Jpn. J. Cancer Res. 92: 439–451

[30] Okamoto T et al (2001) Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitriteinduced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. J. Biol. Chem. 276: 29596–29602

[31] Noguchi Y, Wu J, Duncan R, Strohalm J, Ulbrich K, Akaike T, Maeda H (1998) Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. Jpn. J. Cancer Res. 89: 307–314

[32] Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK (2004) Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. Nature 427: 695

[33] Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK (2002) Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumorlymphatics. Science 296: 1883–1886

[34] Isaka N, Padera TP, Hagendoorn J, Fukumura D, Jain RK (2004) Peritumorlymphatics induced by vascular endothelial growth factor-C exhibit abnormal function. Cancer Res. 64: 4400–4404

[35] Fukumura D, Jain RK (2007) Tumor microenvironment abnormalities: causes, consequences, and strategies to normalize. J. Cell. Biochem. 101: 937–949

[36] Rippe B, Haraldsson B (1987) Fluid and protein fluxes across small and large pores in the microvasculature. Application of two-pore equations. Acta Physiol. Scand. 131: 411–428

[37] Maeda H, Nakamura H, Fang J (2013) The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. Advanced Drug Delivery Reviews 65: 71–79

[38] Boucher Y, Jain RK (1992) Microvascular pressure is the principal driving force for interstitial hypertension in solid tumors: implications for vascular collapse. Cancer Research 52: 5110–5114

[39] Baxter LT, Jain RK (1990) Transport of fluid and macromolecules in tumors II. Role ofheterogenous perfusion and lymphatics. Microvasc. Res. 40 246–263

[40] Jain RK (1987) Transport of molecules in the tumorinterstitium: a review. Cancer Res. 47: 3039–3051

[41] Baxter LT, Jain RK (1989) Transport of fluid and macromolecules in tumors I. Role of interstitial pressure and convection. Microvasc. Res. 37: 77–104

[42] Greish K (2012) Enhanced permeability and retention effect for selective targeting of anticancer nanomedicine: are we there yet? Drug Discovery Today: Technologies 9: 2

[43] Peters W, Teixeira M, Intaglietta M, Gross JF (1980) Microcirculatory studies in rat mammary carcinoma. I. Transparent chamber method, development of microvasculature, and pressures in tumor vessels. Journal of the National Cancer Institute 65: 631–642

[44] JainRK (1990) Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. Cancer Research 50: 814s–819s

[45] Liotta LA, Rao CN (1985) Role of the extracellular matrix in cancer. Annals of the New YorkAcademy of Sciences 460: 333–344

[46] Aukland K, Nicolaysen G (1981) Interstitial fluid volume: local regulatory mechanisms. Physiological Reviews 61: 556–643

[47] Netti PA, Berk DA, Swartz MA, Grodzinsky AJ, Jain RK (2000) Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. Cancer Research 60: 2497–2503

[48] Pluen A, Boucher Y, Ramanujan S, Mckee TD, Gohongi T, Tomaso ED, Brown EB, Izumi Y, Campbell RB, Berk DA, Jain RK (2001) Role of tumor-host interactions in interstitial diffusion of macromolecules: cranial vs. subcutaneous tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4628–4633

[49] Ramanujan S, Pluen A, Mckee TD, Brown EB, Boucher Y, Jain RK (2002) Diffusion and convection in collagen gels: implications for transport in the tumorinterstitium. Biophys. J. 83: 1650–1660

[50] Alexandrakis G, Brown E, Tong RT, Mckee TD, Campbell RB, Boucher Y, Jain RK (2004) Two-photon fluorescence correlation microscopy reveals the two-phase nature of transport in tumors. Nat. Med. 10: 203–207

[51] Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, Jain RK (1998) Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.95: 4607–4612

[52] Jain RK, Stylianopoulos T (2010) Delivering nanomedicine to solid tumors. Nature ReviewsClinical Oncology7: 653–664.

[53] Bae YH, Park K (2011) Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility. Journal of Controlled Release153: 198–205

[54] Less JR, Skalak TC, Sevick EM, Jain RK (1991) Microvascular architecture in a mammary carcinoma: branching patterns and vessel dimensions. Cancer Research 51: 265–273

[55] Northfelt DW, Dezube BJ, Thommes JA, Miller BJ, Fischl MA, Friedman-Kien A, Kaplan LD, Du Mond C, Mamelok RD, Henry DH (2005) Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: results of a randomized phase III clinical trial. Journal of Clinical Oncology 16: 2445–2451.

[56] Bachem MG et al. (2005) Pancreatic carcinoma cells induce fibrosis by stimulating proliferation and matrix synthesis of stellate cells. Gastroenterology 128: 907–921

[57] Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Itty Ipe B, Bawendi MG, Frangioni JV (2007) Renal clearance of quantum dots. Nat. Biotechnol. 25: 1165–1170

[58] Sarin H (2010) Physiologic upper limits of pore size of different blood capillary types and another perspective on the dual pore theory of microvascular permeability. J. Angiogenes. Res. 2: 14

[59] Fang J, Nakamura H, Maeda H (2010) The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect.Advanced Drug Delivery Reviews 63: 136-151

[60] Bae YH, Park K (2011) Targeted drug delivery to tumors: myths, reality, and possibility. Journal of Control Release 153: 198–205.

[61] Kwon K, Lee SC, Han B, Park K (2012) Analysis on the current status of targeted drug delivery to tumors. Journal of Controlled Release 164: 108-114.

[62] Suzuki M, Hori K, Abe I, Saito S, Sato H (1981) A new approach to cancer chemotherapy: selective enhancement of tumor blood flow with angiotensin II. J. Natl. Cancer Inst. 67: 663–669

[63] Guyton C, Hall JE (2000) The body fluids and kidneys. In Textbook of Medical Physiology (Guyton C, Hall JE, eds), pp. 358–382, W.B. Saunders

[64] Greish KG et al (2003) Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting. Clin. Pharmacokinet. 42: 1089–1105

[65] Maeda H (2012) Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting. Proc. Jpn Acad. B Phys. Biol. Sci. 88 53–71

[66] Arun KI, Greish K, Fang J, Maeda H (2006) Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. Drug Discovery Today 11: 812-818

[67] Nagamitsu A, Greish K, Maeda H (2009) Elevating blood pressure as a strategy to increase tumor targeted delivery of macromolecular drug SMANCS: cases of advanced solid tumors.Jpn. J. Clin. Oncol. 39: 756–76

[68] Seki T, Fang J, Maeda H (2009) Enhanced delivery of macromolecular antitumor drugs to tumors by nitroglycerin application. Cancer Sci. 100: 2426–2430

[69] Noguchi A, Takahashi T, Yamaguchi T, Kitamura K, Noguchi A, Tsurumi H, Takashina K, Maeda H (1992) Enhanced tumor localization of monoclonal antibody by treatment with kininase II inhibitor and angiotensin II. Jpn. J. Cancer Res. 83: 240–243

[70] Nagano S, Perentes JY, Jain RK, Boucher Y (2008) Cancer cell death enhances the penetration and efficacy of oncolytic herpes simplex virus in tumors. Cancer Res. 68: 3795–3802

[71] Kawai M, Higuchi H, Takeda M, Kobayashi Y, Ohuchi N (2009) Dynamics of different-sized solid-state nanocrystals as tracers for a drug-delivery system in the interstitium of a human tumorxenograft. Breast Cancer Res. 11(4): R43

[72] Wang J, Lu Z, Gao Y, Wientjes G Au JL (2011) Improving delivery and efficacy of nanomedicines in solid tumors: Role of tumor priming. Nanomedicine (Lond). 6: 1605–1620

[73] Chang E, Chalikonda S, Friedl J, et al (2005) Targeting vaccinia to solid tumors with local hyperthermia. Hum Gene Ther. 16(4): 435–444

[74] Kong G, Braun RD, Dewhirst MW (2000) Hyperthermia enables tumor-specific nanoparticle delivery: effect of particle size. Cancer Res. 60: 4440–4445

[75] Tailor TD, Hanna G, Yarmolenko PS, et al (2010) Effect of pazopanib on tumor microenvironment and liposome delivery. Mol Cancer Ther. 9(6):1798–1808

[76] Wu J et al. (2001) Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxynitrite and matrix metalloproteinases. Jpn. J. Cancer Res. 92, 439–451

[77] Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, Kotamraju VR, Agemy L, Greenwald DR, Ruoslahti E, (2010) Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. Science 328: 1031–1035

[78] Robinson-Smith TM, Isaacsohn I, Mercer CA, Zhou M, Van Rooijen N, Husseinzadeh N, McFarland-Mancini MM, Drew AF (2007) Macrophages mediate inflammation-enhanced metastasis of ovarian tumors in mice. Cancer Res. 67: 5708–5716

[79] Taurin S, Nehoff H, Greish K (2012) Anticancer nanomedicine and tumor vascular permeability; Where is the missing link? Journal of Controlled Release164(3): 265-275

[80] Venditto VJ, Szoka FC Jr (2013) Cancer nanomedicines: So many papers and so few drugs!Advanced Drug Delivery Reviews 65: 80–88

[81] Barenholz Y (2012) Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned Yechezkel (Chezy). Journal of Controlled Release 160: 117-134

[82] http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatory Information /Guidances / UCM199635.pdf, accesado 01/07/2013

[83] Lehtinen J, Magarkar A, Stepniewski M, Hakola S, Bergman M, Tomasz R, Yliperttula M, Urtti A, Bunker A (2012) Analysis of cause of failure of new targeting peptide in PEGylated liposome: Molecular modeling as rational design tool for nanomedicine. European Journal of Pharmaceutical Sciences 46: 121–130.

[84] Lammers T, Kiessling F, Hennink WE, Storm G (2012) Drug targeting to tumors: principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. J. Control. Release 161: 175–187

[85] Kranenborg MH, Boerman OC, Oosterwijk-Wakka JC, Weijert MCD, Corstens FH, Oosterwijk E (1998) Two-step radio- immunotargeting of renal-cell carcinoma xenografts in nude mice with anti-renal cell-carcinoma X anti-DTPA bispecific monoclonal antibodies. Int. J. Cancer 7: 74–80

[86] Paulos CM, Reddy JA, Leamon CP, Turk MJ, Low PS (2004) Ligand binding and kinetics of folate receptor recycling in vivo: impact on receptor-mediated drug delivery. Mol. Pharmacol. 66: 1406–1414

[87] Capone PM, Papsidero LD, Chu TM (1984) Relationship between antigen density and immunotherapeutic response elicited bymonoclonal antibodies against solid tumors. J. Natl. Cancer Inst. 72: 673–677

[88] Damia G, D'Incalci M (2009) Contemporary pre-clinical development of anticancer agents-what are the optimal preclinical models? Eur. J. Cancer 45: 2768–2781

[89] Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, Shalaby MR, Hong K, Nielsen UB, Marks JD, Benz CC, Park JW (2006) Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. Cancer Res. 66: 6732–6740

[90] Cirstoiu-Hapca A, Buchegger F, Lange N, Bossy L, Gurny R, Delie F (2010), Benefit of anti-HER2-coated paclitaxel-loaded immuno-nanoparticles in the treatment of disseminated ovarian cancer: therapeutic efficacy and biodistribution in mice. J. Control. Release 144: 324–331

[91] van Rooy I, Mastrobattista E, Storm G, Hennink WE, Schiffelers RM (2011) Comparisonof five different targeting ligands to enhance accumulation of liposomes into the brain. J. Control. Release 150: 30–36

[92] Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ (2010) Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. J. Cell Biol. 188: 759–768

[93] Lu W, Xiong C, Zhang R, Shi L, Huang M, Zhang G, Song S, Huang Q, Liu G, Li C (2012) Receptor-mediated transcytosis: a mechanismfor active extravascular transport of nanoparticles in solid tumors. J. Control. Release 161: 1005-1014

[94] Kenyon J Chemotherapy and cardiac toxicity- the lesser of two evils. Doctors Lounge Website. Available at: http://www.doctorslounge.com/index.php/blogs/page/14030. Accessed July 13 2013.

[95] Hamilton A, Biganzoli L, Coleman R (2002) A phase I clinical and pharmacokinetic study of polyethylene glycol liposomal doxorubicin (Caelyx, Doxil) at a 6-week interval in patients with metastatic breast cancer.EORTC Ann. Oncol. 13: 910–918

[96] Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y (2003) Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. Clin. Pharmacokinet. 42: 419–436

[97] Mross K, Niemann B, Massing U (2004) Pharmacokinetics of liposomal doxorubicin 662 (TLC-D99; Myocet) in patients with solid tumors: an open-label, single-dose study. Cancer Chemother. Pharmacol. 54: 514–524

[98] Gabizon AA, Shmeeda H, Zalipsky S (2006) Pros and cons of the liposome platform in cancer drug targeting. J. Liposome Res. 16: 175–183

[99] Ewer MS, Martin FJ, Henderson C (2004) Cardiac safety of liposomal anthracyclines. Semin. Oncol. 31: 161–181

[100] Solomon R, Gabizon A (2008) Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: focus on pegylated liposomal Doxorubicin. Clin. Lymphoma Myeloma 8: 21–32

[101] Ta T,Porter TM (2013) Thermosensitive liposomes for localized delivery and triggered release of chemotherapy. Journal of Controlled Release 169:112–125.

[102] de Smet M, Heijman E, Langereis S, Hijnen NM, Grüll H (2011) Magnetic resonance imaging of high intensity focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: an in vivo proof-of-concept study. J. Control. Release 150: 102–110

[103] Lee HJ, Kim SE, Kwon IK, Park C, Kim C, Yang J, Lee SC (2010) Spatially mineralized self-assembled polymeric nanocarriers with enhanced robustness and controlled drug-releasing property. Chem. Commun. 46: 377–379.

[104] Koo AN, Min KH, Lee HJ, Lee S-U, Kim K, Chan Kwon I, Cho SH, Jeong SY, Lee SC (2012) Tumor accumulation and antitumor efficacy of docetaxel-loaded core-shell-corona micelles with shell-specific redox-responsive cross-links. Biomaterials 33: 1489–1499

[105] Tanaka Y, Hongo K, Tada T, Sakai K, Kakizawa Y, Kobayashi S (2003) Growth pattern and rate in residual nonfunctioning pituitary adenomas: correlations among tumor volume doubling time, patient age, and MIB-1 index. J. Neurosurg. 98: 359–365

[106] Takahashi Y, Mai M, Kusama S (1995) Factors influencing growth rate of recurrent stomach cancers as determined by analysis of serum carcinoembryonic antigen. Cancer 75: 1497–1502

[107] Garnett MC, Kallinteri P (2006)Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles. Occup. Med. (Lond.) 56: 307–311

[108] Van S, Das SK, Wang X, Feng Z, Jin Y, Hou Z, Chen F, Pham A, Jiang N, Howell SB, Yu L, (2010) Synthesis, characterization, and biological evaluation of poly(L-gamma-glutamyl-glutamine)- paclitaxel nanoconjugate. Int. J.Nanomedicine 5: 825–837

[109] Duncan R, Vicent MJ, Greco F, Nicholson RI (2005) Polymer–drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endrocine-related cancer. Endocr. Relat. Cancer 12: S189–S199

[110] Meerum Terwogt JM¸ ten Bokkel Huinink WW, Schellens JH, Schot M, Mandjes IA, Zurlo MG, Rocchetti M, Rosing H, Koopman FJ, Beijnen JH (2001) Phase I clinical and pharmacokinetic study of PNU166945, a novel water-soluble polymer-conjugated prodrug of paclitaxel. Anticancer Drugs 12: 315–323

[111] Saini A, Berruti A, Sperone P, Bitossi R, Tampellini M, Dogliotti L, GorzegnoG (2006) Recall inflammatory skin reaction after use of pegylated liposomal doxorubicin in site of previous drug extravasation. Lancet Oncol 7: 186–87.

[112] Uchino H et al (2005) Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC- 6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. Br. J. Cancer 93: 678–687

[113] Ishida T, Ichihara M, Wang X, Kiwada H (2006) Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. J. Control. Release 115: 243–250

[114] Park K (2010) To PEGylate or not to PEGylate, that is not the question. J. Control. Release 142: 147–148

[115] Szebeni J, Muggia F, Gabizon A, Barenholz Y (2011) Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: Prediction and prevention. Advanced Drug Delivery Reviews 63: 1020–1030.

[116] Devine DV, Wong K, Serrano K, Chonn A, Cullis PR (1994) Liposome–complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. Biochim. Biophys. Acta 1191: 43–51

[117] Moghimi SM, Hamad I, Andresen TL, Jörgensen K, Szebeni J (2006) Methylation of the phosphate oxygen moiety of phospholipid-methoxy(polyethylene glycol) conjugate prevents PEGylated liposome-mediated complement activation and anaphylatoxin production. FASEB J. 20: 2591–2593

[118] Pedersen MB, Zhou X, Larsen EKU, Sorensen US, Kjems J, Nygaard JV, Nyengaard JR, Meyer RL, Boesen T, Vorup-Jensen T (2010) Curvature of synthetic and natural surfaces is an important target feature in classical pathway complement activation. J. Immunol. 184: 1931–1945

[119] Szebeni J, Bedocs P, Rozsnyay Z, Weiszhár Z, Rosivall L, Cohen R, Garbuzenko O, Báthori G, Tóth M, Bünger R, Barenholz Y (2012) Liposome-induced complement activation and related cardiopulmonary distress in pigs: factors promoting reactogenicity of Doxil and Ambisome. Nanomedicine: Nanotechnol, Biol, Med. 8: 176–184

[120] Ruenraroengsak P, Cook JM, Florence AT (2010) Nanosystem drug targeting: facing up to complex realities. J. Control. Release 141: 265–276

[121] Gimbrone Jr MA, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J (1972) Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. The Journal of Experimental Medicine 136: 261–276

[122] Jang SH, Wientjes MG, Lu D, Au JLS (2003) Drug delivery and transport to solidtumors. Pharmaceutical Research 20: 1337–1350

[123] MastrobattistaE (2013)Advanced drug delivery in motion.International Journal of Pharmaceutics 454: 517– 520

[124] Main C, Bojke L, Griffin S, Norman G, Barbieri M, Mather L, Stark D, Palmer S, RiemsmaR (2006) Topotecan, pegylated liposomal doxorubicin hydrochloride and paclitaxel for second-line or subsequent treatment of advanced ovarian cancer. Health Technology Assessment 10: 1-80

[125] Champion A, Mitragotri S (2006) Role of target geometry in phagocytosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103: 4930–4934

[126] Kunjachan S, BłauAndrzej, Makel D, Theek B, Kiessling F, Etrych T, Ulbrich K, van Bloois L, Storm G, Bartosz G, Rychlik B, Lammers T(2012)Overcoming cellular multidrug resistance using classical nanomedicine formulations. European Journal of Pharmaceutical Sciences 45: 421–428.

[127] Yin Q, Shen J, Zhang Z, Yu H, LiY (2013) Reversal of multidrug resistance by stimuli-responsive drug delivery systems for therapy of tumor.Advanced Drug Delivery Reviews, In Press.

[128] Hawkins MJ, Soon-Shiong P, Desai N (2008) Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. Advanced Drug Delivery Reviews 60: 876–885.

[129] Etzerodt A, Maniecki MB, Graversen JH, Møller HJ, Torchilin VP, Moestrup SK (2012)Efficient intracellular drug-targeting of macrophages using stealth liposomes directed to the hemoglobin scavenger receptor CD163. Journal of Controlled Release160: 72-80.

[130] Wei H, Zhuo R-X, Zhang X-Z (2013)Design and development of polymeric micelles with cleavable links for intracellular drug delivery. Progress in Polymer Science38: 503-535.

[131] Xu S, Olenyuk BZ, Okamoto CT, Hamm-Alvarez SF (2013) Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: Rationale and advances. Advanced Drug Delivery Reviews 65(1):121-38.

[132] Gratton SE, Ropp PA, Pohlhaus PD, Luft JC, Madden VJ, Napier ME, DeSimone JM (2008) The effect of particle design on cellular internalization pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 11613–11618

[133] Decuzzi P, Godin B, Tanaka T, Lee S, Chiappini C, Liu X, Ferrari M (2010) Size and shape effect in the biodistribution of intravascularly injected particles. J. Control. Release 141: 320–327

[134] Doshi N, Prabhakarpandian B, Rea-Ramsey A, Pant K, Sundaram S, Mitragotri S (2010) Flow and adhesion of drug carriers in blood vessels depend on their shape: a study using model synthetic microvascular networks. J. Control. Release 146: 196–200

[135] Maeda H, Bharate GY, Daruwalla J (2009) Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 71: 409–419

[136] Maeda H (2010) Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and fture prospects. Bioconjug. Chem. 21: 797-802

[137] Kono T, Maeda H, Iwai K, Tashiro S, Maki S, Morinaga T, Mochinaga M, Hiraoka MT, Yokoyama I (1983) Effect of arterial administration of high-molecular-weight anticancer agent SMANCS with lipid lymphographic agent on hepatoma: a preliminary report. Eu. J. Cancer Clin. Oncol. 19: 1053-1065

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva

Número 3, año 12, Diciembre 2013

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Química Viva
E-ISSN: 1666-7948
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar
Universidad de Buenos Aires
Argentina

Alba R., José de Jesús; Ortega S., José Luis; Álvarez H., Gerardo; Cervantes F., Maribel; Ruiz B., Estela; Urtiz E., Norma; Martínez R., Aurora

Riesgos microbiológicos en agua de bebida: una revisión clínica

Química Viva, vol. 12, núm. 3, -diciembre, 2013, pp. 215-233
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86329278004

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Riesgos microbiológicos en agua de bebida: una revisión clínica

José de Jesús Alba R.1,3, José Luis Ortega S.4, Gerardo Álvarez H.1, Maribel Cervantes F.2, Estela Ruiz B.2, Norma Urtiz E.2, Aurora Martínez R.1*

1Facultad de Ciencias Químicas Unidad Gómez Palacio, Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), México.

2Facultad de Ciencias Químicas Unidad Durango, UJED.

3Laboratorio de Asesores Especializados de la Laguna, Gómez Palacio, Durango. 4Unidad Regional de Zonas Áridas. Universidad Autónoma Chapingo.

*E-mail: quimicaaurora@hotmail.com

Recibido 7 de octubre 2013- Reenviado 26 de Octubre 2013- Aceptado 29 de Octubre 2013

Resumen

La contaminación microbiológica y química del agua potable origina efectos adversos a la salud. Un suministro adecuado de agua potable es universalmente reconocido como una necesidad humana básica. El objetivo de la presente revisión fue conocer los riesgos microbiológicos en agua de bebida. Calidad del agua, es garantizar que los consumidores no estén expuestos a agentes patógenos que puedan causar enfermedades. El agua natural puede contener una gran variedad de microorganismos patógenos, bacterias, virus y protozoos. Las cepas patógenas intestinales de Escherichia coli pertenecen a los prototipos: enterohemorrágica, enterotoxigénica, enteroinvasiva, enteropatógena, E. coli productora de la toxina Shiga y de adherencia difusa. Los coliformes totales y fecales termotolerantes se han utilizado como indicadores que afectan la calidad del agua y al evaluar la presencia de E. coli se mide el riesgo de la contaminación microbiana en el agua potable. Se tienen que tomar medidas de prevención para salvaguardar de contaminación futura.

Palabras clave: Calidad del agua, Escherichia coli, contaminación, control, prevención.

Microbiological risks in drinking water: a clinical review

Abstract

The microbiological and chemical contamination of drinking water causes adverse health effects. An adequate supply of drinking water is universally recognized as a basic human need. The aim of this review was to determine the microbiological risks in drinking water. Water quality is to ensure that consumers are not exposed to pathogens that can cause disease. Natural water may contain a wide variety of pathogens, bacteria, viruses and protozoa. Intestinal pathogenic strains of Escherichia coli belonging to prototypes: enterohemorrhagic, enterotoxigenic, enteroinvasive, enteropathogenic E. coli Shiga toxin-producing and diffusely adherent. Total coliforms and fecal coliforms are used as indicators that affect water quality and to assess the presence of E. coli measured the risk of microbial contamination in drinking water. They have to take preventive measures to safeguard future pollution.

Keywords: Water quality, Escherichia coli, pollution control, prevention.

Introducción

El agua dio origen a la vida y la mantiene, es un factor que regula el clima del planeta, esculpe y permite la existencia de los ecosistemas y de la humanidad. La contaminación microbiana y química del agua potable origina efectos adversos a la salud, como cólera, diarrea y fiebre tifoidea, en un número significativo de individuos durante periodos prolongados de tiempo causando incapacidad en los afectados causando pérdidas económicas considerables, lo anterior se debe al crecimiento demográfico, desarrollo industrial y urbanización.1 "Calidad del agua", es un término usado para expresar apropiadamente el sustento del uso del agua para varios procesos.2

En trabajos previos, como el caso de detección de E. coli en tuberías de Europa,3 o en Rawalpindi, Pakistan,4 se ha concluido que era necesaria mayor vigilancia al sistema de agua potable, para diseñar las estrategias más adecuadas para mejorar la calidad y suministro de agua, es necesaria una evaluación continua del agua, para así, determinar la probable fuente de contaminación, analizar los entornos comunitarios, para tomar medidas de saneamiento para el líquido vital, incluyendo aquellas áreas que dependen de fuentes superficiales mejoradas de agua potable.5

Los brotes de enfermedades infecciosas transmitidas por el consumo de agua contaminada siguen siendo grave amenaza de salud en todo el mundo, a pesar de que el agua potable es uno de los recursos más estrechamente vigilados y estrictamente regulados, este fenómeno no solo sucede en los países en desarrollo sino también es amenaza en los países desarrollados. La presencia de crecimiento bacteriano en agua potable puede multiplicar los efectos adversos en los sistemas de distribución de una manera incontrolable.6

Muchos investigadores, han observado que el almacenamiento de agua en el hogar conduce a un deterioro de la calidad del agua debido a su contaminación. Incluso si las familias tienen una fuente de agua limpia para beber, el agua puede contaminarse en el hogar debido a la falta de higiene y de prácticas de mantenimiento a filtros y desinfección de contenedores de agua.5

El agua potable, es un servicio básico en cualquier parte del mundo. Pero las comunidades ubicadas en los alrededores de las ciudades, no son atendidas de igual manera que el área central de las mismas. Cada sistema de gobierno se encarga de distribuir el agua a sus comunidades. Sin embargo, no existe un monitoreo de la calidad del agua, no se lleva un control microbiológico sistemático, necesario para asegurar la potabilidad del agua. Por lo que, el objetivo de la presente revisión fue conocer los riesgos microbiológicos en agua de bebida.

El agua y la contaminación

El agua, no tiene sustituto y no se conoce forma de vida que prescinda de ella: bosques, ciudades, polos, zonas industriales, pastizales, plantíos, bebés, bacterias, ballenas, aviones y cohetes, de cualquier manera, se necesita el agua.2 El agua, es uno de los

elementos más importantes para todas las formas de vida, indispensable en el mantenimiento de la vida en la Tierra y es esencial para la composición y renovación celular. El agua representa el 70% de nuestro cuerpo, participa en la composición de nuestros tejidos y transporta las sustancias más diversas en el organismo.7

El agua químicamente pura es un líquido inodoro e insípido; incoloro y transparente en capas de poco espesor, toma color azul cuando se mira a través de espesores de 6 a 8 m, porque absorbe las radiaciones rojas. A la presión atmosférica normal (760 mm Hg), el punto de congelación del agua es 0℃ y su punto de ebullición de 100℃. El agua alcanza su densidad máxima a una temperatura de 4℃ y se expande al congelarse.2

El agua dulce que se utiliza proviene de dos fuentes: agua superficial y agua subterránea (mantos freáticos), se encuentra en ríos, lagos, pantanos y rebalses o depósitos artificiales. Las cuencas hidrológicas o colectoras, también llamadas cuencas de captación, son aquellas áreas de tierra que captan y llevan el agua de escurrimiento hasta las denominadas masas de agua superficial. El agua que fluye por la superficie de la tierra hasta los cuerpos o masas de agua en la superficie se le conoce como escurrimiento superficial y al agua que fluye por los ríos hasta los océanos se le denomina escurrimiento fluvial. Se considera que el 69% del agua que llega a los ríos en toda la Tierra proviene de la lluvia y de la nieve derretida en sus cuencas, y el agua restante proviene de descargas de agua subterránea. Las cuencas fluviales, alimentadas en gran parte por la lluvia, ocupan el 60% del área de tierra firme y sustentan al 90% de la población mundial.2

Cualquier sociedad civilizada debe considerar el suministro de agua potable como una prioridad. Esto es así, porque el agua potable es una necesidad básica para el desarrollo humano, salud y bienestar.1 Un suministro adecuado de agua potable es, universalmente reconocido como una necesidad humana básica. Sin embargo, millones de personas en el mundo en desarrollo no tienen fácil acceso a un suministro de agua adecuado y seguro.8

Con el cambio climático, el crecimiento demográfico y la escasez de agua, hay una creciente necesidad de gestionar recursos hídricos de manera sostenible. En todo el mundo 1,1 millones de personas carecen de acceso a suministros adecuados de agua y más aún por la gran demanda de afluentes de agua dulce en el mundo. Muchos de los grandes ríos, especialmente en las regiones semiáridas, han reducido significativamente el flujo y captación de agua subterránea, resultando en un descenso de los niveles freáticos en numerosas regiones.2 Desde una perspectiva de salud pública, el acceso a cantidades suficientes de agua limpia y potable es una cuestión crucial. A pesar del hecho de que las grandes cantidades de agua dulce están disponibles en muchas regiones del mundo, el agua potable sigue siendo un recurso limitado.9

Calidad del agua

Calidad del agua, es un término usado para expresar apropiadamente el sustento del uso del agua para varios procesos.2 La calidad del agua es uno de los principales problemas en el tema del agua y su mejora es una de las principales preocupaciones.4 El agua purificada se utiliza como el componente principal en soluciones para diálisis peritoneal en hospitales, en soluciones de nutrientes (alimento infantil), líquidos enterales, preparados en el hospital para administrar a niños y pacientes débiles que no pueden comer alimentos sólidos regulares. La contaminación puede afectar a todo el proceso en la industria farmacéutica o el medio ambiente de un nosocomio.7 Aunque el agua potable es apta para el consumo humano, esto no garantiza que cuente con la calidad suficiente para ser utilizada en instalaciones industriales, equipos, preparación de medicamentos, alimentos, cosméticos, materiales químico farmacéuticos, o unidades de los centros de salud para la limpieza y lavado de semi-áreas críticas o dispositivos anteriores a la aplicación de los procedimientos de desinfección o esterilización. Por esta razón, cada planta industrial o farmacéutica relacionada con los productos de salud debe contar con adecuados sistemas de purificación de agua, lo que le permite satisfacer sus necesidades particulares, especialmente en cuanto a los problemas relacionados con el almacenamiento y distribución interna. Este procedimiento debe garantizar el suministro de agua de acuerdo con el volumen requerido y de conformidad con los puntos críticos exigidos de calidad.7

Los sistemas de control de calidad de agua están diseñados para obtener información cuantitativa sobre la distribución temporal y espacial de la calidad del agua y, por tanto, las variables sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas de los recursos hídricos.10 La protección y salvaguardia de la calidad del agua, se encuentran entre las prioridades más importantes a causa de las implicaciones para el medio ambiente y la salud humana en las zonas donde puede haber contacto directo o indirecto (ingestión, aerosol o inhalación líquida, contacto con la epidermis, etc.) con los patógenos.11 Entre los métodos existentes, la detección y conteo de bacterias indicadoras de base es la técnica utilizada en el monitoreo de la calidad del agua.12

Contaminación del agua

La contaminación del agua es el grado de impurificación, que puede originar efectos adversos a la salud de un número representativo de personas durante periodos previsibles de tiempo y se debe al crecimiento demográfico, desarrollo industrial y urbanización. Estos tres factores evolucionan rápidamente y se dan uno en función del otro. En décadas recientes miles de lagos, ríos y mares se han contaminado en forma alarmantemente debido a las actividades humanas.2

Las fuentes de contaminación del agua pueden ser naturales o artificiales, la contaminación natural es generada por el ambiente, y la artificial por las actividades humanas.

La importancia que ha cobrado la calidad del agua ha permitido evidenciar que entre los factores o agentes que causan su contaminación están: agentes patógenos, desechos que requieren O2, sustancias químicas orgánicas e inorgánicas, nutrientes vegetales que ocasionan crecimiento excesivo de plantas acuáticas, sedimentos o material suspendido, sustancias radioactivas y el calor.2

El acceso al agua potable es esencial para alcanzar una buena salud en la población. Las enfermedades diarreicas causa un estimado de 1,8 millones de muertes cada año en todo el mundo, y estas enfermedades se han relacionado con el acceso limitado a agua potable. Existe una gran preocupación respecto al origen de la contaminación microbiana durante la manipulación y el almacenamiento de agua en los países en desarrollo. La desinfección y almacenamiento seguro del agua de los hogares mejora la calidad del agua potable y con ello la prevención de enfermedades.13

Cuestiones ambientales como el aumento de la salinidad y el calentamiento global pueden afectar a la sostenibilidad de nuestro actual suministro de agua potable y aumentar la amenaza de brotes de enfermedades transmitidas a través del agua.13

El estiércol es una fuente valiosa de nutrientes, sin embargo, puede ser un contaminante del medio ambiente cuando es indebidamente canalizado. Una de las principales consecuencias negativas de la aplicación al suelo del estiércol es la contaminación bacteriana de las aguas superficiales y subterráneas a través de aguas superficiales y de drenaje del subsuelo. Varios factores, tales como: humedad del suelo, lluvia y el periodo de labranza influyen en el transporte de bacterias del suelo al agua.14

El agua natural puede contener una gran variedad de microorganismos patógenos, bacterias, virus y protozoos. El principal origen de estos microorganismos patógenos son las heces humanas y de otros mamíferos de sangre caliente. Estos microorganismos fecales se introducen en los ambientes de agua dulce, principalmente mediante la liberación de efluentes de aguas residuales, las aguas superficiales de escorrentía y la lixiviación de suelos. Para determinar la calidad microbiológica del agua se utilizan indicadores bacterianos de contaminación fecal.15 Patógenos, tales como Bacillus cereus, Clostridium botulinum y Listeria monocytogenes se encuentran en el mismo entorno de los vegetales, mientras que los agentes patógenos entéricos (Escherichia coli (E. coli) y Salmonella spp) pueden contaminar los vegetales, si el estiércol del animal o el agua de riego están contaminados. Algunas bacterias tienen como hábitat natural el agua, como por ejemplo: Flavobacterium spp, Pseudomonas spp, Acinetobacter spp, Moraxella spp. Chromobacterium, Achromobacter spp y Alcaligenes spp, así como, numerosas bacterias ya identificadas.16

La contaminación microbiana de los suministros de agua potable puede tener graves consecuencias para la salud de los consumidores, y este hecho se ha puesto de manifiesto dramáticamente en los últimos dos incidentes ocurridos en Canadá, Walkerton, Ontario y North Battleford, Saskatchewan.17

En mayo del año 2000, el sistema de abastecimiento de agua potable de la ciudad de Walkerton se contaminó con la bacteria E. coli O157:H7, siete personas murieron y más de 2.300 enfermaron. La alarma provocada por este brote llevó al gobierno de Ontario a establecer una investigación, las causas del brote y cómo podría haberse evitado. La investigación no sólo informó sobre lo que había ocurrido en Walkerton, sino también se hicieron recomendaciones preventivas de contaminación, sobre todo los sistemas de abastecimiento de agua potable en Ontario.17

En abril del año 2001, un gran número de personas en el área de North Battleford en Saskatchewan presentaron una enfermedad entérica identificada posteriormente como criptosporidiosis. Aproximadamente, 5.800 a 7.100 personas de la zona de Battleford, junto con varios centenares más de otras comunidades y otras provincias que habían visitado la región se infectaron.17

Los contaminantes químicos del agua potable pueden ser plomo, cadmio, nitrato, nitrito y N-nitrosaminas, que son potencialmente nocivos para el hombre.1 También, se ven implicados el excremento humano y la falta de higiene personal y doméstica en la propagación de muchas enfermedades infecciosas como: cólera, fiebre tifoidea, hepatitis, poliomielitis, criptosporidiosis, ascariasis y esquistosomiasis. En Kenia, las enfermedades diarreicas afectan a los hijos de los residentes.8 La contaminación fecal en los sistemas de agua potable se ha agudizado en los últimos años de lugares recreativos y riego con patógenos emergentes, tales como Giardia, Cryptosporidium y E. coli 0157: H7, entre otros.18

La coexistencia de saneamiento in situ y el uso de las aguas subterráneas en el pasado, han sido confinados a las áreas rurales donde hay tierras adecuadas para permitir una distancia adecuada entre las letrinas y pozos poco profundos. Con la rápida urbanización y expansión de los asentamientos de tugurios en el África subsahariana, los servicios sanitarios en el lugar y las aguas subterráneas se utilizan en algunas zonas urbanas, ya que son opciones asequibles en la ausencia de los servicios suministrados por el gobierno.8 Al respecto, la OMS reporta que, en todo el mundo 1,1 millones de personas todavía no tienen acceso al agua potable, y cada día más de 6.500 niños mueren de diarrea. Muchos investigadores han observado que el almacenamiento de agua en el hogar conduce a un deterioro de la calidad del agua debido a su contaminación en el propio hogar. Incluso, si las familias tienen una fuente de agua potable, ésta puede contaminarse por la falta de higiene y malas prácticas de manipulación. Factores conocidos que afectan la re contaminación del agua en el hogar: tamaño de la boca de la vasija de almacenamiento, transferencia de agua entre los contenedores desde la recolección hasta el almacenamiento, contacto con el agua e inmersión de utensilios y el nuevo crecimiento de bacterias en el mismo recipiente. Diversos estudios también han demostrado que los organismos pueden multiplicarse como biopelículas en los mismos contenedores.5

En los EE.UU, la contaminación de agua subterránea es la fuente más común de enfermedades transmitidas por el agua, asociado con el 64% de brotes entre 1989 y 2002. El

agua subterránea constituye el 92% de los brotes, que a menudo se produjo en pequeñas comunidades.19

Las bacterias enteropatógenas representan importantes riesgos pediátricos en todo el mundo. Muchos de los agentes que causan gastroenteritis son susceptibles a responder a la terapia con antibióticos, por ejemplo, Shigella, Campylobacter, E. coli enteropatógena (EPEC), E. coli enteroinvasiva (EIEC), E. coli enterotoxigénica (ETEC), E. coli enteroagregativa (EagEC), etc. Es probable que, la terapia temprana empírica de estos agentes resulte en una resolución más rápida de la infección. Desafortunadamente, no es común el diagnóstico clínico de algunos de estos patógenos, como en los laboratorios de investigación.20

Escherichia coli

E. coli, es la especie bacteriana más comúnmente aislada en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que involucran tejidos y órganos humanos, es uno de los organismos comunes involucrados en sepsis y en shock inducido por endotoxinas. Las infecciones del tracto urinario y de heridas, neumonía en pacientes hospitalizados inmunosuprimidos y meningitis en neonatos son otras formas comunes de infección causadas por E. coli. Ciertas cepas de E. coli pueden causar enteritis o gastroenteritis por mecanismos diferentes que provocan cinco síndromes clínicos distintos. Es un bacilo Gram (-), móvil, facultativo, oxidasa (-), reductor de nitratos, no esporulado, fermenta la glucosa con producción de ácido y gas, presenta tres antígenos: somático O; flagelar H; y de superficie K.20 E. coli, es miembro predominante de la flora intestinal humana.21 Los seres humanos sanos suelen llevar más de un billón de células de E. coli en sus intestinos. E. coli fue introducida a los laboratorios hace casi un siglo para convertirse en uno de los organismos modelo más importantes y con mucho, es el procarionte más estudiado.22

Los grupos de Shigella y E. coli diarreogénica (DEC) tienen forma variable de causar diarrea, dependiendo de la ubicación geográfica y del estado inmunitario del huésped.23 Recientemente, se han aislado e identificado cepas de DEC por el método reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la superficie del agua de ríos en la ciudad de Dhaka en Bangladesh, por lo que se determinó que la DEC es el principal problema de salud en Dhaka.24 Con su amplia gama de patologías, E. coli es causa importante de morbilidad y mortalidad humana en todo el mundo.22 Las cepas patógenas intestinales pertenecen a los prototipos: E. coli enterohemorrágica (EHEC), EPEC, E. coli productora de la toxina Shiga (STEC), EIEC, ETEC y E. coli de adherencia difusa (DAEC).18

E. coli enterotoxígenica (ETEC)

Las cepas de ETEC, forman enterotoxinas termolábiles (TL) o termoestables (TE) que producen una diarrea secretoria similar a la que causa Vibrio cholerae. La unión superficial de las células bacterianas a las células del epitelio intestinal es un requisito para la producción de

toxina. La producción de toxinas esta mediada por plásmidos y con frecuencia involucra serogrupos de E. coli: 08, 015, 020, 025, 027, 063, 078, 080, 085, 092, 0115, 0128ac, 0139, 0148, 0153, 0159, 0167. La infección con las ETEC, sigue usualmente a la ingestión de agua o alimento contaminado.18,19

Las ETEC, son la causa principal de deshidratación por diarrea entre los bebés en destete en los países en desarrollo. Estos niños tenían de dos a tres episodios de ETEC, cada uno en los 2 primeros años de vida, lo que representa más del 25% de todas las enfermedades diarreicas y los resultados se estiman en unas 700.000 muertes cada año. La ETEC, es ahora reconocida como un problema de salud mundial.23

E. coli enteropatógena (EPEC)

Las cepas de EPEC, causan síndromes diarreicos principalmente en lactantes. La patogenia no es clara; sin embargo, las reacciones inflamatorias y los cambios epiteliales degenerativos que se observan en cortes de tejido pueden ser secundarios a las propiedades adhesivas de las bacterias, que se cree que están relacionadas con plásmidos. Los serogrupos 055, 086, 0111, 0119, 0126, 0127, 0128ab, y 0142 están comúnmente involucrados. Las manifestaciones clínicas de las son fiebre, malestar, vómitos y diarrea, con poca sangre y una cantidad importante de moco.23

Las EPEC, son responsables de la diarrea pediátrica prolongada y constituye una amenaza importante para la salud en países en desarrollo, mientras que la EHEC causa brotes esporádicos pero mortales de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Europa, América del Norte, y Japón. Tanto la EPEC como la EHEC, causantes de diarreas, colonizan la mucosa intestinal y producen una característica histopatológica en las microvellosidades de los enterocitos que forman el "borde de cepillo", conocidos como cuadro de adhesión y borrado del enterocito, esta alteración resulta de la acción de un grupo de proteínas efectoras que se unen a las células huésped a través de un sistema de secreción tipo III codificada por una isla de patogenicidad conocida como locus cromosómico LEE.25

E. coli enteroinvasiva (EIEC)

Las cepas EIEC, son capaces de penetrar las células del epitelio y producen una diarrea inflamatoria, similar a la causada por especies de Shigella. Como con Shigella, la mayoría de las especies son inmóviles, fermentadoras tardías de la lactosa o no fermentadoras y anaerogénicas. Se sospecha de cepas EIEC cuando se observa sangre, moco y neutrófilos segmentados en extendidos de materia fecal. Los serogrupos más comúnmente involucrados son 028ac, 029, 0112, 0124, 0136, 0143, 0144, 0152, y 0164. Los mecanismos patogénicos incluyen invasión de la mucosa del colon, similar a Shigella, y proliferación dentro de las células epiteliales, que culminan en muerte celular.23

E. coli enteroadherente (EAEC)

La EAEC, es un término usado para describir cepas de E. coli que son adherentes a las células Hep-2 o Hela, no producen enterotoxinas TL, TE o verotoxina (VT) y son no invasivas, independientemente de los serogrupos. Las cepas EAEC producen diferentes patrones de adherencia a las células de los tejidos. Un patrón se caracteriza por la formación de pilas de bacterias que se observan tanto en células Hep-2 y en cubreobjetos. Las cepas que producen este patrón de adherencia se mencionan como EagEC. Hasta la fecha, estas cepas han sido recuperadas principalmente en niños con diarrea crónica.23

E. coli enterohemorragica (EHEC)

Las cepas EHEC producen diarrea, probablemente secundaria al daño por toxina a las células del endotelio vascular. Dado que estas cepas son citotóxicas para células Vero, la toxina es denominada por algunos autores como VT y las cepas que la producen como E. coli productoras de VT. Otros investigadores se refieren a esta toxina como toxina semejante a Shiga (SLT).23 Un tema importante con la terapia empírica es que algunos episodios de diarrea bacteriana se deben a la STEC, de diversas maneras a que se refiere en la literatura como STEC, EHEC y VTES. Hay más de 100 serotipos de STEC que causan enfermedades en los seres humanos; los serotipos importantes incluyen E. coli O157: H7, O111: NM, y O26: H11. Las cepas pueden producir toxina Shiga 1 (Stx1), Stx2, las variantes de stx1 o stx2, o toxinas múltiples.20La Stx, representa el factor principal de virulencia en cepas de STEC, y han sido reconocidas las toxinas Stx1 y Stx2, que son similares en actividad biológica, pero distintas inmunológicamente. Varios subtipos de Stx2 se han identificado por la homología en su secuencia y reactividad inmunológica cruzada.26

Una gran proporción de aislamientos de EHEC pertenecen al serotipo O157:H7. En EE.UU, se considera que el origen de la mayoría de los casos de enfermedades relacionadas con E. coli es la carne molida. El aislamiento de E. coli O157:H7 es posible solo durante la fase aguda de la infección, el microorganismo puede no ser detectado de 5 a 7 días después del inicio de la infección. Los aislamientos sospechosos deben ser confirmados con antisueros específicos anti O157: H7.27 A pesar de que E. coli O157:H7 en todo el mundo, se reporta que es el serotipo STEC más importante, debido a su asociación con enfermedades graves y con muchos brotes de diarrea y síndrome urémico hemolítico, las cepas STEC pertenecen a un mayor número de serotipos que se han aislado de infecciones en seres humanos.26Es particularmente importante, controlar las células viables pero no cultivables de E. coli O157: H7 en el agua potable y en fuentes de agua debido al potencial del sistema de distribución para transmitir este patógeno. La detección específica de patógenos viables es importante porque sólo las células viables tienen el potencial para causar infecciones y, por tanto, plantean un riesgo significativo para la salud. Los métodos basados en cultivos siguen siendo ampliamente

utilizados para la identificación positiva de E. coli O157: H7 en una muestra. Sin embargo, estos métodos no detectan células viables y puede dar resultados falsos negativos.28

TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE CONTAMINACIÓN FECAL

La presencia de microbios patógenos en agua potable es un riesgo significativo para la salud de los consumidores. La mayoría de las bacterias en los sistemas de distribución de agua potable están asociadas con las biopelículas que crecen en la superficie interior de las tuberías, incluso bajo condiciones de elevada o baja velocidad en la conducción de agua de bajo o alto cizallamiento, dependiendo de las necesidades de caudal de la red.29 Al evaluar el riesgo de la contaminación microbiana en agua potable, es crucial obtener resultados confiables rápidamente. Tradicionalmente, las bacterias patógenas son detectadas a través de cultivo, ya que no requieren equipo especial, y las bacterias detectadas con estos métodos son viables y activas, ello significa que los métodos de cultivo tienden a subestimar el número real de bacterias que son capaces de causar infecciones. El segundo inconveniente es que, el tiempo requerido para los resultados pueden variar desde 1 día hasta varias semanas para los diferentes microorganismos debido a las diferencias en las tasas de crecimiento (micobacterias de crecimiento lento).29

Hay varios estudios que muestran que los microbios patógenos oportunistas pueden sobrevivir más tiempo y tienen mayor resistencia al cloro cuando se presentan en las biopelículas, más que en el agua potable. En las biopelículas, el suministro de nutrientes para las bacterias es mejor, y las bacterias están protegidas contra la desinfección. Además, los virus pueden adherirse a las biopelículas y seguir siendo infecciosos durante mucho tiempo.

Indicadores de contaminación de tipo fecal

Los indicadores bacterianos (IOS), que residen en el aparato digestivo de los seres humanos y animales, se utilizan en EE.UU y en todo el mundo para evaluar la seguridad microbiológica del agua potable.30 Garantizar su seguridad es un proceso continuo. En los países desarrollados, los reglamentos del agua potable requieren la vigilancia de numerosos parámetros químicos y microbiológicos. Se ha demostrado que la presencia de agentes patógenos se correlaciona con la presencia de contaminación fecal, como resultado de modernos métodos para análisis de agua potable que se basan en el recuento de bacterias fecales como indicadores de contaminación fecal y la posible presencia de organismos que causan enfermedades.31 Las bacterias indicadoras se utilizan con frecuencia como el identificador de la fuente de contaminación fecal y/o organismos indicadores de contaminación en el agua.30 Los coliformes totales (CT), coliformes fecales termotolerantes (CF), E. coli, enterococos y bacterias se utilizan como IOS para vigilar la calidad del agua y así, la evaluación de la salud, ya que es mucho más fácil y menos costoso para detectar y cuantificar

los agentes patógenos. La detección de patógenos es difícil porque las bacterias y los virus pueden estar asociados con ciertos materiales en particular.11

La clasificación del grupo de coliformes se ha basado durante mucho tiempo sobre los criterios definidos en el siglo pasado por Breed y Norton en 1937. Actualmente, todas las especies están reconocidas como β-galactosidasa-positivo y E. coli es también β-glucuronidasa positiva. Además, ahora es bien sabido que un buen porcentaje de las especies, como algunas cepas de E. coli, no pueden fermentar la lactosa ni producen gas.32 Al respecto, algunas cepas de E. coli, pueden dar una reacción negativa a la producción de indol. La cuantificación de los IOS con los métodos tradicionales tiene el tiempo de detección como limitante importante, pues pueden durar 72 h desde el comienzo del análisis.32 El grupo coliforme, se ha sometido a revisiones sobre la base de la capacidad de clasificar los miembros de acuerdo a su genética. Dos factores clave que han llevado a la tendencia hacia el uso de E. coli como el "preferido" para la detección de indicadores de contaminación fecal, no sólo en agua potable sino también en otras matrices.29

La definición de CF también ha sido revisada para que coincida con la genética de sus miembros y ahora incluye el medio ambiente de especies recién identificadas. Como resultado, los CF son cada vez más referidos como coliformes "termotolerantes". Esto, combinado con la mejora de los métodos de detección de E. coli, se ha iniciado una tendencia hacia el uso de E. coli, en lugar de CF como un indicador más confiable de contaminación fecal en agua potable.31Hoy en día, los CT, CF y enterococos se utilizan como IOS de contaminación fecal en agua. Idealmente, un IOS de contaminación fecal deberá cumplir los siguientes criterios: siempre estará presente en humanos y animales de sangre caliente y en las heces se produce un mayor número de los agentes patógenos, que normalmente no se multiplican en ambientes acuáticos; ser identificables claramente por sus características y pruebas confiables, mostrando mayor resistencia a las aguas receptoras y desinfectante frente a patógenos.33

Técnicas tradicionales

Frecuentemente, el indicador de E. coli se prefiere para el recuento de coliformes, es un buen indicador del riesgo sanitario asociado con agua contaminada. Métodos aprobados y utilizados tradicionalmente para el recuento de E. coli en agua, se basan en el cultivo, incluyendo la siembra múltiple en tubos de fermentación, o método de filtración por membrana, seguido de incubación en medios selectivos.15 Comparando, el recuento de los IOS con los métodos de cultivo tradicionales tiene el tiempo de detección como limitante sustancial, pues puede ser tan amplio como 72 h desde el inicio del análisis. Los métodos más rápidos se basan en la detección de la actividad de una enzima en particular y no necesitan seguir los pasos de confirmación de los aislamientos. La directiva europea sobre agua potable define la norma ISO 9308-1 (2002) como un método de referencia para la detección de E. coli y coliformes. El método prescribe el uso de agar lactosa con Tergitol. Los pasos de confirmación son necesarios con el fin de discriminar coliformes y E. coli.32

La falta de certeza en cuanto a su filiación toxica y la imprecisa correlación entre los métodos recomendados para la detección de coliformes ha presentado problemas. El primero es que E. coli es aceptada como bacteria coliforme, la especie contiene variantes que no producen gas de la lactosa o lo hacen después de 48 h, por lo que no se les identifica por medio de esta técnica. No obstante, en la práctica la técnica ha demostrado su efectividad. Estas técnicas proporcionan resultados estadísticos de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado.34Los medios de enriquecimiento contienen peptona, vancomicina, cefixamina, cefsolodina y telurito de potasio, son utilizados para aumentar la detección de microorganismos. La E. coli forma colonias redondas, convexas y lisas, con bordes definidos. Algunas cepas son hemolíticas en gelosa sangre. En el medio de Mc Conkey o en el medio de agar Eosina Azul de Metileno, las colonias de E. coli tienen un brillo metálico; son colonias planas no viscosas. Los organismos aislados en los medios "diferenciales" son posteriormente identificados mediante pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares.34

Las infecciones con este tipo de patógeno han sido, por lo tanto, motivo de preocupación cada vez mayor en el diagnóstico clínico de las enfermedades diarreicas en los últimos años. Sin embargo, las tasas actuales de las infecciones por estos patógenos entéricos son probablemente subestimadas en gran medida debido a las limitaciones de los actuales métodos de diagnóstico clínico para poder distinguirlos de la flora no patógena normal.21

Pruebas Bioquímicas

Algunas pruebas bioquímicas y otros ensayos han sido utilizados para diferenciar E. coli de otras enterobacterias. Indol, E. coli produce indol en caldo que contiene triptófano. Rojo de metilo, esta prueba indica el pH final del cultivo en caldo con 0.5 % de glucosa después de una incubación de 4 días a 37℃. E. coli da un pH inferior a 4.5 y es por tanto, rojo de metilo positivo. Citrato, el medio de citrato de Koser modificado por Simmons contiene citrato de sodio y azul de timol como indicador, la única fuente de carbono es el citrato. Los microorganismos que pueden utilizar el citrato como fuente de carbono se desarrollan bien y el indicador se vuelve azul. Los demás microorganismos no prosperan y el medio conserva su color verde. Voges-Proskauer, depende de la producción de acetilmetilcarbinol a partir de la glucosa. En presencia de un álcali este compuesto es oxidado a diacetilo y da color rosa.35

E. coli, descompone carbohidratos con producción de ácido y gas; produce aproximadamente igual cantidad de CO_2 y de H_2 a partir de la glucosa. Todos los cultivos contienen variantes y mutantes estables con respecto a morfología colonial (rugosa o lisa), características antigénicas, comportamiento bioquímico y resistencia a los virus.35 Debido a la importancia que representa contar con técnicas sencillas y confiables para la determinación de microorganismos indicadores de la calidad sanitaria de los alimentos, se han desarrollado, métodos como el PetrifilmMR donde se utilizan medios deshidratados como medio Bilis Rojo

Violeta que contienen elementos nutritivos, una base gelificante en agua fría, un indicador de la actividad de glucoronidasa y un indicador químico para el recuento de CT y E. coli.35

Metodologías instrumentales para análisis de agua

La capacidad de detectar la contaminación microbiana en el agua potable es un asunto de preocupación urgente para los servicios de agua y las autoridades de salud pública. El sistema de Colilert 18/Quanti-Traye se basa en el número más probable y la técnica es basada en enzimas, es un ensayo semi-automático reducido a multiwells. Se puede detectar simultáneamente coliformes y E. coli con una incubación de 18-22 h.32

Los métodos basados en la biología molecular, tales como el análisis de productos por PCR, dan datos precisos con respecto a la ocurrencia de las bacterias. Sin embargo, los métodos basados en ADN no demuestran la viabilidad de las bacterias, y los métodos básicos son sólo cualitativos y no cuantitativos. La fluorescencia de hibridación in situ (FISH) se basa en la unión específica de sondas de ácidos nucleicos a las regiones específicas en el rRNA.29 Este método también fue utilizado por Yang en el 2007 en el Norte de Taiwán.

En la actualidad, los métodos basados en la biología molecular se utilizan para las investigaciones epidemiológicas de brotes, control y seguimiento de la propagación de patógenos potenciales. La electroforesis de campo pulsado, es el método biomolecular más utilizado para la subtipificación de cepas de STEC.26 Tradicionalmente, los métodos por FISH se basan en el uso de sondas de ADN de oligonucleótidos convencionales que contienen alrededor de 20 bases. Recientemente, los métodos por FISH han sido desarrollados usando sondas de péptidos de ácidos nucleicos (PNA) marcados con fluorescencia, dirigidas a secuencias de genes de rRNA blanco específico. Las moléculas de PNA son imitadores de ADN, donde se sustituye la carga negativa de la columna vertebral de azúcar-fosfato por una columna vertebral aquiral, la columna vertebral neutral de poliamida formada por unidades repetitivas de N-(2-aminoetil) glicina.29 Además, se ha encontrado que las pruebas de PNA penetran mejor a través de la pared celular hidrofóbica de los microorganismos más que las pruebas tradicionales de ADN. Los métodos FISH PNA, confirman rápidamente la presencia de diversas bacterias patógenas. Asimismo, Liu y colaboradores (2008), desarrollaron un método que podría detectar específicamente un pequeño número de células de Escherichia cultivables y viables pero no cultivables O157:H7 en un litro de agua del grifo, así como en el agua de río. Las bacterias diana capturadas fueron detectadas utilizando los genes rfbE y fliC como los marcadores con la combinación de RT-PCR y el método electrónico de microarrays de ADN. Este método también demostró ser capaz de detectar células de E. coli O157: H7 viables pero no cultivables en un litro de agua del río.

El agua es esencial para la vida, es materia prima para la higiene, limpieza, actividad industrial, farmacéutica, hospitalaria, etc. La calidad sanitaria del agua para consumo humano es indiscutible para preservar la salud. Por esta razón, cada planta industrial o farmacéutica

debe conocer y saber tratar los efectos en el proceso de su producto final, contar con adecuados sistemas de purificación de agua, para el óptimo proceso de sus productos y deben contar con adecuados mecanismos de tratamiento de aguas residuales, bioacumulación, alcantarillado, residuos agrícolas, industriales, radiactivos y térmicos que son los contaminantes principales del agua en nuestro planeta. Al respecto, "UNILEVER" anunció en Enero de 2012 la creación de la Fundación Unilever, dedicada a mejorar la calidad de vida mediante la prestación de higiene, saneamiento, acceso al agua potable, nutrición básica y mejora de la autoestima, formando alianza con: Oxford Committee for Famine Relief, Population Services International, Save the Children, Fondo de Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) y el Programa Mundial de Alimentos. De la misma manera, en Marzo del 2012 el UNICEF y la OMS, publicaron que el mundo ha cumplido con la meta de los objetivos de Desarrollo del Milenio de reducir a la mitad la proporción de personas sin acceso al agua potable mucho antes de la fecha límite de 2015. Entre 1990 y 2010, más de 2.000 millones de personas tuvieron acceso a fuentes mejoradas de agua potable. No obstante, la meta de saneamiento sigue estando muy retrasada. Aunque se cuente con el equipo y personal especializado para detectar la contaminación microbiana en agua potable, se tienen que tomar medidas de prevención para salvaguardar de contaminación futura y así evitar los riesgos microbiológicos en agua de bebida, debe ser asunto de preocupación urgente para los servicios de agua y las autoridades en salud pública. El análisis microbiológico del agua es rutinario en tomas de pozos o durante el proceso de purificación. Sin embargo, en la toma domiciliaria de las comunidades no se realizan dichas pruebas. Por lo tanto, es necesario revisar periódicamente la calidad microbiológica del agua de bebida usada en toda la comunidad.

El objetivo principal de gestión de la calidad del agua desde una perspectiva de salud es garantizar que los consumidores no estén expuestos a niveles de agentes patógenos que puedan causar enfermedades. Un requisito prioritario en la prevención y la protección de la salud pública es tener resultados confiables y rápidos. Al evaluar la presencia de E. coli se mide el riesgo de la contaminación microbiana en el agua potable, esto es crucial para obtener resultados confiables rápidamente y así tomar las medidas de saneamiento oportunas, como floculación y filtración con arena, cloración, transporte y almacenamiento, entre otros.

Referencias

1. Agatemor Ch, Okolo PO. University of Benin water supply system: Microbiological and physico-chemical assessments. Environmentalist. 2007; 27:227-239.

2. Martínez-Romero A, Fonseca-Gómez K, Ortega-Sánchez JL, García-Luján C. Monitoreo de la calidad microbiológica del agua en la cuenca hidrológica del Río Nazas, México. Quimica Viva. 2009;1:35-47.

3. Juhna T, Birzniece D, Larsson S, Zulenkovs D, Sharipo A, Azevedo NF, Ménard-Szczebara F, Castagnet S, Féliers C, Keevil CW. Detection of Escherichia coli in Biofilms from Pipe Samples and Coupons in Driking Water Distribution Networks. Applied and Environmental Microbiology. 2007; 73(22):7456-7464.

4. Farooq S, Hashmi I, Qazi IA, Qaiser S, Rasheed S. Monitoring of Coliforms and chlorine residual in water distribution network of Rawalpindi, Pakistan. Environ Monit Assess. 2008; 140:339-347.

5. Levy K, Nelson KL, Hubbard A, Eisenberg JNS. Following the water: a controlled study of drinking water storage in Northern Coastal Ecuador. Environmental Health Perspectives. 2008; 116(11):1533-1540.

6. Eichler S, Richard Ch, Hôltje C, Westphal P, Bôtel J, Brettar I, Mehling A, Hôfle MG. Composition and Dynamics of Bacterial Communities of a Drinking Water Supply System as Assessed by RNA- and DNA-Based 16S rRNA Gene Fingerprinting. Applied and Environmental Microbiology. 2006; 72(3):1858–1872.

7. Penna VTCh, Martins SAM, Mazzola PG. Identification of bacteria in drinking and purified water during the monitoring of a typical water purification system. BMC Public Health. 2002; 2(1):1-11.

8. Kimani-Murage, EW, Ngindu AM. Quality of Water the Slum Dwellers use: The Case of a Kenyan Slum. Journal of Urban Health: Bulletin of the New York Academy of Medicine. 2007; 84(6):829-838.

9. Lévesque B, Pereg D, Watkinson E, Maguire JS, Bissonnette L, Gingras S, Rouja P, Bergeron MG, Dewailly E. Assessment of microbiological quality of drinking water from household tanks in Bermuda. Canadian Journal of Microbiology. 2008; 54(6): 495-500.

10. Karamouz M, Nokhandan AK, Kerachian R, Maksimovic C. Design of on-line river water quality monitoring systems using the entropy theory: a case study. Environ Monit Assess. 2009; 155:61-81.

11. Ostoich M, Aimo E, Frate R, Vazzolers M, Stradella S, Osti P. Intergrated approach for microbiological impact assessment of public wastewater treatment plants. Chemistry and Ecology. 2007; 23(1):43-62.

12. Djuikom E, Njiné T, Nola M, Kemka N, Zébazé Togouet SH, Jugnia LB. Significance and suitability of Aeromonas hydrophila vs. fecal coliforms in assessing microbiological water quality. World J Microbiol Biotechnol. 2008; 24(11): 2665–2670.

13. Malakauskas M, Kasnauskyté N, Kudirkiené E, Sernienė L, Malakauskas A, Stimbirys A, Milius J. Microbiological evaluation of drinking water from centralized and small community supply systems in Kaunas Region, Lithuania. Veterinarija Ir Zootechnika. 2007; 30(60):50-56.

14. Thiagarajan A, Gordon R, Madani A, Stratton GW. Discharge of Escherichia Coli from agricultural surface and subsurface drainage water: tillage effects. Water Air Soil Pollut. 2007; 182: 3-12.

15. Prats J, Garcia-Armisen T, Larrea J, Servais P. Comparison of culture-based methods to enumerate Escherichia coli in tropical and temperate freshwaters. The Society for Applied Microbiology. 2008; 46: 243–248.

16. Aydin A. The Microbiological and Physico-Chemical Quality of Groundwater in West Thrace, Turkey. Polish J of Environ Stud. 2007; 16(3): 377-383.

17. Krewski D, Balbus J, Butler-Jones D, Haas ChN, Isaac-Renton J, Roberts KJ, Sinclair M. Managing the Microbiological Risks of Drinking Water. Journal of Toxicology and Environmental Health. 2004; 67(20-22): 1591–1617.

18. Carlos C, Alexandrino F, Vieira MAM, Stoppe NC, Sato MIZ, Gomes TAT, Ottoboni LMM. Prevalence of virulence factors in Escherichia coli isolated from healthy animals and water sources in Brazil. Journal of Water and Health. 2011; 9(1): 138-142.

19. Fong TT, Mansfield LS, Wilson DL, Schwab DJ, Molloy SL, Rose JB. Massive Microbiological Groundwater Contamination Associated with a Waterborne Outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio. Environ Health Perspect. 2007; 115(6).

20. Ochoa TJ, Chen J, Walker ChM, Gonzales E, Cleary TG. Rifaximin does not induce toxin production or phage-mediated lysis of Shiga toxin producing Escherichia coli. Antimicrobial Angents and Chemotherapy. 2007; 51(8): 2837-2841.

21. Yang J, Wu F, Tsai J, Mu J, Lin J, Chen K, Kuo SH, Chiang C, Wu H. Comparison between O Serotyping Method and Multiplex Real-Time PCR to Identify Diarrhoeagenic Escherichia coli in Taiwan. J Clin Microbiol. 2007; 45(11): 3620–3625.

22. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, Bingen E, Bonacorsi S, Bouchier Ch, Bouvet O, Calteau A, Chiapello H, Clermont O, Cruveiller S, Danchin A, Diard M, Dossat C, El Karoui M, Frapy E, Garry L, Ghigo JM, Gilles AM, Johnson J, Le Bouguénec Ch, Lescat M, Mangenot S, Martinez-Jéhanne W, Matic I, Nassif X, Oztas S, Petit MA, Pichon Ch, Rouy Z, Saint Ruf C, Schneider D, Tourret J, Vacherie V, Vallenet D, Médigue C, Rocha EPC, Denamur E. Organised genome dynamics in the Escherichia coli species results in highly diverse adaptive paths. PLoS Genetics. 2009; 5(1).

23. Hien BTT, Scheutz F, Cam PD, Serichantalergs O, Huong TT, Thu TM. Diarrheagenic Escherichia coli and Shigella Strains Isolated from Children in a Hospital Case-Control Study in Hanoi, Vietnam. Journal of Clinical Microbiology. 2008; 46(3): 996-1004.

24. Saurab KM, Majibur RM, Rashed N. Detection of virulence potential of diarrhoeagenic Escherichia coli isolated from surfacewater of rivers surrounding Dhaka city. Journal of Bangladesh Academy of Sciences. 2012; 36(1):109-121.

25. Loukiadis E, Nobe R, Herold S, Tramuta C, Ogura Y, Ooka T, Morabito S, Kérourédan M, Brugére H, Schmidt H, Hayashi T, Oswald E. Distribution, functional expression and genetic organization of cif, a phage-encoded type III-secreted effector from enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli. Journal of Bacteriology 2008; 190(1): 275-285.

26. Vaz TMI, Irino K, Nishimura LS, Cergole-Novella MC, Guth BEC. Genetic heterogeneity of Shiga Toxin-producing Escherichia coli strains isolated in Sao Paulo, Brazil, from 1976 trought 2003, as revealed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. Journal of Clinical Microbiology. 2006; 44(3): 798-804.

27. Abskharon RNN, Hassan SHA, Gad El-Rab SMF, Shoreit AAM. Heavy Metal Resistant of E. coli Isolated from Wastewater Sites in Assiut City, Egypt. Bull Environ Contam Toxicol. 2008; 81: 309–315.

28. Liu Y, Gilchrist A, Zhang J, Li X-F. Detection of viable but nonculturable Escherichia coli O157:H7 bacteria in drinking water and river water. Applied and Environmental Microbiology. 2008; 74(5): 1502–1507.

29. Lehtola MJ, Torvinen E, Kusnetsov J, Pitkânen T, Maunula L, von Bonsdorff C-H, Martikainen PJ, Wilks SA, Keevil CW, Miettinen IT. Survival of Mycobaterium avium, Legionella pneumophila, Escherichia coli, and Caliciviruses in drinking water associated biofilms grown under high-shear turbulent flow. Applied and Environmental Microbiology. 2007; 73(9): 2854-2859.

30. Anderson KL, Whitlock JE, Harwood VJ. Persistence and Differential Survival of Fecal Indicator Bacteria in Subtropical Waters and Sediments. Applied and Environmental Microbiology. 2005; 71(6): 3041-3048.

31. Tallon P, Magajna B, Lofranco C, Leung KT. Microbial indicators of faecal contamination in water: A current perspective. Springer: Water, Air, and Soil Pollution. 2005; 166: 139-166.

32. Bonadonna L, Cataldo C, Coccia AM, Chiaretti G, Semproni M. Evaluation of the phenotypic characteristics of coliform bacteria recovered with two methods: the European Drinking Water Directive reference method and the Colilert 18/Quanty-TrayTM system. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 2006; 22: 629-634.

33. Koutsotoli AD, Dimou DS, Bezirtzoglou, EEB, Alamanos YP, Maipa VE. Long-term and short-term inducible effects of trifluralin on Escherichia coli and Enterococcus faecalis. Microbial Ecology in Health and Disease. 2005; 17(2): 121-127.

34. Baudart J, Lebaron P. Rapid detection of Escherichia coli in waters using fluorescent in situ hybridization, direct viable counting and solid phase cytometry. Journal of Applied Microbiology. 2010; 109(4): 1253 - 1264.

35. Brown J, Stauber C, Murphy JL, Khan A, Mu T, Elliott M, Sobsey MD. Ambient-temperature incubation for the field detection of Escherichia coli in drinking water. Journal of Applied Microbiology. 2011; 110(4): 915-923.

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva

Número 3, año 12, Diciembre 2013

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Química Viva
E-ISSN: 1666-7948
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar
Universidad de Buenos Aires
Argentina

Sánchez Juan, Rocío
LA QUIMICA DEL COLOR EN LOS ALIMENTOS
Química Viva, vol. 12, núm. 3, -diciembre, 2013, pp. 234-246
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86329278005

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

LA QUIMICA DEL COLOR EN LOS ALIMENTOS

Rocío Sánchez Juan

Licenciada en Química por la Universidad de Salamanca (España)

Profesora de Enseñanza Secundaria. Especialidad: Física y Química

E mail: rsjrocio@hotmail.com

Recibido: 20 de Noviembre de 2013- Aceptado 30 de noviembre de 2013

RESUMEN

El presente trabajo se centra en un tipo de aditivo alimentario muy presente en nuestros días, como son los colorantes. Se presentan sus características principales y su problemática y se analizan algunos de los principales colorantes tanto naturales como artificiales.

PALABRAS CLAVE: colorantes, aditivos, números E,

THE CHEMISTRY OF COLOURS IN FOOD

ABSTRACT

The present essay is focused on a current type of food additives: the colourings. Colourings are very present in our daily lives. Their main characteristics and side effects are being discussed and the main colourings, both natural and synthetic are being analysed.

KEY WORDS: colouring, additive, E numbers,

[f1]

1. INTRODUCCIÓN

Si la comida no tiene buen aspecto no sabe bien. Esto es cierto hasta el punto de que hay bastantes alimentos naturales considerados exquisitos por algunos y que otros no pueden comer sólo por su aspecto particular. Esto ocurre por ejemplo con los caracoles, las angulas, las ostras o los callos, sin que tengamos que recurrir a ejemplos de otras civilizaciones.

Es curioso observar la influencia del color sobre el sabor, habiendo mucha gente que confunde el sabor de un vino tinto con el de un blanco si no lo ve antes, o que es incapaz de decir qué es lo que está comiendo si lo hace a ciegas. [1]

Debido a la importancia del aspecto de los alimentos es por lo que los colorantes alimentarios tienen un papel tan relevante entre los aditivos alimentarios. Muchas veces se emplean para resaltar el color natural de los alimentos y otras para devolver el color perdido en las manipulaciones para su conservación. Esto último es lo que ocurre por ejemplo con las conservas de fresa y de guisantes que sin los colorantes resultarían de un feo y poco apetitoso color marrón. [1]

2. LOS COLORANTES ¿ADITIVOS MODERNOS?

Los aditivos constan en la letra pequeña de las etiquetas de los alimentos industriales y en conserva. Con estas sustancias, el fabricante pretende garantizar una calidad perdurable: sirven para la conservación, el aspecto atractivo, el aroma y el sabor de los alimentos. [2]

Sin embargo, no debe pensarse que la adición de estos compuestos es una práctica moderna, de hecho, los primeros aditivos que se utilizaron fueron los conservantes (en los desiertos de Asia central ya se utilizaba la salazón hace 7000 años) y los colorantes [3], sobre los que versa el presente trabajo.

La coloración de los alimentos ya se practicaba en tiempos de los romanos y de los egipcios.

En la Edad Media, con el fin de remediar la monotonía de su alimentación, la gente añadía colorantes naturales como el ocre, los extractos de acelgas, de zanahorias o de hierbas. [3]

A principios del siglo XIX, con la creciente evolución de la Química, los alimentos eran coloreados con cromato de plomo, sulfito de mercurio, arseniato de cobre o brea de hulla. [3]. Muchos de éstos fueron prohibidos en 1887 con la primera ley de los colorantes, habiéndose constatado sus efectos tóxicos.

Más tarde, en la segunda mitad del siglo XIX, fueron descubiertos los colorantes azoicos de tintes luminosos, que en un principio fueron utilizados para la coloración de los productos textiles y que, posteriormente, se introdujeron en los alimentos. De esta manera se conseguía que tuvieran un aspecto más apetecible, lo que a su vez también permitía poner a la venta productos en perfecto estado así como pasados, ya que el comprador podía ser engañado sobre el estado de los productos. [2]

2. LEGISLACIÓN ACTUAL

Actualmente los colorantes son el grupo de aditivos en el que mayores diferencias se encuentran en las legislaciones entre distintos países. En algunos, como los países nórdicos, prácticamente no pueden utilizarse, mientras que en el Reino Unido se utilizan algunos que no están autorizados en casi ningún otro país de la Unión Europea. También existen diferencias notables entre los colorantes autorizados en Estados Unidos y en la Unión Europea, lo que dificulta ocasionalmente el comercio internacional de algunos alimentos elaborados.

Hay que recordar que para que se pueda utilizar un colorante alimentario (o cualquier aditivo) en la Unión Europea en un alimento, primero debe figurar en la lista de los autorizados en general, y segundo, debe estar autorizado para ese producto concreto. [4]

De los colorantes permitidos hoy en día la mayor parte pertenecen al grupo de las vitaminas, las provitaminas y sustancias naturales como la clorofila, los carotenos y el rojo de remolacha. Su inocuidad es indiscutible y así por ejemplo, el beta-caroteno y la riboflavina pueden añadirse a los alimentos sin necesidad de declararlos. Asimismo, el caramelo sintético está también, por lo general, permitido sin restricciones para muchos alimentos. [2]

2.1. ¿QUÉ ES EL VALOR I.D.A.?

En este punto sobre legislación debemos mencionar el valor I.D.A., que corresponde a las siglas ingesta diaria aceptable. Mediante este valor se indica la dosis diaria tolerable de una determinada sustancia, es decir, la cantidad que una persona puede tomar diariamente durante

toda su vida sin que ello le suponga un perjuicio para su salud. Esta cantidad se expresa en mg por cada kg de peso corporal y día. [2]

No obstante, debe tenerse en cuenta que la I.D.A. no es siempre válida para los bebés porque su mecanismo de desintoxicación es más débil. Por esto existe una legislación específica muy severa para los alimentos de los lactantes. [3]

La I.D.A. es una noción que evoluciona y que puede ser revisada y corregida en función de nuevos descubrimientos y experimentos científicos. Este parámetro es establecido por los Comités de expertos europeos y mundiales y puede variar ligeramente de un Comité a otro. [3]

2.2. LOS NÚMEROS E

Con el fin de permitir la libre circulación de los alimentos de un país a otro, la Unión Europea le ha asignado a los aditivos un número de 3 a 4 cifras precedido de la letra E (de Europa) que permite identificarlos, conocer su función y su denominación química. [3]

Como ingredientes de un producto alimenticio, los aditivos deben figurar obligatoriamente en la etiqueta del envase.

El primer número indica el papel principal de cada aditivo:

E1-colorantes

E2-conservantes

E3-antioxidantes

E4-emulgentes, estabilizantes, espesantes y gelificantes

E5-agentes antiaglomerantes, ácidos, bases y sales

E620 a E635-potenciadores del sabor

E901 a E904-agentes de recubrimiento

E950 a E967-edulcorantes

Los números E permiten, al sustituir las palabras por las cifras, mencionar los aditivos de manera más concisa en los embalajes de dimensiones reducidas así como facilitar su identificación independientemente de la lengua utilizada en la etiqueta. [3]

3. QUÍMICA DE LOS COLORANTES

Como ya se ha indicado, un colorante es una sustancia utilizada como aditivo en un alimento para recuperar su color, perdido tras un procesado industrial, para acentuar el color original o para dotarle de un color más atractivo. [3]

Los colorantes pueden ser naturales, si son extraídos de una sustancia vegetal, animal o mineral, o sintéticos, si son productos modificados química o físicamente.

[f2]

Entre los colorantes naturales se distinguen los hidrosolubles, solubles en agua, los liposolubles o solubles en la grasa, y los minerales. [3]

COLORANTES NATURALES HIDROSOLUBLES	
Curcumina (E100)	Riboflavina, lactoflavina o B2 (E101)
Cochinilla o ácido carmínico (E120)	Caramelo (E150)
Betanina o rojo de remolacha (E162)	Antocianos (E163)
COLORANTES NATURALES LIPOSOLUBLES	
Clorofilas (E140 y 141)	Carotenoides (E160)
Xantofilas (E161)	
MINERALES	
Carbón vegetal (E153)	Carbonato cálcico (E170)
Dióxido de titanio (E171)	Óxidos e hidróxidos de hierro (E172)
Aluminio (E173)	Plata (E174)
Oro (E175)	

[3]

Entre los colorantes artificiales o sintéticos se distinguen los colorantes azoicos y no azoicos.

Los primeros deben su color al grupo azo –N=N– conjugado con anillos aromáticos por ambos extremos.

COLORANTES SINTÉTICOS AZOICOS	
Tartrazina (E102)	Rojo allura AC (E129)
Amarillo anaranjado S o amarillo sol FCF (E110)	Negro brillante BN (E151)
Azorrubina, carmoisina (E122)	Marrón FK (E154)*
Amaranto (E123)	Marrón HT (E155)*
Rojo cochinilla A o rojo Ponceau 4R (E124)	Litol Rubina BK (E180)**
Rojo 2G (E128)*	
COLORANTES SINTÉTICOS NO AZOICOS	
Amarillo de quinoleína (E104)	Indigotina o carmín de índigo (E132)
Eritrosina (E127)	Azul brillante FCF (E133)
Azul patentado V (E131)	Verde ácido brillante BS (E142)

[3]

*El "Rojo 2G", "Marrón FK" y "Marrón HT" se utilizan, entre los países desarrollados, prácticamente sólo en el Reino Unido.

** "Litol Rubina BK" se utiliza exclusivamente para teñir la corteza de algunos quesos.

Los colorantes artificiales son solubles en agua, debido a la presencia de grupos de ácido sulfónico, y consecuentemente son fáciles de utilizar, generalmente en forma de sales sódicas, en líquidos y materiales pastosos. También se pueden utilizar en forma insoluble, como lacas con hidróxido de aluminio, cuando se añaden a productos sólidos, para evitar que estos productos "destiñan". En este segundo caso, el colorante representa solamente entre el 10% y el 40% del peso total.

Además de mucho más fáciles de utilizar que los colorantes naturales, los colorantes artificiales son también, en general, más resistentes a los tratamientos térmicos, pH extremos, luz, etc., que los colorantes naturales. Solamente la eritrosina, la indigotina y el verde ácido brillante son relativamente sensibles a la acción de la luz. [4]

En el punto 5 se recogen las principales características de cada uno de los colorantes que aparecen en las tablas anteriores. Debe recordarse, que se incluyen los colorantes que figuran en la lista de colorantes autorizados en la Unión Europea. En Estados Unidos el listado es distinto, estando autorizados siete, que tienen el código FD&C (food, drugs and cosmetics).

4. EFECTOS SECUNDARIOS

En 1939, científicos japoneses constataron que un colorante sintético utilizado frecuentemente provocaba cáncer en los animales de experimentación. Este descubrimiento llevó en poco tiempo a la prohibición de todos los colorantes azoicos con fines alimentarios. Sólo después de largos estudios para demostrar la inocuidad de algunos de estos colorantes fueron nuevamente permitidos. [2] Aún hoy dicha inocuidad toxicológica de los colorantes azoicos es discutida. [3]

Aunque la estructura química de estos colorantes, utilizados principalmente para los dulces, ha ido cambiando con el tiempo de manera que no se descomponen en el organismo sino que son eliminados por completo e inalterados, comportan todavía cierto riesgo. Éste consiste básicamente en la aparición de reacciones alérgicas, siendo las personas que sufren de asma o que son sensibles al ácido acetilsalicílico las que peor toleran los colorantes azoicos. [2] [3]

5. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS COLORANTES MENCIONADOS

- COLORANTES NATURALES HIDROSOLUBLES
- Curcumina (E100): color naranja amarillento, extraído de la raíz de la cúrcuma u obtenido sintéticamente por fermentación con ayuda de bacterias. Aparece en refrescos, mermeladas, mantequillas, quesos, productos de pastelería y panadería, curry, té, salchichas y platos preparados a base de arroz. No presenta toxicidad, salvo predisposición alérgica. [2] [3] [5]
- Riboflavina, lactoflavina o B2 (E101): color amarillo tirando a fluorescente, con un ligero olor. Es la vitamina B2. Se obtiene de la levadura de cerveza generalmente sintética. Se encuentra en el hígado, verduras, sopas, salsas, pasta, productos lácteos y también es producida por la flora intestinal. Se considera inocuo. [2] [3] [5]
- Cochinilla (E120): color rojo carmín. Se obtiene del caparazón seco de las hembras fecundadas del insecto cochinilla del nopal. Es estable a la luz, al calor y a los ácidos de las frutas. Su uso está muy extendido en licores, vinos de frutas, golosinas, refrescos, confituras, etc… También forma parte de la composición de algunos cosméticos como pintalabios. No se conocen sus efectos secundarios pero es causante de algunas reacciones alérgicas (asma y perturbaciones gastrointestinales). Existe controversia no demostrada sobre si es posible que cause hiperactividad en niños. [2] [3] [5]
- Caramelo (E150): color marrón. Existen distintos tipos obtenidos por calentamiento de azúcar o almidón, algunos en presencia de amoniaco o sulfito amónico. Aparece en golosinas, cola, cerveza, bebidas alcohólicas, bollería, pan, cereales, chocolate… Se considera inocuo aunque en algunos experimentos con ratas se han descrito alteraciones sanguíneas.

- Betanina o rojo de remolacha (E162): color rojo oscuro. Se obtiene por prensado y extracción de la remolacha. Está presente en productos de pastelería, chicle, yogur, salsas, postres… Se considera inocuo y lo que es más, en algunos estudios se ha constatado acción anticancerígena. [2] [5]
- Antocianos (E163): colores vegetales de rojo a violeta azulado. Se obtiene por extracción de moras, fresas, grosellas, uvas, frambuesas, maíz negro… Presente en bebidas, queso, confituras, helados y productos lácteos aromatizados. Sin efectos secundarios. [2] [3].

- COLORANTES NATURALES LIPOSOLUBLES
- Clorofilas (E140 y 141): color verde. Se extrae químicamente de las plantas verdes. Está presente en chicles, dulces, verduras, confituras, licores… Se considera inocuo.
- Carotenoides (E160): color naranja amarillento obtenido a partir de extractos vegetales como la zanahoria, algas… o sintetizado con microorganismos alterados genéticamente. Son precursores de la vitamina A. Se estabiliza mediante el ácido ascórbico y protege de la podredumbre por oxidación. Aparece en mantequillas, margarinas, queso, mahonesa, helados, postres, mazapán. Sin efectos secundarios.
- Xantofilas (E161): color naranja procedente de la xantofila de ortigas, alfalfa, aceite de palma o yema de huevo. Se usa en salsas, condimentos, golosinas, pasteles, galletas, pienso para aves… Se considera inocuo.

- MINERALES
- Carbón vegetal (E153): color negro obtenido de la carbonización de la madera, turba, lignito o hulla u otros materiales vegetales. Aparece en recubrimientos de cera para quesos, queso Morbier, grageas. No presenta efectos adversos si no contiene benzopirenos. [2] [5]
- Carbonato cálcico (E170): color blanco grisáceo, también utilizado como antiaglomerante, estabilizante y soporte para aditivos. Se obtiene por molienda de piedra calcárea o por precipitación de iones calcio con iones carbonato. Está presente en recubrimientos y grageas, alimentos para bebés, elementos decorativos de alimentación, pastelería, quesos,… Se considera inocuo. [2] [3] [5]
- Dióxido de titanio (E171): color blanco obtenido de la mena de hierro ilmenita. Aparece en grageas, chicle, recubrimientos en medicamentos y decoración de dulces. Se desconocen los posibles efectos secundarios pero se han descrito eventuales efectos cancerígenos. [2] [3] [5]
- Óxidos e hidróxidos de hierro (E172): color de los óxidos de hierro: amarillo, rojo, negro, que se pueden mezclar entre ellos o con dióxido de titanio para obtener tonos marrones.

Están presentes en grageas, dulces, recubrimientos, aceitunas, corteza de queso, medicamentos. Se consideran inocuos. [2] [5]

- Aluminio (E173): color gris plateado, componente de la corteza terrestre, sintetizado por electrolisis a partir de la bauxita. Se usa en recubrimientos de productos azucarados, decoración de pasteles y galletas, medicamentos como algunos antiácidos. En bajas cantidades es inocuo pero en dosis elevadas es tóxico para las células nerviosas (potencia el Alzheimer [3] [5]) y el metabolismo mineral. Se elimina por vía renal donde puede acumularse. [2] [3] [5]
- Plata (E174): color plateado. Es insoluble y bactericida. Sólo se puede utilizar en licores y en recubrimientos y adornos de dulces. Su uso está muy limitado y resulta inofensivo si se ingiere en pequeñas cantidades.

➢ COLORANTES SINTÉTICOS AZOICOS

➢ Tartrazina (E102): color amarillo limón. Es el colorante que produce más reacciones alérgicas y es sospechoso de dejar residuos de sustancias cancerígenas [3]. A partir del 20 de julio de 2010, los alimentos que contengan este colorante deben llevar la advertencia: "puede alterar la actividad y la atención en niños" [2]. Algunos alimentos que lo contienen son refrescos en polvo, dulces, helados, aperitivos, salsas, condimentos (ejemplo: para paellas, en sustitución del azafrán).

[f3]

➢ Amarillo anaranjado S o amarillo sol FCF (E110): color amarillo anaranjado. Aparece en mermeladas, galletas y productos de pastelería, refrescos de naranja, sopas instantáneas, harina para rebozar… [5]. Al igual que la tartrazina, se considera cancerígeno y frecuente alérgeno. [5]

➢ Azorrubina, carmoisina (E122): color rojo. Este colorante se usa para conseguir el color frambuesa en caramelos, helados, postres [4] y también en sopas y platos preparados [5]. Puede desencadenar problemas respiratorios y cutáneos en personas asmáticas o sensibles a la aspirina y los salicilatos. [2]. En experimentos con ratones se observó anemias, linfomas y tumores, por lo que se considera sospechoso pese a la poca información que se tiene. [5].

➢ Amaranto (E123): color rojo presente en caramelos, productos de pastelería, licores… Sospechoso de reacciones alérgicas y cancerígeno [5]. En 1970 se publicó que producía cáncer y defectos en los embriones en animales de experimentación (alteraciones en los cromosomas). En 1976 se prohibió en EE.UU a pesar de no haber podido confirmar fehacientemente los riesgos de este colorante. [4]

- Rojo cochinilla A o rojo Ponceau 4R (E124): color rojo artificial cuyo nombre no tiene nada que ver con la auténtica "cochinilla" (E120) que es un colorante natural. Se utiliza para dar color "fresa" a los caramelos, productos de pastelería, helados… y en sucedáneos de caviar y derivados cárnicos (en el chorizo, por ejemplo, sin demasiada justificación, al menos en España, sustituyendo en todo o en parte al pimentón). Desde 1976 no se utiliza en Estados Unidos. [4]
- Rojo 2G (E128): color rojo sintético, poco usado, sólo en alimentos como el embutido inglés con cereales o hamburguesas y salchichas con ingredientes vegetales. Posibles efectos secundarios: alergias, residuos de sustancias posiblemente cancerígenas. Está prohibido en Australia. [3]
- Rojo allura AC (E129): color rojo obtenido sintéticamente mediante acoplamiento azoico del petróleo. Se emplea en golosinas, helados, postres, bebidas sin alcohol, complementos alimentarios y cosméticos. [5] En EE.UU se utiliza desde 1980 como sustituyente del amaranto. [4]
- Negro brillante BN (E151): color negro empleado en regalices, salsas, dulces y principalmente para colorear sucedáneos del caviar. No se permite su uso en los Países Nórdicos, EE.UU, Canadá y Japón. Se ha indicado la posibilidad de que pueda afectar a algunas personas alérgicas a la aspirina y también a algunos asmáticos. [4] Por acción del calor se convierte en tóxico. [5]
- Marrón FK (E154): color marrón. En concentraciones altas puede acumularse en los riñones y vasos linfáticos. [5] Este colorante artificial es realmente una mezcla de diversas sustancias, fundamentalmente las sales sódicas de los ácidos 4-(2,4-diaminofenilazo) bencenesulfónico, 4-(4,6-diamino-m-tolilazo) bencenesulfónico, 4,4'-(4,6-diamino-1,3-fenilenebisazo)- di(bencenesulfónico), 4,4'-(2,4-diamino-1,3-fenilenebisazo)-di(bencenesulfónico), 4,4'-(2,4-diamino-5-metil-1,3-fenilen- bisazo)di(bencenesulfónico) y 4,4',4''-(2,4-diaminobenceno-1,3,5-trisazo)tri-(bencenesulfónico). En el tubo digestivo puede romperse en cierta proporción, por el grupo azo, formando ácido sulfanílico y triaminobenceno. A pesar de estar incluido de forma genérica en la lista de colorantes de la Unión Europea, solamente se utiliza, y muy poco, en el Reino Unido, para colorear algunos pescados como el arenque, ahumados o curados. [4]
- Marrón HT (E155): color marrón rojizo presente en galletas, postres, condimientos, salsas, pescado ahumado, sopa, aperitivos… [3]. Posibles efectos secundarios: en concentraciones altas puede acumularse en los riñones y ganglios linfáticos. También es sospechoso de residuos de sustancias potencialmente cancerígenas. [5]
- Litol Rubina BK (E180): También conocido como "pigmento rubí", o "carmín 6B". Se utiliza, generalmente en forma de sal de calcio (litol rubina BCA) exclusivamente para teñir de rojo la corteza de algunos quesos. El colorante, que es insoluble en agua en frío, no pasa a la masa del producto, y aunque algunas de estas cortezas sean comestibles, generalmente

no se comen, por lo que el colorante no tiene ningún efecto sobre el consumidor. Por esta razón los estudios toxicológicos son menos completos que los de los otros colorantes. [4]

- COLORANTES SINTÉTICOS NO AZOICOS
- Amarillo de quinoleína (E104): Se conoce también como "amarillo de quinolina" o "amarillo ácido 3". Este colorante es una mezcla de varias sustancias químicas muy semejantes entre sí, que difieren en el número y la posición de los grupos sulfónicos sobre el primero de los anillos aromáticos. Se utiliza en bebidas refrescantes y alcohólicas, y en la elaboración de productos de repostería, conservas vegetales, derivados cárnicos o de pescado (como color de "ahumado"), etc. Aunque no existen datos que indiquen eventuales efectos nocivos a las concentraciones utilizadas en los alimentos, no está autorizado como aditivo alimentario en Estados Unidos, Méjico y Japón, entre otros países, pero sí en Australia, Canadá o Chile. [4]
- Eritrosina (E127): color rojo. Incluye en su molécula 4 átomos de yodo, lo que hace que este elemento represente más de la mitad de su peso total. [4] La eritrosina ha sido el colorante más popular en los postres lácteos con aroma de fresa pero ahora no se utiliza demasiado. Puede estar presente en postres aromatizados, en mermeladas, especialmente en la de fresa, en caramelos, derivados cárnicos, patés de atún o de salmón, y en algunas otras aplicaciones. Es un colorante muy eficaz para teñir las guindas en conserva, ya que se fija a ellas y no destiñe. Su principal inconveniente desde el punto de vista tecnológico es que es relativamente sensible a la acción de la luz. La eritrosina a dosis muy elevadas (4% en la dieta de animales de experimentación) produce alteraciones en la tiroides, que pueden llegar en algunos casos hasta el desarrollo de tumores. Este efecto, debido probablemente a su alto contenido en yodo, no se produce a dosis bajas. Sin embargo, aunque en su forma original se absorbe muy poco, no se conoce bien hasta qué punto el metabolismo de las bacterias intestinales puede producir su descomposición, originando sustancias más sencillas, o yodo libre, que sean más fácilmente absorbibles. [4]. Además de alterar la función tiroidea se conoce que inhibe la acción de la pepsina. [5]
- Azul patentado V (E131): color azul también conocido con el nombre de "azul sulfán". Es un colorante utilizado para conseguir tonos verdes en los alimentos, al combinarlo con colorantes amarillos como el E-102 y el E-104. Se utiliza en conservas vegetales y mermeladas (guindas verdes y mermelada de ciruela, por ejemplo), en pastelería, caramelos y bebidas. [4]. Esta sustancia se absorbe en pequeña proporción, menos del 10% del total ingerido, eliminándose además rápidamente por vía biliar. La mayor parte tampoco resulta afectado por la flora bacteriana intestinal, excretándose sin cambios en su estructura. Se ha indicado que puede producir reacciones asimilables a alergias en algunos casos muy raros [4] así como provocar alergias, urticarias o cáncer. [5]

- Indigotina o carmín de índigo (E132): este colorante es el único representante de la familia de colorantes conocida como "indigoides" que se puede utilizar legalmente para colorear alimentos. La indigotina es uno de los colorantes artificiales menos estable, pudiendo alterarse el color en medios muy ácidos, o en presencia de sulfito. Se utiliza en la elaboración de bebidas, caramelos, licores, hojaldre, confitería, helados… [2] [4] Aunque no tiene efectos secundarios conocidos tampoco es útil. [5]
- Azul brillante FCF (E133): color azul sensible a los oxidantes (lejía) y a la luz. Se considera inocuo [2] aunque en dosis altas puede acumularse en los riñones y vasos linfáticos [3]. Está presente en refrescos, productos de confitería, helados, postres, aperitivos…
- Verde ácido brillante BS (E142): también conocido como "verde ácido brillante BS". Color de verde oscuro a azul oscuro. Se utiliza en bebidas refrescantes, productos de confitería, chicles, caramelos… También sería útil para colorear guisantes y otras verduras que ven alterado su color por la destrucción de la clorofila en el escaldado previo a la congelación o durante el enlatado pero esto no está autorizado en muchos países. [4]. Se considera cancerígeno en dosis elevadas así como altera el patrimonio hereditario en experimentos hechos con bacterias. [3]

6. CONCLUSIONES

Los colorantes son aditivos químicos que se añaden a los alimentos con el único fin de hacerlos más atractivos para nosotros. Así, debemos tener en cuenta que cuanto más coloreado, transformado o elaborado sea un producto, mayores serán las posibilidades de que contenga numerosos aditivos. Esto ocurre especialmente con las golosinas, aperitivos, refrescos, platos preparados, postres industriales, productos de confitería, salsas, postres, productos de charcutería y salazones, huevas de pescado y surimi, chicles, pasteles, siropes, helados, bebidas alcohólicas, condimentos y sopas deshidratadas. [3]

Como reflexión final podemos preguntarnos: ¿De verdad tenemos que colorear los alimentos para hacerlos más atractivos?

[f4]

7. BIBLIOGRAFÍA

[1] La Química y la alimentación. Foro permanente Química y Sociedad. Federación Empresarial de la Industria Química Española

[2] Elmadfa, I., Muskat, E. y Fritzsche, D. Tabla de aditivos. Los números E. Ed. Hispano Europea. 2011

[3] ¿Veneno en su plato? Usos y riesgos de los aditivos alimentarios. Guias prácticas OCU. 2006.

[4] Calvo, M. Bioquímica de los alimentos. milksci.unizar.es/bioquimica/temas/aditivos/colorartif.html

[5]Valderrama, M. colaboradora en www.enbuenasmanos.com

Fotos:

[f1] http://alimenticias.blogspot.com

[f2] http://recyecology.net

[f3] http://es.wikipedia.org

[f4] http:// infantil-educarte.blogspot.com

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva

Número 3, año 12, Diciembre 2013

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Química Viva
E-ISSN: 1666-7948
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar
Universidad de Buenos Aires
Argentina

Méndez, Laura; Ortega, José Miguel; Choy, Marisela
Sensor electroquímico para la determinación de sulfito
Química Viva, vol. 12, núm. 3, -diciembre, 2013, pp. 247-260
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86329278006

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Sensor electroquímico para la determinación de sulfito

Laura, Méndez[1]; José Miguel, Ortega[2]; Marisela, Choy[3]

Laboratorio Electroquímica. Universidad de Los Andes. Venezuela-Mérida 5101.

[1] lauramendez@ula.ve

Recibido 11 de Agosto 2013- Reenviado y Aceptado 1 de Diciembre 2013

RESUMEN

En el presente trabajo se describe un nuevo dispositivo electródico que podría ser utilizado para la determinación de sulfito. Este dispositivo está basado en el uso de un electrodo de pasta de carbón modificado con p-rosanilina-formaldehído (PRA) en un buffer fosfato a pH 7. El modificador fue soportado sobre alúmina neutra. El PRA-formaldehído ha sido utilizado como un método estándar para la detección de dióxido de azufre en la atmósfera y sulfitos en alimentos usando técnicas espectroscópicas. Los resultados por voltametría cíclica y voltametría de pulso diferencial muestran que el electrodo modificado con estas especies químicas exhibe actividad cuando se sumerge en soluciones cuya concentración es del orden milimolar en sulfito. Mediante el método de adición de estándar se pudo determinar la concentración de sulfito en dos muestras de vino blanco, cuyos valores oscilaron entre 0,34 y 0,36 mM. Se observó que las muestras no presentan interferencias provenientes de la matriz para este análisis y los porcentajes de recuperación exhiben valores ente 99 y 103.

***Palabras Clave**:* Sulfito, Aditivos en alimentos, Para-rosanilina (PRA)

Electrochemical sensor for the determination of sulfite

ABSTRACT

The present paper describes a new electrodic device which could be used for the determination of sulfite. This device is based on the use of a carbon paste electrode modified with p-rosaniline-formaldehyde (PRA) in a phosphate buffer at pH 7. The modifier was supported on neutral alumina.The pair PRA-formaldehyde has been used as a standard method for the detection of sulfur dioxide in the atmosphere and sulfites in foods by using spectroscopic techniques. The results from cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry show that the p-formaldehyde-rosaniline modified electrode exhibits activity when immersed in solutions whose sulfite concentration is in the order of millimoles. It was observed that the samples do not show interference from the matrix for this analysis and recovery rates exhibit values between 99 and 103.

Keywords: Sulfite; Food aditive; Para-rosaniline

Introducción

Los sulfitos son frecuentemente usados como conservantes en los alimentos. No obstante, a pesar de la eficiencia de los sulfitos en su acción preservante, se ha determinado numerosos efectos adversos en el ser humano, relacionados principalmente a su consumo. Por tal razón, la Food and Drug Administration (FDA) requiere que la presencia de los sulfitos en cantidades iguales o superiores a 10 ppm, en alimentos procesados, deben ser declarados en la etiqueta.

La oxidación de sulfito es usualmente el primer método de detección electroquímica y ha sido estudiado con una gran variedad de electrodos, incluyendo platino (Gasana et al., 2003), oro (Li et al., 2002), varias formas de carbón (Casella et al., 1995), óxidos metálicos (Corbo et al., 2002), electrodo de platino modificado (Dadamos et al., 2009) y biosensores (Dinckaya et al., 2007). El proceso de oxidación de sulfitos, puede ser cuantificable en la mayoría de los electrodos y ofrece una simple ruta de análisis, ya que tiende a ser métodos rápidos y de bajo costos, en sustitución a los métodos de titulación (Isaac et al., 2006).

Los electrodos de pasta de carbón modificado (EPCM), han presentado gran interés en el desarrollo de sensores voltamétricos para determinaciones analíticas, debido a su fácil preparación, baja corriente de fondo y amplio rango de potencial (Kalcher et al., 1995). En el presente trabajo se modificó un electrodo de pasta de carbón con p-rosanilina-formaldehído, esta especie forma complejo con el sulfito y ha sido usado como un método estándar para la detección de dióxido de azufre en la atmósfera y sulfitos en alimentos usando técnicas espectroscópicas. Estas especies fueron soportadas sobre alúmina neutra y utilizada en la determinación de sulfito en muestras de vino blanco.

Parte experimental

Los reactivos utilizados fueron: Para-rosanilina (Aldrich), Sulfito de sodio anhídrido (J.T. Baker), Aceite mineral o nujol (Aldrich), Cloruro de potasio (Merck), Formaldehido (Merck), Grafito (Fischer Chemical), Alúmina neutra para coluna (Merck), ácido tartárico (Aldrich), ácido cítrico (Fischer Chemical), ácido ascórbico (Aldrich) y todas las soluciones se prepararon con agua ultra pura (Mullipore, 18 MΩ).

El electrodo de pasta de carbón (EPC) fue preparado al mezclar directamente polvo de grafito (G67-500) y nujol como aglomerante. Mientras que el electrodo de pasta de carbón modificado (EPCM) a la pasta de carbón se le agregó el modificador el cual está compuesto por la mezcla PRA-formaldehído (1:1) soportado sobre alúmina neutra, en una proporción 61,44%m/m carbón, 34,45%m/m nujol y 4,16%m/m modificador. La mezcla se combinó hasta obtener la mayor uniformidad. El material pastoso fue empacado en un cilindro hueco de PlexyGlass con una varilla de acero, la cual se usó como contacto eléctrico con el circuito del potenciotato.

El electrodo con una superficie fresca, fue colocado en la celda electroanalítica en una solución acuosa de sulfito de sodio cuyas concentraciones se varió entre 3 y 50 mM. Además, se utilizó como electrolito de soporte un buffer fosfato a pH 7 y KCl a pH 7.

Para este estudio se utilizaron como técnicas de análisis voltametría cíclica y de pulso diferencial. Las medidas electroquímicas fueron realizadas en un Potenciostato/Galvanostato Autolab 30/PGSTAT 30, acoplado a un procesador de datos. La celda electroanalítica consistió en un sistema de tres electrodos, el electrodo de referencia (Ag/AgCl), el contraelectrodo de Pt y el electrodo de trabajo (EPC y EPCM). Todos los reactivos fueron de grado analítico

Resultados y Discusión

a. Preparación y caracterización de un electrodo pasta de carbón modificado con PRA-formaldehído

En la figura 1, se muestra los voltagramas cíclicos de electrodo de pasta de carbón sin modificar (EPC) y electrodo de pasta modificado (EPCM) en ausencia de alúmina como soporte. El grafico muestra una disminución en la corriente de oxidación del sulfito cuando se modifica con PRA-formaldehido. Sin embargo, la corriente pico en el electrodo modificado aparecen a valores menos positivos (aproximadamente 0,800V) que aquellas observadas para el electrodo sin modificar (1,000V). Parece que la modificación favorece energéticamente la oxidación de sulfito a potenciales menores. La disminución de la corriente se debe a la poca estabilidad del modificador en la pasta ya que se observó cómo el PRA-formaldehido, el cual es coloreado, se escapa de la pasta por difusión hacia el seno de la solución.

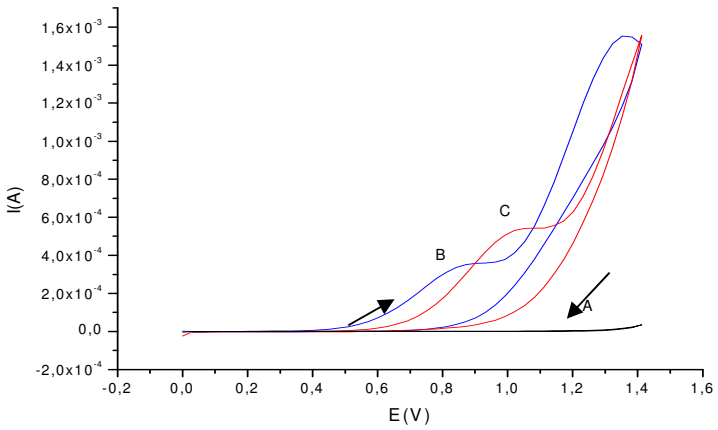


Figura 1. Oxidación del sulfito por voltametria cíclica en KCl 0.1 M a pH 7, v=50mVs^{-1}. **A)** En ausencia de sulfito, usando EPCM y EPC; **B)** EPCM en Na_2SO_3 50mM; **C)** EPC sin modificar en Na_2SO_3 50mM

Se procedió a mejorar la estabilidad de EPCM mediante la adición de alúmina. La alúmina retiene por adsorción al PRA-formaldehído en la pasta. El porcentaje de modificador, PRA-formaldehido-alúmina, fue incrementándose a medida que se registraba la respuesta del electrodo en una solución de Na_2SO_3 3mM. La figura 2 resume los resultados. La corriente de pico alcanzó un máximo para una composición grafito-nujol-modificador de 61,44%m/m, 34,45%m/m y 4,16%m/m, respectivamente. Para valores mayores del modificador (alúmina + PRA-formaldehido) la corriente decrece debido a la disminución de la coherencia mecánica de la pasta del electrodo. La corriente también disminuye a porcentajes menores a 4,16 debido probablemente a la disminución del PRA- formaldehido en la composición de la pasta.

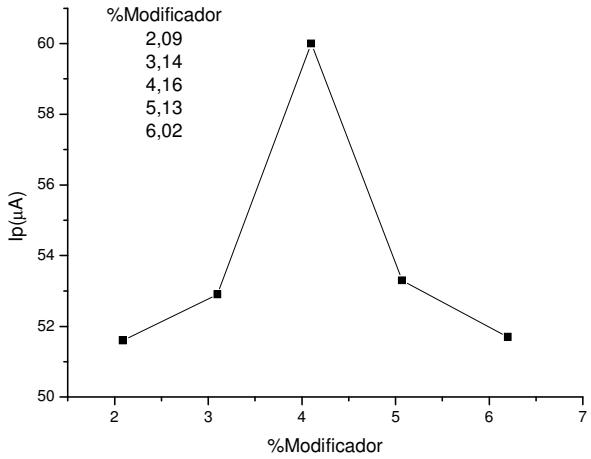


Figura 2. Ip en función al % de modificador en un EPCM en buffer de fosfato pH 7 en Na_2SO_3 3mM. v = 8mVs^{-1}. ΔE= 75mV.

El efecto de la incorporación de la alúmina a la pasta de carbón sobre la oxidación de sulfito puede ser observado en la figura 3. En este caso no se observó la difusión del modificador hacia el seno de la solución. La incorporación de la alúmina como soporte origina mayores corrientes en el EPCM que en el EPC. Sin embargo, el potencial pico cuando se usó EPCM de la figura 3 aparece desplazado a valores más positivos en el observado en la figura 1, donde no se usó alúmina. Posiblemente, la resistencia del electrodo se incrementó con el aumento de la proporción de alúmina. La oxidación de sulfito en el electrodo modificado ocurre siempre a menor potencial que en los electrodos sin modificar. El efecto del modificador es claro en presencia y en ausencia de la alúmina, pues favorece energéticamente la oxidación del analito. La presencia de la alúmina en la composición de la pasta del electrodo no afecta significativamente la magnitud de la corriente, pero mejora la estabilidad del electrodo, haciéndolo útil para determinaciones analíticas.

En los voltagramas de pulso diferencial para el SO_3^{-2} de la figura 4.A, se observa que la corriente pico aumenta linealmente con la concentración de sulfito, siendo este comportamiento estable y reproducible. En la figura 4.B se muestra la curva de calibración correspondiente, la cual exhibe una zona lineal en el intervalo de concentración comprendido 0,22 y 0,73mM SO_3^{-2}, obteniéndose un coeficiente de correlación r = 0,9976, con una desviación estándar ($S_{Y/X}$) de 0,55692. La ecuación de regresión es I = 20,57682 [SO_3^{-2}] - 0,49896, determinándose un límite de detección de 0,08 mM y el límite de cuantificación 0,27 mM.

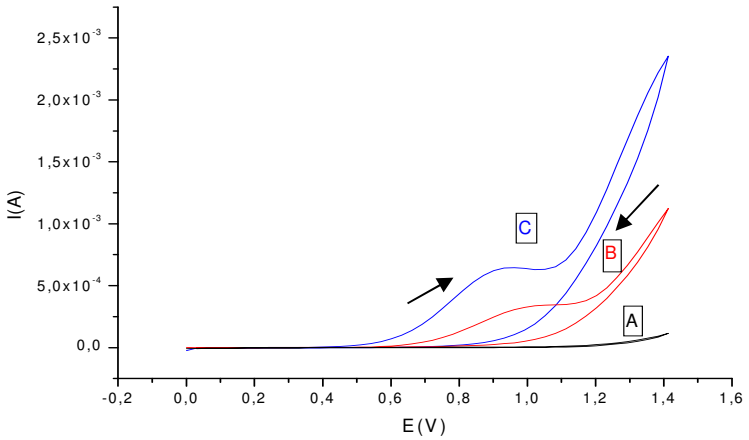
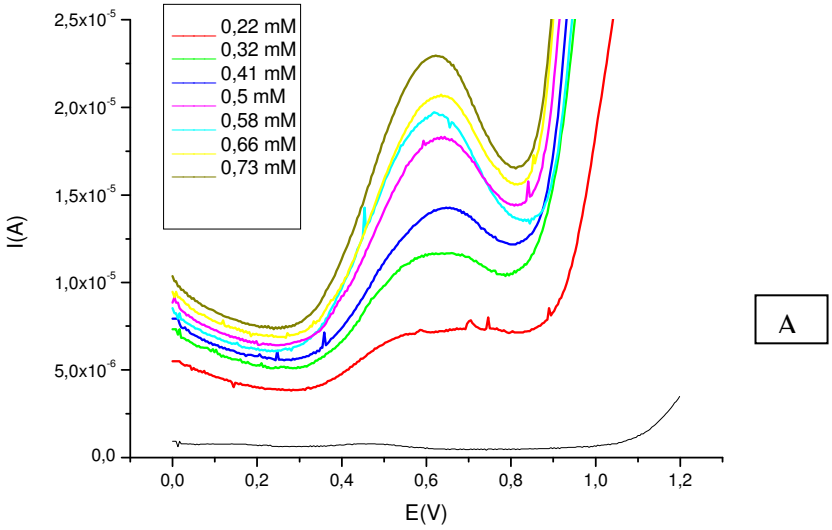


Figura 3. Oxidación del sulfito por voltametria cíclica en KCl 0.1 M a pH 7, v=50mVs^{-1}. **A)** buffer fosfato pH 7; **B)** EPC con alúmina en Na_2SO_3 50mM; **C)** EPCM en Na_2SO_3 50mM

El límite de detección alcanzado para este sistema electroquímico fue 0,08mM, el cual es comparable con el reportado por García et al (2005) en la determinación de sulfito sobre carbón vítreo modificado con películas de hexacianoferrato de hierro (80 µM), pero más bajo que el correspondiente al electrodo de aluminio modificado con hexacianoferrato de níquel (3*10^{-6}M) (Pournaghi- Azar, 2003).

Sin embargo, la modificación del presente trabajo del electrodo de pasta de carbón es de fácil construcción, el electrodo es muy económico y fácil de operar que el electrodo de aluminio o carbón vítreo y tiene ventaja de tener superficies totalmente renovadas para cada medida.



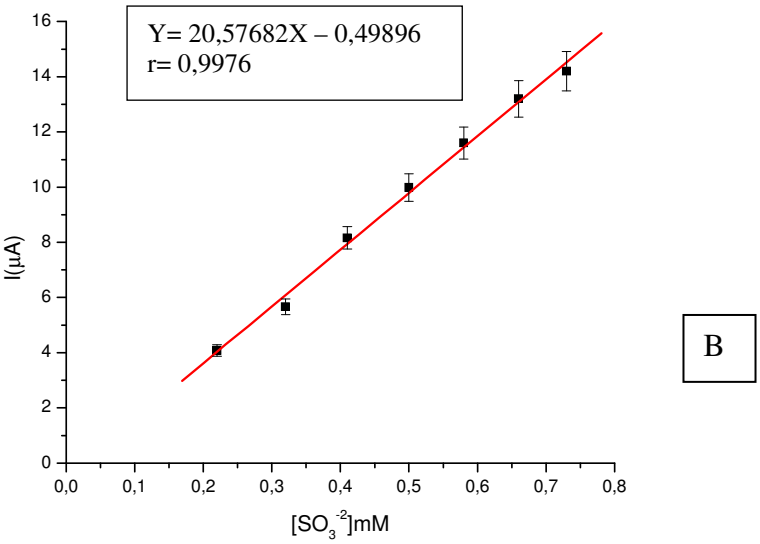


Figura 4. A) Voltagramas de pulso diferencial, para varias concentraciones de SO_3^{-2} en buffer fosfato a pH 8, v=8mVs^{-1}. **B)** Curva de calibración para SO_3^{-2} construida a partir de los voltagramas de pulso diferencial.

b. Estudio de interferencias

El estudio de interferencias fue realizado para evaluar el efecto interferente del ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, glucosa y sacarosa en el sistema utilizado. Estas sustancias fueron analizadas porque acompaña al sulfito en las muestras reales, como es el caso de bebidas y alimentos. Para poner a prueba el efecto de las sustancias interferentes mencionadas anteriormente, se prepararon soluciones de igual concentración de sulfito y del

interferente. La concentración de sulfito se mantiene constante y se le fue adicionando alícuota o pequeños volúmenes de la especie interferente, lo que implica el aumento de la concentración del interferente. Así, determinar el rango de concentración donde estas especies interferentes, no interfieren con la señal de oxidación del sulfito, y poder detectar la concentración de sulfito en muestras reales, sin necesidad de realizar un pretratamiento previo a la muestra; para ello, se graficaron las Ip en función de la concentración de la especie interferente.

En la figura 5 y 6, se observa que en un rango de concentración 0,0 – 0,5 mM las especies interferentes como el ácido tartárico y el ácido cítrico, no interfieren con la señal de oxidación sulfito, porque permanece constante. Se puede inferir que a partir de 0,58 mM, el ácido tartárico y el ácido cítrico puede comenzar a influir en la determinación del sulfito en muestras reales.

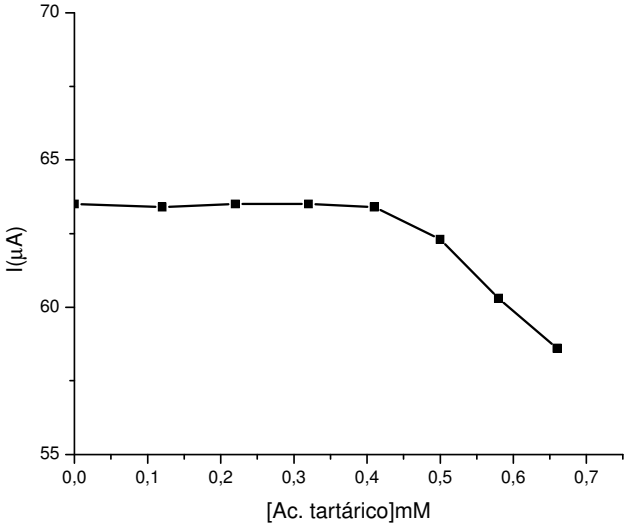


Figura 5. Efecto de la concentración ácido tartárico sobre la corriente de pico en el EPCM con alúmina en buffer fosfato a pH 8. υ = 8mVs^{-1}. ΔE= 75mV.

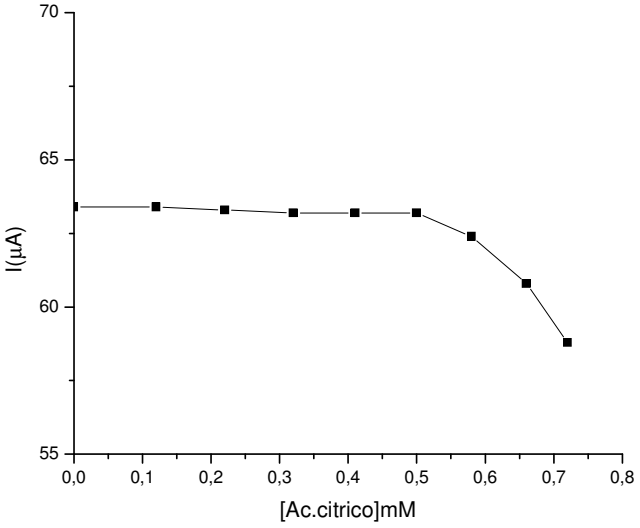


Figura 6. Efecto de la concentración ácido cítrico sobre la corriente de pico en el EPCM con alúmina en buffer fosfato a pH 8. υ = 8mVs^{-1}. ΔE= 75mV.

Mientras, en el análisis realizado para la especie interferente, como el ácido ascórbico, se revela que esta especie estudiada interfiere seriamente en la respuesta de oxidación del sulfito cuando está presente en una concentración mayor a 0,32 mM, como se muestra en la figura 7. Esto concuerda con lo reportado por Pournaghi- Azar, 2003 y Dadamos et al, 2009; sin embargo, las muestras de alimentos no poseen generalmente concentraciones tan elevadas de ácidos ascórbico por lo que no debería ser un problema en la determinación de sulfitos (García et al, 2005).

En la figura 8 y 9 se observa que los azúcares (glucosa y sacarosa) no interfieren en la determinación de sulfito, sino cuando está presente en exceso con respecto al sulfito (Pournaghi- Azar, 2003)

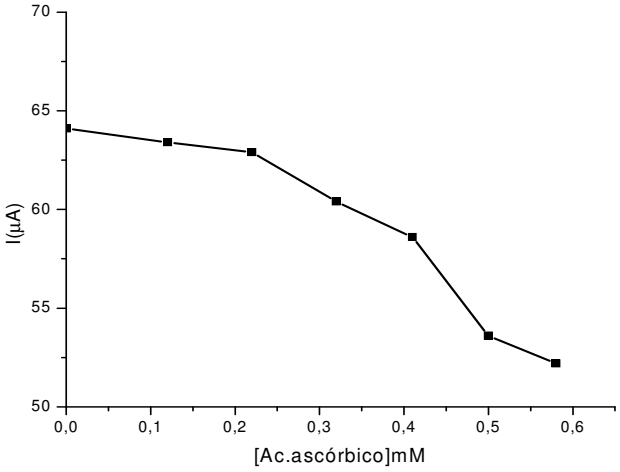


Figura 7. Efecto de la concentración ácido ascórbico sobre la corriente de pico en el EPCM con alúmina en buffer fosfato a pH 8. υ = 8mVs^{-1}. ΔE= 75mV.

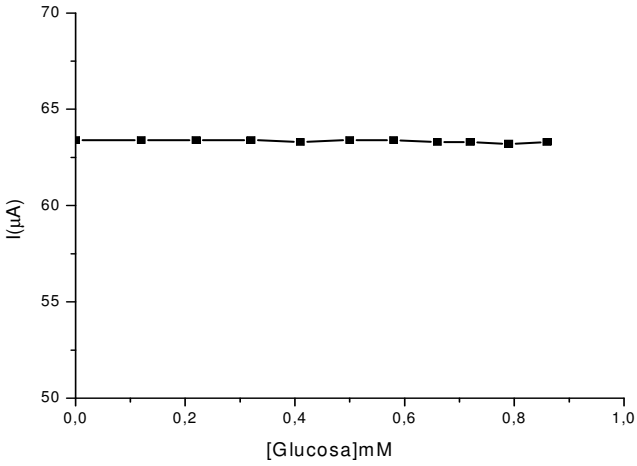


Figura 8. Efecto de la concentración glucosa sobre la corriente de pico en el EPCM con alúmina en buffer fosfato a pH 8. υ = 8mVs^{-1}. ΔE= 75mV.

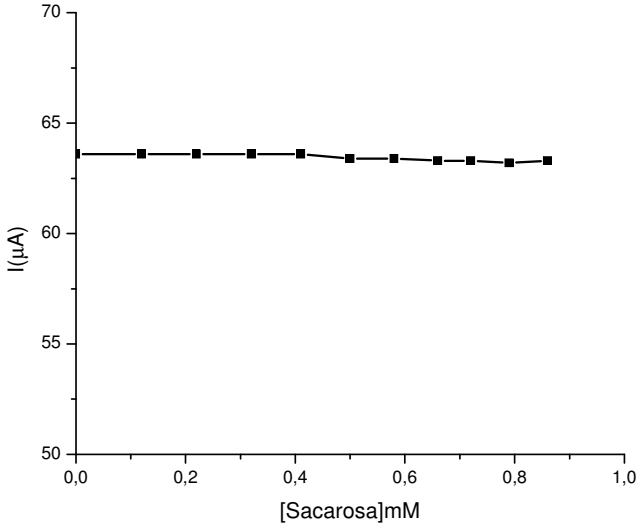


Figura 9. Efecto de la concentración sacarosa sobre la corriente de pico en el EPCM con alúmina en buffer fosfato a pH 8. υ = 8mVs^{-1}. ΔE= 75mV.

En el estudio de interferencia se puede concluir, que en una rango de concentración de 0,0 – 0,5 mM las especies interferente estudiadas no afecta significativamente la determinación de sulfito, a excepción, del ácido ascórbico, cuando se encuentra en concentraciones elevadas.

c. Determinación de sulfito usando un electrodo modificado con PRA-formaldehído en muestra de vino

Con el fin de examinar la aplicabilidad del EPCM, el dispositivo se usó para la determinación de sulfito en muestra reales de vino blanco. Para ello se aplicó el método de adición estándar y la curva de calibración sencilla, tomando en consideración que las interferencias más comunes que pueda presentar el vino no son significativas para el intervalo concentraciones entre 0,0-0,5 mM de las interferentes.

Las muestras de vino blanco que se analizaron de dos vinos provienen de dos marcas comerciales diferentes, el vino 1 el “Frontera” y el vino 2 de “Las Condes”, ambos de procedencia chilena. Se tomaron alícuotas de 10 ml, las cuales se ajustaron a pH 8 y sucesivamente se realizaron las medidas por VPD.

El método de adición estándar se realizó con la finalidad de verificar si existen interferencias provenientes de la matriz de las muestras de vino blanco. Se realizaron curvas de adición estándar, variando el volumen del estándar y manteniendo el volumen fijo de la muestra, que se desee analizar. Cada curva de calibrado incluyó al menos una serie de cuatro puntos, y se midieron un mínimo de tres veces cada uno. En la figura 11.A y 11.B se muestra las gráficas de adición estándar obtenida para ambas muestra de vino de blanco, obteniéndose

la concentración del sulfito en la muestras de vino blanco por extrapolación de la línea segmentada. Los valores se muestran en la tabla 1.

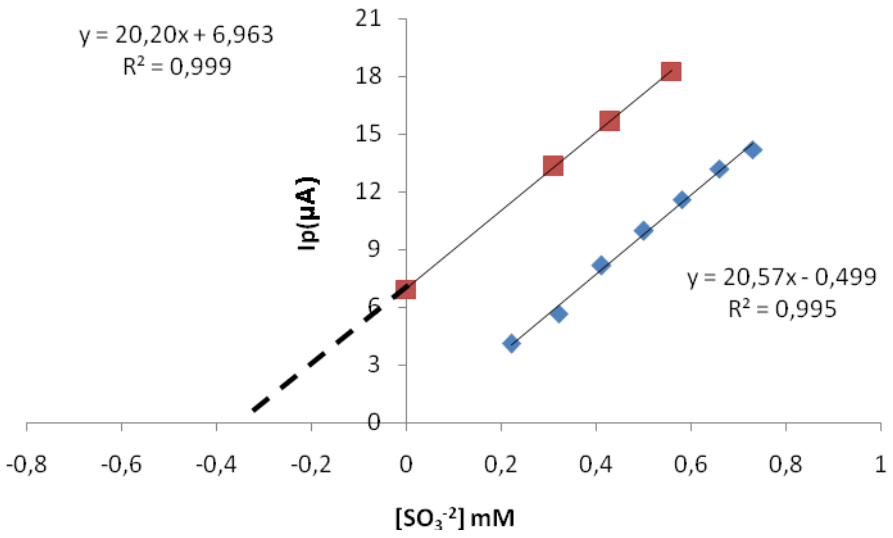
Tabla 1. Determinación de sulfito en muestras de vino blanco usando un electrodo modificado con PRA-formaldehído

Muestras	Sulfito (mM)[a]	Sulfito (ppm)[a]	Sulfito (mM)[b]	Sulfito (ppm)[b]
Vino 1	0,35	27,9	0,34	27,2
Vino 2	0,37	29,6	0,36	28,8

a: Curva de calibración sencilla b: Método de adición estándar

De los resultados obtenidos en la tabla 1 se puede inferir que la cantidad de sulfito encontrada en las muestras de vino 1 y 2 están por encima de los valores encontrados por Cardwell y Christophersen (2000) para vino blanco, donde usaron un electrodo de platino acoplado a un sistema de inyección de flujo. Mientras que la cantidad de sulfito establecida en muestra de vino blanco oscila en un rango de 0,3 -1,8mM según García et al (2005) y los valores encontrados usando el EPCM están dentro de los niveles permitidos.

Al comparar el valor de la pendiente de la curva de calibración sencilla que fue de 20,57 µA/mM, con los valores obtenidos de la pendiente para las diferentes curvas del método de adición estándar de las diferentes muestras de vino blanco (20,18 µA/mM y 20,20 µA/mM), se observa que son muy reproducibles y no muestran diferencias significativas para las dos muestras de vino blanco. Este comportamiento permite concluir que no existen interferencias de matriz, en la metodología aplicada para la determinación de sulfito en diferentes tipos de muestras de vino blanco.



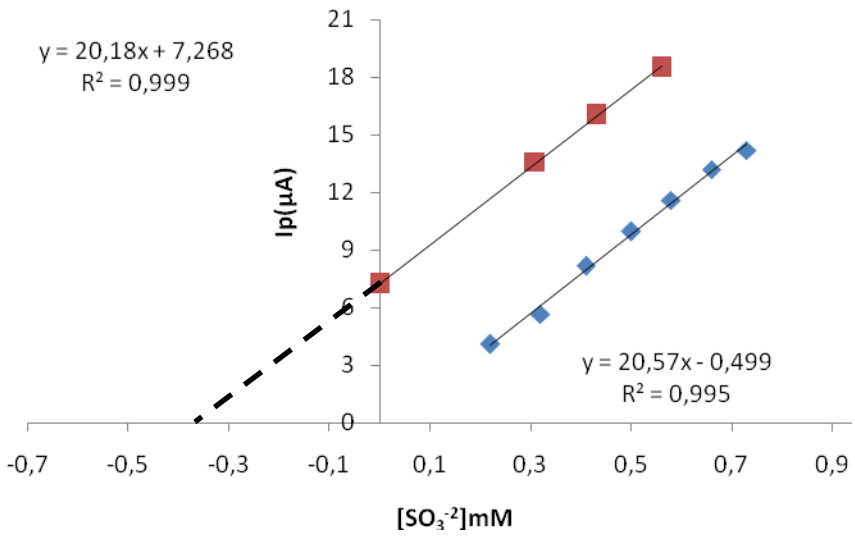


Figura 11. A) Curva de calibración por adición estándar, para el vino 1 (Frontera) en buffer fosfato a pH 8, v=8mVs^{-1}. **B)** Curva de calibración por adición estándar, para el vino 2 (Las Condes) en buffer fosfato a pH 8, v=8mVs^{-1}.

d. Estudio de recuperación para diferentes muestras de vino blanco

Para validar el procedimiento analítico se prepararon tres soluciones con una concentración de sulfito conocida de 0,5 mM. Estos resultados se muestran en la tabla 2 donde se puede observar que la recuperación oscila entre 98,92 y 102,95 %, con un CV< 3%, lo que nos sugiere una exactitud aceptable del procedimiento analítico, sin interferencias de la matriz.

Tabla 2. Porcentaje de recuperación encontrada en SO_3^{-2} en diferentes muestras de vino blanco

Muestras	%Recuperación	%CV
Vino 1	102,95±2,57	2,50
Vino 2	98,92±1,10	1,11

Conclusiones

Se ha diseñado un nuevo electrodo para la determinación de sulfito basado en el uso de pasta carbón modificada con PRA-formaldehído, encontrándose que la composición óptima para la elaboración de los electrodos de pasta de carbón modificados fueron de 61,44%m/m carbón, 34,45%m/m nujol y 4,16%m/m modificador. La modificación favorece energéticamente la oxidación de sulfito a potenciales menores.

La presencia de alúmina en la composición de la pasta del electrodo mejora la estabilidad del sistema, de manera tal que este electrodo podría ser utilizado en determinaciones analíticas. Este sensor exhibe una zona lineal en el intervalo de concentración comprendido 0,22 y 0,73 mM SO_3^{-2} con un coeficiente de correlación r = 0,9976, donde el límite de detección es 0,08 mM y el límite de cuantificación es 0,27 mM.

Mediante el método de adición de estándar se determinó la concentración de sulfito en dos muestras de vino blanco que oscila en un rango de 0,34 y 0,36 mM y a su vez se demostró que las muestras no presenta interferencias proveniente de la matriz y pueden utilizarse sin tratamiento previo.

El estudio realizado con diferentes muestras de vino blanco, empleando electrodo de pasta de carbón modificado con PRA-formaldehído, mostraron en todos los casos una recuperación cuantitativa de 98,92 - 102,95 % y con un CV< 3%.La validación del método mostró que el nuevo dispositivo tiene un rango lineal de 0,22-0,73 mM para el sulfito en vino blanco, con un límite de detección y cuantificación comparable a los reportados en la bibliografía.

Referencias

Casella. I. y Marchese R. **(1995)**. Sulfite oxidation at a platinum glassy carbon electrode. Determination of sulfite by ion exclusion chromatography with amperometric detetion. *Anal. Chim. Acta*. **311:199 208**.

Cardwell, T y Christophersen, M. **(2000)**. Determination of sulfur dioxide and ascorbic acid in beverages using a dual channel flow injection electrochemical detection system. *Anal. Chim. Acta.* **416: 105-110**

Corbo, D y Bertotti, M. **(2002)**. Use of a copper electrode in alkaline medium as an amperometric sensor for sulphite in a flow-through configuration. *Anal. Bional. Chem*., **374:416 - 420**.

Dadamos, T y Teixeira, M. **(2009)**. Electrochemical sensor for sulfite determination based on a nanostructured copper-salen film modified electrode. *Electrochimica Acta*. **54:4552**.

Dinckaya, E, Sezginturk, M, Akyilmaz, E, Nil, F. **(2007)**. Sulfite dtermination using sulfite oxidase biosensor based glassy carbón electrode coated with thin mercury film. *Food Chemistry*. **101: 1540-1544.**

Gasana, E, Westbrock, P., Tommerman, E., Thum H,P. y Kickens, P. **(2003)**. A wall-jet disc electrode for simultaneous and continuous on-line measurement of sodium dithionite, sulfite and indigo concentrations by means of multistep chronoamperometry. *Anal. Chim. Acta*. **486:73**.

García,T, Casero, E, Lorenzo, E, Pariente, F. **(2005)**. Electrochemical sensor for sulfite detrmination based on iron hexacyanoferrate film modified electrodes. *Sensors and Actuators B*. **106:803-809**

Isaac, A., Livingstone, C., Wain, A.C., Compton, R. G., y Davis, J. **(2006)**. Electroanalytical methods for the determination of sulfite in food and beverages. *Trends in Analytical Chemistry*. **25:589 -598.**

Kalcher, K., Kauffman, J.M., Svancara, I., Vytras, K., Neuhold, C., y Yang, Z. **(1995)**.Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: A review with particular emphasis on the period 1990-1993. *Electroanalysis*. **7:5-22**.

Li, H., Wang, J.Q., Xu, J,M., Zhang, W y Jin, L, T. **(2002)**. A novel nano-Au-assembled amperometric SO_2 gas sensor: preparation, characterization and sensing behavior. *Sensor Actuators B.*, **87:18**.

Li, Y y Zhao, M. **(2006)**. Simple methods for rapid determination of sulfite in food products. *Food Control*. **17: 975-980**.

Pournaghi- Azar, M.H., Hydarpour, M., Dastangoo, H. **(2003)**. *Voltametric and amperometric determination sulfite using an aluminum electrode modified by nickel pentacyanonitrosylferrate film. Application to the analysis of some real samples.* **497:133**.

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva

Número 3, año 12, Diciembre 2013

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Química Viva
E-ISSN: 1666-7948
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar
Universidad de Buenos Aires
Argentina

Claudio Cacciatore, Luis; Verrengia Guerrero, Noemí Rosario; Cristina Cochón, Adriana
Toxicocinética del metilazinfos e inhibición in vitro de la actividad colinesterásica por metilazinfos-oxón en los invertebrados Biomphalaria glabrata y Lumbriculus variegatus
Química Viva, vol. 12, núm. 3, -diciembre, 2013, pp. 261-273
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86329278007

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Toxicocinética del metilazinfos e inhibición *in vitro* de la actividad colinesterásica por metilazinfos-oxón en los invertebrados *Biomphalaria glabrata* y *Lumbriculus variegatus*

Luis Claudio Cacciatore, Noemí Rosario Verrengia Guerrero,

Adriana Cristina Cochón*

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Nuñez, 1428, Buenos Aires, Argentina.

E-mail: adcris@qb.fcen.uba.ar

Recibido 25 de Octubre 2013- Aceptado 29 de Octubre 2013

Resumen

Los pesticidas organofosforados ejercen su toxicidad por inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, causando neurotoxicidad. La presencia de esta enzima en invertebrados y vertebrados confiere a esta clase de pesticidas una enorme toxicidad hacia blancos no deseados. El metilazinfos es un insecticida organofosforado que debe sufrir una activación metabólica a metilazinfos-oxón para poder inhibir la actividad colinesterasa. En trabajos anteriores se había demostrado que el oligoqueto *Lumbriculus variegatus* es mucho más sensible a la exposición *in vivo* a metilazinfos que el gasterópodo *Biomphalaria glabrata.* En el presente trabajo se investigó si esa sensibilidad diferencial se debía a diferencias en las cinéticas de absorción y/o eliminación del pesticida o a diferencias en la sensibilidad *in vitro* de las colinesterasas de ambos invertebrados al oxón derivado. Utilizando un modelo unicompartimental de primer orden se pudo comprobar que la absorción y eliminación del pesticida son muy rápidas en ambas especies con factores de bioconcentración muy similares. Por el contrario, se necesitó una concentración 1500 veces mayor de metilazinfos-oxón para inhibir un 50% la actividad colinesterasa en los extractos del gasterópodo que en el oligoqueto. Estos resultados estarían indicando que la diferente sensibilidad de ambas especies a la inhibición de la actividad colinesterasa por metilazinfos se debería más a factores toxicodinámicos que a factores toxicocinéticos.

Palabras clave: metilazinfos, invertebrados, toxicocinética, colinesterasa

Toxicokinetics of azinphos-methyl and in vitro inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl-oxon in two freshwater invertebrates: Biomphalaria glabrata and Lumbriculus variegatus

Abstract

Organophosphate pesticide toxicity occurs through inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, resulting in neurotoxicity. The presence of this enzyme in invertebrates and vertebrates confers to this class of pesticides a great toxicity to non target organisms. Azinphos-methyl is an organophosphate insecticide that must undergo metabolic activation to azinphos-methyl-oxon in order to inhibit cholinesterase activity. In a previous study, a greater sensitivity of *Lumbriculus variegatus* when comparing with *Biomphalaria glabrata* following *in vivo* exposure of the organisms to azinphos-methyl has already been observed. In the present study, it was investigated whether the inter-species difference in sensitivity to cholinesterase inhibition was due to: (a) differences in the uptake and elimination rates of the pesticide, or (b) differences in the *in vitro* sensitivity of the cholinesterases to de oxon derivative. Employing a first order mono compartmental model, it was found that the uptake and elimination rates were very fast in both species, with very similar bioconcentration factors. In contrast, a concentration of azinphos-methyl-oxon 1500 times higher was needed to inhibit 50% cholinesterase activity in the gastropod than in the oligochaete extracts. These results indicate that the different sensitivity of both species to cholinesterase inhibition would be more related to toxicodynamic than to toxicokinetic processes.

Keywords: azinphos-methyl, invertebrates, toxicokinetics, cholinesterases.

Introducción

Los pesticidas organofosforados se utilizan en la agricultura moderna en todo el mundo. Aunque estos pesticidas persisten en el ambiente por un período relativamente corto de tiempo, presentan una alta toxicidad aguda que puede representar un serio peligro para los ecosistemas (1). La toxicidad primaria aguda de los organofosforados se debe a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), una enzima crítica en la función normal del sistema nervioso. Por ello, la evaluación de la actividad de esta enzima ha sido uno de los criterios de valoración más utilizado para evaluar la exposición de la vida silvestre a estos pesticidas (2).

Los organofosforados que presentan un átomo de oxígeno unido a un átomo de fósforo son altamente reactivos y no necesitan ningún tipo de activación para inhibir la actividad de las colinesterasas (ChE). Por otro lado, aquellos que poseen un átomo de azufre unido al átomo de fósforo, deben ser metabólicamente activados a través de una desulfuración oxidativa a los correspondientes oxones para ejercer su acción inhibitoria (3).

El metilazinfos (MAZ) (Figura 1) es un insecticida organofosforado del tipo fosforoditioato que debe ser metabolizado al oxón derivado (MAZ-oxón) para ejercer su acción anticolinesterásica. En nuestro país, este insecticida es utilizado en el Norte de la Patagonia para el control de *Carpocapsa pomonella*. Eventualmente, el MAZ alcanza, por escorrentía superficial, a los cursos de agua ejerciendo su efecto tóxico en los ecosistemas acuáticos (4).

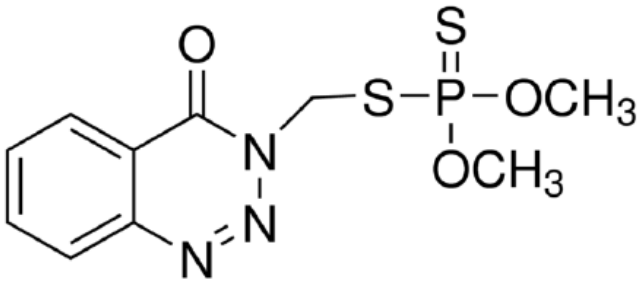


Figura 1: Estructura molecular del metilazinfos

Lumbriculus variegatus es un oligoqueto de agua dulce que ha sido recomendado y ampliamente adoptado como un organismo estándar para estudios de bioacumulación y ensayos de toxicidad (5,6). *Biomphalaria glabrata* es un gasterópodo pulmonado que vive en aguas dulceacuícolas tropicales, principalmente en canales, valles de irrigación y en pequeños cursos de agua. *B. glabrata* es uno de los gasterópodos más estudiados por ser huésped intermediario del parásito *Schistosoma mansoni*, que produce en el ser humano la enfermedad denominada esquistosomiasis (7).

Se ha demostrado que *L. variegatus* es más sensible que *B. glabrata* a la inhibición de la actividad ChE por exposición *in vivo* a MAZ. Así, la exposición por 48 horas a 0,006 µg ml^{-1} de MAZ inhibió un 50% la actividad ChE de *L. variegatus* mientras que para obtener el mismo grado de inhibición en *B. glabrata* se necesitaron 5 µg ml^{-1} (8). Con el objetivo de ahondar en los mecanismos involucrados en la diferencia de sensibilidad de ambas especies, en el presente trabajo se procedió a: (1) calcular distintos parámetros toxicocinéticos del MAZ (las constantes de absorción y de eliminación, el factor de bioconcentración y el tiempo de vida media) en los organismos expuestos *in vivo* por 48 h al pesticida y (2) estudiar el efecto *in vitro* del metabolito biológicamente activo del MAZ, el MAZ-oxón sobre las ChEs de *L. variegatus* y *B. glabrata*. La hipótesis de trabajo fue que la diferencia de sensibilidad al MAZ entre *L. variegatus* y *B. glabrata* podría deberse a diferencias en la sensibilidad del blanco molecular y/o a diferencias en factores toxicocinéticos.

Materiales y Métodos

Reactivos

Los organofosforados MAZ Pestanal®, pureza >98%, y MAZ-oxón Supelco® y los reactivos ioduro de acetiltiocolina (AsCh) y 5,5'-ditio-2-bis-nitrobenzoato (DTNB) se compraron a Sigma Aldrich de Argentina S.A. El agua y el acetonitrilo, calidad HPLC, se adquirieron a Sintorgan S.A. (Buenos Aires, Argentina). Los otros reactivos utilizados en el trabajo fueron de grado analítico, marca Carlo Erba, Mallinckrodt o Merck.

Organismos seleccionados

El oligoqueto *L. variegatus,* fue inicialmente obtenido de los cultivos del Prof. K. Simkiss, Universidad de Reading, Reino Unido. Una vez en el laboratorio, los organismos se cultivaron en peceras de plástico de 12 litros con aireación como se describe en (9). Para todos los bioensayos se utilizaron organismos adultos de 2,5 ± 0,5 cm de largo.

Los cultivos de *B. glabrata* fueron obtenidos inicialmente del Laboratorio de Invertebrados, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Los organismos fueron luego cultivados en nuestros laboratorios en peceras de vidrio aireadas (9). En todos los experimentos, se emplearon organismos adultos de tamaño similar (18 ± 2 mm de diámetro).

Para los cultivos y los bioensayos se utilizó agua de red, declorada por al menos 24 horas, con las siguientes propiedades físico-químicas: dureza total = 67 ± 3 mg $CaCO_3$ L^{-1}; alcalinidad = 29 ± 2 mg $CaCO_3$ L^{-1}; pH = 7,0 ± 0,2; y conductividad = 250 ± 17 µS cm^{-1}. Para los bioensayos, el agua declorada fue filtrada por una columna de carbón a fin de eliminar la materia orgánica que pudiera estar disuelta.

Ensayos de toxicocinética

Los experimentos de absorción se llevaron a cabo bajo condiciones estáticas, sin aireación y sin suministrar alimento, en peceras de 3 L conteniendo 600 ml de solución de pesticida en agua declorada y filtrada. La concentración de MAZ fue de 5 µg ml^{-1}. Esta concentración se corresponde con el nivel de exposición que produce, en *B. glabrata*, un 50 % de inhibición sobre la actividad de ChEs a las 48 h (8). Las soluciones acuosas conteniendo el pesticida se prepararon a partir de una solución concentrada de MAZ en acetona, siendo la concentración final de acetona en las peceras de exposición de 0,05 %. Los caracoles y las lombrices se expusieron en forma independiente por 0, 20, 40 minutos y 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de exposición, cada caracol o una muestra de 10 a 15 lombrices se retiraron de las peceras, se enjuagaron con agua destilada para eliminar cualquier resto de MAZ procedente de la solución acuosa y se secaron con papel absorbente. En el caso de los caracoles, se les retiró el caparazón. Las muestras se pesaron (187 ± 62 mg/caracol y 245 ± 67 mg/muestra de lombrices), se homogeneizaron en 1,5 ml de agua destilada, se desproteinizaron y se sometieron a extracción con acetato de etilo y análisis químico.

Para determinar los parámetros toxicocinéticos se utilizó un modelo unicompartimental, en el cual la concentración de un xenobiótico en un organismo acuático es descripta como el resultado de una cinética de primer orden tanto en la absorción como en la eliminación (10):

$$dC_{org}/dt = k_1.C_W - k_2.C_{org}$$

En esta ecuación, k_1 es la constante de velocidad de absorción (ml g^{-1} h^{-1}) y k_2 es la constante de velocidad de eliminación (h^{-1}); C_W es la concentración de exposición en el agua del xenobiótico (µg ml^{-1}) y C_{org} es la concentración del compuesto en el organismo acuático (µg g^{-1}). Frente a una concentración de exposición constante, esta ecuación puede ser integrada como:

$$C_{org} = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \cdot (1 - e^{-k2.t}) \qquad (1)$$

En una situación de estado estacionario ($dC_{org}/dt = 0$) esta ecuación se puede simplificar a

$$FBC = \frac{C_{org}}{C_W} = \frac{k_1}{k_2}$$

Las constantes k_1 y k_2 pueden determinarse a través del ajuste matemático por iteraciones múltiples a la ecuación (1) de los datos obtenidos durante la fase de absorción.

A partir del valor de k_2 se puede obtener el tiempo de vida media de un xenobiótico, esto es, el tiempo necesario para que la concentración de dicho compuesto descienda hasta alcanzar un valor igual a la mitad de su concentración inicial.

$t_{½} = \ln 2/ k_2 = 0{,}693/ k_2$

Separación y cuantificación del MAZ

La separación y cuantificación del MAZ en muestras de agua y en el material biológico se realizó en un cromatógrafo líquido de alta performance, Class-VP Shimadzu, con columna de fase reversa C18, Supelcosil LC 18, 5 µm, con dimensiones de 25 cm por 4,6 mm, y guarda columna Supelguard LC-18 de 2 cm, bomba de flujo isocrático, detector UV-visible, perteneciente al Laboratorio de Control de Calidad, Servicio de Farmacia, Hospital Nacional Prof. Dr. Alejandro Posadas. Las corridas se desarrollaron en todos los casos a una temperatura del horno de 40 °C. La columna se equilibró con una fase móvil compuesta por acetonitrilo-agua (45:55 V/V) previamente a la inyección de la muestra. El flujo de la corrida fue de 1ml min^{-1} y la detección se realizó con un detector UV-Visible a 220 nm. La respuesta fue lineal en el rango de concentraciones comprendido entre 0,17-54,6 µg ml^{-1} y la recta de regresión lineal fue y = 118.736,73x (mg L^{-1}) + 974,10. El límite de cuantificación fue de 0,17 µg ml^{-1}.

Inhibición *in vitro* de la actividad ChE por MAZ-oxón

Los tejidos de *L. variegatus* y *B. glabrata* fueron homogenizados en *buffer* Tris/HCl 20 mM, pH 7,5, adicionado de 0,5 mM de EDTA. Los homogenatos se centrifugaron a 11.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. En una batería de tubos plásticos se agregaron distintas concentraciones de MAZ-oxón disuelto en etanol absoluto y se evaporó casi a sequedad en corriente de nitrógeno. A estos tubos se incorporaron, al momento de efectuar la incubación, 300 µl del sobrenadante. La incubación se realizó a 37 °C por 15 minutos. Posteriormente se procedió a medir la actividad ChE.

La actividad ChE se midió, por duplicado, en buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 8,0, 0,2 mM de DTNB y 0,75 mM de AsCh (9). La actividad se registró continuamente a 412 nm. La lectura cinética se efectuó cada 10 segundos desde 0 a 90 segundos. Los valores se corrigieron por hidrólisis espontánea del sustrato y por la reducción no específica del cromógeno por los extractos titulares. La concentración de proteínas se midió por el método de Lowry y col. (11) utilizando albúmina sérica bovina como estándar. La actividad enzimática se expresó como µmoles de sustrato hidrolizado min^{-1} mg $proteína^{-1}$.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como valores individuales o como el promedio ± D.E. (desviación estándar). El efecto del MAZ-oxón sobre la actividad ChE se analizó utilizando ANOVA de un factor y las comparaciones entre grupos se realizaron utilizando la prueba de Tukey-Kramer. Se utilizó un nivel de significación de 0,05.

Resultados

Toxicocinética del MAZ

Las Figuras 2 y 3 representan la cinética de absorción del metil azinfos por *L. variegatus* y *B. glabrata*, respectivamente, durante una exposición constante a 5 µg ml^{-1} del pesticida. Los datos experimentales se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal iterativo a la ecuación $C_o = k_1/k_2\ C_w\ (1-e^{-k2t})$ y se calcularon los valores de k_1 y k_2. La concentración del metil azinfos en el agua, fue constante y comprobada experimentalmente (5,00 ± 0,10 µg ml^{-1}) durante la exposición.

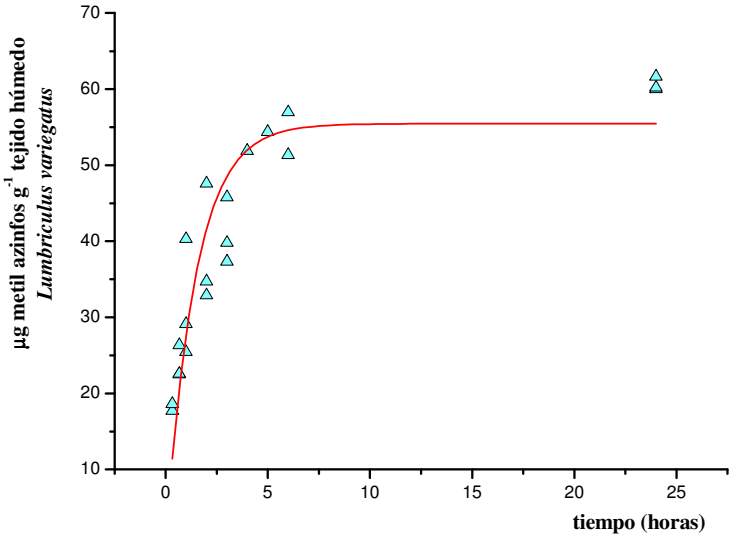


Figura 2: Cinética de absorción del MAZ por *L. variegatus* y el aparente estado estacionario alcanzado. Los datos experimentales corresponden a la fase de exposición al pesticida (5 µg ml^{-1}). Los mismos se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal iterativo a la ecuación $C_o = k_1/k_2\ C_w\ (1-e^{-k2t})$ utilizando el programa OriginPro versión 7.5. Cada punto representa el contenido del compuesto parental correspondiente a un pool de 10-15 lombrices. La línea continua muestra el ajuste al modelo con un coeficiente de determinación, R^2 = 0,82179.

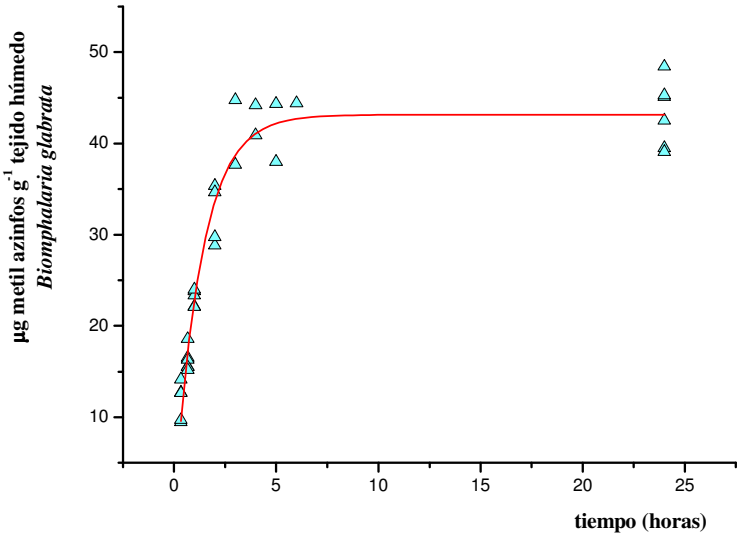


Figura 3: Cinética de absorción del MAZ por *B. glabrata* y el aparente estado estacionario alcanzado. Los datos experimentales corresponden a la fase de exposición al pesticida (5 µg ml^{-1}). Los mismos se ajustaron mediante un análisis de regresión no lineal iterativo a la ecuación $C_o = k_1/k_2\ C_w\ (1-e^{-k2t})$ utilizando el programa OriginPro versión 7.5. Cada punto representa el contenido del compuesto parental correspondiente a un caracol. La línea continua muestra el ajuste al modelo con un coeficiente de determinación, $R^2 = 0{,}93568$.

En el caso de *L. variegatus*, los resultados obtenidos fueron para la constante de absorción, $k_1 = 7{,}71 \pm 0{,}35$ ml g^{-1} h^{-1} y, para la constante de eliminación, $k_2 = 0{,}70 \pm 0{,}10$ h^{-1}. Según este modelo el estado estacionario se alcanzó aproximadamente a las 5 horas de exposición. El FBC_{cin} resultó de 11,0 ± 0,5 ml g^{-1} y el $t_{½}$ de 59 minutos.

En el caso de *B. glabrata*, los resultados obtenidos fueron para la constante de absorción, $k_1 = 6{,}56 \pm 0{,}13$ ml g^{-1} h^{-1} y, para la constante de eliminación, $k_2 = 0{,}76 \pm 0{,}04$ h^{-1}. Según este modelo el estado estacionario se alcanzó aproximadamente a las 4 horas de exposición. El FBC_{cin} resultó de 8,6 ± 0,2 ml g^{-1} y el $t_{½}$ de 55 minutos.

Inhibición *in vitro* de la actividad ChE por MAZ-oxón

Los valores de actividad ChE en el sobrenadante de los homogenatos de *L. variegatus* y *B. glabrata* incubados durante 15 minutos con distintas concentraciones de MAZ-oxón, se muestran en las Figuras 4 y 5, respectivamente. En ambos casos se observó una inhibición enzimática dependiente de la concentración de MAZ-oxón. La concentración de xenobiótico requerida para causar *in vitro* un 50% de la inhibición de la actividad ChE (CI_{50}) en *L. variegatus* y el intervalo de confianza del 95% resultó ser de 0,0025 (0,0020-0,0030) µg ml^{-1}. En el caso de *B. glabrata* la CI_{50} y el intervalo de confianza del 95% fueron: 3,8 (2,2-10,7) µg ml^{-1}.

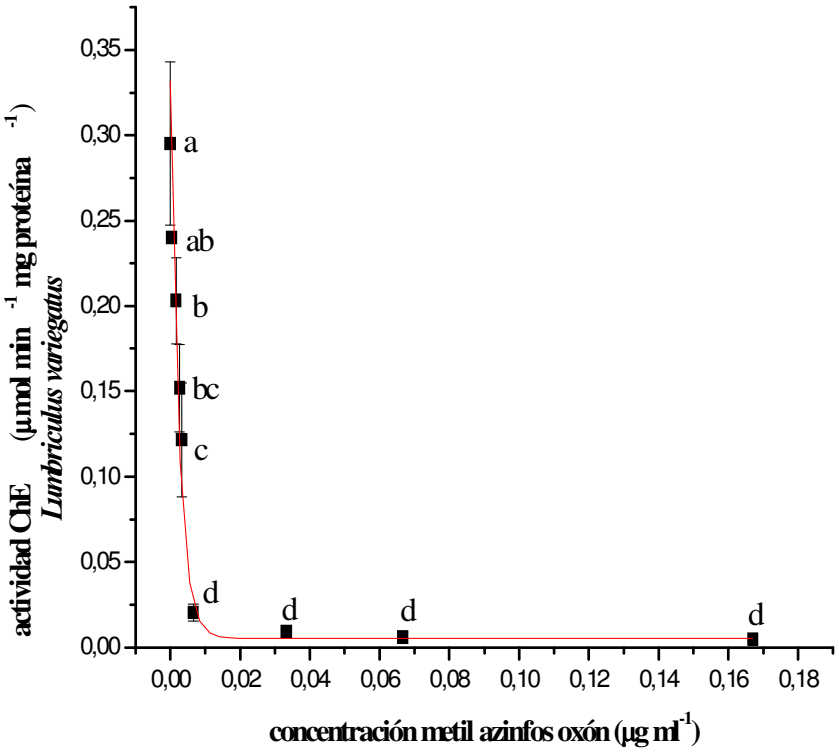


Figura 4: Efecto de concentraciones crecientes de MAZ-oxón sobre la actividad de colinesterasa (ChE) en *L. variegatus*. Cada punto representa el promedio ± D.E. de tres o más determinaciones. Las diferentes letras señalan diferencias estadísticas significativas a $p < 0,05$

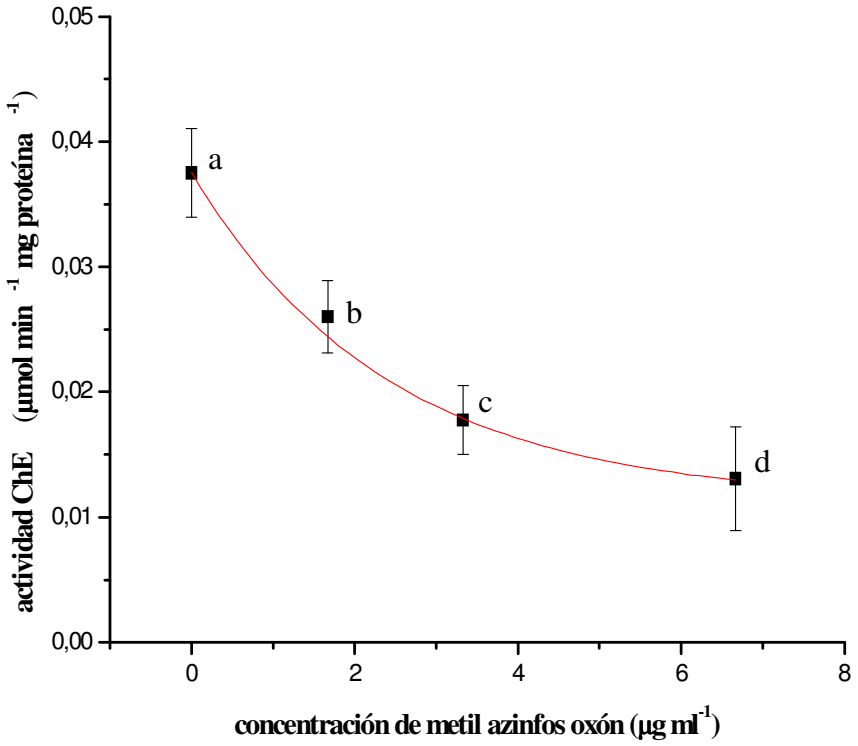


Figura 5: Efecto de concentraciones crecientes de MAZ-oxón sobre la actividad colinesterasa (ChE) en tejidos blandos de *B. glabrata*. Cada punto representa el promedio ± D.E. de tres o más determinaciones. Las diferentes letras señalan diferencias estadísticas significativas a $p < 0,05$

Discusión

Estudios previos realizados exponiendo a *L. variegatus* y *B. glabrata* por 48 horas a MAZ habían permitido demostrar que los oligoquetos eran unas 1000 veces más sensibles que los gasterópodos a la inhibición *in vivo* de la actividad ChE por este organofosforado (8). Los resultados del presente trabajo indican que tanto en *L. variegatus* como en *B. glabrata* expuestos a la concentración de 5 µg ml^{-1} de MAZ la absorción fue rápida, alcanzándose un estado estacionario aparente entre las 4 y 5 horas de exposición. En ambas especies, la velocidad de eliminación también fue rápida con un $t_{½}$ menor a 1 hora. Por último, los FBC_{cin} calculados utilizando el modelo unicompartimental tampoco difirieron significativamente entre ambas especies. Estos resultados estarían indicando que la diferencia de sensibilidad entre los oligoquetos y los gasterópodos no se debería a diferencias en sus respectivas cinéticas de absorción y/o eliminación del MAZ ni en su capacidad de bioconcentrarlo.

Además de procesos toxicocinéticos, procesos toxicodinámicos tales como diferencias en la sensibilidad de los enzimas blanco pueden contribuir a la diferente susceptibilidad para la

inhibición de las ChEs entre las especies. En el presente trabajo se pudo establecer que la actividad ChE de *L. variegatus* fue 1500 veces más sensible al MAZ-oxón que la de *B. glabrata*. Estos resultados podrían deberse, por un lado, a las diferencias en las ChEs presentes en ambos organismos, considerando que trabajos previos han demostrado que la actividad principal en *L. variegatus* es butirilcolinesterasa y en *B. glabrata* es AChE (8). Por otro lado, también podrían deberse a la presencia en los extractos de carboxilesterasas con distinta afinidad por el MAZ-oxón. Estas enzimas juegan un rol importante en el metabolismo y subsecuente detoxificación de muchos pesticidas y drogas. Las carboxilesterasas participan en la detoxificación de los organofosforados de dos maneras: a) por hidrólisis de uniones éster de aquellos organofosforados que contienen este tipo de unión y b) por unión estequiométrica de los organofosforados en el sitio activo de la enzima produciendo su inhibición. Debido a esta unión estequiométrica, varios investigadores han postulado que las carboxilesterasas protegerían a la AChE de la toxicidad mediada por estos pesticidas (12, 13). Así, la presencia en *B. glabrata* de carboxilesterasas mucho más sensibles al MAZ-oxón que las *de L. variegatus* podrían contribuir, al menos en parte, a explicar por qué se necesita una mayor concentración de MAZ-oxón para inhibir la actividad ChE de *B. glabrata*. En este sentido, estudios *in vivo* mostraron que mientras las carboxilesterasas de *B. glabrata* que utilizan p-nitrofenilbutirato como sustrato son más sensibles que las ChEs a la inhibición por MAZ, en el caso de *L. variegatus* ocurre lo contrario (14,15).

Referencias

1. Laguerre C., Sanchez-Hernandez, J., Kohler, H.R., Triebskorn, R., Capowiez, Y., Rault, M., Mazzia, C. (2009). B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: An enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure. Environ. Poll. 157:199-207.

2. Sanchez-Hernandez, J.C. (2007). Ecotoxicological Perspectives of B-Esterases in the Assessment of Pesticide Contamination. In: Plattenberg, R. H. (Ed.), Environmental Pollution: New Resarch. Nova Science Publishers, Inc. N. Y., USA, pp. 1-45.

3. Gupta, R. C.(2006). Classification and Uses of Organophosphates and Carbamates. In Gupta, R. C.(Ed), Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds. Elesevier Academic Press: Burlington, MA, pp 5-24.

4. Loewy, R.M., Monza, L.B., Kiers, V.E., Savini, M.C. (2011). Pesticide distribution in an agricultural environment in Argentina. J. Environ. Sci. Health B. 46: 662-670.

5. USEPA, United States Environmental Protection Agency (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates, 600/R-94/024. US EPA Washington, DC.

6. ASTM, American Society for Testing and Materials (1995). Standard guide for conducting sediment toxicity tests with freshwater invertebrates. E 1393-94ª. En: Annual Book of ASTM Standards. Vol 11.05. Philadelphia, PA.

7. Balaban, A. E., Fried, B. (2013) Maintenance of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* in artificial spring water, deionized water, or conditioned tap water. Comparative Parasitology 80(1):118-119. 2013

8. Kristoff, G., Verrengia Guerrero, N., Pechén de D'Angelo, A.M., Cochón, A.C. (2006). Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. Toxicology 222:185-194.

9. Kristoff, G., Verrengia Guerrero N.R., Cochón A.C. (2008).Effects of azinphos-methyl exposure on enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses in *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. Chemosphere 72:1333-1339.

10. Nichols, J. W., Schultz, I. R., Fitzsimmons, P.N. (2006) *In vitro–in vivo* extrapolation of quantitative hepatic biotransformation data for fish. I. A review of methods, and strategies for incorporating intrinsic clearance estimates into chemical kinetic models. Aquat. Toxicol. 78: 74–90.

11. Lowry, O.H., Rosebrough, Fan, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

12. Maxwell, D. M. (1992) The specificity of carboxylesterase protection against the toxicity of organophosphorus compounds. Toxicol. Appl. Pharmacol. 114:306-312.

13. Wheelock, C.E., Shan, G., Ottea, J. (2005) Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. J. Pestic. Sci. 30:75-83.

14. Kristoff, G. (2010). Estudio comparativo de biomarcadores en los invertebrados acuáticos *Biomphalaria glabrata* y *Lumbriculus variegatus* expuestos a pesticidas de relevancia ambiental. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

15. Kristoff, G., Chiny Barrionuevo, D., Cacciatore, L.C., Verrengia Guerrero, N. R., Cochón, A.C. (2012). In vivo studies on inhibition and recovery of B-esterase activities in *Biomphalaria glabrata* exposed to azinphos-methyl: Analysis of enzyme, substrate and tissue dependence. Aquat. Toxicol. 112-113, 19-26.

***Autora responsable de la publicación:**

Adriana C. Cochón.Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Universidad de Buenos Aires. Departamento de Química Biológica,

Ciudad Universitaria, Pab. II. 4to piso, 1428 Buenos Aires, Argentina.

TE: 0054-11-4576-3342 Fax: 0054-11-4576-3342

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva

Número 3, año 12, Diciembre 2013

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Química Viva
E-ISSN: 1666-7948
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar
Universidad de Buenos Aires
Argentina

Sariego Frómeta, Sandra; Marin Morán, Jorge Erick; Ochoa Pacheco, Ania; Viera Tamayo, Yosvel
Petiveria alliacea L.: distintas condiciones experimentales en la elaboración de extractos con actividad antimicrobiana
Química Viva, vol. 12, núm. 3, -diciembre, 2013, pp. 274-287
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86329278008

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Petiveria alliacea L.: distintas condiciones experimentales en la elaboración de extractos con actividad antimicrobiana

Lic. Sandra Sariego Frómeta[1], MSc. Jorge Erick Marin Morán[2], MSc. Ania Ochoa Pacheco[2], MSc. Yosvel Viera Tamayo[3]

[1]Departamento de Biología Agrícola. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma, Km 17½ carretera a Manzanillo. Peralejo, Bayamo. Granma. Cuba. CP 85100.

[2]Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba

[3]Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma

E-mail: ssariegof@udg.co.cu

Recibido 1 de Noviembre 2013- Reenviado 9 de Noviembre 2013-Aceptado 11 de Noviembre 2013

Resumen

La presente investigación comprende la revisión de dieciocho artículos científicos desarrollados en seis países distintos, relacionados con la actividad antimicrobiana de extractos de *Petiveria alliacea* L. Se realizó una tabla resumen detallada en la que se plasmaron las condiciones experimentales empleadas en estudios previos. Del análisis realizado se sugiere que futuras investigaciones en la planta pudieran encaminarse a reevaluar la efectividad de los extractos elaborados con hojas, tallos y raíces empleando material vegetal fresco, temperaturas que no excedan los 37°C durante la elaboración de los extractos y etanol al 70 o al 80%. Las diferencias obtenidas y los resultados negativos en los estudios publicados pudieran atribuirse a diversos factores entre los que se encuentran algunos vinculados con el material vegetal empleado y otros con las condiciones experimentales diseñadas en cada investigación.

Palabras clave: *Petiveria alliacea*, extractos vegetales, actividad antimicrobiana.

Petiveria alliacea L.: various experimental conditions in the extracts elaboration with antimicrobial activity

Abstract

The present investigation comprises the revision of eighteen scientific articles carried out in six different countries. The articles are related with the antimicrobial activity of *Petiveria alliacea* L. extracts. A detailed table was created in a summary of the experimental conditions used in previous studies was presented. Departing from the developed analysis, it is suggested that future investigations could be focused on the reevaluation of the effectiveness of extracts elaborated through leaves, stems and roots using fresh vegetal material, temperatures below 37℃ during their elaboration and ethanol at 70 or 80%. The differences and negative results in the studies that were published could be attributed to different factors among which some related with the vegetal material used and others related with the experimental conditions designed in each investigation.

Key words*: Petiveria alliacea,* vegetal extracts, antimicrobial activity.

Introducción

Las enfermedades infecciosas constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. El uso indiscriminado de antibióticos sintéticos y comerciales ha empeorado el panorama, pues muchos de los microorganismos causantes de enfermedades comunes, que podían ser tratados fácilmente, han adquirido gran resistencia. Cuantiosas son las investigaciones enfocadas en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales, dentro de estas, un gran número han sido dirigidas hacia la evaluación de actividades antimicrobianas en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Las plantas ofrecen grandes posibilidades en el descubrimiento de nuevos fármacos, ya que de ellas se han aislado alrededor de 12 000 metabolitos secundarios, de los cuales un por ciento significativo presentan actividad antimicrobiana[1]. *Petiveria alliacea* L., es una planta perenne de la familia Phytolaccaceae, usualmente conocida como anamú en los países de habla hispana[2] y originaria del sur de Estados Unidos, de Norteamérica y México. Esta especie tiene una distribución geográfica muy amplia, desde la Florida, en toda América Central, desde Colombia hasta la Argentina y en África[3]. En la figura 1 se muestra una fotografía de la planta y de su raíz.

Petiveria alliacea

Raíz de *Petiveria alliacea*

Lo anterior, llama la atención acerca de que en un área geográfica relativamente extensa se conozca la planta con distintos nombres comunes, pero con propiedades curativas que a pesar de su diversidad, revelan una cierta consistencia entre las diferentes regiones. Podría preguntarse: ¿Cómo fue posible difundir el conocimiento y las aplicaciones de las propiedades etnobotánicas de esta planta entre tantas y distintas etnias con diferentes lenguas y religiones?[4] La actividad antimicrobiana de esta especie es una de las propiedades etnobotánicas más difundidas por países y regiones, razón por la cual ha sido utilizada con fines medicinales y ha sido cultivada como "planta de la suerte" a la cual se le atribuyen propiedades mágicas en la preservación de la salud humana, alejando los males y las hechicerías[3]. De manera general, en algunos países entre los que se encuentran Argentina, Cuba, Brasil, Guatemala, Haití, México, Puerto Rico y Venezuela se le atribuyen a esta planta propiedades etnobotánicas para el tratamiento de infecciones cutáneas, urinarias, venéreas y del tracto respiratorio. Se le han otorgado además, propiedades depurativas, antifúngicas y antisépticas[5].

Lo anterior, ha sugerido la realización de estudios *in vitro* por investigadores de estos países para comprobar científicamente su posible efecto antimicrobiano. No obstante, las investigaciones desarrolladas han evidenciado discrepancias en los resultados publicados entre autores. Podría pensarse en la alternativa de reevaluar la actividad antimicrobiana de esta planta frente a los microorganismos seleccionados en estudios anteriores, modificando las condiciones experimentales durante la preparación de los extractos. En la presente investigación pretendemos analizar las condiciones experimentales empleadas en estudios previos relacionados con la evaluación de la actividad antimicrobiana de esta planta y solucionar una interrogante cuya respuesta basada en los resultados precedentes resulta muy contradictoria en la actualidad.

Materiales y Métodos

Se revisaron un total de 18 artículos científicos (procedentes de 6 países distintos) referentes a la actividad antimicrobiana de *Petiveria alliacea*, aunque no desestimamos la posibilidad de la existencia de otros artículos que aborden la temática analizada. Se elaboró una tabla resumen en la que se clasificó la información atendiendo a la parte de la planta empleada en cada estudio, especificándose en todos los casos si se realizó o no el secado del material vegetal. Se detalló el país de procedencia de cada investigación, la actividad biológica probada, los tipos de extractos evaluados, las pruebas microbiológicas realizadas, y en los casos en los que las investigaciones lo declararan las dosis empleadas y los parámetros asumidos para inferir resultados positivos considerando las formulaciones farmacéuticas activas frente a los microorganismos. Se especificaron las especies de microorganismos analizadas en cada artículo, detallando en cada caso si las cepas empleadas eran o no de referencia internacional. En la tabla resumen se plasmaron además, los resultados de las evaluaciones antimicrobianas y los autores y el año de cada investigación.

Resultados y Discusión

Consideraciones generales

La artículos revisados indican que han sido diversas las condiciones experimentales probadas en la evaluación de la actividad antimicrobiana de *Petiveria alliacea.* Estos estudios abordan la evaluación antimicrobiana de diversas formulaciones farmacéuticas entre las que se encuentran decocciones, extractos fluidos, extractos blandos y tinturas. De manera general, se han empleado una gran variedad de solventes en la preparación de los extractos, entre los que se encuentran el agua, etanol a diferentes por cientos (30, 50, 60, 70, 80, 95 y 100%), metanol, hexano, acetona, diclorometano, alcohol isopropílico, y mezclas de solventes como diclorometano-metanol en la proporción 2:1.

Los solventes de mayor preferencia en la elaboración de los extractos han sido el agua y el etanol. Resulta totalmente lógico que se centraran los estudios en extractos elaborados con etanol por ser un solvente barato, abundante y de baja toxicidad. Los resultados prácticos obtenidos por diferentes investigadores corroboran que el etanol es el solvente más promisorio para extraer la mayoría de los metabolitos secundarios[6]. En la realización de los extractos se han utilizado las hojas, los tallos y las raíces de esta planta, resultando las hojas el material vegetal de preferencia. Ochoa *et al.* (2013)[7] plantearon la necesidad de comparar la actividad antimicrobiana de extractos elaborados a partir de hojas secas y hojas frescas, considerando oportuno evaluar además el efecto de la concentración de los extractos y el tamaño de partícula del material vegetal. Los estudios de actividad antimicrobiana de esta planta se han desarrollado fundamentalmente en Cuba y Guatemala, encontrándose que el 50% de los artículos revisados fueron publicados en la década del noventa. La actividad antibacteriana del anamú ha sido probada al menos frente a 30 especies pertenecientes a 17 géneros distintos. El

86,7% de las especies de bacterias evaluadas de manera general en los artículos pueden teñirse con la tinción de Gram, de las cuales un 50% en cada caso, se clasifican como gram-positivas y gram-negativas. Se excluyen de esta clasificación, cuatro especies del género *Mycobacterium* pues una vez teñidas con colorantes básicos no se pueden decolorar en etanol independientemente del tratamiento con yodo, y que por tanto, se tiñen con las tinciones de Ziehl-Neelsen y auramina. En los artículos consultados, algunos autores utilizan indistintamente los nombres científicos *Salmonella typhosa* y *Salmonella typhi*. Es válido aclarar, que estos términos han sido atribuidos a la bacteria considerada el agente etiológico de la fiebre tifoidea[8] y por tanto, fueron analizados como una misma especie; aunque reportamos en la **tabla resumen** los nombres específicos utilizados originalmente por los autores de cada artículo. La actividad antifúngica de extractos vegetales del anamú ha sido probada al menos, frente a 16 especies de hongos pertenecientes a 9 géneros diferentes. Se ha evaluado la actividad antifúngica frente a tres especies del género *Aspergillus*, consideradas importantes agentes etiológicos de la aspergilosis. La posible efectividad de los metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales de esta planta se ha determinado frente cinco especies de hongos dermatófitos íntimamente relacionados (pertenecientes a los géneros *Epidermophyton*, *Microsporum* y *Trichophyton*) y causantes de dermatofitosis (usualmente conocidas como tiñas). *Cryptococcus neoformans,* considerada la especie más importante de este género desde el punto de vista médico y conocida por causar una forma severa de meningitis y meningo-encefalitis también ha sido evaluada en la actividad antifúngica de esta planta. Otras especies de hongos como *Neurospora crassa*, dos especies del género *Cladosporium,* tres del género *Candida* y cepas de referencia de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* han sido incluidas en estos estudios *in vitro*.

Tabla resumen de estudios realizados por países de la actividad antimicrobiana de extractos de *Petiveria alliacea* L.

Parte de la planta	Origen	Actividad biológica probada	Tipo de extracto	Prueba microbiológica (Dosis/Resultado positivo)	Microorganismos evaluados	Resultado	Referencia
Hojas (secas)	Argentina	Antibacteriana (cepas de resistencia a la penicilina G)	Acuoso	Modificación del método de difusión en agar de Pérez *et al.* (1990) D: 50 µL	*Staphylococcus aureus*	-	Anesini y Pérez (1993)[18]
					Escherichia coli	-	
Hojas (secas)	Argentina	Antibacteriana	Acuoso	Modificación del método de difusión en agar de Pérez *et al.* (1990) D: 50 µL RP: No declarado	*Salmonella typhi*	-	Pérez y Anesini (1994a)[19]
Hojas (secas)	Argentina	Antibacteriana	Acuoso	Método de difusión en agar D: No declarada RP: No declarado	*Pseudomonas aeruginosa*	-	Pérez y Anesini (1994b)[20]
Hojas (secas)	Brasil	Antibacteriana	Acuoso	Método de dilución CLSI (2006) D: 0.5-1.5 x 10^4 UFC/mL RP: Se determinó la CMI	*Bacillus subtilis* (ATCC 6633)	-	Guedes *et al.* (2009)[21]
					Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)	-	
					Escherichia coli (ATCC 25922)	-	
					Streptococcus mutans (ATCC 27175)	-	
					Enterococcus faecalis (ATCC 29212)	-	
					Staphylococcus epidermitis (ATCC 27853)	-	
					Staphylococcus aureus (ATCC 25923)	-	

Leyenda: D: Dosis, **RP:** Resultado positivo, **CLSI:** Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, **UFC:** Unidad Formadora de Colonias, **CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria

(-): Extracto inactivo; **(+):** Extracto activo.

Selección del material vegetal

Del análisis de la **tabla resumen** es posible apreciar que las hojas son el órgano vegetativo de la planta más empleado en la elaboración de los extractos, independientemente de que los escasos estudios realizados con tallos y raíces evidencian resultados más alentadores. Se conoce que los precursores de los compuestos con actividad antimicrobiana de *Petiveria alliacea* son algunos aminoácidos que contienen azufre. En las raíces de esta planta se han aislado cinco aminoácidos en cantidades variables entre los que se encuentran la S-metil-cisteína, S-etil-cisteína y S-propil-cisteína. Estos tres aminoácidos han sido encontrados en cantidades muy bajas en las raíces de esta planta (< 3µg/g de peso fresco)[9]. Sin embargo, las concentraciones reportadas en este órgano de la S-(2-hidroxietil) cisteína (0,2 mg/g de peso fresco)[9] y de la S-bencil-cisteína (<10µg/g de peso fresco) [10] indican que a partir de estos dos aminoácidos, se obtienen otros dos compuestos conocidos trivialmente como 6-hidroxietina y petiverina que constituyen los principales precursores de los metabolitos secundarios a los que se le atribuye la actividad antimicrobiana. Kubec y Musah (2001)[10] aislaron dos diasteroisómeros del sulfóxido de S-bencil-cisteína (petiverina A y petiverina B) y plantearon que el contenido total de petiverinas en las hojas, tallos y raíces de esta planta es muy variable, siendo de 0,07, 0,29 y 2,97 mg/g de peso fresco, respectivamente. El elevado contenido de petiverinas en las raíces (42 veces superior que el reportado en las hojas y 10 veces superior al reportado en los tallos) de esta especie, sugiere la utilización de las mismas como el principal órgano de elección durante la elaboración de los extractos. No obstante, independientemente de que el anamú es una planta perenne y de amplia distribución, su explotación a gran escala mediante la utilización de las raíces podría afectar la supervivencia de la especie. En los estudios anteriores, el principal criterio de elección de las hojas como material de partida para la elaboración de los extractos podría atribuirse a que además de ser el órgano más biodisponible del reino vegetal, su utilización no implica la destrucción total de la planta lo que sugiere el uso sostenible de la especie. Es posible asumir, que el contenido de petiverinas varía entre plantas que crecen en localidades diferentes teniendo en cuenta que su formación depende de diversos factores entre los que se encuentran la composición del suelo, el suministro de azufre y nitrógeno, el clima y la fecha de colecta[10].

¿Es necesario secar el material vegetal?

Temperaturas a utilizar en la preparación de los extractos

El sulfóxido de cisteína liasa es una enzima considerada la primera allinasa heteromérica, detectada y purificada de las raíces de *Petiveria alliacea*[11]. Esta enzima es compartimentalizada en las vacuolas de las células, mientras su sustrato son los Cis sulfóxidos de cisteína S-sustituidos que se localizan en el citoplasma[12]. Al ocurrir la rotura de los tejidos, la enzima reacciona esencialmente con las petiverinas para producir ácidos sulfínicos y el ácido α-aminoacrílico, que son intermediarios efímeros cuya formación no se puede rastrear fácilmente. Los ácidos sulfínicos entre los que se encuentran el ácido fenilmetanosulfínico

(PMSA) rápida y espontáneamente se condensan con pérdida de agua para producir los correspondientes tiosulfinatos, de los cuales el más abundante en el anamú es el S-bencil-fenilmetanotiosulfinato, también conocido como petivericina. El ácido α-aminoacrílico subsiguientemente se descompone en piruvato, que es el producto estable formado en estas reacciones. De este modo, la cinética de las reacciones de las allinasas se determina monitoreando la formación de tiosulfinatos o piruvato. El PMSA formado puede ser interceptado posteriormente por la enzima factor lacrimógeno sintasa (LFS) y convertido en el factor lacrimógeno (PMTSO) conocido comúnmente como sulfino. Las concentraciones relativas de petivericina y PMTSO en los extractos varían en función de las proporciones en las que se encuentren las enzimas LFS y las allinasas. Estudios *in vitro* han demostrado que si la concentración de la enzima LFS es cinco veces mayor a la de las allinasas se obtienen como resultado de esta reacción el PMTSO, sus productos de descomposición, y benzaldehído. Si la concentración de las allinasas es al menos 1,2 veces mayor con relación a la del LFS se obtienen cantidades sustanciales de PMTSO y de petivericinas[13]. Kim *et al.* (2006)[14] plantearon que las discrepancias y la ausencia de actividad antimicrobiana de esta planta en los estudios precedentes podían ser el resultado de diferentes procedimientos empleados durante la preparación de las muestras. Concluyeron además, que la inactivación de enzimas por el secado del material vegetal y/o la aplicación de calor durante la preparación de los extractos podría interferir en la formación efectiva del sulfino, los tiosulfinatos, y por consiguiente de otros compuestos activos antimicrobianos como los trisulfuros. Se ha demostrado que la actividad del sulfóxido de cisteína liasa se incrementa con el aumento de la temperatura en un rango de 4 a 52°C. A 67°C la actividad de esta enzima disminuye precipitadamente y se desnaturaliza a 84°C. Empleando como sustrato a las petiverinas la actividad de esta enzima mostró un 80% de actividad a 37 °C y un 100% a 52 °C[11]. La teoría más reciente que intenta explicar las contradicciones existentes en los estudios de actividad antimicrobiana de esta planta se basa en el hecho de que un exceso de la enzima LFS con relación a la allinasa puede disminuir de forma efectiva la formación de tiosulfinatos. En tales casos es la formación del sulfino lacrimógeno (PMTSO) en lugar de los tiosulfinatos quien sirve como evidencia de la presencia de las allinasas debido a que las allinasas proveen el ácido sulfínico (PMSA), que es el sustrato en el que actúan las enzimas LFS para producir sulfino[13]. Se conoce que el sulfino y los tiosulfinatos son compuestos termolábiles que sufren reacciones subsecuentes particularmente cuando son sometidos a calentamiento dando lugar fundamentalmente a diversos sulfuros, estilbenos, benzaldehído y otros productos secundarios de descomposición, en su mayoría, carentes de actividad antimicrobiana[14]. Las temperaturas empleadas en el secado del material vegetal y durante la elaboración de los extractos podrían ser las variables más significativas a tener en cuenta en los estudios de actividad antimicrobiana de esta planta. Se sugiere la utilización de material vegetal fresco y temperaturas que no excedan los 37°C durante la elaboración de los extractos, aún cuando se conoce que las allinasas logran un 100% de actividad catalítica a 52°C. Se trata de lograr el equilibrio entre la actividad catalítica de la allinasa y la preservación del sulfino y los tiosulfinatos, cuyas concentraciones elevadas en los

extractos garantizan la efectividad de la actividad antimicrobiana de esta planta. Esta actividad atribuida esencialmente a los tiosulfinatos se debe a que estos compuestos reaccionan con grupos tioles de proteínas celulares de los microorganismos dando lugar esencialmente a disulfuros mixtos que inhiben complejos enzimáticos, la transformación de proteínas, la síntesis de lípidos y de ARN[15]. En el reino *Plantae*, existen bien definidas dos estrategias defensivas. El anamú pertenece a los niveles evolutivos bajos (Subclase *Cariophylidae*) y basa su sistema defensivo contra patógenos en la síntesis y acumulación de sustancias antimicrobianas, las cuales estarán listas para ser empleadas cuando ocurra el ataque a la planta. Este sistema defensivo se conoce como "defensa cuantitativa o defensa estática", pues estos productos se concentran en cada uno de los órganos a defender. Para lograr esta bioacumulación, las especies pertenecientes a estos niveles taxonómicos, necesitan dedicar cantidades importantes de energía y precursores que le permitan mantener éstos altos niveles de antimicrobianos en la planta.

Solventes de elección y actividad antimicrobiana de los extractos

De la revisión realizada es posible apreciar que los extractos de las hojas han mostrado actividad frente al 36,7% de las bacterias evaluadas en estudios antimicrobianos; presentando una mayor efectividad ante las gram-positivas (63,6%). Las bacterias más susceptibles a los extractos de las hojas han sido: *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis.* Una observación interesante es que los extractos de los tallos han mostrado actividad frente al 72.7% de las bacterias evaluadas en estudios antimicrobianos. Los extractos empleados se han realizado con tres solventes diferentes entre los que se encuentran el agua, la acetona y el etanol (al 95% o diluido en agua en la proporción 1:1). De estos solventes, el etanol al 95% resultó activo según Misas *et al*. (1979)[16] frente al 70% de las bacterias evaluadas. Lo anterior, indica que se logra una mayor extracción de metabolitos antimicrobianos en los tallos con respecto a las hojas, en las que solo se ha obtenido actividad en una de once bacterias, con este solvente al por ciento analizado. Las bacterias más susceptibles a los extractos de los tallos han sido: *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Shigella flexneri* y *Serratia marcescens.* Se encontró y revisó un solo artículo de actividad antibacteriana de los extractos de las raíces que fue activo frente *Mycobacterium tuberculosis* (la única bacteria analizada) y elaborado con agua y etanol en la proporción 1:1.

Kim *et al.* (2006)[14] demostraron la actividad antibacteriana de ocho compuestos sulfurados puros aislados de extractos de las raíces de anamú, los cuales fueron activos frente a nueve especies de bacterias y resultaron inactivos a *Pseudomonas aeruginosa.* El índice de polaridad de los solventes es un factor importante a tener en cuenta durante la elaboración de los extractos. Los extractos en acetona de hojas y tallos de esta planta han mostrado actividad frente a un 40% de las bacterias evaluadas en estudios previos. Resulta llamativo que extractos de las hojas elaborados con metanol, solvente con igual índice de polaridad que la

acetona (5.1) resultaron inactivos frente a las 17 especies de bacterias evaluadas por Meléndez y Capriles (2006)[17]. Los resultados negativos obtenidos por estos autores pudieran atribuirse al secado del material vegetal realizado en estufa durante dos días consecutivos a 65°C. De la revisión realizada es posible concluir que *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* han sido las especies de bacterias más susceptibles a los extractos de esta planta. La actividad antifúngica de extractos de las hojas, tallos y raíces de *Petiveria alliacea* se ha evaluado frente a trece, dos y cuatro especies, respectivamente. Los extractos de las hojas han mostrado actividad frente a cinco especies de hongos, de ellos *Epidermophyton floccosum* resultó susceptible al extracto acuoso y *Cryptococcus neoformans* fue sensible al extracto en diclorometano. Se han utilizado una gran variedad de solventes en la determinación de la actividad antifúngica de extractos de las hojas de anamú frente a *Candida albicans*, solo el etanol al 70% ha mostrado efectividad frente a esta y otras dos especies del mismo género. Extractos de tallos y raíces en una mezcla de etanol y agua en la proporción 1:1 resultaron activos frente a este importante patógeno humano. De manera general, los extractos elaborados con etanol al 70 y al 80% han logrado una elevada efectividad frente a las especies de bacterias y de hongos evaluadas en estudios de actividad antimicrobiana de esta planta, lo que sugiere que con la utilización de este solvente a estas concentraciones se incrementa su poder difusivo en las células facilitándose una mayor extracción de metabolitos bioactivos. El etanol a estas concentraciones presenta un índice de polaridad intermedio, lo que corrobora que la utilización de solventes relativamente polares no afecta la extracción de los tiosulfinatos, impidiendo la formación de sus respectivos productos de descomposición[14]. Se ha demostrado además, que batir el material vegetal fresco con la finalidad de disminuir su tamaño de partícula favorece el incremento en los extractos de células lisadas por destrucción mecánica de paredes y membranas celulares. Lo anterior, justifica una mayor extracción de metabolitos durante la maceración del material vegetal, los cuales se mezclarán directamente con el solvente una vez destruidas las células implicando una reducción del proceso difusivo de extracción como consecuencia del incremento de procesos cinéticos.

Métodos empleados en la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Petiveria alliacea*

De manera general, los estudios de actividad antimicrobiana de *Petiveria alliacea* se han realizado con los métodos de difusión en agar (72,2%). Esta técnica es la más empleada en los estudios de susceptibilidad de los microorganismos, ya que es posible evaluar una gran cantidad de antibióticos en un corto período de tiempo. No obstante, estos métodos tienen varias limitaciones como son: densidad del inóculo, temperatura de incubación, tiempo de la incubación, tamaño de la placa, espesor y composición del medio. Los artículos publicados indican que las concentraciones de los extractos empleadas en estos estudios han sido muy variables. En este sentido, es válido aclarar que en la actualidad no existe una organización o institución que legisle o estandarice las concentraciones de extractos vegetales a emplear, por

tanto, la selección de las concentraciones a evaluar es arbitraria aunque deben tenerse en cuenta los niveles de toxicidad de los extractos frente a los modelos biológicos a los que esté dirigida su aplicación. En términos de investigaciones científicas el método de dilución es más sensible y revela datos cuantitativos, pero resulta de engorrosa labor y se hace difícil evaluar una gran cantidad de antibióticos al mismo tiempo.

Conclusiones

La actividad antimicrobiana de extractos de *Petiveria alliacea* se debe probablemente, al sinergismo entre varios compuestos químicos presentes en los mismos, de los cuales, los derivados sulfurados del metabolismo secundario de esta planta juegan un rol esencial. Las diferencias obtenidas y los resultados negativos reflejados en los estudios publicados pudieran atribuirse a diversos factores entre los que se encuentran algunos vinculados con el material vegetal empleado y otros con las condiciones experimentales diseñadas en cada investigación. Las concentraciones endógenas de petiverinas y las proporciones enzimáticas de allinasa y de LFS en el material vegetal son factores aleatorios que influyen decisivamente en los resultados. Sin embargo, el órgano vegetativo a utilizar, la realización o no del secado del material vegetal, la temperatura empleada en la elaboración y concentración de los extractos, así como la selección de los solventes adecuados pudieran ser diseñados previamente para alcanzar resultados positivos. Se sugiere que la elección de las raíces como material vegetal en la elaboración de los extractos se valore en dependencia de la escala de cada investigación, siempre y cuando implique el uso sostenible de la especie. Los estudios futuros de actividad antimicrobiana de esta planta pudieran encaminarse a reevaluar la efectividad de los extractos elaborados con los órganos vegetativos comúnmente empleados teniendo en cuenta otras condiciones experimentales para las que se sugiere emplear material vegetal fresco, la utilización de temperaturas que no excedan los 37°C durante la elaboración de los extractos y de etanol al 70 o al 80%.

Referencias

1 - Shaheen SZ, Vasu KB, Charya MS, 2009. Antimicrobial activity of the fruit extracts of *Coccinia indica.* African Journal of Biotechnology 8 (24): 7073-7076.

2.- Duarte MR, Lopes JF, 2005. Leaf and stem morphoanatomy of *Petiveria alliacea.* Fitoterapia 76: 599– 607.

3.- Schroeder MA, Burgos AM, 2011. Concentraciones foliares y dinámica estacional de nutrientes en *Petiveria alliacea* L. Revista Cubana de Plantas Medicinales 16(4):374-389.

4.- Ferrer JI, 2007. Principales referencias etnomédicas sobre el anamú (*Petiveria alliacea Linn*) y principios activos encontrados en la planta. Un acercamiento al tema. Revista CENIC Ciencias Biológicas 38(1): 27-30.

5.-Vilchez M, 2007. Estudio preliminar del Anamú (*Petiveria alliacea*) en la reducción del puerperio bovino en la finca El Rosario, municipio de la Trinidad, departamento de Estelí. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Agraria. Managua-Nicaragua.

6.- Cabrera D, Sánchez Y, Espinosa A, Almeida M, 2011. Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de extractos de *Bryophyllum pinnata.* QuímicaViva.

7.- Ochoa A, Marín J, González Z, Hidalgo A, Mujawimana R, Tamayo K, Sariego S, 2013. *In vitro* antimicrobial activity of total extracts of the leaves of *Petiveria alliacea* L. (Anamu). Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences 49 (2): 241-250.

8. - Breed RS, 1955. *Salmonella typhosa* versus *Salmonella typhi*. International Bulletin of bacteriological 5(4): 165-168.

9. Kubec R, Kim S, Musah R, 2002. S-Substituted cysteine derivatives and thiosulfinate formation in *Petiveria alliacea*-part II. Phytochemistry 61: 675-680.

10. Kubec R, Musah RA, 2001. Cysteine sulfoxide derivatives in *Petiveria alliacea*. Phytochemistry 58: 981-985.

11. Musah RA, He Q, Kubec R, Jadhav A, 2009. Studies of a Novel Cysteine Sulfoxide Lyase from *Petiveria alliacea*: The First Heteromeric Alliinase. Plant Physiology 151: 1304-1316.

12. Lancaster JE, Collin HA, 1981. Presence of alliinase in isolated vacuoles and alkyl cysteine sulphoxides in the cytoplasm of bulbs in onion (*Allium cepa*). Plant Sci Lett 22:169–176.

13. - Musah RA, He Q, Kubec R, 2009. Discovery and Characterization of a Novel Lachrymatory Factor Synthase in *Petiveria alliacea* and Its Influence on Alliinase-Mediated Formation of Biologically Active Organosulfur Compounds. Physiology 151: 1294–1303.

14. Kim S, Kubec R, Musah RA, 2006. Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacea* L. Journal of Ethnopharmacology 104: 188-192.

15. Ankri S, Mirelman D, 1999. Review Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes and Infection 2: 125–129.

16.- Misas C, Hernández N, Abraham A, 1979. The biological assessment of Cuban plants.III. Revista Cubana de Medicina Tropical 31(1): 21-27.

17.- Meléndez PA, Capriles VA, 2006. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. Phytomedicine 13: 272–276.

18.- Anesini C, Pérez C, 1993. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology 39: 119-128.

19. - Pérez C, Anesini C, 1994. *In vitro* antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi.* Journal of Ethnopharmacology 44: 41-46.

20.- Pérez C, Anesini C, 1994. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by Argentinean medicinal plants. Fitoterapia 65 (2): 169-172.

21.- Guedes R, Nogueira N, Almeida A, Souza C, Oliveira W, 2009. Atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Petiveria alliacea* L. Latin American Journal of Pharmacy 28 (4): 520-524.

22.- De la Torre R, Martínez M, Fernández M, Morón F, 1994. Caracterización farmacológica y toxicológica de *Petiveria alliacea* L. (Anamú). I Evaluación de la actividad antimicrobiana. Revista Cubana de Farmacia 28(1):55-59.

23.- Martínez P, Baracaldo N, Santos M, Guzmán N, 2003. Estudio Farmacognóstico, Fitoquímico y Microbiológico de la *Petiveria alliacea* L. Gaceta Médica Espirituana.

24.- Cáceres A, Girón L, Alvarado S, Torres M, 1987. Screening of antimicrobial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. Journal of Ethnopharmacology 20: 223-237.

25.- Cáceres A, López B, González S, Berger I, Tada I, Maki J, 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. Journal of Ethnopharmacology 62: 195-202.

26.- Cáceres A, Cano O, Samayo B, Aguilar L, 1990. Plants used in Guatemala for treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against Enterobacteria. Journal of Ethnopharmacology 30: 55- 73.

27.- Frame A, Riosolivares E, De Jesús L, Ortiz D, Pagan J, Méndez S, 1998. Plants from Puerto Rico with anti-*Mycobacterium tuberculosis* properties. PR Health SCI J, 17(3): 243-253.

28. - Szczepanski V, Zgorzelak C, Hoyer P, Arzneim G, 1975. Isolation, structure elucidation and synthesis of an antimicrobial substance from *Petiveria alliacea*. Res Lab Schering ag Berlin D-100 Germany.

29.- López A, Hernández N, Misas C, 1981. Potential antineoplastic activity of Cuban plants. IV. Revista Cubana de Farmacia 15(1): 71-77.

30.- Cáceres A, López B, Girón M, Logemann H, 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections.1. Screening for antimytotic activity of 44 plant extracts. Journal of Ethnopharmacology 31: 263- 276.

31.- Cáceres A, Jauregui E, Herrera D, Logemann H, 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infections.1: Screening of 38 plant extracts for anticandidal activity. Journal of Ethnopharmacology 33: 277-283.

32.- Benevides P, Young M, Giesbrecht A, Roque N, Bolzani V, 2001. Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. Phytochemistry 57: 743-747.

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva

Número 3, año 12, Diciembre 2013

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Química Viva
E-ISSN: 1666-7948
quimicaviva@qb.fcen.uba.ar
Universidad de Buenos Aires
Argentina

Petit A., Karla; Colina L., José; Yegres E., Francisco; Moran G., Hector; Richard-Yegres, Nicole
Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de Aloe vera
Química Viva, vol. 12, núm. 3, -diciembre, 2013, pp. 288-304
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86329278009

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

*Revista **QuímicaViva** - Número 3, año 12, diciembre 2013 - quimicaviva@qb.fcen.uba.ar*

Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de *Aloe vera*

Petit A. Karla[1], Colina L. José[1], Yegres E. Francisco[2], Moran G. Hector[3], Richard-Yegres Nicole[2],

1) Departamento de Química, Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda (UNEFM), 2) Laboratorio de Investigación y Apoyo Docente Santa Ana (LIADSA), UNEFM, 3) Centro de Investigación de Ciencias Básicas (CICBa), UNEFM. Venezuela.

kpetit@correo.unefm.edu.ve

Recibido 13 de Noviembre 2013 – Reenviado 26 de noviembre 2013-Aceptado 30 de noviembre 2013

RESUMEN

Se evaluó la capacidad de cepas fúngicas aisladas de ambientes contaminados con petróleo, podredumbre blanca de árboles, ambientes cerrados y acíbar de *Aloe vera* para crecer y degradar antraceno, fluoranteno y pireno. Las cepas se seleccionaron inicialmente por su habilidad para crecer en placas con Czapek complementadas con diesel como única fuente de carbono y energía, se identificaron hongos pertenecientes a los géneros *Acremonium, Aspergillus, Fusarium, Paecillomyces, Penicilium y Trichoderma*, seguidamente las cepas fueron sometidas a ensayos de crecimiento en placas con medio Czapek complementado con los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) como única fuente de carbono, a partir de este ensayo se seleccionaron tres cepas que presentaron mayor crecimiento en los HPA, todas del género *Aspergillus,* con las cuales se determinó la degradación de HPA en cultivos líquidos en 20 días de incubación. La cuantificación de los HPA se realizó por cromatografía de gases. La cepa U2010-27A (*Aspergillus versicolor*) mostró la mayor tasa de biotransformación de los HPA, entre 15 y 20 %, por lo que se seleccionó para ensayos de biorremediación en un suelo contaminado con HPA, las tasas de degradación en 60 días de incubación resultaron 23,6% pireno, 10,6% fluoranteno y 5,0% antraceno. Estos resultados sitúan a la cepa U2010-27A como un hongo con potencial para biorremediar suelos contaminados con HPA.

Palabras clave: Biodegradación, Hidrocarburos aromáticos policíclicos, hongos

Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungi isolated from water contaminated with oil, white rot and aloe from Aloe vera

ABSTRACT

We evaluated the ability of fungal strains isolated from oil-contaminated environments, white rot of trees, aloes indoors and *Aloe vera* to grow and degraded anthracene, fluoranthene and pyrene. The strains were initially selected for their ability to grow on plates with Czapek Medium (Cz) supplemented with diesel as the sole source of carbon and energy. Several isolates were identified as fungi belonging to the genera *Acremonium, Aspergillus, Fusarium, Paecillomyces, Penicillium* and *Trichoderma*. The three strains selected by their best growth with PAHs belonged to the *Aspergillus* genus. The degradation of PAHs was determined in liquid cultures during 20 days of incubation, quantifying PAHs by gas chromatography. The strain U2010-27A (*Aspergillus versicolor*) showed the highest yield of biotransformation of PAHs, between 15 and 20%, so it was chosen for testing bioremediation in contaminated soil. The degradation yields at 60 days incubation were 23.6 % pyrene, 10.6 % fluoranthene and 5.0 % anthracene. These results indicated that the strain U2010-27A could be a potential candidate for bioremediation of contaminated soils.

Keywords: *Biodegradation, polycyclic aromatic hydrocarbons, fungi*

Introducción

El petróleo tiene una gran importancia en la sociedad moderna, sin embargo, éste muestra varios aspectos negativos, siendo los problemas ambientales derivados de su explotación y uso los más importantes. Su sola presencia en el ambiente implica una serie de problemas relacionados con la contaminación, la disminución de la calidad del agua, el suelo y de la vida de muchas plantas y animales; pudiendo afectar finalmente, la calidad de vida de los seres humanos, que interactúan con los ecosistemas y cadenas alimenticias afectadas [1].

Entre los numerosos compuestos que contiene el petróleo, están los hidrocarburos aromáticos, los cuales varían en estructura, tamaño y complejidad; desde compuestos monocíclicos hasta estructuras de cadenas largas y complejas constituidas por anillos aromáticos [2]. De éstos compuestos, los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) han sido los más estudiados debido a que forman parte de una amplia variedad de productos de importancia biológica, química e industrial [3].

Los HPA se encuentran entre los contaminantes de mayor impacto biológico debido a los efectos cancerígenos y mutagénicos que provocan en los sistemas vivos [4]. Este efecto biológico varía en función de la estructura del HPA, la agencia para la protección ambiental americana (EPA) seleccionó 16 de los HPA, llamados prioritarios debido a su alta toxicidad, entre los que se encuentran antraceno, fluoranteno y pireno [5].

En los últimos años se ha incrementado el interés en el uso de biotecnologías destinadas a recuperar ambientes contaminados con petróleo o sus derivados, que complementen los métodos químicos y físicos tradicionales. Aparece así la biorremediación, una técnica basada en el uso de microorganismos para degradar los hidrocarburos presentes en el petróleo y otros combustibles que representa uno de los principales mecanismos por los cuales estos contaminantes pueden ser eliminados del ambiente y generalmente resulta más económica que otras alternativas de restauración [6].

Gran parte de los estudios de biorremediación, se han centrado en las bacterias, por la facilidad que ofrecen para estudiar sus vías metabólicas y llevar a cabo construcciones genéticas que permitan degradar específicamente determinados compuestos contaminantes; sin embargo la capacidad de los hongos, para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos y llevarlos hasta compuestos más simples, ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamiento de contaminaciones. Ese potencial radica fundamentalmente en las características de su sistema enzimático y en su vigoroso crecimiento que les permite, a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes tipos de sustratos y acceder a los compuestos que constituyen las contaminaciones más frecuentes [7].

El objetivo de este estudio fue aislar e identificar cepas fúngicas de diferentes fuentes con potencial para biodegradar antraceno, fluoranteno y pireno, tres HPA de alto impacto debido a su frecuencia y recalcitrancia en ambientes impactados por actividades petroleras, con lo cual se pretende hacer un aporte biotecnológico al saneamiento de ambientes contaminados con estos compuestos.

Materiales y Métodos

Aislamiento de cepas fúngicas

Muestras de corteza de árboles (aprox.10 g) con podredumbre blanca [3,8], acíbar de *Aloe vera* (aprox. 5 g) con crecimiento fúngico [9,10], agua contaminada con petróleo crudo (10 mL) [11], ambientes cerradosfueron suspendidas en 100 mL de medio líquido Czapek (Cz) [13]. Luego de 24 h de incubación, a partir de estas soluciones se aislaron cepas fúngicas con la capacidad para crecer en medio Cz[14] complementado con una emulsión de diésel comercial 5% (CzD) como única fuente de carbono y energía [15]. Las colonias se incubaron a 32ºC durante 7 días. Los cultivos de hongos puros se obtuvieron mediante posteriores transferencias a placas de agar fresco.

La identificación de las especies fúngicas se realizó mediante estudios macro y microscópicos de características morfológicas (hifas, conidios, células conidiogenas y conidióforos), la información fue compilada y comparada con claves taxonómicas descritas en bibliografía especializada [16, 17, 18,19, 20].

Habilidad de las cepas fúngicas para crecer en HPA

Las cepas fúngicas con capacidad para crecer en CzD se seleccionaron por su habilidad para crecer en medio Cz complementado con antraceno, fluoranteno o pireno 0,5 mg/mL como única fuente de carbono y energía [20]. Se utilizó un control positivo de medio Cz sacarosa y negativo de Cz sin ninguna fuente de carbono. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 32 ºC. Para evaluar el crecimiento de las cepas se estableció una escala basada en el tamaño de la colonia: (++) Buen crecimiento; (+) Moderado crecimiento; (-/+) Escaso crecimiento; (-) No se observó crecimiento.

Preparación del inóculo

Los inóculos fueron preparados a partir de cultivos puros colocados en recipientes inclinados con medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) estos se incubaron a 32 ºC. Luego de 7 días el cultivo fue lavado con 10 mL de agua desionizada estéril con lo cual se obtuvo una suspensión de esporas, eliminando los fragmentos de micelio de la suspensión por filtración con lana de vidrio estéril [21]. La concentración de esporas en el inóculo se estimó con una cámara de Neubauer.

Ensayo de degradación de HPA en cultivos líquidos

Las cepas seleccionadas se sometieron a ensayos de degradación en Erlenmeyers de 125 mL que contenían 20 mL de medio Cz líquido, complementado con antraceno, fluoranteno o pireno (CzH) (como única fuente de carbono) disueltos en acetona hasta una concentración de 0,5 mg/mL. Evaporado totalmente el solvente, los medios se esterilizaron a 121ºC y 15 psia por 20 min. Los recipientes se inocularon con una suspensión de esporas de cada una de las cepas hasta una concentración de 10^5 esporas/mL [21]. Adicionalmente se inoculó Cz líquido complementado con 0,5 mg/mL de sacarosa (Control [+]), medio Cz sin fuente de carbono (Control [-]) y medio CzH sin inóculo (Controles [0]), con la finalidad de establecer comparaciones. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Los cultivos fueron incubados a 32℃ y 130 rpm en un agitador de mesa (*Innova* 2100). Se tomaron cultivos transcurridos 5, 10, 15 y 20 días de incubación, se determinó el peso seco de la masa fúngica y cantidad de antraceno, fluoranteno, pireno o sacarosa residual en los medios.

Tratamiento de la muestra de suelo

La muestra de suelo utilizada para los microcosmos (aprox. 2 Kg) fue colectada de una parcela de cultivo de la Unidad de Apoyo Académico Ing. José Landaeta (UNEFM) localizada en Coro, Venezuela. El suelo presento pH 6.5, Nitrógeno total 2,8 g/Kg, Potasio 2,3 g/Kg, Fósforo 0,8 g/Kg, CE 0,52 dS/m. El suelo fue secado al aire y tamizado a 2 mm, luego almacenado en la oscuridad a 4 ºC hasta su uso [22].

Ensayo de degradación en un microcosmos contaminado con HPA

Los microcosmos se instalaron en Erlenmeyer (2 L) que contenían 250 g de suelo contaminado con antraceno, fluoranteno y pireno (MH), los cuales se agregaron disueltos en acetona, evaporado el solvente en su totalidad. El sistema fue agitado durante 1 h [23]. La concentración final de los hidrocarburos en el suelo fue 500 mg/kg de suelo. Cada MH fue inoculado con una suspensión de 10^5 esporas/g de suelo, disponiendo de MH control no inoculados (MC). El contenido de humedad en los microcosmos se mantuvo alrededor de 70% de la capacidad de retención de agua del suelo, con agua destilada estéril [21]. Los Erlenmeyers fueron tapados con algodón y fibra de lana estéril la cual se sustituyó cada 20 días y colocados a temperatura ambiente (aprox. 32ºC), realizando un duplicado para cada recipiente. Se tomó un MH y MC cada 15, 30, 45 y 60 días para determinar la cantidad de antraceno, fluoranteno y pireno residual en las muestras se suelo.

Procedimiento analítico

La extracción de los HPA de los cultivos líquidos se realizó con diclorometano (DCM), los extractos se hicieron pasar por cámara de sulfato de sodio anhídrido y aforados a 10 mL. Los HPA de las muestras de suelo fueron extraídos con DCM por 16 h usando un dispositivo Soxhlet [21]. La cuantificación de los HPA se realizó en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies modelo

6890N, Netwook GC) acoplado a un detector de ionización de llama.Usando una columnacapilar 19091-j913, HP-5% Fenil-Metil Siloxano (30.0 m x 320 µm x 0.25 µm, AgilentTechnologies). Se programó una temperatura inicial de 150℃ por 30 seg y un incremento lineal de 20℃/min hasta 230 ℃. La temperatura del detector e inyector se mantuvo en 280℃, el volumen de inyección fue de 1 µL. La cuantificación de los HPA en cultivos líquidos se realizó por medio de la relación del área del analito respecto al área del estándar interno con una curva de calibrado, usando fluoranteno o pireno como estándar interno. La cuantificación de HPA en las muestras de suelo se realizó estimando las áreas de los picos obtenidos y calculando la concentración del analito utilizando relación lineal con una curva patrón.

La biomasa fúngica producida se obtuvo filtrando al vacío el contenido de los cultivos con papel Whatman Nº1. El filtrado se lavó dos veces con 10 mL de acetona y agua destilada estéril y el material fue secado en estufa a 60 ºC hasta peso constante. El peso se determinó en una balanza analítica (Ohaus Adventur). La cantidad de sacarosa residual en los cultivos se determinó mediante método espectrofotométrico [24] a 490 nm utilizando un espectrofotómetro (Genesys, UV/VIS).

Análisis estadístico

La significancia de los resultados se comprobó por análisis de varianza, ANOVA y sistemas de comparación múltiples utilizando el test de Duncan, para resultados con 95% de confianza, empleando el software Infostat.

RESULTADOS

Capacidad de las cepas fúngicas para crecer en HPA

Se estudió la habilidad de hongos de diferentes fuentes para crecer en medios de cultivo complementados con diesel obteniéndose 10 diferentes aislados (resultados similares han sido reportados por Bento *et al.*[15] y Hettige *et al.*[25]) los cuales fueron purificados e identificados, seguidamente las cepas fúngicas se ensayaron por su capacidad para crecer en medios de cultivo con antraceno, fluoranteno o pireno como única fuente de carbono. Las cepas aisladas (Tabla 1) pertenecen principalmente al género *Aspergillus*, el cual ha sido ampliamente descrito por su capacidad para metabolizar HPA [26,27,28]. El resto de las cepas aisladas pertenecen a los géneros *Acremonium, Fusarium, Paecillomyces, Penicilium* y *Trichoderma*, todos reportados por su capacidad hidrocarbonoclástica [20,28,29]. Estas cepas fueron almacenadas en el cepario de hongos y levaduras del LIADSA-UNEFM. Los ensayos de crecimiento de las cepas en cultivos con HPA muestran que los hongos aislados de ambientes contaminados con petróleo crecieron en todos los HPA de prueba, característica que ha sido descrita por Okerentugba *et al.* [11] y Naranjo *et al.* [20]. Las cepas aisladas de podredumbre blanca de árbol crecieron en medios con antraceno y pireno (resultados similares obtenidos por Van Hamme *et al.*[3,31]; Acevedo *et al.*[30]; Gianfreda

et al.[32]), aunque solo la cepa U2010-26C fue capaz de utilizar fluoranteno como sustrato. Los hongos aislados de los espacios cerrados del Laboratorio de Análisis Químico (LAQ) no evidenciaron crecimiento aparente sobre los HPA durante este ensayo. La cepa U2010-1A aislada a partir de una muestra de acíbar de *A. vera* mostró crecimiento en todos los medio con HPA, siendo este el primer informe de crecimiento de un hongo aislado de esta fuente sobre HPA. Estos resultados permitieron seleccionar las cepas U2010-27A, U2010-1A y U2010-26C para próximos ensayos en cultivos líquidos.

Tabla 1.

Crecimiento de las cepas fúngicas en los sustratos de prueba

				Medio Czapek Dox complementado con				
Cepa	Género	Especie	Fuente	Sacarosa	Control (-)	Antraceno	Fluoranteno	Pireno
U 2010-2C	*Aspergillus*	*niger*	Agua [a]	++	-	+	+	+
U 2011-2A	*Penicilium*	*sp*	Ambiente [b]	++	-	-	-	-/+
U 2010-27A	*Aspergillus*	*versicolor*	Agua [a]	++	-	++	++	++
U 2010-26C	*Aspergillus*	*oryzae*	Madera [c]	++	-/+	++	+	+
U 2011-5A	*Acremoniun*	*sp*	Madera[c]	++	-	+	-	-/+
U 2010-2E	*Trichoderma*	*sp*	Agua [a]	+	-	+	+	+
U 2010-1A	*Aspergillus*	*nidulans*	Acibar [d]	++	-	++	+	++
U 2011-1A	*Fusarium*	*solana*	Ambiente [b]	+	-	-	-	-
U 2010-1B	*Paecillomyces*	*variotti*	Agua [a]	++	-	+	+	+
U 2011-3A	*Aspergillus*	*flavus*	Madera[c]	++	-	+	-	+

Aislamiento a partir: [a] Aguas de servicio petrolero, Refinería Amuay; [b] Ambientes cerrados, LAQ-UNEFM; [c] Podredumbre blanca de árboles;[d]Acíbar de *A. vera*.(++) Buen crecimiento; (+) Moderado crecimiento; (-/+) Escaso crecimiento; (-) No se observó crecimiento.

Degradación de HPA en cultivos líquidos

Se determinó la habilidad para degradar antraceno, fluoranteno o pireno en cultivos líquidos de 20 días de incubación de tres cepas seleccionadas del ensayo de crecimiento en HPA. La figura 1 muestra el patrón cinético de consumo de HPA y la biomasa fúngica producida durante el ensayo. Las cepas cumplieron con una fase adaptativa, en la cual el hongo ajusta su aparato enzimático para metabolizar el sustrato, observándose degradación a partir de los días 5 a 10 del ensayo, evidenciado por la disminución de la cantidad del HPA residual y el aumento de la biomasa producida por el hongo. Luego de la fase de adaptación cada una de las cepas ensayadas mostró un comportamiento específico de metabolización de los HPA y crecimiento, aunque ninguna de ellas logró agotar completamente el sustrato. Las cepas U2010-26C y U2010-1A reportaron porcentajes de degradación entre 5 y 15 % hasta el día 20 del ensayo (figuras 1A y 1C), demostrando que la cepa aislada del acíbar de *A. vera* es capaz biodegradar antraceno, fluoranteno y pireno a las concentraciones de estos ensayos. Este resultado evidencia que la capacidad para metabolizar algunos HPA no es exclusiva de hongos aislados de ambientes contaminados con hidrocarburos o podredumbre blanca de árboles. Aunque son muchos los informes publicados de bioconversión de HPA por hongos del genero *Aspergillus* [26,27,28], esta es la primera evidencia de degradación de HPA por un hongo aislado de *A. vera.* Antraceno fue el HPA degradado en mayor cantidad, seguido de fluoranteno y pireno, esto debido a que durante la degradación microbiana de compuestos aromáticos los HPA de menor peso molecular se degradan con mayor rapidez [33]. U2010-27A fue el hongo que reportó las mayores porcentajes de consumo de HPA, entre 15 y 20 %, en contradicción con lo esperado esta cepa presentó un mayor consumo de pireno 19,9% seguido de fluoranteno 15,5% y antraceno 11,5%. Estos resultados, aunque contrastan con lo expuesto anteriormente, han sido también reportados por Viñas *et al.*[34]. Esta característica de la cepa para degradar preferiblemente pireno -un HPA de mayor número de anillos aromáticos y peso molecular que fluoranteno o antraceno- probablemente se deba a una marcada selectividad en el complejo enzimático de este hongo. Característica que lo hace recomendable para procesos de biorremediación en suelos contaminados con HPA de alto peso molecular (4 o más anillos aromáticos).

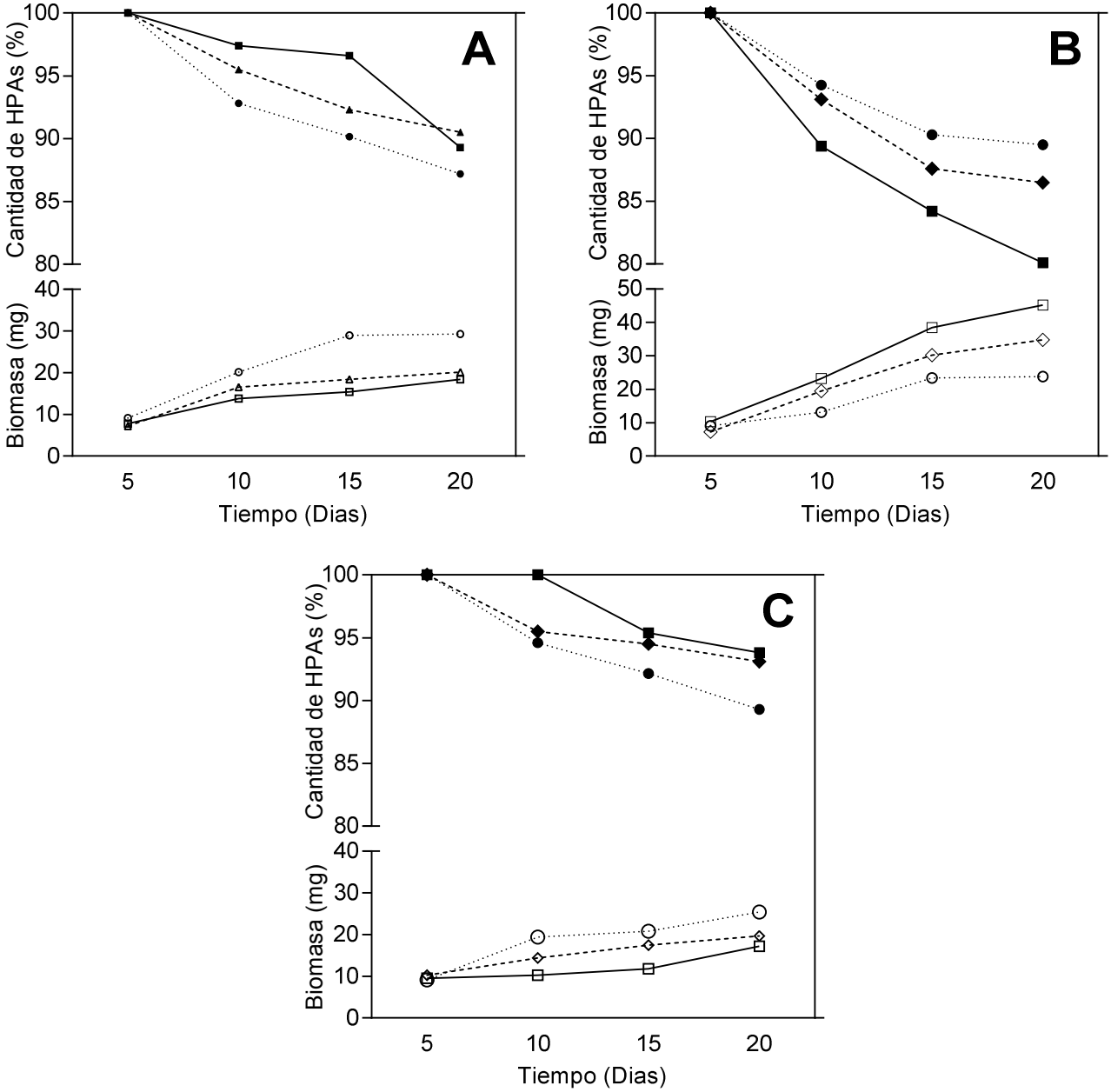


Fig.1 Cinética de degradación y biomasa de las cepas en cultivos líquidos complementados con HPAs. (A) U2010-26C, *A. oryzae*; (B) U2010-27A, *A. versicolor;* (C) U2010-1A, *A. nidulans.* Símbolos. Degradación de: antraceno (●), fluoranteno (◆) pireno (■); Biomasa fúngica en presencia de: antraceno (○), fluoranteno (◇), pireno (□).

Degradación de HPA en un suelo contaminado

La capacidad para biorremediar un suelo contaminado con HPA se evaluó utilizando la cepa U2010-27A, la cual mostró la mejor asimilación de HPA en cultivos líquidos. Los resultados de agotamiento de antraceno, fluoranteno y pireno en 60 días de ensayo (figura 2) muestran un comportamiento similar al presentado por el hongo en cultivos líquidos (figura 1B), con porcentajes de degradación entre 5 y 10% para antraceno y fluoranteno respectivamente. La pendiente de las curvas indica que la degradación de estos dos HPA se realizó en mayor

medida durante los primeros 15 días de ensayo, luego de este periodo la degradación disminuyó con una cinética constante hasta el final del ensayo. Pireno fue el HPA que desapareció en mayor cantidad, agotándose 23,6% al día 60 del ensayo, presentando mayor degradación de este compuesto entre los días 15 y 30 La asimilación sostenida de los HPA sugiere que la cepa U2010-27A mantuvo la producción de esporas durante el ensayo, lo que demuestra que este hongo es capaz de colonizar ambientes distintos al autóctono, ofreciendo versatilidad de hábitat para futuros procesos de biorremediación. Aunque no se analizaron intermediarios metabólicos durante este ensayo [33,35], las concentraciones en los MC (en los cuales no se detectó cambios significativos en las concentraciones de los HPA) confirman la biodegradación de los HPA por la cepa.

DISCUSIÓN

Se estableció un ensayo preliminar de crecimiento de cepas en diesel comercial previo a los ensayos de crecimiento en HPA, se seleccionó diesel comercial como sustrato selectivo ya que se han reportado informes de crecimiento de hongos en este combustible con potencial para degradar otros hidrocarburos [15]. De acuerdo con Pino *et al.*[36], el diesel es una mezcla compleja de hidrocarburos que contiene principalmente alcanos, alquenos e hidrocarburos aromáticos, por lo que este ensayo permitió el aislamiento de 10 cepas con la habilidad para crecer en diesel y posiblemente usarlo como fuente de carbono.

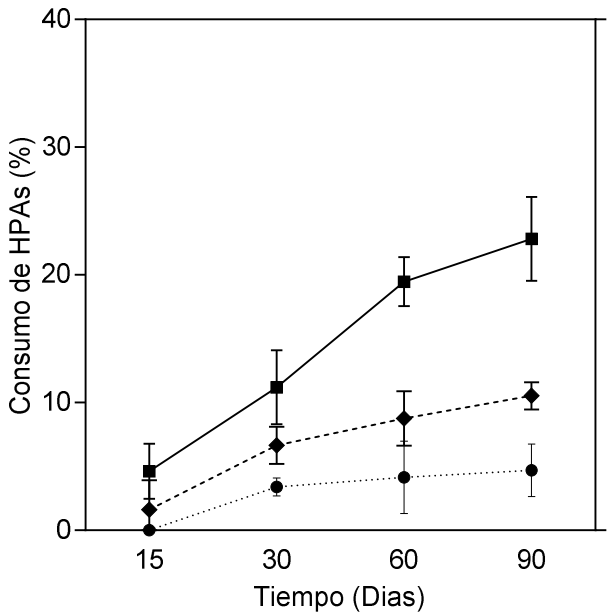


Fig. 2 Degradación de HPAs en un suelo contaminado utilizando la cepa U2010-27A, *A. versicolor.* Símbolos. Degradación de: antraceno (●), fluoranteno (◆) pireno (■).

Las mismas fueron clasificadas e identificadas, obteniéndose 6 géneros diferentes, todos reportados por su capacidad para biodegradar HPA y otros hidrocarburos [29]. Los

resultados de crecimiento de estos hongos en los HPA muestran que las cepas aisladas de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca y acíbar de *A. vera* poseen el potencial para crecer en medios de cultivo complementados con antraceno, fluoranteno y pireno, característica que para las dos primeras fuentes ha sido reportada por Van Hamme *et al.*[3,31]; Naranjo *et al.*[20], Acevedo *et al.*[30]. Sin embargo no se encontraron informes de hongos aislados de acíbar de *A. vera* con capacidad para crecer en HPA, constituyendo este el primer reporte de un hongo aislado de esta fuente con habilidad para crecer en antraceno, fluoranteno y pireno.

Los experimentos anteriores permitieron la selección de tres cepas con la habilidad de crecer y degradar cada uno de los HPA. El ascenso en la cantidad de biomasa proporcional al agotamiento de los hidrocarburos indica que efectivamente los hongos seleccionados son capaces de utilizar los HPA como fuente de carbono y energía, aunque durante las determinaciones cromatograficas no se detectaron picos con áreas relevantes que permitieran afirmar la presencia de compuestos intermedios de la degradación de alguno de los HPA. La cepa U2010-26C *A. oryzae,* un hongo aislado a partir de podredumbre blanca de árbol, mostró porcentajes de degradación entre 5 y 15%. La capacidad de estos hongos lignolíticos para degradar HPA ha sido descrita recientemente por Dashtban *et al.*[37]; Acevedo *et al.*[30]; Lladó *et al.* [38]. De acuerdo con Asgher *et al.* [39] y Rubilar *et al.*[40], los hongos aislados de esta fuente son los principalmente utilizados debido a la producción de enzimas oxidativas de importancia en procesos de biorremediación. Aunque esta investigación no abarcó la determinación de enzimas extracelulares asociadas a la degradación de HPA, se sabe que la degradación por hongos lignolítico se produce en dos pasos, primeramente por la acción del sistema hidrolítico que produce hidrolasas responsable de la transformación de macromoléculas y posteriormente por el sistema oxidativo lignolítico, responsable de la degradación de varios contaminantes, entre ellos los HPA [41]. La ventaja de este mecanismo radica en la estructura irregular de la molécula de lignina, que hace que los hongos adaptados a su asimilación produzcan enzimas con muy baja especificidad de sustrato que los hace adecuados para la degradación de diferentes compuestos [42]. Los porcentajes de degradación para U2010-27A *A. versicolor*, muestran que este hongo presentó el mayor crecimiento y degradación de HPA (15-20%) de las cepas evaluadas. Hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo han sido también reportados por Okerentungba *et al.*[11], el cual aisló e identifico cepas de *Aspergillus sp* de aguas contaminadas con petróleo de los ríos Omuihuechi y New Calabar en Nigeria. La capacidad de *A. versicolor* para degradar HPA ha sido reportada por Uzoamaka *et al.*[26], el cual describe su alta capacidad para degradar HPA. El mecanismo enzimático para la degradación de HPA para hongos aislados de ambientes contaminados con petróleo ha sido estudiado por Naranjo *et al.*[20,43] en cuyos informes se reporta evidencias de producción de enzimas lignolíticas, principalmente lacasa y lignina peroxidasas. La degradación de HPA por la cepa U2010-1A *A. nidulans* un hongo aislado de acíbar de la planta *de A. vera* estuvo entre 5 y 15%, reportes de degradación de HPA por hongos aislados de esta fuente no se encontraron, aunque se sospecha que el mecanismo que

le permitió a esta cepa metabolizar HPA, podría ser similar al de los hongos lignolítico ya que los componentes principales del acíbar son aloína y emodina, dos antraquinonas complejas que poseen varios anillos aromáticos en su estructura [44].

El ensayo de biorremediación con la cepa U2010-27A*A versicolor*, mostró que esta cepa es capaz de disminuir los niveles HPA en un suelo contaminado con 60 días de incubación (tiempos similares de incubación en microcosmos han sido reportados por Potin *et al*. [21]. La degradación en el MH se comparó con la cantidad de HPA en el MC, se utilizó un control de suelo no estéril con la finalidad de evaluar una posible degradación de HPA por poblaciones indígenas presentes en el suelo [21]. Los resultados evidencian que estas poblaciones no mostraron habilidad para metabolizar ninguno de los HPA, ya que no se detectaron variaciones significativas en la concentración de ninguno de los hidrocarburos. Los niveles de agotamiento de HPA en MH muestran que la cepa U2010-27A, degrada entre el 5 y 25% los HPA presentes en el suelo; aunque han sido reportados niveles de degradación para *A. versicolor* de hasta 99% de una amplia variedad de HPA entre ellos antraceno, fluoranteno y pireno [26]. Los niveles de transformación y asimilación de HPA en suelos suelen ser bajos comparados con los estudios realizados en cultivos líquidos [45]. Además la degradación presentada por U2010-27A en estos ensayos es frecuente para hongos del género *Aspergillus,* el cual de acuerdo con Pernía *et al.* [29], son hongos de mínima degradación, con porcentajes que alcanzan el 22%. Comparativamente, la degradación de cada uno de los HPA en el suelo indica que la cepa mantiene su capacidad para degradar preferiblemente compuestos con mayor peso molecular. Este comportamiento es especialmente importante ya que se sabe que la persistencia de los HPA en el medio ambiente aumenta con el tamaño de la molécula, además la toxicidad de estos compuestos se incrementa con el peso molecular y carácter lipofílico [46]. La degradación ascendente y cultivos en placas con PDA tomados de MH demuestran que U2010-27A además de tener la habilidad para colonizar un medio distinto el autóctono, fue capaz sobrevivir durante todo el ensayo. Esta cualidad para de colonizar ambientes distintos a su hábitat, sobrevivir a condiciones de baja disponibilidad de nutrientes y competir con poblaciones indígenas, le confiere a la cepa U2010-27A especiales atributos para la biorremediación de suelos contaminados con HPA.

CONCLUSIÓN

Este estudio permitió el aislamiento de cepas fúngicas con potencial para degradar antraceno, fluoranteno y pireno. Sucesivos ensayos de degradación en cultivos líquidos con tres cepas seleccionadas mostraron efectiva degradación de los HPA en 20 días de incubación. De estos hongos hidrocarbonoclásticos se seleccionó la cepa U2010-27A *A. versicolor* para ensayos de biorremediación en un suelo contaminado con los HPA, logrando una disminución en los niveles de los contaminantes, especialmente los de mayor peso molecular. Estos resultados demuestran la capacidad de esta cepa para la biorremediación de suelos contaminados con HPA, por lo que el próximo paso a seguir en la investigación será la

evaluación de mayores tiempos de incubación en suelos contaminados y la determinación e identificación de las principales enzimas extracelulares producidas por el hongo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Iván Leál Granadillo (Departamento de Química, UNEFM) por facilitar los estándares utilizados en los análisis de CG.Así mismo, se agradece a los laboratorios de Química General, Análisis Químico y LIADSA de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda por su apoyo al desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

[1] **San Sebastian M, Hurtig A** (2004) Oil exploitation in the Amazon basin of Ecuador: a public health emergency. Rev. Panam. Salud Publica/Pan. Am. J. Public Health, 15(3):109-116.

[2] **Tisot B, Welte D** (1984) Petroleum formation and ocurrence, Springer-Verlag. New York. pp 699.

[3]**Van Hamme J, Singh A, Ward O** (2003a) Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol Mol Biol Rev 67:503549.

[4] **Cuadras A, Ramírez N, Rovira E, Marcé R, Borrull F** (2012) Evaluación del riesgo asociado a la exposición de hidrocarburosaromáticos policíclicos en la salud de la población residente alrededor del complejo químico de Tarragona. Rev. salud ambient, 12(1):14-25

[5] **Peltonen K, Kuljukka T** (1995) Air sampling and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. J. Chomatogra, 710: 93-108.

[6] **Riojas H, Torres L, Moncada I, Balderas J, Gortáres P** (2010) Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Revista Química Viva, 3(9):120-145.

[7] **Hammel K** (1995) Mechanisms for polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Degradatión by ligninolytic fungi. Environmental Health perspectives, 103:508-512.

[8]**Conesa A, Punt P, Van den Hondel C** (2002) Fungal peroxidases: Molecular aspects and applications. J Biotechnol, 193:143-158.

[9] **Tschaplinsk T, González M, Gebre G, Páez A** (2000) Soluble carbohydrates, and aloin concentration of *Aloe vera* plants exponed to three irradiance levels. Environmen Experimental Botany 2000; 44: 133-139. Environmen Experimental Botany, 44: 133-139.

[10] **Jiménez J** (1997) Aislamiento y caracterización de un hongo del género *Aspergillus* que contamina y consume el Acíbar de *Aloe vera.* Rev. de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 21(1):26-27.

[11] **Okerentugba P y Ezeronye O** (2003) Petroleum degrading potentials of single microbial cultures isolated from rivers and effluent in Nigeria. African Journal of Biotechnology,2(9): 288-292.

[12] **Márquez M, Navas P, López E, Yegres J** (2013)Capacidad degradadora de hongos aerógenos aislados en la campana de extracción del laboratorio de VASSA, S.A. sobre desechos del ensayo del punto de anilina para aceites minerales. Rev. de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 33(1):111-115.

[13] **Prenafeta-Boldú F, Kuhn A, Luykx M, Anke H, Van Groenestijn J, De Bont J** (2001) Isolation and characterization of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. Mycol Res, 105:477-484.

[14] **Pelaéz F, Martinez M, Martinez A** (1995) Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes evolved in lignin degradation. Mycol Res, 99:37-42.

[15]**Bento F, Gaylarde C** (2001) Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. International Biodeterioration and Biodegradation, 47: 107–112.

[16]**Abarca M** (2000) Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Rev Iberoam Micol, 17: 79-84.

[17]**Booth C** (1971) The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

[18]**Kohlmeyer J, Volkmann B** (1991) Illustrated key to the filamentous higher marine fungi. Botanica Marina, 34: 1-61.

[19]**De Hoog G** (2000) Atlas of Clinical Fungi, Second Edition,Amer Society for Microbiology, pp1126.

[20] **Naranjo L, Urbina H, De Sisto A, León V** (2007) Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. Biocatalysis and Biotransformation, 25: 1- 9.

[21] **Potin O, Rafin C, Veignie E** (2004) Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. Int. Biodet. Biodegrad, 54:45-52.

[22] **Yucheng W, Yongming L, Dexun Z, Jinzhi N, Wuxin L, Ying T, Zhengao L** (2007) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with *Monilinia sp.*: degradation and microbial community analysis. Biodegradation, 19:247-257.

[23] **Andersson B, Henrysson T** (1996) Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol, 46: 647-652.

[24] **Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F** (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances.*Anal. Chem*, *28*(3):350-356

[25] **Hettige G. y Sheridan J** (1984) Mycoflora of stored diesel fuel in New Zealand. *International biodeterioration* 20: 225-227.

[26] **Uzoamaka G, Floretta T, Florence M** (2009) Hydrocarbon Degradation Potentials of Indigenous Fungal Isolates from Petroleum Contaminated Soils. Journal of Physical and Natural Sciences, 31: 1-6.

[27] **Oudot J, Dupont J, Haloui S, Roquebert M** (1993) Biodegradation potential of hydrocarbon-degrading fungi in tropical soil. Soil Biology and Biochemistry, 25: 1167- 1173.

[28] **Chaineau C, Morel J, Dupont J, Bury E, Oudot J** (1999) Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbonassimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. Science of the Total Environment, 227: 237–247.

[29] **Pernía B, Demey J, Inojosa Y, Naranjo L** (2012) Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de crudo y sus derivados: Un meta-análisis. Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal, 3(1):1-40.

[30] **Acevedo F, Pizzul L, Castillo M, González M, Cea M, Gianfreda L, Diez M** (2010) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by free and nanoclay-immobilized manganese peroxidase from Anthracophyllum discolor. Chemosphere 80(3): 271-8.

[31] **Van Hamme J, Wong E, Dettman H, Gray M, PickardM** (2003b) Dibenzyl sulfide metabolism by white rot fungi. Appl Environ Microbiol, 69:1320-1324.

[32] **Gianfreda L, Rao M** (2004) Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A review. Enzyme Microb Technol, 35:339-354.

[33] **Cerniglia C** (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation, 3: 351-368.

[34]**Viñas M, Sabaté J, Espuny M, Solanas M** (2005) Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. Appl Environ Microbiol, 71: 7008-7018.

[35]**Vila J, Lopez Z, Sabate J, Minguillon C, Solanas A, Grifoll M** (2001) Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by Mycobacterium sp. Strain AP1: actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl Environ Microbiol, 67: 5497–5505.

[36]**Pino N, Carvajal S, Gallo A, Peñuela G** (2012) Comparación entre bioestimulación y bioaumentación para la recuperación de suelos contaminados con diesel. Rev Producción+Limpia, 7(1): 101-108.

[37]**Dashtban M, Schraft H, Syed T, Qin W** (2010) Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. Int J Biochem Mol Biol, 1(1): 36–50.

[38] **Lladó S, Grácia E, Solanas A, Viñas M** (2013) Fungal and bacterial microbial community assessment during bioremediation assays in an aged creosote-polluted soil. J. Soil Biology and Biochemistry, 67:114-123.

[39] **Asgher M, Nawaz B, Ashraf M, Legge R** (2008) Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. Biodegradation, 19:771-783.

[40] **Rubilar O, Diez M, GianfredaL** (2008) Transformation of chlorinated phenolic compounds by white rot fungi. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol, 38: 227-268.

[41] **Sánchez C** (2009) Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnol. Adv, 27: 185-194.

[42] **GianfredaL, Rao M, Scelza R, Scotti R** (2010) Role of enzymes in the remediation of polluted environments. J. soil sci. plant nutr, 10 (3): 333- 353.

[43] **Naranjo L, Pernía B, Guerra M, Demey J, De Sisto A, Inojosa Y, González M, Fusella E, Freites M, Yegres F** (2013) Potential role of oxidative exoenzymes of theextremophilic fungus *Pestalotiopsis palmarum* BM-04 in biotransformation of extra-heavy crude oil. Microbial Biotechnology, 6(6):720–730.

[44] **Palanikumar L, Panneerselvam N** (2010) Aloin: Medicinal Properties and Future perspectives. Journal of Pharmacy Research, 3(11): 2682-2685

[45] **Pointing S** (2001) Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Appl Microbiol Biotechnol, 57(1-2):20-33.

[46] **Sienra M, Préndez M, Romero R** (2002) Metodología para la extracción, fraccionamiento y cuantificación de hidrocarburos aromáticos policiclico presentes en material partículado urbano. Boletin de la Sociedad Chilena de Química. Appl Microbiol Biotechnol, 47(4):

QuímicaViva

ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista QuímicaViva

Número 3, año 12, Diciembre 2013

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar