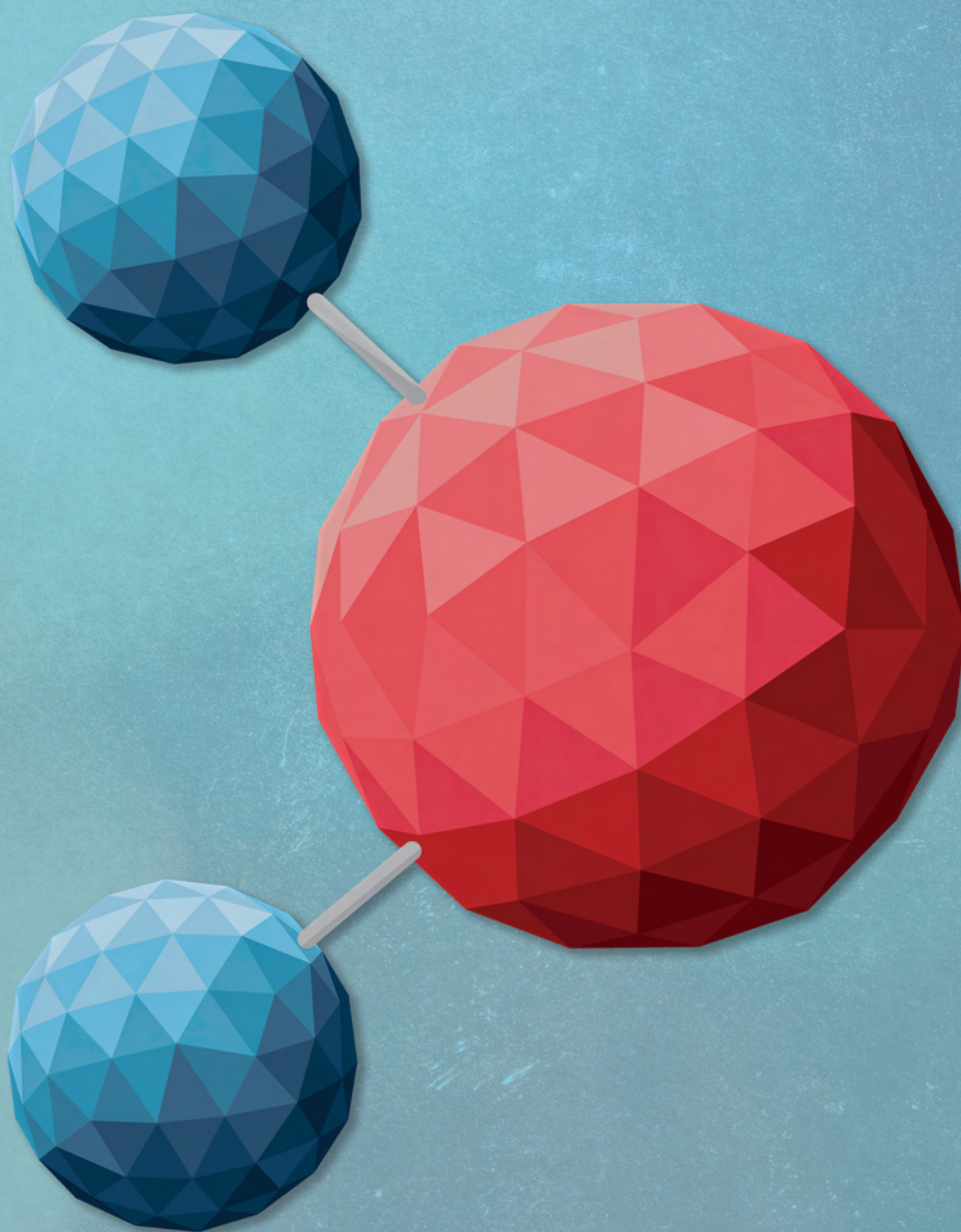


MOLEQLA

Revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide

·Número 14·



Portada

Carmen Santisteban Trigo

Logotipo y Título de la revista

Juan Manuel García Arcos, Rafael Hoyos Manchado y Rafael Iigo
Roció Escudero Ávila, Inés Maldonado Lasunción y Javier Revello Sánchez

Plantilla de la revista

Norberto Díaz Díaz

Responsables de las secciones que aparecen en este número

MoleQla Guiri: Ana Martín Calvo
MoleQla Viva: Guillermo López Lluch
MoleQla General: Patrick J. Merling
MoleQla Ambiental: Elena García Pérez
MoleQla Informática: Norberto Díaz Díaz
MoleQla Nutricional: Patrick J. Merkling
MoleQla Nanotecnología: Ana Paula Zaderenko Partida
MoleQla Verde: Paula Gómez Álvarez
MoleQla Patrimonio: María Pilar Ortiz Calderón

Responsables de maquetación de las secciones que aparecen en este número

MoleQla Guiri: Pablo Rodríguez Núñez
MoleQla Viva: David Cabrerizo Granados
MoleQla General: Alina Georgiana Ioja
MoleQla Ambiental: Juan Antonio del Castillo Polo
MoleQla Informática: Juan Humanes Ferrer
MoleQla Nutricional: María Remedios Domínguez Flórez
MoleQla Nanotecnología: Rafael Ruiz González
MoleQla Verde: Alejandro Salguero Jiménez
MoleQla Patrimonio: Clara Rodríguez Fernández
Maquetador Global: Rafael Rastrero Prieto

Información sobre todas las secciones de MoleQla en <http://www.upo.es/MoleQla>

Editores

Sofía Calero Díaz
Ana Paula Zaderenko Partida
Juan Antonio Anta Montalvo
Patrick J. Merkling



ISSN 2173-0903
Editado el 21 de Junio de 2014
Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España

MoleQla, inmersa en su proceso de continuo cambio, estrena nuevas secciones. Esto es consecuencia lógica de haber convertido la revista en revista de Ciencias en el número de primavera. Por lo tanto, una reorganización en profundidad se hacía necesaria, se han creado nuevas secciones a la vez que otras se han fusionado, mientras que todavía otras se han renombrado para reflejar más fielmente su alcance habitual. Así, MoleQla General se ha convertido en MoleQla Química, MoleQla Sanitaria en MoleQla Farmacéutica, MoleQla Viva en MoleQla Celular y MoleQla Bioinformática en MoleQla Informática. En el ámbito de las operaciones, tenemos la absorción o fusión de MoleQla Verde por MoleQla Ambiental (al menos en lo que el nombre concierne), y de MoleQla Termodinámica y Cinética por MoleQla Energía. Surgen MoleQla en la Industria, MoleQla Ciencia Ficción, MoleQla Tierra, MoleQla Médica, MoleQla Deporte y MoleQla Forense. Además, contaremos también con una sección MoleQla Instituto especialmente enfocada a recibir artículos seleccionados de alumnos de instituto. Buena suerte a estas nuevas secciones que nos depararán una lectura variada y apasionante.

Nos abandonan MoleQla de andar por casa, la sección Curiosidades, y MoleQla Guiri. Aunque esta última sección desaparece, los artículos en inglés se incorporarán directamente en la sección más afín, pudiéndose así publicar indistintamente en castellano o en inglés.

Encontraréis como siempre en nuestra página web la lista completa de secciones a las que podéis dirigir vuestros artículos. Buen verano.



El equipo editorial de MoleQla

ÍNDICE

1. MoleQla Viva

1.1 *Inmunocitoquinas*

1.2 *Estudio genético del orangután para su conservación como especie amenazada*

2. MoleQla Nutricional

2.1 *Gelatina, desmintiendo el mito*

3. MoleQla General

3.1 *Cinamaldehído: no sólo un dulce aroma*

3.2 *“Descubrimiento y destrucción humana: armas químicas, el agente nervioso Sarín”*

3.3 *Aflatoxinas, nuevos biomarcadores del cáncer hepático*

4. MoleQla Informática

4.1 *BIGO: Mejora del análisis de enriquecimiento en grupos de genes*

4.2 *Cytoscape: guía de iniciación al desarrollo*

5. MoleQla Guiri

5.1 *Cyanide poisoning*

5.2 *Monosodium Glutamate, let's have poison for lunch*

6. MoleQla Verde

6.1 *Síntesis y reciclado de materiales verdes con fluidos supercríticos*

6.2 *La química verde desde la perspectiva de los fabricantes farmacéuticos*

7. MoleQla Ambiental

7.1 HAPs, necesarios pero peligrosos

7.2 La catástrofe medioambiental del petrolero Exxon Valdez

7.3 ¿Alimentar a personas o envenenarlas?

8. MoleQla Patrimonio

8.1 La EDXRF, caracterización de pigmentos presentes en obras pictóricas desde el siglo XVI hasta el XX

8.2 Espectrometría de masas y su aplicación en la datación de algunas obras de interés histórico-artístico.

8.3 -EDXRF en el estudio de pintura. Limitaciones y técnicas de análisis complementario

9. MoleQla Nanotecnología

9.1 Liposomas para generar vectores no virales

9.2 Nanopartículas de Jano

9.3 Máquinas moleculares: entre la realidad y la ficción

10. MoleQla Cursos, Congresos y Becas

Inmunocitoquinas

Pablo Pérez Franco

Resumen—Existe interés en el uso de citoquinas como principio activo de fármacos en el tratamiento de enfermedades como el cáncer debido a su capacidad de regular el sistema inmune. No obstante, alcanzar las concentraciones adecuadas de citoquina en el tejido objetivo administrándola por vía intravenosa supondría en muchos casos tratar al paciente con cantidades intolerables por su toxicidad. Una alternativa para dirigir específicamente a las citoquinas es fusionarla a anticuerpos completos o fragmentos de los mismos. Este método ha tenido buenos resultados en ensayos preclínicos y actualmente se encuentran en desarrollo plataformas que optimicen las propiedades biológicas de estas inmunocitoquinas.

Palabras Claves— Inmunocitoquina, Fármaco, Cáncer, Anticuerpo, Proteína.

1. INTRODUCCIÓN

Las citoquinas son un grupo heterogéneo de proteínas y glicoproteínas de bajo peso molecular secretadas principalmente por células blancas de la sangre, aunque no de forma exclusiva.[1]

Su función es mediar en la respuesta del sistema inmunológico actuando como mensajeros entre los distintos componentes del mismo o como factor hematopoyético. Así pues, se emplean como señales intercelulares en la comunicación de las distintas células implicadas en la respuesta inmunológica [1,2]. Habitualmente, esta señalización mediante citoquinas es de tipo autocrino o paracrino, aunque la existencia de una señalización endocrina (atravesando el torrente sanguíneo) también se ha descrito [2].

Debido a su papel biológico, se ha propuesto el uso de citoquinas como fármacos para tratar distintas enfermedades, principalmente cáncer (p.e. melanoma) e infecciones víricas (p.e. hepatitis B y C), existiendo fármacos basados en distintas citoquinas como interferón (IFN- α , IFN- β e IFN- γ) o el factor de necrosis tumoral (TNF) [2].

No obstante, alcanzar la dosis terapéutica de citoquinas por vía parenteral puede suponer una concentración demasiado alta de las mismas circulando por el organismo (debido a cómo actúan *per se*), produciéndose efectos muy tóxicos en otros tejidos [2-4]. Por ello, a pesar de que en ensayos preclínicos se hayan seleccionado una cantidad importante de este tipo de moléculas como principio activo en fármacos, solo un pequeño porcentaje ha conseguido superar los ensayos clínicos y llegar al mercado [2, 4].

Lo mencionado anteriormente se pone de manifiesto especialmente cuando se pretende tratar cáncer (enfermedad por excelencia en la que estos fármacos son prometedores), situación en la que se requieren altas dosis de citoquinas en una localización muy concreta. Así pues, para solucionar estos inconvenientes se han propuesto métodos que pasan por dirigir de forma específica las citoquinas. Entre ellos, la inyección directa del fármaco en el tejido sobre el que debe actuar o en otro vecino. No obstante, esta opción no siempre es posible, aparte de

resultar ineficaz cuando se trata una enfermedad sistémica (p.e. micrometástasis), y posee inconvenientes frente a la aplicación en el torrente sanguíneo [2,3].

2. INMUNOCITOQUINAS

2.1. Citoquinas dirigidas por anticuerpos

Con el desarrollo de la ingeniería de anticuerpos, la producción de proteínas de fusión de tipo citoquina-inmunoglobulina se ha convertido en una opción factible para dirigir el fármaco de forma específica hasta el tumor, combinando de esta forma la acción inmunoreguladora de las citoquinas y la especificidad de las proteínas de tipo inmunoglobulina [4]. Para aplicar esta técnica, como es obvio, se requiere conocer receptores para el dominio inmunoglobulina, habitualmente antígenos presentados

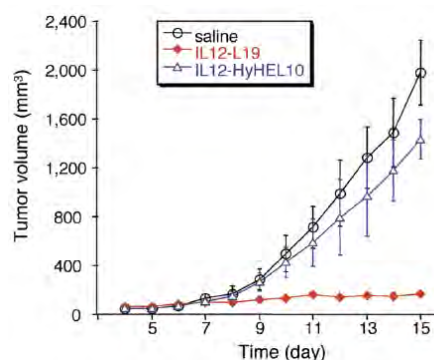


Fig. 1. Gráfica que muestra el crecimiento de un tumor (teratocarcinoma) en ratones a los que se les inyecta tres sustancias diferentes: tampón salino (*saline*), una inmunocitoquina formada a partir de un fragmento scFv contra tejido neovascular y dos dominios de interleuquina 12 (IL12-L19) y una proteína de fusión con los mismos dominios citoquina pero con un fragmento scFv para lisozima de huevo de gallina (IL12-HyHEL10) que sirvió como control negativo al tener unas propiedades farmacocinéticas similares [5].

por tejido objetivo, y seleccionar la citoquina que cause un efecto adecuado en función de la localización: inducción directa de apoptosis, incremento de la presentación de antígenos por macrófagos, etc. Este método se ha mostrado muy efectivo en modelos murinos, sin que la citoquina tenga que ser dirigida específicamente contra el tumor (Figura 1).

Actualmente, se encuentran en desarrollo plataformas para la expresión de proteínas de fusión de tipo inmunocitoquina cuyas propiedades biológicas sean las mejores con un buen rendimiento. Para ello, algo fundamental es decidir la estructura de la proteína de fusión [6].

2.2. Formato

A la hora de sintetizar una proteína de fusión de tipo inmunocitoquina, se debe tener en cuenta:

- **Dominios citoquina:** el tipo de citoquinas que van a formar la proteína de fusión (efecto biológico). Se suele emplear la proteína completa.
- **Valencia:** es el número de dominios provenientes de citoquinas en la nueva proteína de fusión capaces de interaccionar con receptores.
- **Dominios inmunoglobulina (Ig):** deben seleccionarse los anticuerpos o fragmentos que se fusionarán a los dominios citoquinas (dirigen la proteína dentro del organismo hacia el antígeno).

Considerando los tres componentes anteriores, existe una amplia variedad de combinaciones que den lugar a proteínas de fusión [2,4,7].

En primer lugar, se han de determinar los dominios de tipo citoquina. En la naturaleza, las citoquinas actúan generalmente como monómeros, dímeros (homodímeros o heterodímeros) u homotrímeros. Artificialmente, se pueden fusionar dos o más dominios en un derivado de una sola cadena (Figura 2).

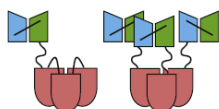


Fig. 2. Un homotrímero puede fusionarse entre sí y posteriormente con el dominio globulina (izquierda) o bien fusionar cada molécula de citoquina a un dominio globulina diferente [2].

Ahora bien, las combinaciones de dominios inmunoglobulina es el factor que permite sintetizar una gran cantidad de posibles inmunocitoquinas. Básicamente, se pueden distinguir dos tipos de inmunocitoquina en función de los dominios Ig: citoquinas fusionadas a una molécula de anticuerpo (generalmente inmunoglobulina G, IgG) completa o bien citoquinas fusionadas a fragmentos de anticuerpo [2,4,7].

Dentro de las primeras, las citoquinas suelen fusionarse a los extremos C-terminal o N-terminal (regiones constantes de la cadena pesada o variables tanto de la pesada como de la ligera). Véase la Figura 3.

Más aún, se pueden realizar construcciones complejas a partir de inmunoglobulinas completas, como es el caso de la técnica *dock-and-lock*: se fusiona al extremo C-terminal de la IgG un dominio (*homodimerizing docking domain*, DDD) de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) y a las citoquinas el dominio de anclaje de la proteína de anclaje de quinasa A (AKAP). Como resultado, se unen de forma no covalente cuatro moléculas de citoquinas en el extremo C-terminal de la cadena pesada de la inmunoglobulina [2].

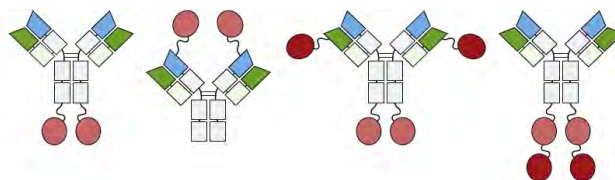


Fig. 3. Esquema de los dominios Ig (rectángulos) de un anticuerpo inmunoglobulina G unido a citoquinas (círculos) en la región constante, variable pesada, constante y variable ligera y con derivados de una sola cadena de citoquinas en la pesada, respectivamente.[2]

En cuanto a las inmunocitoquinas basadas en fragmentos de anticuerpos, la variedad es mayor si cabe. Podemos obtener este tipo de proteínas de fusión a partir de las anteriores simplemente eliminando dominios inmunoglobulina. Por ejemplo, manteniendo la región del fragmento cristalizante (Fc) o del fragmento de unión a antígeno (Fab).

Se pueden emplear también derivados de una sola cadena procedentes de la fusión de los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas (scFv-citoquina, Figura 2 y Figura 4). Estos mismos pueden encontrarse fusionados solo a los dominios citoquinas o adicionalmente a otros dominios inmunoglobulina (p.e. Fab o Fc).

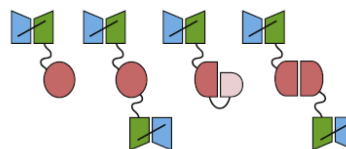


Fig. 4. Esquema de distintas inmunocitoquinas unidos a fragmentos scFv (formas azules y verdes). Nótese que en el último caso hay dos moléculas diferentes que interaccionan entre sí mediante enlaces no peptídicos en la zona de citoquinas (homodímero), mientras que en todas las demás se representa una sola cadena peptídica [2].

Por último, encontramos una variante parecida a la anterior que consisten en unir dos regiones variables ligeras y dos regiones variables constantes (*diabodies*) que a su vez se fusionan con las citoquinas [2,4,7].

Como se ha visto, existe una plétora de combinaciones posibles para sintetizar proteínas de fusión de tipo inmunocitoquina. Sin embargo, no todas son válidas a la hora de diseñar un medicamento debido a las diferentes propiedades farmacológicas que presentan [2,4,6]. Así pues, deben determinarse las características farmacodinámicas y farmacocinéticas de estas proteínas para seleccionar aquella de mejores propiedades biológicas. Lo cual, en ocasiones, puede depender directamente del tipo de enfermedad.

2.3 Farmacocinética y farmacodinámica

Una característica de las inmunocitoquinas es que deben interaccionar al menos con dos receptores diferentes: uno para dominios Ig y otro para citoquinas. Por ello, las inmunocitoquinas pueden actuar de diferente forma en función de la localización de sus receptores: se dice que la inmunocitoquina actúa *cis* cuando los receptores para el dominio Ig y citoquina se encuentran en la misma célula, se dice que actúa *trans* cuando los receptores están

en células distintas. Esto puede hacer que la citoquina actúe sobre receptores distintos, como es el caso de TNF. Esta proteína se presenta naturalmente de dos formas: transmembrana y soluble (obtenido tras el corte proteolítica de la primera). Las actividades de ambas formas son diferentes entre sí. Una proteína de fusión de tipo inmunocitoquina imitaría el del tipo transmembrana, pues el dominio Ig se encontraría unido a su receptor y la citoquina expuesta al medio extracelular [2].

El peso molecular de la proteína de fusión es otro aspecto fundamental en el desarrollo de inmunocitoquinas. Por un lado, proteínas de fusión con inmunoglobulinas completas (habitualmente IgG) admiten una mayor valencia (más dominios citoquina). La presencia del fragmento Fc en la inmunoglobulina completa implica en general mayor tiempo de vida media en circulación [4], lo cual mejora la cantidad de fármaco que llega al tejido diana [6], pero también aumenta su toxicidad al disminuir la capacidad de aclaramiento [4,6]. Además, las proteínas de alto peso molecular presentan mayores dificultades a la hora de atravesar los vasos sanguíneos para llegar al tejido blanco y penetrar en tumores sólidos, donde de la presión intersticial es alta [2,4].

Por otro lado, inmunocitoquinas basadas en fragmentos pequeños de anticuerpos como scFv poseen menor valencia, por lo que su avidéz es menor. De la misma forma, presentan tiempos de vida media en circulación menores. No obstante, también presentan una menor toxicidad y pueden atravesar mejor los tejidos [4].

Una solución que parece optimizar los parámetros farmacocinéticos es el uso de *diabodies*, pues no presentan una toxicidad alta, pueden penetrar bien en los tejidos y tienen una valencia mayor que los scFv [7].

Ahora bien, predecir las características farmacocinéticas de estas proteínas de fusión es complicado. Aparte del mecanismo de acción, otros factores limitan la llegada de las inmunocitoquinas al tejido blanco, como son valores extremos del punto isoeléctrico, glicosilaciones y la cantidad de receptores de citoquinas [4]. Así pues, la farmacocinética de las proteínas de fusión debe determinarse con ensayos con técnicas de medicina nuclear y radioinmuno-lógicas para cuantificar la distribución en el organismo previamente. En las proteínas de fusión estudiada, se han encontrado tres grandes grupos: aquellas cuya distribución hacia el tejido blanco es independiente de la dosis empleada, aquellas cuya distribución hacia el tejido blanco es dependiente de la dosis y aquellas cuya distribución hacia el tejido blanco se produce cuando el receptor del dominio citoquina no se encuentra activo [7].

3. CONCLUSIONES

Las inmunocitoquinas constituyen una solución potencialmente eficaz para los problemas derivados del uso de citoquinas libres como fármacos, especialmente en el tra-

tamiento de cáncer. Para ello, se deben determinar los efectos de las citoquinas empleadas y antígenos adecuados sobre los que actúen los dominios inmunoglobulina.

Actualmente, algunas inmunocitoquinas se encuentran en fase de ensayo clínico. Las citoquinas empleadas en estas proteínas de fusión son IL-2 (interleuquina 2), IL-12, IL-10 y TNF. Los dominios Ig empleados son IgG completa, *diabodies* y scFv derivados de IgG. En cuanto a los antígenos, se están empleando de diversos tipos: moléculas expresadas en la superficie de células tumorales (disialoganglósido GD2, proteína CD20), proteínas en el microentorno del tumor (fibronectina EDA, EDB y tenascina) y estructuras del núcleo (en zonas del tumor donde haya necrosis, ADN) [2,4].

Sin embargo, dado el vasto abanico de citoquinas y posibles proteínas de fusión, debe seguirse investigando sobre otras combinaciones para encontrar una que sea específica en cuanto a blanco y efecto biológico, y además tenga unas propiedades farmacocinéticas adecuadas.

REFERENCIAS

- [1] R.A. Goldsby, T.J. Kindt and B.A. Osborne, *Kuby Immunology*. W. H. Freeman, pp. 276-296, 2006.
- [2] R.E. Kontermann, "Antibody-cytokine fusion proteins," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 526, no. 2, pp. 194-205, Oct 2012, doi:10.1016/j.abb.2012.03.001.
- [3] M.L. Penichet and S.L. Morrison, "Antibody-cytokine fusion proteins for the therapy of cancer," *Journal of Immunological Methods*, vol. 248, no. 1-2, pp. 91-101, Feb 2001, doi:10.1016/S0022-1759(00)00345-8.
- [4] T. List and D. Neri, "Immunocytokines: a review of molecules in clinical development for cancer therapy," *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*, vol. 5, no. Suppl. 1, pp. 29-45, Aug 2013, doi:10.2147/CPAA.S49231.
- [5] C. Halin et al., "Enhancement of the antitumor activity of interleukin-12 by targeted delivery to neovasculature," *Nature Biotechnology*, vol. 20, no. 3, pp. 264-269, Mar 2002, doi: 10.1038/nbt0302-264
- [6] S.D. Gillies, "A new platform for constructing antibody-cytokine fusion proteins (immunocytokines) with improved biological properties and adaptable cytokine activity," *Protein Engineering, Design & Selection*, vol. 26, no. 10, pp. 561-569, Sep 2013, doi:10.1093/protein/gzt045
- [7] N. Pasche and D. Neri, "Immunocytokines: a novel class of potent armed antibodies," *Drug Discovery Today*, vol. 17, no. 11-12, pp. 583-590, Jun 2012, doi: 10.1016/j.drudis.2012.01.007



Pablo Pérez Franco cursaba durante el momento de la publicación cuarto curso del Grado en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

Estudio genético del orangután para su conservación como especie amenazada

M.^a Ángeles Cenizo Salvago

Resumen— Este artículo muestra la importancia que tiene conocer en profundidad los procesos genéticos que ha experimentado una especie en categoría de amenaza para llevar a cabo las medidas de gestión más adecuadas con el objetivo de lograr la conservación de su diversidad genética, evitando de este modo la extinción de la especie.

Palabras Claves— Aislamiento reproductivo, árbol filogenético, área de distribución, cautividad, conservación, cuello de botella, deriva genética, diferenciación genética, divergencia genética, diversidad genética, efecto fundador, endemismo, endogamia, especiación, especie, exogamia, filogeografía, grupo monofilético, hábitat, introducción, introgresión, población, reforzamiento, reintroducción, vicarianza.

1. INTRODUCCIÓN

Los orangutanes son primates asiáticos del género *Pongo* endémicos de Indonesia y Malasia. Actualmente están presentes exclusivamente en las selvas tropicales de Borneo y Sumatra (Imagen 1). Cada una de esas dos poblaciones fue considerada de la misma especie hasta el año 1996. Sin embargo, a partir de esa fecha comenzaron a considerarse dos especies distintas: *Pongo pygmaeus* (Orangután de Borneo) y *Pongo abelii* (Orangután de Sumatra). Además, la especie de Borneo está subdividida en tres subespecies [1].



Imagen 1. Área de distribución del Orangután

2. HÁBITAT Y CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

Los orangutanes pasan la mayor parte del tiempo en las copas de los árboles, aunque también pueden adentrarse en praderas, campos de cultivo y lagos poco profundos. La selva tropical tiene una temperatura media mensual de 20-28 °C y se caracteriza por una precipitación constante durante todo el año, con apenas variación entre estaciones.

Este simio es el más grande de los que habitan en los árboles del sudeste de Asia, ya que pueden llegar a medir hasta dos metros de altura. Son de constitución fuerte y

presentan largos brazos, mientras que sus piernas son bastante cortas y débiles. Pueden llegar a vivir hasta 45 años. Son animales diurnos, bastante solitarios y omnívoros, aunque se alimentan principalmente de frutas [2].

3. FILOGENIA, TAMAÑOS POBLACIONALES Y ESTUDIO GENÉTICO

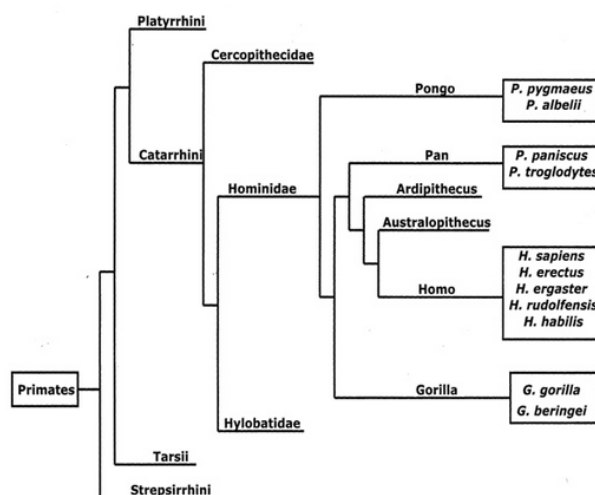


Imagen 2. Árbol filogenético [3]

Las dos especies de orangután están separadas geográficamente (Imagen 1). Debido a que las diferencias fenotípicas entre ambas son bastante claras y cada especie constituye un grupo monofilético, son consideradas especies distintas (Imagen 2) [4]. Se estima que en la naturaleza hay entorno a 50.000 orangutanes en Borneo y alrededor de 7.000 individuos en Sumatra. Además, en cautividad hay unos 350 individuos en Estados Unidos.

Debido a esta escasez de individuos, conocer la genética del orangután es de vital importancia para llevar a cabo las medidas más adecuadas para su conservación. Por

ello, científicos de la Universidad de Washington han descubierto que los orangutanes son más diversos que otros primates como los humanos o los chimpancés, pero han evolucionado mucho más lentamente. Esto es debido a que las inversiones, traslocaciones, deleciones, inserciones o duplicaciones de regiones de ADN han sido muy poco dinámicos. Además, la tasa de ganancia o pérdida de genes y la tasa de mutaciones encontradas fueron muy bajas en comparación con otros primates. Por lo que la estructura del genoma del orangután ha variado muy poco.

Por otro lado, dentro de las dos especies del género *Pongo*, se ha observado que la especie *P. abelii* es más diversa que *P. pygmaeus* [5]. Que la población de Borneo sea menos diversa puede ser debido a un cuello de botella a causa de una contracción severa de la selva tropical [6].

Los científicos han considerado una tasa de mutación de 2×10^{-18} , un tiempo generacional de 20 años y han hallado el número efectivo para poder averiguar cuánto tiempo hace que divergieron las dos especies. El resultado fue que las dos especies divergieron hace unos 400.000 años y que el número poblacional del ancestro común fue de 17.000 individuos. Además, la población de Borneo ha experimentado una reciente expansión, mientras que la población de Sumatra ha permanecido estable (Imagen 4) [5].

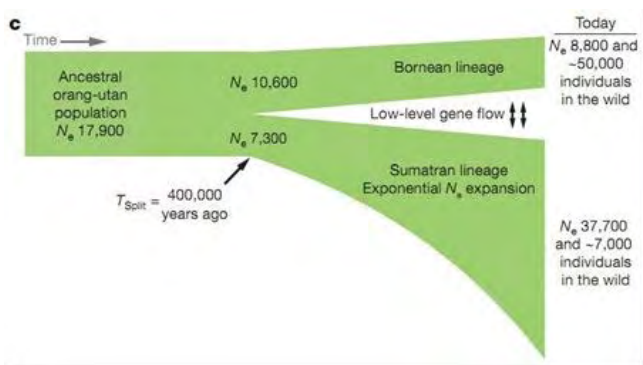


Imagen 3. Divergencia genética de las poblaciones de Borneo y Sumatra.

Existen varias hipótesis sobre la filogeografía de ambas especies de orangután. Esta divergencia genética probablemente se produjo debido al aislamiento reproductivo entre ambas especies a causa de una vicarianza, es decir, se comenzó a dar una especiación geográfica, que a lo largo del tiempo dio lugar a una gran diferenciación genética entre las poblaciones de cada una de las islas y por lo tanto surgieron dos nuevas especies.

Sin embargo, la alta diferenciación genética entre los orangutanes de Borneo y Sumatra es intrigante debido a que durante el período glacial del Pleistoceno, en el que estas islas actuaron como refugios, tuvo lugar la formación de puentes de tierra entre las islas [7].

Por lo que, es posible que los orangutanes estuvieran en una de las dos islas, y gracias a la formación de los puentes de tierra varios individuos emigraron hacia la otra isla produciéndose un efecto fundador. Y por tanto, al desaparecer los puentes de tierra, se produjo aislamiento reproductivo, divergencia genética y de esta forma en la nueva población surgió una especie distinta.

4. CATEGORÍA DE AMENAZA Y PROTECCIÓN LEGAL

Según la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) los orangutanes de Sumatra se encuentran en peligro crítico de extinción y a los de Borneo en peligro de extinción [8,9].

La principal amenaza es la destrucción de su hábitat, en concreto por la deforestación de los bosques tropicales y el desarrollo de las plantaciones de palma de aceite. Además, muchos orangutanes jóvenes son capturados por parte de los humanos para posteriormente ser vendidos como mascotas, lo que conlleva en la mayoría de los casos al asesinato de sus madres. [2]

Entre la protección legal para los orangutanes se encuentran: la Ley Internacional y las Leyes Nacionales, CITES (la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies). Además, Indonesia hizo ilegal poseer o vender orangutanes en 1930 y Malasia aprobó leyes similares en 1960 [10].

5. CONCLUSIONES Y MEDIDAS DE CONSERVACIÓN

Debido a las presiones antrópicas a las que están sometidos los orangutanes, especialmente por la destrucción de su hábitat, se deben llevar a cabo medidas para conservar la diversidad genética de las dos especies. Ya que una gran diversidad genética puede disminuir el riesgo de sufrir procesos demográficos y genéticos negativos que puedan conducirlos a la extinción, como la deriva genética. Por ello, ya se han están llevando a cabo una serie de proyectos para su conservación.

En cuanto a medidas de conservación ex situ (fuera del medio natural), existen centros de rescate y rehabilitación como son los de la Fundación para la Supervivencia del Orangután de Borneo (fundada por el Dr. Willie Smits) o centros de la Fundación Internacional del Orangután (fundada por el Dr. Birute Galdikas). Además, estos centros también promueven la conservación y recreación de la selva tropical con el objetivo de mantener el hábitat de estos animales. También existen centros de cría en cautividad cuyo objetivo es el refuerzo de las poblaciones silvestres. Además, también hay orangutanes en zoológicos, orientados a la investigación, divulgación, educación y conservación.

En cuanto a medidas de conservación in situ (en el medio natural), se pueden llevar a cabo planes de refuerzo, reintroducción e introducción. Sin embargo, se deben tomar consideraciones para maximizar el éxito y precauciones para reducir posibles riesgos de depresión por endogamia, exogamia o introgresión [11].

REFERENCIAS

[1] <http://en.wikipedia.org/wiki/Orangutan>

[2] <http://www.blueplanetbiomes.org/orangutan.htm>

[3] http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/ahrens_just/classification.htm

[4] <http://pin.primate.wisc.edu/factsheets/entry/orangutan>

[5] <http://www.biounalm.com/2011/01/se-secuencia-el-genoma-del-orangutan.html>

[6] <http://www.pnas.org/content/107/50/21376.full>

[7] <http://www.pnas.org/content/107/50/21376.full>

[8] <http://www.iucnredlist.org/details/39780/0>

[9] <http://www.iucnredlist.org/details/17975/0>

[10] <http://www.orangutanpedia.com/leyes-protoger-orangutanes/>

[11] <http://centrodeartigos.com/revista-digital-universitaria/contenido-27952.html>



M.ª Ángeles Cenizo Salvago estudiante de cuarto curso del Grado en Ciencias Ambientales en la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

Gelatina, desmintiendo el mito

Elena Díaz-de-Marco, María Giles-Mancilla y Lucía López-Bermudo

Resumen—La gelatina se encuentra dentro del grupo de alimentos que a nivel popular se piensa que se obtienen a partir de procesos químicos y, por tanto, no son naturales por lo que pueden ser dañinos para nuestro cuerpo. La gelatina comercial si entra dentro de esta descripción, es decir se obtiene a través de procesos químicos. Sin embargo, existen formas naturales de obtenerla con un valor nutritivo superior y mucho más saludables. En este artículo vamos a centrarnos en esta gelatina poco conocida.

Palabras Claves— Gelatina, colágeno, aminoácidos esenciales, desnaturalización.

1. INTRODUCCIÓN

Como paso previo a nuestro estudio procedimos a realizar una encuesta con el fin de conocer la opinión predominante en la población sobre la gelatina. Los resultados fueron los esperados, ya que aproximadamente entre el 90-95% de los entrevistados coincidían en considerar a ésta como un alimento rico en azúcares, grasas y aditivos químicos. Vamos a tratar de refutar a lo largo de todo el artículo, esta percepción negativa.

La gelatina -o grenetina, como se llama en algunos países de Sudamérica- se usaba ya en el antiguo Egipto, tal y como se ha podido observar en antiguos murales de Tebas. Actualmente México es el país que más gelatina consume. Un hecho curioso es que la mayoría de nosotros consumimos gelatina sin ser conscientes de ellos; un ejemplo es el *mouse*. Este contiene gelatina al igual que la mayoría de las tartas, helados de polo y sorbetes. Batidos o zumos sorpresivamente también poseen gelatina a modo de espesante. Por último éste alimento además se usa para hacer espuma de tomate o para espesar caldos. Sabiendo esto podemos pensar que comemos gelatina más de lo que creemos.

2. COMPOSICIÓN

La gelatina es un coloide orgánico formado por proteínas. Se trata de una sustancia incolora, insípida e inodora en su estado puro. La proteína de la que estamos hablando es el colágeno, que se extrae de los huesos, tejido conectivo, cartílagos, cueros, raeduras de pieles de animales, pescados y algas.

Estructuralmente el colágeno, al igual que el resto de proteínas se encuentra integrado por la unión de aminoácidos a través del enlace peptídico. La unión de estos monómeros, que son principalmente residuos de prolina, junto con su continua repetición hace que las cadenas se enrollen hacia la izquierda, adquiriendo la forma de una triple hélice llamada tropocolágeno.

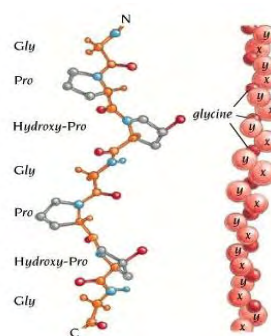


Fig. 1 Estructura molecular del colágeno [8]

Esta disposición espacial le confiere al colágeno gran flexibilidad y resistencia a fuerzas de tracción, es decir, al estiramiento. Imagínese, por ejemplo, nuestros tendones o piel. Otra propiedad de la estructura del colágeno es la cualidad de formar geles.

Vamos a acudir a un sencillo ejemplo para comprender esta última característica: el cocido. Para su elaboración necesitamos los siguientes ingredientes: en una olla con agua se añaden garbanzos, patatas, chorizo, carne, huesos de jamón y algún otro hueso. A continuación, se pone a hervir y pasados unos minutos retiramos el caldo. Dejándolo enfriar vemos como va adquiriendo una textura gelatinosa. ¿Por qué ocurre este fenómeno? Porque cuando añadimos el hueso de jamón éste contiene colágeno y al ser calentado se desnaturaliza provocando la ruptura y la pérdida de su estructura helicoidal. Al enfriarse, las fibras de colágeno se unen formando una red tridimensional que atrapa al agua formando, finalmente, la gelatina. Por eso, cuando hacemos postres con gelatina, primero calentamos y luego dejamos enfriar. Estas transformaciones se producen rápidamente y sin apenas provocar cambios en sus propiedades.



Fig. 2 Textura gelatinosa tras dejar enfriar el cocido

Industrialmente el colágeno se extrae de manera parecida al ejemplo anterior, a partir de piel de bovino y porcinos, entre otros, que se encuentren en unas condiciones aptas para el consumo humano.

De forma general, en el proceso de extracción de colágeno, primero se procedería a una limpieza para facilitar la extracción del colágeno; a continuación se trataría con agua caliente o disoluciones alcalinas para desnaturar la triple hélice y hacer así que se forme finalmente la gelatina. Por último, ésta se somete a un proceso de deshidratación y desinfección para eliminar la posible presencia de microorganismos.

La industria alimenticia ha desarrollado productos como el colágeno en polvo o en gránulos de colágeno que permiten a nuestro organismo obtener los beneficios de esta proteína. El colágeno en polvo permite que nuestro cuerpo mantenga una cantidad adecuada de masa muscular, ayudándolo a utilizar eficientemente sus reservas de grasa y azúcar. *“Además el colágeno en polvo es un excelente aliado contra los procesos de flacidez de los tejidos y combinado con la actividad física se convierte en una excelente fuente de proteínas capaces de sintetizar masa corporal magra, manteniendo así la apariencia juvenil de nuestro cuerpo”*, nos comenta Jaime Farfán, profesor en la Facultad de Ingeniería de Alimentos Unicamp. [6].

3. PROPIEDADES NUTRICIONALES

En cuanto a sus aspectos nutricionales, la gelatina común se encuentra formada por un 85% de proteínas, 2% de sales minerales y el resto de agua. De la gelatina podemos destacar principalmente características positivas como son; un bajo contenido en grasas; la presencia de 18 aminoácidos de los cuales 8 son aminoácidos esenciales, siendo el triptófano el único que faltaría. Corroborando esta última información, la doctora Ana Ordoñez, nutricionista en una clínica en Madrid, afirma que *“La gelatina aporta una proteína casi pura y de alto valor nutritivo, que contiene la inmensa mayoría de los aminoácidos esenciales que el organismo no puede sintetizar y debe recibir a través de la comida”* [7]. Por ende, la gelatina tiene un valor energético relativamente bajo con

un valor calórico teórico de 3,5 calorías/gramo.

En los últimos años el doctor Milan Adam desde la universidad de Praga, nos dice lo siguiente: *“repetir periódicamente una terapia consistente en ingerir al menos durante dos meses 10 gramos diarios de gelatina reduce y hasta elimina los dolores artrósicos”* [6]. De esta forma vemos que hay suficientes indicios sobre los efectos beneficiosos de este alimento. Dada la similitud entre la proteína de la gelatina y el colágeno presente en el organismo humano, podemos afirmar que no se le conocen efectos secundarios.

Cuando alcanzamos los 50 años de edad, el cuerpo produce sólo el 35% del colágeno necesario convirtiéndose por ello, en una de las principales causas del envejecimiento pues, la disminución del consumo esta proteína tiene efectos relevantes en nuestro cuerpo: los músculos se tornan flácidos, las articulaciones y ligamentos pierden elasticidad y la resistencia, el cartílago que rodean las articulaciones se vuelven frágiles y porosos, con aspecto de esponja. El cabello pierde fuerza, ya que se reduce el grosor del cabello. Algunos órganos pueden sufrir desplazamientos o presentar un mal funcionamiento. La piel es más delgada, se deshidrata y pierde elasticidad, dando lugar a la flacidez y la aparición de estrías

En referencia a las desventajas surgen cuando hablamos de la gelatina como producto industrial, ya que normalmente la relacionamos con la que venden en los supermercados. Profundizando en el etiquetado de una conocida marca de gelatina, en concreto Royal, descubrimos que tan solo el 11% corresponde a gelatina siendo el resto aromas, correctores de acidez, etc. como vemos en la imagen. Este es uno de los motivos por el cual se tiene una mala percepción de este producto.

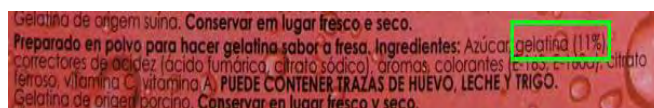


Fig. 3 Etiqueta nutricional de gelatina marca Royal

En cuanto a las aplicaciones culinarias, podemos decir que la gelatina tiene un carácter muy versátil ya que al ser insípida, incolora e inodora puede ser utilizada tanto en platos dulces como salados. Así, se emplea en la pastelería para cuajar postres, estabilizar mousses y cremas, espesar líquidos, y en algunos casos dar brillo a pasteles, tartas o frutas ya preparados, también en gominolas, etc. También es muy usada en dietas hipocalóricas; es capaz de absorber agua, y por ello se usa para la producción de alimentos “light”.

La gelatina tiene múltiples aplicaciones, es muy utilizada en la industria farmacéutica, donde actúa como excipiente de supositorios y cápsulas combinados con glicerina. La gelatina vegetal extraída de las algas- agar-agar, argina- son muy utilizadas con fines bacteriológicos como

soportes de cultivos y para la conservación de preparaciones microscópicas., donde se emplea como fijador del pelo, ya que, a diferencia de la gomina, el agua fría no la disuelve.

En cuanto a los formatos de industrialización de este productos predominan en los mercados principalmente dos. Una de las formas es en hojas de gelatina; laminas transparentes cuyo modo de empleo es la cocción en agua. Existe también la gelatina granulada, que viene en sobres, muy usada en su versión con sabores a frutas. Hay una tercera, aunque menos usada, la gelatina instantánea, soluble en agua fría sin la necesidad de calentarla.

5. CONCLUSIONES

A pesar de la mala fama de la gelatina, hemos visto que hay suficientes indicios sobre los efectos beneficiosos de este alimento, pues se trata de un elemento muy útil desde muchos puntos de vista, siempre que la consideremos en estado puro. Sus propiedades la convierten por tanto en un alimento único y necesario, tal y como afirma la Organización Mundial de la Salud. [9]

REFERENCIA

- [1] Enciclopedia Salvat
- [2] Diccionario Enciclopédico Espasa. Tomo 12. Editorial Espasa-Calpe S.A
- [3] <http://restaurantedelolmo.blogspot.com.es>
- [4] Biología 2º Bachillerato. Editorial sm
- [5] <http://www.gominolasdepetroleo.com/2011/10/escierto-que-la-gelatina-se-hace.html>
- [6] <http://es.shvoong.com/medicine-and-health/nutrition/2048417-beneficio-la-gelatina-en-el/>
- [7] <http://suite101.net/article/gelatina-de-pensamientos-un-postre-sencillo-y-romntico-a31012>
- [8] <http://www.magneticafm.com/2014/04/21/desarrollan-colageno-10-veces-mas-eficiente-para-tratamientos-articulares/>
- [9] <http://www.gentede hoy.com/site/2014/02/la-gelatina/>



Estudiantes de 1º de Nutrición Humana y Dietética en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Pablo de Olavide.

Cinamaldehído: no sólo un dulce aroma

Christian Carrizosa Balmont

Resumen—El cinamaldehído es el componente mayoritario de la canela, y es responsable de la mayor parte de sus propiedades. Además de su acción antimicrobiana, es capaz de disminuir la presión arterial mediante su interacción con los canales de calcio celulares, así como de reducir los niveles de glucosa en sangre gracias a un incremento de la sensibilidad a la insulina. No obstante, lo más sorprendente es su papel en el Alzheimer y en la viabilidad de células cancerosas.

Palabras Claves—cinamaldehído, vasorrelajante, Alzheimer, diabetes, cáncer.

1. INTRODUCCIÓN

La canela (Fig. 1) es una de las especias más comunes en la cocina de prácticamente cualquier cultura, debido a su profundo y exótico aroma. Se obtiene de la corteza de los árboles *Cinnamomum*, y su uso culinario se remonta a siglos atrás, especialmente en India [1, 2].



Fig. 1. Canela en sus formas comerciales (polvo y rama).

Sin embargo, su uso no acaba en la cocina: sus propiedades terapéuticas incluyen su uso como antioxidante, antiinflamatorio e incluso como antimicrobiano; tal ha sido su repercusión medicinal que llegó a tener reputación como remedio contra resfriados. Estas propiedades no serían posibles sin los múltiples compuestos químicos que la constituyen: ácido cinámico, cinamaldehído, cinamato, eugenol...; este artículo se centrará en el cinamaldehído, el cual es responsable de los característicos sabor y olor de la canela [1-3].

2. ESTRUCTURA QUÍMICA

De fórmula molecular C_9H_8O y masa molecular 136.2 g/mol, el cinamaldehído se encuentra presente en la naturaleza como *trans*-cinamaldehído (Fig. 2), y está compuesto por un aldehído insaturado unido a un grupo fenilo; por ello, tiene aromaticidad. Tiene color amarillo pálido, y presenta una baja solubilidad en agua, siendo muy soluble en aceites.

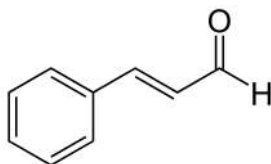


Fig. 2. Estructura química del cinamaldehído.

3. CINAMALDEHÍDO Y PRESIÓN SANGUÍNEA

Ya en el siglo pasado, en la década de los 70, Harada y Yano descubrieron que el cinamaldehído provocaba una rápida disminución de la presión arterial, que se atribuyó a un efecto vasodilatador. Sin embargo, no fueron capaces de demostrar cuál era la causa subyacente [3].

Nuevos estudios de Yanaga *et al.*, demostraron la existencia de una dependencia entre la concentración de cinamaldehído y su efecto vasorrelajante en anillos de aorta de rata (sin presencia de endotelio) pre-contraídos mediante KCl o prostaglandina $F_{2\alpha}$, y se propuso que su acción se debía al bloqueo de los canales de Ca^{2+} , lo que provocaba una inhibición directa de la contracción muscular (Fig. 3). Además, El-Bassossy *et al.* demostraron que el cinamaldehído protegía frente a la hipertensión asociada a la diabetes, apuntando a que la posible causa era el bloqueo de la elevada entrada de Ca^{2+} en células vasculares que se da en dicha patología, lo cual corroboraba la

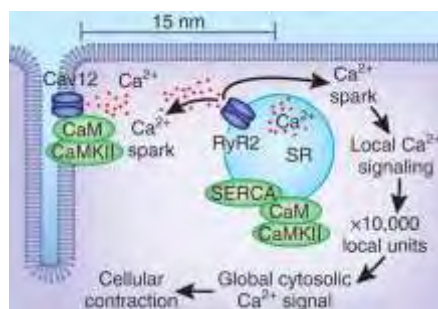


Fig. 3. El calcio y la contracción muscular.

información anterior. Finalmente, Xue *et al.* [4] volvieron a demostrar que la disminución de la presión sanguínea provocada por el cinamaldehído era independiente del endotelio, y propusieron que se debía a la inhibición de la afluencia de calcio y/o su liberación intracelular [3, 4].

Por otra parte, Alvarez-Collazo *et al.* [3] también estudiaron cómo la inhibición de los canales de calcio de tipo L por parte del cinamaldehído es, en parte, responsable del efecto vasorrelajante del mismo, como puede observarse en la siguiente gráfica (Fig. 4), en la que se muestra la relación entre la concentración de cinamaldehído frente a su efecto vasorrelajante.

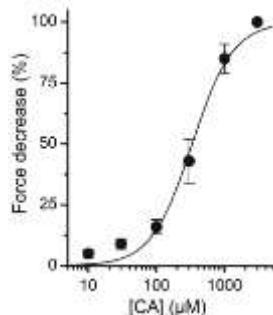


Fig. 4. Efecto vasorrelajante del cinamaldehído.

4. CINAMALDEHÍDO Y ALZHEIMER

La forma más común de demencia es el alzheimer, una enfermedad neurodegenerativa debida al depósito de agregados proteicos, denominados amiloides, y ovillos neurofibrilares formados como consecuencia de modificaciones anormales, como hiperfosforilación u oxidación, en la proteína tau, la cual es de vital importancia para el ensamblaje, función y estabilidad de los microtúbulos [5].

En el experimento llevado a cabo por Roshni C. George *et al.* [5] se demuestra que dos componentes de la canela reducen la agregación *in vivo* de proteínas tau (Fig. 5), al ser menor la absorbancia a 305 nm de las muestras incubadas con cinamaldehído (ya que el agregado de tau aporta turbidez). En concreto, los compuestos empleados fueron el cinamaldehído y la epicatequina en su forma oxidada, los cuales interaccionan con los dos residuos cisteinil de tau, reduciendo significativamente su agregación. Además, dichos componentes son capaces de proteger a la proteína tau de los daños oxidativos provocados por radicales libres y otros productos tóxicos.

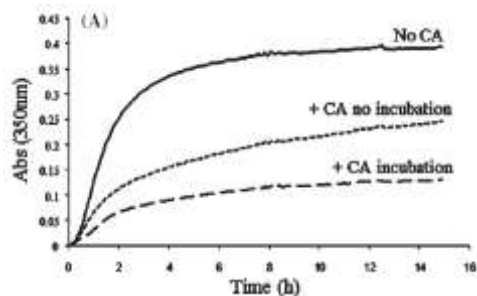


Fig. 5. Efecto del cinamaldehído en la agregación de tau.

5. CINAMALDEHÍDO Y CÁNCER

Shi-Hua Fang *et al.* [6] llevaron a cabo en 2004 una evaluación de los efectos citotóxicos e inhibitorios del cinamaldehído sobre líneas celulares cancerosas humanas y otras no cancerosas. Los resultados (Fig. 6) fueron que el cinamaldehído presentaba un potente efecto inhibidor de la viabilidad celular en los cultivos tumorales a concentraciones de solamente 1 μM; mientras que las líneas celulares normales no se veían afectadas, lo cual demuestra que la administración de dosis elevadas de cinamaldehído no debería presentar efectos secundarios aparentes.

Se propuso que la acción antitumoral del cinamal-

dehído se debía a sus efectos en la inhibición del desarrollo de células cancerosas, unido a la inducción de apoptosis en dichas células. Dado su origen natural, podría constituir un excelente tratamiento contra el cáncer, siendo capaz de actuar sobre el crecimiento y supervivencia de células tumorales de forma diferente a los actuales tratamientos hormonales y la quimioterapia, que presentan el inconveniente de la resistencia a drogas. [6]

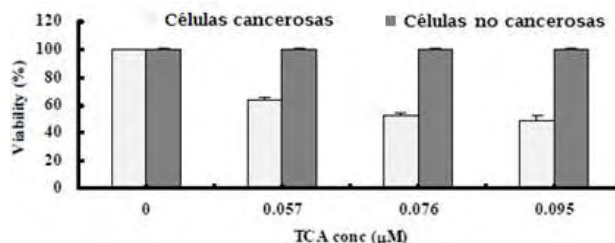


Fig. 6. Efecto del cinamaldehído en la viabilidad celular.

6. CINAMALDEHÍDO Y DIABETES

La obesidad y la diabetes son enfermedades crónicas en las que se manifiesta un incremento en el riesgo de enfermedad coronaria, infartos, hipertensión, dislipemia, fallo renal y diabetes tipo II, entre otras. Los afectados por la diabetes se caracterizan por presentar elevados niveles de glucosa en sangre, junto a una moderada hiperlipemia. Esto se debe a una insensibilidad a la insulina, lo cual provoca una disminución del transportador GLUT4, proteína encargada de la entrada de glucosa desde el torrente sanguíneo a la célula, y cuya presencia/ausencia en la membrana plasmática es regulada por la insulina. Así, los compuestos que faciliten la translocación por GLUT4, o que incrementen la sensibilidad a insulina, pueden ser beneficiosos en el tratamiento de la diabetes [7, 8].

Soliman *et al.* [7] comprobaron en su estudio que si se trataban ratas diabéticas (previamente alimentadas con una dieta rica en grasas) con extracto de canela, ésta producía efectos similares a la insulina, e incrementaba la sensibilidad hacia dicha hormona; además, la secreción de haptoglobina, proteína que aparece elevada en los casos de obesidad, experimentaba una reducción, mientras que la expresión de leptina, proteína lipolítica, incrementaba. Sus conclusiones fueron que el efecto anti-diabético del extracto de canela se debía al incremento de sensibilidad a insulina, la disminución de los niveles de glucosa en sangre y el aumento de la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo de los lípidos.

También Shaohui *et al.* demostraron que el cinamaldehído reduce los niveles de glucosa en sangre en ratas diabéticas, además de incrementar los niveles de insulina. Por su parte, Zhang *et al.* probaron el aumento del transportador GLUT4 en los tejidos grasos, hepáticos y musculares de las ratas diabéticas que eran tratadas con cinamaldehído. Nikzamir *et al.* [8] repitieron el estudio anterior, pero esta vez en mioblastos C2C12; los resultados coincidieron con los esperados, aumentando el número de transportadores de glucosa, pero además se llegó a la conclusión de que dicho incremento era debido a una mayor expresión génica (Fig. 7), más que a una reducción

en la degradación del transportador GLUT4.

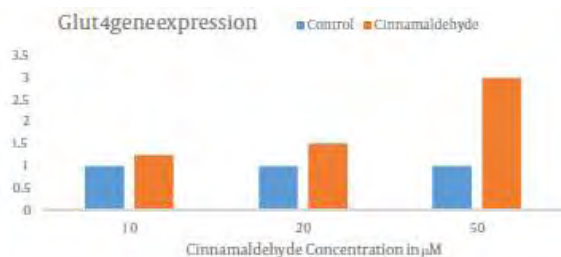


Fig. 7. Efecto del cinamaldehído en el mRNA de GLUT4.

7. ACCIÓN ANTIMICROBIANA

Desde hace mucho tiempo la canela ha sido utilizada para preservar los alimentos, debido a su acción antibacteriana. Ésta fue estudiada por Gende *et al.* [9] en 2008 sobre *Paenibacillus larvae*, bacteria responsable de una de las enfermedades más importantes en apicultura: la "loque americana", que causa la muerte de las larvas de abeja (especialmente a las larvas de abeja reina). Así, mediante una bioautografía (técnica analítica en la que los compuestos orgánicos son separados por cromatografía e identificados por su efecto en microorganismos), se demostró el efecto bactericida del cinamaldehído (Fig. 8). También se calcularon distintos parámetros del aceite esencial de canela, relacionados con su actividad bactericida: su concentración mínima inhibitoria (CMI), de unos 50 mg/L, y su concentración mínima bactericida (CMB), la cual se sitúa alrededor de unos 150 mg/L.

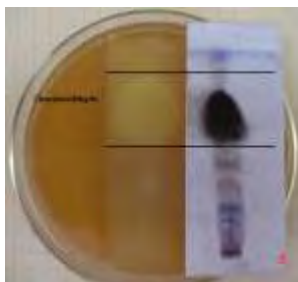


Fig. 8. Efecto bactericida del cinamaldehído.

Yang *et al.* [10] también realizaron un estudio de estas propiedades de la canela, comparando la actividad de los extractos procedentes de distintas partes de la *Cinnamomum cassia* sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. La mayor actividad, con una CMI entre 0.3-0.7 mg/L, fue encontrada en los brotes, y los compuestos responsables fueron cinamaldehído, O-metoxicinamaldehído, cumarina y eucaliptol. Las bacterias afectadas mostraban una serie de cambios morfológicos secuenciales: la adopción de una forma celular ovalada con arrugas (debido a la pérdida de material celular) precedía a la formación de agregados de células que habían perdido la integridad de su membrana (exhibiendo en ella material fibroso). Por ello se propuso que la acción del cinamaldehído y el resto de componentes activos en la canela ejercían su actividad antibacteriana mediante un mecanismo dependiente de su interacción con la membrana. Parece ser que la acción antimicrobiana se debe a

los fenoles presentes en la canela, que provocan la disrupción de la membrana celular (Al-Habib *et al.*).

8. CITOTOXICIDAD

En el estudio de Nikzamir *et al.* [8] también fue objeto de estudio la citotoxicidad del cinamaldehído. Así, las células C2C12 fueron incubadas durante una hora con diferentes concentraciones de dicho compuesto. Los resultados quedan plasmados en el siguiente gráfico (Fig. 9).

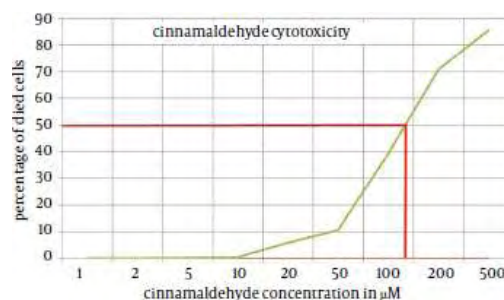


Fig. 9. Toxicidad del cinamaldehído en células C2C12.

Como puede observarse, la toxicidad del cinamaldehído es prácticamente nula a concentraciones inferiores a 10 µM; sin embargo, a partir de este punto empieza a ser tóxico, llegando a ser letal para el 10% de las células a concentraciones de 50 µM. A partir de dicha concentración, la viabilidad celular se reduce exponencialmente.

8. CONCLUSIONES

Las propiedades beneficiosas de la canela han sido empleadas desde hace muchos años, con su uso terapéutico o como conservante para evitar la proliferación de microorganismos. No obstante, aún desconocemos la mayoría de lo que su componente mayoritario, el cinamaldehído, es capaz de hacer. Su naturaleza no artificial, unida a su papel en la ralentización del Alzheimer, la reducción de los niveles de glucosa en sangre, y el ataque selectivo a células tumorales, exigen nuevas investigaciones sobre este compuesto, que podría jugar un papel esencial en el tratamiento de muchas patologías, como la obesidad, diabetes, cáncer, alzheimer...

REFERENCIAS

- [1] Priyanga Ranasinghe, Shehani Piger, GA Sirimal Premakumara, Priyadarshani Galappaththy, Godwin R Constantine and Prasad Katulanda, "Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review", *BMC Complementary & Alternative Medicine*, **2013**, 13:275, doi:10.1186/1472-6882-13-275.
- [2] Vaibhavi Jakheta, Rakesh Patel, Pankaj Khatri, Neeraj Pahuja, Sunil Garg, Anupriya Pandey, Sonu Sharma, "Cinnamon: a pharmacological review", *Journal of Advanced Scientific Research*, **2010**, 1: 2, 19-23.
- [3] Julio Alvarez-Collazo, Lucía Alonso-Carbajo, Ana I. López-Medina, Yeranddy A. Alpizar, Sendoa Tajada, Bernd Nilius, Thomas Voets, José Ramón López-López, Karel Talavera, María Teresa Pérez-García, Julio L. Alvarez, "Cinnamaldehyde inhibits L-type calcium channels in mouse ventricular cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells", *Pflügers Arch - Eur J Physiol*, **2014**, doi: 10.1007/s00424-014-1472-8.

- [4] Yong-Liang Xue, Hai-Xia Shi, Ferid Murad, Ka Bian, "Vasodilatory effects of cinnamaldehyde and its mechanism of action in the rat aorta", *Vascular Health and Risk Management*, **2011**, 7, 273-280. doi: 10.2147/VHRM.S15429.
- [5] Roshni C. George, John Lew and Donald J. Graves, "Interaction of Cinnamaldehyde and Epicatechin with Tau Implications of Beneficial Effects in Modulating Alzheimer's Disease Pathogenesis", *Journal of Alzheimer's Disease*, **2013**, 36, 21-40, doi: 10.3233/JAD-122113, ISSN 1387-2877.
- [6] Shih-Hua Fang, Yerra Koteswara Rao, and Yew-Min Tzeng, "Cytotoxic Effect of trans-Cinnamaldehyde from Cinnamomum osmophloeum Leaves on Human Cancer Cell Lines", *International Journal of Applied Science and Engineering*, **2004**, 2, 2: 136-147.
- [7] Mohamed Mohamed Soliman, Hossam Fouad Attia, Samir Ahmed El-Shazly and Osama Mesilhy Saleh, "Biomedical Effects of Cinnamon Extract on Obesity and Diabetes Relevance in Wistar Rats", *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **2012**, doi: 10.3923/ajbmb.2012.
- [8] Abdolrahim Nikzamir, Alireza Palangi, Alireza Kheirollaha, Hashemi Tabar, Alimohamad Malakaskar, Hajieh Shahbazian and Mohammad Fathi, "Expression of Glucose Transporter 4 (GLUT4) is Increased by Cinnamaldehyde in C2C12 Mouse Muscle Cells", *Iran Red Crescent Med J*, **2014** .doi: 10.5812/ircmj.13426.
- [9] Liesel Brenda Gende, Ignazio Floris, Rosalia Fritz and Martin Javier Eguaras, "Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus* larvae from Argentine", *Bulletin of Insectology*, **2008**, 61: 1, 1-4.
- [10] Cheng-Hong Yang, Cheng-San Yang, Mei-Lee Hwang, Chi-Chun Chang, Rong-Xian Li and Li-Yeh Chuang, "Antimicrobial Activity of Various Parts of *Cinnamomum Cassia* Extracted with Different Extraction Methods", *Journal of Food Biochemistry*, **2011**, doi: 10.1111/j.1745-4514.2011.00584.x.



Christian Carrizosa Balmont es estudiante de primer curso del Grado de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide, curso 13-14.

“Descubrimiento y destrucción humana: armas químicas, el agente nervioso Sarín”

María Jesús Sancho Velasco

Resumen— La impresionante evolución de las armas químicas y la multitud de usos que poseen ha llevado a muchos países a almacenar y a emplear muchas de ellas en las guerras y asedios sucedidos hasta hoy día. El descubrimiento accidental del gas sarín, y sus propiedades y efectos, lo han convertido en una de las armas más peligrosas actualmente.

Palabras Claves— Acetilcolinesterasa, agentes nerviosos, armas químicas, guerra, sarín.

1. INTRODUCCIÓN

Se definen las armas químicas como artefactos que emplean propiedades tóxicas de sustancias químicas (independientemente de su origen) para matar, incapacitar o herir. La ONU califica este tipo de armas como “destructores masivos”, y su producción y almacenamiento están excluidos por la Convención de 1993. Podemos clasificarlas en función de sus efectos: sin uso legítimo (sólo con objeto de investigación), con efecto a pequeña escala y con efecto a gran escala. Dentro de los que conllevan un efecto a pequeña escala, destacamos los agentes nerviosos, principalmente el sarín.

Cabe hacer mención al artículo publicado en el Número 4 de esta revista: “La química como arma”, por Lucía Morales Cacho, en el cual se tratan, de forma general, las armas químicas.

2. HISTORIA

Las armas químicas hacen su aparición hace miles de años, cuando los cazadores unguían las puntas de sus lanzas con veneno. Creaciones más avanzadas las encontramos en las épocas antigua y clásica, destacando la utilización de fueles para introducir el humo de las semillas de la mostaza, y otros vegetales tóxicos, en túneles donde excavaban los enemigos, o la utilización de arsénico en revueltas campesinas.

Tras un parón en el uso de estas nocivas armas, resurgieron durante el Renacimiento con los proyectiles incendiarios, llenos de azufre y antimonio. Desde entonces se fueron desarrollando y encontrando cada vez más agentes químicos para su uso en guerras y revueltas, pero fue en el siglo XX cuando se produjo el “Boom”.

La primera vez que se utilizaron agentes químicos a gran escala fue durante la Primera Guerra Mundial. Al finalizar ésta, en el periodo de entreguerras, se usaron para sofocar rebeliones y doblegar a las poblaciones.

En la Segunda Guerra Mundial algunas potencias utilizaron agentes químicos, pero la gran revolución la inició la Alemania nazi descubriendo accidentalmente los agentes nerviosos: tabún, soman, VX y, especialmente, el sarín. Se desarrollaron como pesticidas y, debido a su capacidad de afectar a todo tipo de seres vivos, se emplearon como una potente arma química gaseosa; sin embargo, Alemania no usó estos agentes temiendo que los Aliados contraatacaran (aunque sí los usaron en el exterminio judío).

Tras la Segunda Guerra Mundial se han sucedido acontecimientos protagonizados por estos agentes. Acontecimientos que siguen ocurriendo actualmente, como, por ejemplo, en el pasado año 2013, en un ataque con gas Sarín conocido como la *Masacre de Ghouta*.

3. AGENTES NERVIOSOS

Los agentes nerviosos, ésteres del ácido fosfórico con los OH sustituidos, se comportan como compuestos organofosforados, inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa. Son compuestos manufacturados, y los agentes de guerra más tóxicos conocidos, peligrosos en estado líquido y gaseoso, causan la muerte varios minutos después de la exposición.

Estos agentes se pueden clasificar en “agentes G”, vapores a temperatura ambiente, y “agentes V”, líquidos y muy persistentes. Dentro de los G destaca el sarín, tema central de este artículo.

4. EL SARÍN, EL ARMA QUÍMICA MÁS MORTAL

El Sarín o GB (Fig 1) es un compuesto organofosforado, un líquido incoloro e inodoro que se encuentra de forma natural en el ambiente, y que puede convertirse fácilmente en vapor y propagarse. Está catalogado como arma de destrucción masiva y su almacenamiento ha sido declarado ilegal.

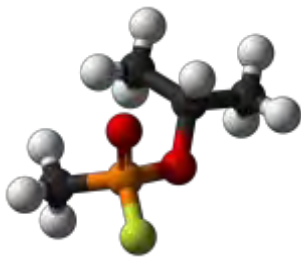


Fig. 1. Molécula 3D del sarín (cs.wikipedia.org/wiki/Sarin)

Como mencionamos anteriormente, fue descubierto como pesticida en Alemania durante la Segunda Guerra Mundial, y fue utilizado posteriormente en la Guerra Irán-Irak en 1980, así como por una secta religiosa japonesa en 1995 y, en la llamada *Masacre de Ghouta* en 2013, siendo ésta su aparición más reciente.

En cuanto a sus propiedades, encontramos que posee 1088,7 (25°C) Kg/m³ de densidad, su punto de fusión es de -56°C (217K) y su punto de ebullición de 158°C (431K). Es persistente durante días en climas fríos y horas en climas cálidos, es extremadamente tóxico y miscible en agua y disolventes orgánicos, aunque lentamente, produciendo una fuerte contaminación.

4.1. Estructura y producción

El sarín, de fórmula C₄H₁₀FO₂P y conocido por la IUPAC como metilfosfonofluoridato de O-isopropilo, es una molécula quiral, con cuatro sustituyentes unidos covalentemente a un fósforo tetraédrico (Fig.2.). La forma S_p es el enantiómero más activo, ya que se une con más fuerza a la acetilcolinesterasa.

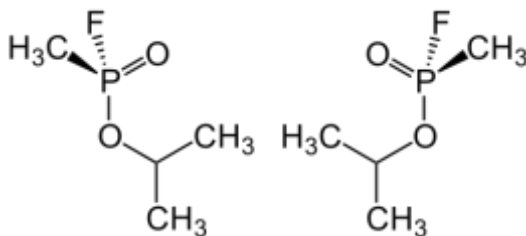
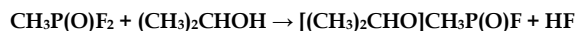


Fig.2. Enantiómero R (izquierda) y S (derecha) del sarín (<http://de.wikipedia.org/wiki/Sarin>).

El sarín se obtiene haciendo reaccionar metilfosfonil difluoruro y alcohol isopropílico:



También se agrega a la mezcla isopropolamina, con el objetivo de neutralizar el fluoruro de hidrógeno obtenido durante la alcoholisis.

4.2. Mecanismo de toxicidad

El Sarín es un compuesto altamente tóxico, que puede introducirse en el organismo por contacto con la piel, mucosas o inhalación, siendo esta última la más común.

Su mecanismo de acción es parecido al de algunos pesticidas, como el malatión. En lo referente a la actividad biológica se asemeja a medicamentos como la piridostigmina y la fisostigmina.

Ataca al sistema nervioso, inhibiendo la acción de la acetilcolinesterasa. Actúa sobre ella mediante la formación de un enlace covalente con el residuo de serina en el centro activo; con la enzima inhibida, la acetilcolina se acumula en las sinapsis y el impulso nervioso se produce continuamente ya que, al estar inhibida la acetilcolinesterasa, no se degrada la acetilcolina y no se produce la relajación muscular.

Importante es destacar que la unión del agente y la enzima es irreversible, produciendo el envejecimiento ésta si no se administra el tratamiento.

4.3. Síntomas y tratamiento

Como la mayoría de los agentes nerviosos, produce fasciculaciones, debilidad y parálisis en los músculos, convulsiones y coma asociado al Sistema Nervioso Central (SNC), náuseas, vómitos, lagrimeo, broncorrea, sudoración, conocidos estos últimos como efectos colinérgicos y, a causa de la combinación de estos síntomas, se produce una visión borrosa, dolor de cabeza, irregularidades en la presión sanguínea, ansiedad y una respiración lenta.

Una sola gota de sarín en la piel causa contracción y sudoración y, aunque no afecta a la piel, al caer sobre ésta se absorbe rápidamente por los poros y produce un efecto tóxico general.

Como datos importantes, encontramos que una concentración letal sería de 0,1 mg/L en un minuto de exposición; en concentraciones más bajas, una exposición a este gas deja secuelas, como trastornos del SNC transitorios (de 4 a 6 semanas).

La muerte suele producirse como resultado de asfixia, debido a la incapacidad de funcionar de los músculos implicados en la respiración.

En cuanto al tratamiento, en primer lugar hay que retirar la ropa por la exposición a vapor o líquido. Si ha habido un contacto cutáneo, usar hipoclorito de sodio o calcio al 0,5%, solución de jabón y una gran cantidad de agua.

En caso de hipoxia (estado en el cual el cuerpo se ve privado de oxígeno), no se debe administrar atropina, antes hay que proporcionar oxígeno. Hay que aplicarlo al menos durante tres horas, hasta la recuperación; la atropina, junto con otros antidotos aplicables a esta exposición, como pralidoxima (reactiva la acetilcolinesterasa) y el dia-

zepam (frena las convulsiones), están disponibles en autoinyectores (Fig.3.) de uso militar (2mg de atropina y 600mg de Cl de pralidoxima); en caso de gravedad se requiere asistencia respiratoria mecánica, manejo del medio interno y del coma.



Fig.3. Autoinyector de antídotos
(www.bioquimicaambiental.es/neurotoxicidad.pdf).

Cabe mencionar que la administración de atropina a personas no expuestas genera efectos adversos.

5. CONCLUSIONES

Inicialmente empleado como un potente pesticida, el sarín se ha convertido en una importante y peligrosa arma química en manos de grandes potencias como EE.UU. y Japón. Su fácil obtención y propagación, ha llevado a su almacenamiento y utilización en varias masacres. Si a ello le sumamos su difícil detección, ¿podría convertirse en un futuro en un arma esencial en las guerras si no se erradica su producción? En la Convención de 1993 ya se prohibió su almacenamiento, pero aún así no se ha conseguido detenerlo, por lo que es conveniente tomar otro tipo de medidas y, quizás, proporcionar antídotos o que se encuentren más a mano en los países que corran el riesgo de sufrir ataques por este peculiar gas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] http://www.bvsde.paho.org/cursode/e/modulos/modulo_1.8.A3a.pdf
- [2] <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tf.asp?id=524&tid=93>
- [3] <https://www.ndhan.gov/data/translation/Sarin%20Nerve%20Gas-Spanish.pdf>
- [4] http://www.escalofrio.com/n/Catastrofes/Las_Armas_Quimicas/Las_Armas_Quimicas.php
- [5] <http://www.ecologiahoy.com/gas-sarin>
- [6] <http://www.semana.com/mundo/articulo/el-gas-sarin-arma-quimica-mas-mortal/355666-3>
- [7] http://www.ecured.cu/index.php/Gas_Sar%C3%ADn
- [8] <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tfacts166.pdf>
- [9] <http://es.wikipedia.org/wiki/Sar%C3%ADn>
- [10] http://www2.uah.es/tejedor_bio/bioquimica_ambiental/t12-neurotoxicidad-pagina.pdf



María Jesús Sancho Velasco, estudiante de 1º de Biotecnología. Cursó Bachillerato en el I.E.S. Alba Plata (Fuente de Cantos, Badajoz).

Aflatoxinas, nuevos biomarcadores del cáncer hepático

Víctor Manuel Duarte Rute

Resumen- Las aflatoxinas abarcan un amplio espectro de micotoxinas producidas por dos tipos de hongos del género *aspergillus*, que crecen fundamentalmente en condiciones húmedas. Estos compuestos son uno de los causantes del carcinoma hepatocelular, un tumor que afecta en especial a personas de países cuyas condiciones climáticas guardan una estrecha relación con las condiciones óptimas de crecimiento de la especie *aspergillus*. En este artículo describiremos cuáles son las características de estas toxinas, en especial la aflatoxina B1, y qué provocan en el genoma de nuestras células.

Palabras clave- aflatoxina, hongo, cáncer, carcinoma hepatocelular, micotoxina.

1. Introducción y factor geográfico

El término aflatoxina hace referencia a una subfamilia de micotoxinas procedentes de dos especies de hongos, *aspergillus parasiticus* y *aspergillus flavus*, fuente de contaminación de numerosos cultivos y cosechas, que inducen la aparición de diversas enfermedades en humanos, primates, roedores, peces y aves. Una de las enfermedades provocadas por estas micotoxinas es el cáncer hepático, pues se ha comprobado que existen restos de metabolitos secundarios de la aflatoxina en el 50 % de los análisis llevados a cabo en pacientes de este tipo de tumor. De esta forma, podemos concluir que las aflatoxinas constituyen unos de los mayores factores de riesgo para contraer el carcinoma hepatocelular (también conocido por sus siglas en inglés, HCC), una de las principales causas de defunción en humanos.

Por otra parte, también es sabido que la relación de las aflatoxinas con el cáncer hepático cumple un factor geográfico, es decir, la incidencia de estas micotoxinas depende en gran medida de la situación geográfica del paciente. Para corroborar esto sólo debemos atenernos a los datos estadísticos: casi el 80 % de los pacientes de cáncer hepático originado por una aflatoxina se concentran en determinadas áreas del globo terráqueo. En concreto estamos hablando de países de África subsahariana, sudeste de Asia y América Latina, regiones con un PIB por debajo de la media y unas condiciones climatológicas similares.

Si analizamos detenidamente cuáles son estos factores climatológicos nos encontramos con una alta humedad relativa y unas temperaturas altas propias de climas tropicales. Por lo tanto, estos dos factores, unidos a otros relacionados con la escasez de recursos para el almacenamiento de los alimentos, serán claves para que se instalen y se reproduzcan

fácilmente las colonias de hongos que fabricarán las aflatoxinas.

Las regiones citadas anteriormente cuentan con todo lo necesario para que las colonias de hongos puedan establecerse y nutrirse de los alimentos y los cultivos; en este caso, a las condiciones de altas temperaturas y humedad se une el factor económico, ya que estos países no disponen de las herramientas óptimas para almacenar y conservar los alimentos cultivados y así evitar la acción de microorganismos. Las ínfimas condiciones en que estos alimentos son conservados facilitan la aparición de hongos cuyo metabolismo contamina los alimentos con estas nocivas micotoxinas. Además, existe una coincidencia en los alimentos más propensos a contaminarse por aflatoxinas y aquellos que están presentes en la dieta diaria de los habitantes de estas zonas, como son los cereales o el arroz.

2. Estructura y metabolismo de las aflatoxinas

Cualquier agente genotóxico tiene una capacidad innata para alterar la estructura y la secuencia genética de una o de un conjunto de células y, por lo tanto, poseen un componente mayoritario mutagénico que induce un cambio irreversible en el ADN. Las aflatoxinas son un conjunto de moléculas englobadas dentro de esta familia, que son capaces de modificar químicamente la secuencia nucleotídica de una célula, principalmente oxidando una hebra de ADN y ocasionando errores que, si los mecanismos de reparación no lo solucionan, pueden provocar un gran problema a mayor escala.

Todas las aflatoxinas son muy similares en cuanto a su estructura, diferenciándose exclusivamente en uno o dos grupos funcionales. Pertenecen a la familia de los compuestos heterocíclicos (poseen cinco anillos,

entre ellos tres son heterociclos con oxígeno) y se han descubierto actualmente más de 18 aflatoxinas distintas; sólo 6 de ellas están directamente relacionadas con procesos de contaminación de alimentos y, por consiguiente, con las distintas enfermedades inherentes a ellos en los organismos vivos. Estas 6 aflatoxinas se dividen en 3 grupos (B, G y M), de las cuales la que presenta mayor toxicidad es la aflatoxina B1, cuya estructura se muestra en la figura 1.

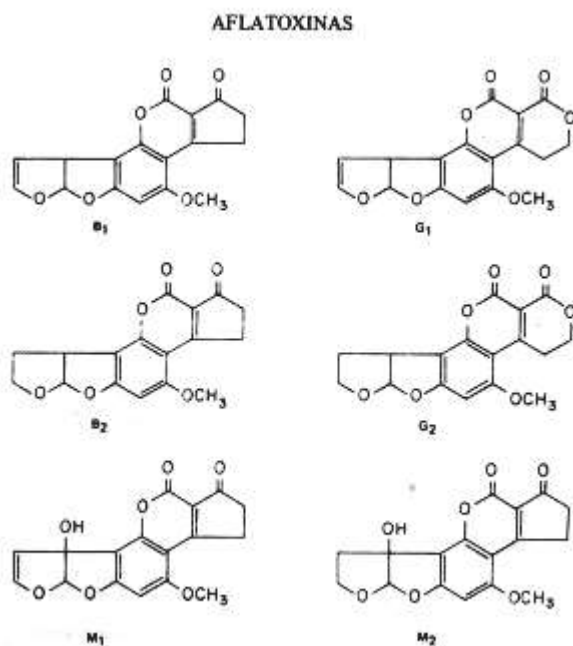


Figura 1: Estructura de algunas de las aflatoxinas más tóxicas, entre ellas la B1.

Para que un organismo se vea afectado por estos compuestos es necesario que estén expuestos a ellos durante un tiempo prolongado, cuando el organismo metaboliza las aflatoxinas y las convierte en metabolitos secundarios con un grado de toxicidad más alto que la propia aflatoxina. Es decir, el compuesto en sí es inocuo para cualquier organismo vivo, pero cuando las células lo incorporan en sus rutas metabólicas los transforman en sustancias que verdaderamente sí pueden originar tumores hepáticos. El metabolismo de todas las aflatoxinas sucede en los hepatocitos, y participan una serie de enzimas englobadas dentro de la familia de los citocromos p450 (concretamente las enzimas 3A4, 3A5, 3A7 y 1A2). Estas enzimas transforman la aflatoxina en un compuesto mayoritario (aflatoxina-8,9-epo-epóxido, o AFB0) y otro presente en cantidades más bajas (aflatoxina-8,9-endo-epóxido); el epo-epóxido es un compuesto con una alta reactividad, que puede formar derivados junto con el ADN, ya que reacciona con el gen supresor de

tumores p53 provocando su inactivación y, por consiguiente, la formación del tumor hepático. El epo-epóxido tiene la capacidad de formar aductos con el ADN que desencadenan la transversión de una guanina a una timina en el codón 249 perteneciente al exón 7 del gen p53 y, por tanto, en lugar de una arginina se sintetiza y se coloca en su lugar una serina; las estadísticas apoyan este hecho, ya que más del 50 % de los pacientes de carcinoma hepatocelular posee este tipo de mutación, que está íntimamente vinculada con la exposición prolongada a la aflatoxina B1 procedente de alimentos contaminados.

Existen, además, otras formas de metabolizar la aflatoxina B1 en los hepatocitos, como observamos en la figura 2. Según el tipo de modificación química que lleven a cabo las enzimas p450 podemos obtener como producto resultante la misma AFB1 (por una desmetilación), AFB0 (compuesto principal que origina el carcinoma) o AFM1 y AFQ1 (dos tipos distintos de aflatoxinas formadas por una hidroxilación). Y si nos centramos en la AFB0 nos encontramos con dos caminos posibles: uno de unión al ADN, que origina la mutación, y otro de unión a proteínas y aminoácidos que causa aflatoxicosis, enfermedad causada por la exposición prolongada a las aflatoxinas con mayor susceptibilidad en animales que en humanos, donde el principal problema que provocan se debe a su carácter mutagénico.

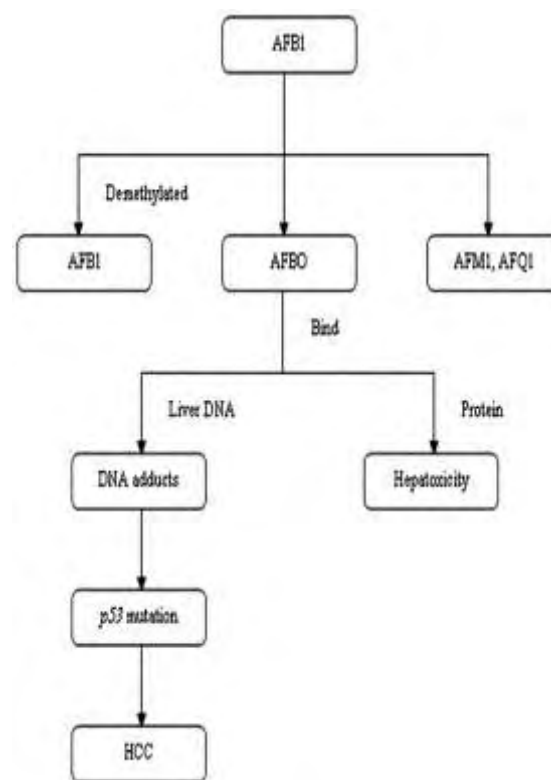


Figura 2: Distintas modificaciones químicas de la aflatoxina B1.

3. Conclusiones

En la actualidad existen una gran cantidad de enfermedades que afectan al ser humano, unas más dañinas que otras dependiendo del sistema inmunológico de cada persona, del tipo de patógeno o, en el caso de enfermedades no infecciosas, por los factores de riesgo ante los que nos encontramos diariamente; donde no hay cabida para la duda es en nuestra persistente lucha por combatir y vencer a estas enfermedades, en seguir investigando día a día por descubrir nuevos resquicios donde indagar, parcelas donde seamos más fuertes que nuestros enemigos. Son innumerables los descubrimientos actuales acerca de nuevos fármacos o productos sintéticos que ayuden al organismo a combatir estas enfermedades, en especial aquellos que sean anticancerígenos, uno de los campos más investigados hoy día.

En este artículo nos hemos centrado en uno de los factores de riesgo para un determinado cáncer, el carcinoma hepatocelular, un tema donde deberíamos centrar nuestra atención debido a la alta probabilidad de sufrir este tumor con una exposición prolongada a las aflatoxinas presentes en climas húmedos. Una vía para destruir el carcinoma hepatocelular es investigar acerca de estas micotoxinas, y sintetizar algún tipo de antimicótico que pueda inhibir la reproducción de las dos especies de hongos productoras de estos compuestos, de tal forma que disminuyan los casos de hepatocarcinomas en el mundo.

4. Referencias

[1] Abdu Selim Hamid, Isaías Goitom Tesfamariam, Yucheng Zhang y Zhen Gui Zhang; "Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention"; *Oncology Letters*; **2012**; vol. 5; pag. 1087-1092. (Texto y figura 2)

[2] Michael C. Kew; "Aflatoxins as a Cause of Hepatocellular Carcinoma"; *Journal of gastrointestinal and liver diseases*; **2013**; vol. 22; pag. 305-310.

[3] Yasunobu Matsuda, Toshifumi Wakai, Masayuki Kubota, Mami Osawa, Ayumi Sanpei, Shun Fujimaki; "Mycotoxins are conventional and novel risk biomarkers for hepatocellular carcinoma"; *World journal of gastroenterology*; **2013**; vol. 19; pag. 2587-2590.

[4] <http://www.micotoxinas.com.br/aflatoxinas.jpg> (Figura 1)

BIGO: Mejora del análisis de enriquecimiento en grupos de genes

Aurelio López Fernández

Resumen—El análisis de enriquecimiento de genes permite hacer una validación, basada en conocimiento biológico previo, de los resultados obtenidos por técnicas de agrupación de genes (Clustering y Biclustering) sobre bases de datos de expresión genética. En este artículo se presenta BIGO, una herramienta que mejora dicho análisis aportando nuevas informaciones que permiten acotar mejor el estudio y generar nuevas conclusiones.

Palabras Clave—Análisis de enriquecimiento, Validación biológica, Ontologizer, BIGO, Clustering, Biclustering.

1. INTRODUCCIÓN

La bioinformática surge por la necesidad de estudiar la cantidad masiva de información biológica que se genera en la actualidad. Esta disciplina pasa a ser una ciencia al aportar la capacidad de análisis y la creación de modelos predictivos para los sistemas biológicos [1]. Una de las aplicaciones de la bioinformática es el análisis de la expresión genética, es decir, el estudio de la cantidad de ARNm que genera un conjunto de genes a partir de un número determinado de muestras o condiciones experimentales (diferentes individuos, tejidos cancerosos/sanos...) [2].

La información correspondiente a la expresión genética se almacena en microarrays, proporcionando información de la actividad de un conjunto de genes en un momento determinado. Por tanto, los microarrays permiten la comprensión de la regulación de genes así como el desarrollo y evolución de las enfermedades, por ejemplo, el estudio de por qué algunas células aumentan de forma incontrolada en casos de cáncer [3].

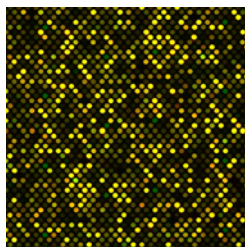


Figura 1: Sección de un microarray

En la figura 1, podemos observar un microarray

Aurelio López Fernández, Escuela Politécnica Superior, Universidad Pablo de Olavide, E-mail: aurelio.lfdez@gmail.com

en el que cada punto de color representa a un gen en particular (filas), mientras que su tonalidad hace referencia a la cantidad de ARNm expresado bajo una condición experimental concreta (columnas).

Esta información se dispone en matrices, $M = \{w_{ij} | 1 \leq i \leq n, 1 \leq j \leq m\}$, donde cada gen corresponde a una fila, $F = \{f_1, f_2, \dots, f_n\}$, y cada muestra experimental a una columna, $C = \{c_1, c_2, \dots, c_m\}$. Por lo que cada elemento de la matriz w_{ij} representa una cantidad de ARNm sobre un gen i ante una muestra experimental j .

$$M = \begin{pmatrix} w_{11} & w_{12} & \dots & w_{1m} \\ w_{21} & w_{22} & \dots & w_{2m} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ w_{n1} & w_{n2} & \dots & w_{nm} \end{pmatrix}$$

Figura 2: Matriz de expresión genética

1.1. Clustering

El Clustering es de las técnicas más utilizadas para el estudio de la expresión genética y su objetivo es la obtención de agrupaciones de genes o muestras experimentales que compartan un gran porcentaje de sus características. Así, el objetivo puede ser, obtener una agrupación de genes en función de su expresión bajo determinadas condiciones o la obtención de una agrupación de condiciones basadas en la expresión de un número de genes. Estas agrupaciones se denominan clusters.

Una de las dificultades que han tenido que superar las técnicas de Clustering aplicadas a expresión genética es la adaptación a la estructura específica que tienen este tipo de matrices, ya que existe una gran diferencia de tamaño entre las dos dimensiones

de la misma, es decir, más genes que condiciones [5].

La desventaja principal de las técnicas de Clustering es que las agrupaciones realizadas se basan en tan solo una dimensión. De tal manera, la agrupación de genes está basada en toda la dimensión de las muestras experimentales, mientras que la agrupación de muestras experimentales se basa en toda la dimensión de los genes. Se ha comprobado que en la naturaleza, un subgrupo de genes puede estar co-expresado y co-regulado bajo un conjunto de muestras experimentales pero su comportamiento podría variar bajo otro conjunto distinto [2].

Por ello, las técnicas de Biclustering se crearon con la finalidad de satisfacer este tipo de comportamiento.

1.2. Biclustering

El objetivo de las técnicas de Biclustering consiste en la identificación de subgrupos de genes y subgrupos de muestras experimentales que muestran patrones similares de comportamiento. Ello se consigue aplicando Clustering sobre dichos genes y muestras experimentales de manera simultánea, en lugar de realizarlo con una sola dimensión [2].

Al tratarse de subgrupos o submatrices, tenemos la posibilidad de que un gen o muestra experimental se encuentre en ninguno, uno o distintos biclusters. Por lo que nos proporciona una restricción mucho menor que los clusters, aumentando el número de posibles resultados y el solapamiento entre esas submatrices.

2. VALIDACIÓN BIOLÓGICA

La validación en Bioinformática puede ser agrupada en técnicas analíticas/matemáticas, que miden la calidad de los resultados en base a unas métricas que no se basan en ningún conocimiento previo, como por ejemplo en [6], y en técnicas que si se basan en ese conocimiento previo para determinar cómo de relevante es un resultado desde un punto de vista biológico, como por ejemplo en [7]. El conocimiento biológico previo es extraído de bases de datos biológicas disponibles en la web.

Gene Ontology, es una de las bases de datos más revelantes para la clasificación y asignación de funciones génicas y proteicas. Es una iniciativa centrada en unificar la representación de los genes y de sus productos de todas las especies. Gene Ontology está basado en términos, donde cada término GO dispone de un identificador único numérico (GO:xxxxxx), y un nombre asociado. Cada término GO es incluido dentro de una de las tres ontologías existentes: función molecular, componente celular o proceso biológico.

El análisis de enriquecimiento de genes es una de las técnicas de validación basadas en conocimiento biológico previo. Partiendo de una base de datos biológica, el objetivo de este análisis es la recopilación de aquellos términos biológicos que están relacionados con los genes del cluster o bicluster. Cada término biológico se pone en valor a partir de una medida estadística, el p-value, que nos indica la importancia de un término biológico con respecto a un conjunto de genes analizado, determinando si el resultado es positivo (valor próximo a 0), o se trata de un resultado más relacionado con el azar (valor más alejado a 0) [8].

Ontologizer es un software para llevar a cabo el análisis de enriquecimiento obteniendo, para cada grupo de genes analizado, los términos GO relacionados con dichos genes junto con el p-value asociado a cada término [9].

3. BIGO

El objetivo de BIGO es aprovechar la potencia de la herramienta Ontologizer y proporcionar información relevante a la validación de grupos de genes, clusters o biclusters, que dicha herramienta aporta.

BIGO procesa la validación generada por Ontologizer para obtener, por un lado, un ranking de términos biológicos, y por otro, un grafo que representa la relación entre los grupos de genes.

3.1. Ranking

El ranking se genera a partir de todos los términos biológicos encontrados en todos los grupos de genes analizados. El orden que se establece está basado en el número de veces que cada término biológico aparece entre los grupos de genes mencionados.

Nombre	Total grupos	Localizacion
positive regulation of phosphorylation	1	[13]
macromolecular complex	1	[5]
response to starvation	2	[25, 24]
regulation of gene silencing	3	[24, 4, 10]

Cuadro 1: Ejemplo de Ranking con distintos niveles.

El cuadro 1 representa un ejemplo de ranking donde cada línea corresponde a un término biológico y las columnas asociadas son las siguientes:

- Nombre: Nombre del término GO obtenido de Gen Ontology.
- Total grupos: Cantidad total de grupos de genes donde se encuentra el término en cuestión.
- Localización: Lista de los biclusters en los que aparece el término biológico.

En este ejemplo, la primera y segunda fila

corresponden a términos biológicos que aparecen en un único bicluster, en el 13 y el 5 respectivamente. Sin embargo, la última fila corresponde a un término biológico que aparece en tres biclusters, [24, 4, 10].

Los primeros términos del ranking nos permitirán centrar las conclusiones del estudio biológico sobre aquellos términos que realmente distinguen a un grupo de genes de otros. Por otro lado, los últimos términos del ranking facilitan la localización de las stop-words, es decir, funciones biológicas consideradas muy genéricas, ya que aparecen en un elevado número de genes, y que no deben ser tenidas en cuenta en el análisis final. En conclusión, este ranking ayuda a acotar de manera más precisa la validación generada por Ontologizer, permitiendo conclusiones más certeras.

3.2. Grafo

El grafo se obtiene a partir del ranking generado y representa la relación existente entre los grupos de genes en función del número de términos biológicos que comparten.

Cada nodo del grafo es un grupo de genes identificado por un número único, mientras que la arista unirá dos nodos si dichos grupos de genes comparten términos biológicos. El peso de la arista corresponde al número de términos biológicos compartidos entre sí.

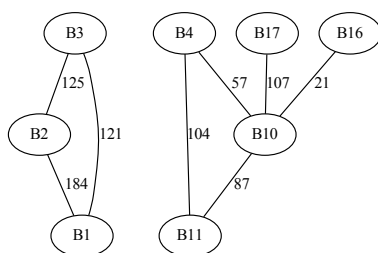


Figura 3: Representación gráfica de grupos de genes.

En el ejemplo de la figura 3 se observa que existen dos grandes grupos de genes bien diferenciados y no relacionados entre sí. Además, los biclusters incluidos en cada grupo están muy relacionados entre ellos debido a que comparten un gran número de términos biológicos entre sí.

El grafo tiene como objetivo la representación gráfica de las relaciones entre los distintos grupos de genes. Además, nos permite conocer si en nuestro resultado existen grupos de genes bien definidos e independientes entre sí. Además, aquellos grupos muy relacionados son también interesantes, en el

caso en que no compartan una elevada proporción de sus genes.

CONCLUSIONES

En este artículo se ha expuesto una nueva herramienta para aumentar la información obtenida por el análisis de enriquecimiento obtenido por Ontologizer.

BIGO se basa en la obtención de un ranking a partir de los términos biológicos detectados de todos los grupos de genes, y posteriormente, un grafo que representa la relación entre esos grupos de genes.

Futuros trabajos permitirán añadir más información útil y transformar BIGO en una herramienta web accesible a cualquier investigador.

REFERENCIAS

- [1] Norberto Diaz, "Tesis Doctoral: Similitud funcional de genes basada en conocimiento biológico".
- [2] S.C. Madeira and A.L. Oliveira, "Biclustering algorithms for biological data analysis: a survey," IEEE Transactions on computational Biology and Bioinformatics, vol. 1, no. 1, pp. 24 - 45, Jan/Mar 2004.
- [3] P. Baldi and G.W. Hatfield "DNA Microarrays and Gene Expression. From Experiments to Data Analysis and Modelling," Cambridge University Press, 2002.
- [4] G. Kerr, H.J. Ruskin, M. Crane and P. Doolan "Techniques for clustering gene expression data," Computers in Biology and Medicine, 38, pp. 289 - 293, Mar 2008.
- [5] D. Jiang, C. Tang and A. Zhang "Cluster Analysis for Gene Expression Data: A Survey," vol. 16, no. 11, pp 1370 - 1386, Nov 2004.
- [6] C. van Rijsbergen. Information Retrieval. Second Edition, Butterworths, 1979.
- [7] I. Priness, O. Maimon, and I. Ben-Gal. Evaluation of gene-expression clustering via mutual information distance measure. BMC Bioinformatics, 8:111+, March 2007.
- [8] Rempher K.J. and Urquico K. "The P value: What it really means," American Nurse Today, 2(5), pp 13 - 15. 2007.
- [9] Bauer S, Grossmann S, Vingron M and Robinson PN. "Ontologizer 2.0—a multifunctional tool for GO term enrichment analysis and data exploration." Bioinformatics (Oxford University Press), 24(14), pp. 1650 - 1651, 2008.



Aurelio López Fernández estudia 3º de Grado en Ingeniería Informática de Sistemas de Información en la Universidad Pablo de Olavide. Su interés investigador incluye el análisis inteligente de datos, la computación biomédica y biológica, el reconocimiento de patrones y las bases de datos. Desde 2013 es alumno interno en el Departamento de Lenguajes y Sistemas Informáticos. En 2011 obtuvo el Premio Extraordinario de Formación Profesional por la Junta de Andalucía.

Cytoscape: guía de iniciación al desarrollo

Juan J. Díaz–Montaña

Resumen—Cytoscape es una de las aplicaciones más usadas para la visualización y análisis de redes biológicas poseyendo una enorme comunidad tanto de usuarios como de desarrolladores. Este artículo pretende mostrar una visión general de Cytoscape y su evolución, así como presentar una introducción al desarrollo de apps. De esta forma, en el presente documento se abordará de forma ordenada qué pasos hay que seguir para el correcto desarrollo de apps, referenciando en todo momento en donde se puede ampliar la información que aquí se recoge. Note que este artículo no pretende ser un tutorial o manual de usuario ya que los susodichos pueden encontrarse en la web de Cytoscape (<http://www.cytoscape.org>).

Palabras Clave—Cytoscape, Cytoscape.js, App, Plugin.

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos diez años se han podido observar grandes avances científicos y técnicos en la industria biotecnológica que han permitido disminuir enormemente el precio de los experimentos, mejorando al mismo tiempo los resultados que estos generan de una manera notable. Esto ha producido un crecimiento exponencial de la información biológica disponible, provocando una necesidad en la generación de herramientas para analizarlas y extraer conocimiento de ella [1].

En este sentido, los modelos computacionales para representar información biológica se hacen cada vez más importantes a fin de desarrollar técnicas computacionales para la extracción de patrones y conocimiento a partir de análisis de expresión genética. Las redes genéticas surgen como una manera sencilla de representar un grupo de genes así como las relaciones existentes entre ellos. Una red genética consiste en una red en la que cada nodo representa un gen, mientras que cada asociación denota la relación existente entre ellos [2].

En este artículo se presenta una breve introducción al programa Cytoscape, una de las aplicaciones más usadas por la comunidad científica para la visualización y el estudio de redes, así como una pequeña guía de iniciación al desarrollo tanto del núcleo central como de extensiones, haciendo especial hincapié en donde encontrar toda la información necesaria para ello.

2. CYTOSCAPE

En el año 2002 el Instituto de Biología de Sistemas en Seattle creó Cytoscape como una plataforma software para la visualización y el análisis de redes[3].

La idea original de Cytoscape es crear una plataforma completamente agnóstica en términos de uso, es decir, válida para visualizar y analizar cualquier red formada por nodos y aristas (por ejemplo, redes sociales). Esta plataforma creció rápidamente y pronto pasó a ser desarrollado por un consorcio internacional de desarrolladores de código abierto y abrirse de forma que cualquier persona pueda colaborar. Simultáneamente, Cytoscape se fue especializando cada vez más en la integración, la visualización y el análisis de redes biológicas [4]. Actualmente, con unas 8000 descargas mensuales, 15000 descargas mensuales de apps, más de 450 citas según MEDLINE, más de 1800 desarrolladores en el grupo de discusión en GoogleGroups[5], más de 1400 usuarios en el grupo de ayuda en GoogleGroups[6] y aun en plena expansión, Cytoscape es una de las aplicaciones más exitosas para la visualización y el estudio de redes biológicas, siendo especialmente popular en el estudio de sistemas biológicos. Un ejemplo de la gran acogida de Cytoscape por parte de la comunidad científica es el hecho de que Bioconductor[7], posiblemente el paquete de R más utilizado para la investigación bioinformática haya desarrollado un paquete para su integración con Cytoscape [8].

Cytoscape se ha guiado desde su origen por dos principios básicos: ofrecer una funcionalidad central a la que se le puedan añadir funcionalidades adicionales en forma de extensiones y mantener separados el estilo gráfico y los datos. El núcleo central de Cytoscape permite cargar y guardar redes en gran multitud de formatos. Una vez cargadas, permite visualizar las redes de forma sencilla ofreciendo múltiples estilos así como diferentes algoritmos para distribuir los nodos en la pantalla y propiedades visuales, lo cual es especialmente importante debido al enorme tamaño que pueden llegar a tener las redes genéticas. Además, permite integrar cualquier tipo de datos en la red

mediante el uso de atributos y tablas de forma que es posible mapear un determinado nodo o arista a un determinado valor. Igualmente se incluyen herramientas básicas para el manejo de la red de entrada, incluyendo la selección de subredes, el filtrado, etc. Por último, a partir de la versión 3.0, Cytoscape también incluye diversos algoritmos de análisis de redes. En la Figura 1 se puede observar la pantalla principal de Cytoscape que incluye los distintos menús, una red y la información que contiene dicha red.

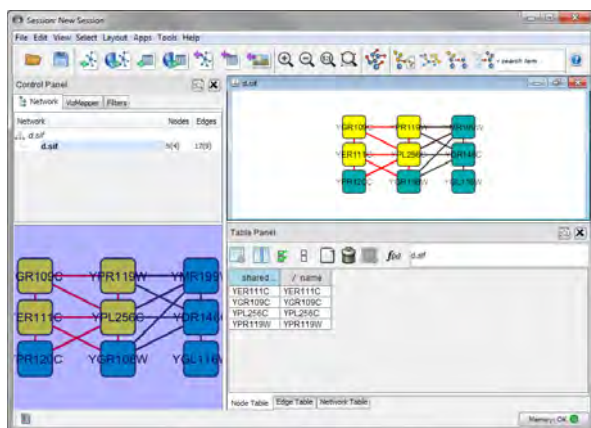


Figura 1. Cytoscape 3 UI.

2.1. Desarrollo de Cytoscape

Durante las versiones 1.X y 2.X, debido a su enorme y rápido crecimiento y a que prácticamente cualquiera podía colaborar en su desarrollo, Cytoscape fue desarrollado sin seguir ningún tipo de diseño o arquitectura en particular. Dado que cada desarrollador se guiaba por su propia manera de entender el software, el resultado fue un desarrollo muy poco depurado, con una maraña de dependencias, clases duplicadas, duplicidades dentro de las clase y una compatibilidad entre las distintas versiones bastante inconsistente. Además, los plugin eran simplemente cargados junto con Cytoscape. Esto producía problemas cuando había dos plugins con dependencias a la misma librería pero distintas versiones ya que ambas eran cargadas al mismo tiempo produciendo la duplicidad de clases y métodos.

El lanzamiento de Cytoscape 3 ha sido todo un hito y ha supuesto un cambio radical en la arquitectura de Cytoscape y en el desarrollo de extensiones; dando solución a todos los problemas anteriores mediante la utilización de una arquitectura a base de micro-servicios más modularizada y escalable. Esta nueva arquitectura está basada en OSGi[9], una especificación para diseñar plataformas utilizando multiples componentes software (llamados bundles) que se comunican los unos con los otros mediante interfaces. OSGi permite instalar, iniciar, detener, actualizar y desinstalar componentes de forma remota sin necesidad de reiniciar. Cytoscape pasa, por lo tanto, a estar

formado por una serie de componentes (jar) que se comunican mediante interfaces, desacoplado así la implementación de cada componente y permitiendo una mayor flexibilidad. Esta nueva arquitectura permite a los desarrolladores utilizar determinados módulos de Cytoscape para construir otras aplicaciones e incluso substituir módulos de Cytoscape por módulos propios, permitiendo añadir nuevos motores de renderizado o bases de datos. Además, las apps pasan a ser otro componente más dentro del sistema que puede ser iniciado o parado según sea necesario y que tiene sus propias dependencias independientemente del resto del sistema. Dichas dependencias son gestionadas mediante Maven[10], una herramienta para la gestión y construcción de proyectos que utiliza un fichero basado en el formato XML, el Project Object Model (POM), para describir el proyecto de software a construir, sus dependencias de otros módulos y componentes externos, y el orden de construcción de los elementos. Maven incluye objetivos predefinidos para realizar ciertas tareas claramente definidas, como la compilación del código y su empaquetado. Una característica clave de Maven es que está listo para usarse en red de forma que el motor incluido en su núcleo puede dinámicamente descargar las dependencias de un repositorio online. Además, para evitar incompatibilidad y facilitar el mantenimiento de las apps, Cytoscape ha adoptado el estándar Versionamiento Semántico (en inglés SemVer)[11], lo cual significa que la versión de Cytoscape seguirá el formato X.Y.Z donde X, Y, y Z son enteros no negativos. X es la versión "major", Y es la versión "minor", y Z es la versión "patch". Una vez que se publique la nueva versión, no será modificada sino que cualquier modificación será liberada como una nueva versión incrementando el numero correspondiente en 1. La versión patch se incrementará cuando se realicen pequeños arreglos compatibles con la versión anterior, la version minor cuando se añadan nuevas funcionalidades compatibles con la versión anterior y la version major cuando se produzcan cambios incompatibles con la versión anterior. Esto implica que todas las versiones 3.X serán compatibles entre sí. Un buen ejemplo de Versionamiento Semántico es el versionamiento del lenguaje Python. Por último, todo el código ha sido publicado en GitHub (<https://github.com/cytoscape>) y toda la documentación actualizada y organizada.

Aparte de GitHub para alojar el código, los desarrolladores de Cytoscape utilizan una serie de herramientas para gestionar los diversos aspectos de su desarrollo, todas ellas gratuitas y de código abierto. Estas herramientas son accesibles desde <http://code.cytoscape.org> Para la gestión de tareas utilizan Redmine[12], una herramienta para la gestión de proyectos que incluye un sistema de seguimiento de incidentes con seguimiento de errores así como calendario de actividades, diagramas de Gantt para la representación visual de la línea del tiempo de los

proyectos, wiki, foro, visor del repositorio de control de versiones, RSS, control de flujo de trabajo basado en roles, integración con correo electrónico, etcétera. Para la integración continua utilizan Jenkins (antes llamado Hudson)[13], que corre en un servidor, permite ejecutar proyectos basados en Maven y soporta herramientas de control de versiones como git. La integración continua es esencial para el mantenimiento de un producto donde colaboran múltiples desarrolladores ya que reduce la longitud de la iteración desarrollo-test-feedback. Para la gestión de los distintos repositorios utilizan Nexus[14], que establece el estándar para la gestión de repositorios permitiendo acceder remotamente a repositorios remotos y componentes software compartidos. Nexus hace de proxy de los repositorios centrales de Maven y captura cualquier nueva dependencia y la almacena poniéndola a disposición de los demás desarrolladores, convirtiéndose en el punto central para descargar cualquier dependencia y permitiendo el control de lo que se descarga a través del repositorio. Por último, para la evaluación del código existente utilizan Sonar[15], una plataforma para evaluar código fuente que usa diversas herramientas de análisis estático de código fuente como Checkstyle, PMD o FindBugs para obtener información sobre código duplicado, estándares de codificación, pruebas unitarias, cobertura de código, complejidad ciclomática, posibles errores, comentarios y diseño del software. Un buen resumen del valor que Nexus, Jenkins y Sonar añaden a Maven puede verse en el blog de Chariot Solutions [16] y más información sobre la importancia de la inspección continua del código en Merson et al. [17]

Actualmente Cytoscape está desarrollado íntegramente en Java SE 6. Al ser código abierto y desarrollado por una comunidad, la mejor manera de involucrarse en su desarrollo es integrarse en dicha comunidad. Para ello existe la lista de correo cytoscape-discuss [5] en la que, además de cientos de desarrolladores, participan activamente los autores centrales de Cytoscape y se mueve gran parte de la actividad de Cytoscape. Para consultar dudas también se puede utilizar Stackoverflow [18] aunque la comunidad es mucho menos activa respecto a Cytoscape pero bastante más sobre Cytoscape.js, que será tratado posteriormente.

Toda la información necesaria para desarrollar el núcleo de Cytoscape puede encontrarse en la sección *CoreDevelopment* de la wiki de Cytoscape [19], incluyendo los pasos básicos para empezar y detalles sobre la arquitectura, la API, cómo depurar, cómo testear y problemas de compatibilidad hacia atrás. Más detalles sobre la API pueden encontrarse en <http://chianti.ucsd.edu/cytoscape-3.1.0/API/> y cualquier duda o problema que surja debe ser preguntado en la lista de correo Cytoscape-discuss [5].

2.2. Extendiendo Cytoscape

No es difícil darse cuenta de que Cytoscape es solo una sólida base pero que su verdadero potencial se encuentra en el hecho de que pueda ser extendido a través de apps (o plugins en versiones anteriores a la 3,0). Dichas apps añaden nuevos estilos visuales, soporte de nuevos formatos de datos, capacidades algorítmicas, acceso a bases de datos públicas, interacción con otros lenguajes diferentes a Java o cualquier otro tipo de funcionalidad que sea de utilidad.

La gran ventaja de las apps es que pueden ser compartidas de una forma cómoda y son fácilmente instalables. De esta manera no es necesario desarrollar una nueva app para cada necesidad particular, sino que la comunidad puede beneficiarse de lo ya realizado por otros desarrolladores. La sencillez con la que se pueden crear apps utilizando la API de Cytoscape ha permitido a una amplia comunidad de científicos e investigadores que contribuyen al desarrollo de nuevas características y funcionalidades. Este crecimiento se ha producido de forma natural a través del esfuerzo independiente de multitud de autores, resultando en un conjunto de herramientas muy potente a la vez que heterogéneo. En Saito et. al [20] se ofrece una guía bastante completa aunque algo desactualizada de los plugins existentes hasta la versión 2,8. Para conocer las apps y plugins existentes se recomienda acceder al app store[21].

Las licencias de las apps son individuales para cada una pero suelen ser gratuitas, al menos para fines académicos. Algunas tienen su código abierto siguiendo el ejemplo de Cytoscape aunque no es imprescindible ya que sólo es necesario subir un fichero jar para suministrar una nueva app. Las apps se pueden instalar y desinstalar desde la propia app store, desde el administrador de apps de Cytoscape o directamente desde un fichero jar.

A día de hoy existen unas 500 apps, divididas en 46 categorías para facilitar las búsquedas.

2.2.1. Desarrollo de plugins

Los plugins eran la forma de extender Cytoscape hasta la versión 2,8 y actualmente no tiene mucho sentido seguir desarrollándolos, y es conveniente pasar al desarrollo de apps para la nueva versión 3. En cualquier caso, los plugins son muy sencillos de desarrollar ya que éstos no son más que un fichero jar cuya clase principal extiende a la clase *CytoscapePlugin* y todos los aspectos gráficos están desarrollados utilizando *java.Swing*. También es importante que el nombre del jar no contenga ningún espacio.

Es de resaltar que las distintas versiones 1.X o 2.X no son totalmente compatibles, por lo que para garantizar la compatibilidad es necesario probar el plugin en todas las posibles versiones una por una. Además, no se admiten referencias a jars de terceros por lo que todas las dependencias deben ir incluidas

en un único fichero jar. Esto puede producir el mal funcionamiento de Cytoscape en una situación en la que el usuario tiene dos plugins con dependencias a la misma librería pero con distintas versiones. Además, al no haber dependencias, no es posible crear un plugin que utilice funciones de otro, facilitando las duplicidades.

Los pasos básicos para el desarrollo de plugins así como varios ejemplos y una información más detallada sobre como realizar distintas interacciones con la API pueden encontrarse en la sección *Cytoscape_Plugin_Tutorial* de la wiki de Cytoscape [19].

2.2.2. Desarrollo de apps

Las apps son la nueva forma de extender Cytoscape a partir de la versión 3 y presentan la ventaja de que, al seguir Cytoscape el estándar Versionamiento Semántico, sabemos que una app funcionara para todas las versiones superiores.

Para aprovechar al máximo las ventajas de la nueva arquitectura de Cytoscape, las apps pueden presentarse como un servicio OSGi más del sistema y utilizar Maven para gestionar las dependencias. Este tipo de app es denominada *Bundle App* y solventa los problemas existentes en los antiguos plugins. Asimismo permite hacer referencia a jars de terceros de una manera consistente (Cytoscape alojará los jar de terceros que la aplicación necesite si no están ya alojados en los repositorios central de Maven o nexus de Cytoscape) e incluso depender de otras apps, evitando colisiones entre las distintas versiones. Además, este tipo de App permite exponer una API para que pueda ser accedida a través de otras apps o de cualquier otro componente software.

Por desgracia, esto implica mucho que aprender acerca de OSGi y Maven, por lo que Cytoscape 3 también permite apps al estilo de los antiguos plugins, denominadas *Simple App*. Una *simple app* no es más que un fichero jar que cuya clase principal extiende a la clase *AbstractCySwingApp* y todos los aspectos gráficos están desarrollados utilizando *java.Swing* o *CySwing*, una extensión de *Swing* propia de Cytoscape. Este tipo de app es ideal para portar plugins a Cytoscape 3 realizando los mínimos cambios (http://wiki.cytoscape.org/Cytoscape_3/AppDeveloper/PluginPortingGuide) pero presenta los mismos problemas de dependencias que los enunciados anteriormente.

Toda la información necesaria para el desarrollo de apps puede encontrarse en la sección *AppDeveloper* de la wiki de Cytoscape [19].

3. CYTOSCAPE.JS

Aprovechando que las tecnologías web han madurado lo suficiente para implementar aplicaciones complejas, Cytoscape ha lanzado *Cytoscape.js*[22], una librería escrita en JavaScript[23] que utiliza las nuevas

funcionalidades de HTML5[24] para permitir la visualización de redes complejas en la web. De esta forma, Cytoscape Web [25], basado en tecnología Flash, es sustituido por *Cytoscape.js*, el cual funciona prácticamente en todos los navegadores modernos (incluidos tablets y smartphones) además de no necesitar de ninguna tecnología externa.

Cytoscape.js permite mostrar y manipular redes en la web de manera similar a como se muestran en Cytoscape. Esto permite preparar, integrar o analizar datos utilizando cualquier lenguaje o aplicación, además de visualizarlos y publicarlos en forma de aplicación web. Además, está pensado para poder realizar análisis de grafos, con lo que incluye algunas funciones básicas de teoría de grafos.

Cytoscape.js comparte los principios básicos de Cytoscape: ofrecer una funcionalidad central a la que se le puedan añadir funcionalidades adicionales en forma de extensiones y mantener separados el estilo gráfico y los datos. Para ello, *Cytoscape.js* se basa en eventos para mantener separados el núcleo central del renderizador. Además, al igual que Cytoscape, ofrece una API que permite extender las funciones básicas así como interactuar con *Cytoscape.js* utilizando JavaScript. Esta arquitectura hace de *Cytoscape.js* una librería altamente configurable, muy dinámica y bien diseñada para la creación de aplicaciones web complejas que incluyan la interacción del usuario. El objetivo final, es hacer los dos proyectos tan compatibles como sea posible. Por ejemplo, Cytoscape 3.1 ya permite exportar las tablas de una red y su estilo en ficheros JSON y CSS respectivamente. Dichos ficheros pueden ser leídos y mostrados por *Cytoscape.js* permitiendo portar redes de forma sencilla.

Por otro lado, *Cytoscape.js* es totalmente compatible con CommonJS [26] y NodeJS [27] pudiendo ser utilizado sin necesidad de renderizar nada. Esto puede resultar de poca utilidad a fecha de hoy pero a medida que las capacidades de *Cytoscape.js* se vayan desarrollando, irá teniendo más sentido utilizarlo en el *back-end*.

Aunque a día de hoy *Cytoscape.js* aún no tiene el alcance de Cytoscape, no por ello se debe quitarle importancia. En los últimos años se viene observando el auge del software como servicio (SaaS) [28] y de las aplicaciones basadas en JavaScript y de NodeJS en particular. *Cytoscape.js* es el punto de unión entre Cytoscape como producto de escritorio y la web. Por ello, es muy probable que *Cytoscape.js* encierre gran parte del futuro de Cytoscape. En este sentido, uno de los futuros proyectos pendientes es permitir el uso de Cytoscape a través de la línea de comandos de forma que pueda ser usado como *back-end* en la nube y *Cytoscape.js* como *front-end* para así poder ofrecer Cytoscape como una aplicación web.

3.1. Extendiendo Cytoscape.js

Cytoscape.js es aun algo novedoso, por lo que la disponibilidad de extensiones y plugins es mucho menor. Toda la información necesaria para el desarrollo de extensiones y plugins, así como la arquitectura y la API de Cytoscape.js puede encontrarse en su web [22] por lo que aquí simplemente se incluyen los aspectos más básicos.

3.1.1. Desarrollo de plugins

Un plugin Cytoscape.js es simplemente un plugin de jQuery que es llamado desde el contenedor de Cytoscape.js e interactúa con éste a través de su API; por ejemplo para ampliar la interfaz de usuario. Aunque Cytoscape.js no requiere jQuery como una dependencia, tiene compatibilidad con el mismo. Al ser jQuery uno de los frameworks más utilizados hoy en día, los plugins basados en tal tecnología son una opción para la mayoría de los desarrolladores. Todos los plugins existentes para Cytoscape.js pueden encontrarse en la página oficial de jQuery[29].

3.1.2. Desarrollo de extensiones

La API de extensión de Cytoscape.js permite añadir nuevos diseños, nuevas funciones de renderizado y nuevas utilidad tanto para toda la aplicación como para elementos dentro de ella. Todas ellas siguen el siguiente formato:

```
cytoscape(tipo, nombre, extension);
```

Donde el valor de tipo puede ser *core* (agrega una función básica), *collection* (agrega una función de recogida), *layout* (registra un prototipo de diseño) o *renderer* (registra un prototipo de procesador); nombre indica el nombre de la extensión, que debe ser una sola palabra en minúsculas; y extensión es la función que se quiere añadir.

4. CONCLUSIONES

Cytoscape es una plataforma ampliamente utilizada dentro de la comunidad científica y con un infinito potencial de desarrollo. Es una herramienta tremendamente útil para la visualización y el análisis de redes que no deja de crecer acorde con las necesidades de sus usuarios. Al ser ampliamente utilizado, Cytoscape otorga una gran visibilidad a sus apps, lo cual es muy conveniente para los desarrolladores.

Otro aspecto importante es que, como casi todo en el mundo del software, se está moviendo a la web; lo cual abre a los desarrolladores un gran abanico de posibilidades.

Tras haber leído este artículo se debe tener clara la importancia y el potencial de Cytoscape además de el camino a seguir para participar activamente en Cytoscape, ya sea desarrollando el núcleo central o extendiéndolo mediante apps.

REFERENCIAS

- [1] D. Eisenberg, E. M. Marcotte, I. Xenarios, and T. O. Yeates, "Protein function in the post-genomic era." *Nature*, vol. 405(6788), pp. 823–6., 2000. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1038/35015694>
- [2] G. W. Bell and F. Lewitter, *Methods in Enzymology*, 2006, ch. Visualizing Networks, pp. 408–421.
- [3] P. Shannon, A. Markiel, O. Ozier, N. S. Baliga, J. T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, and T. Ideker, "Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks," *Genome Research*, vol. 13, no. 11, pp. 2498–2504, Nov. 2003. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.1239303>
- [4] S. Killcoyne, G. W. Carter, J. Smith, and B. John, *Protein Networks and Pathway Analysis*. Methods in Molecular Biology, 2009, ch. Cytoscape: A Community-Based Framework for Network Modeling, pp. 219–239.
- [5] Cytoscape discuss. grupos de google. <https://groups.google.com/forum/?fromgroups#forum/cytoscape-discuss>.
- [6] Cytoscape helpdesk. grupos de google. <https://groups.google.com/forum/#forum/cytoscape-helpdesk>.
- [7] R. C. e. a. Gentleman, "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics," *Genome Biology*, vol. 5, 2004. [Online]. Available: <http://genomebiology.com/content/5/10/R80>
- [8] P. T. Shannon, M. Grimes, B. Kutlu, J. J. Bot, and D. J. Galas, "Rcytoscape: tools for exploratory network analysis," *BMC Bioinformatics*, vol. 14, 2013.
- [9] Osgi alliance. <http://www.osgi.org>.
- [10] The Apache Software Foundation. Maven - welcome to apache maven. <http://maven.apache.org>.
- [11] T. Preston-Werner. Semantic versioning 2.0.0. <http://semver.org>.
- [12] J.-P. Lang. Overview - redmine. <http://www.redmine.org>.
- [13] Jenkins. <http://jenkins-ci.org>.
- [14] Sonatype Inc. Sonatype.org: Nexus. <http://www.sonatype.org/nexus>.
- [15] SonarSource S.A. Sonarqube. <http://www.sonarqube.org>.
- [16] J. Confino. Making the most of maven: Nexus, hudson, sonar. <http://chariotsolutions.com/blog/post/making-the-most-of-maven-nexus-hudson>
- [17] P. e. a. Merson, "Continuous inspection. a pattern for keeping your code healthy and aligned to the architecture."
- [18] Stackoverflow. <http://stackoverflow.com/questions/tagged/cytoscape>.
- [19] Cytoscape wiki. http://wiki.cytoscape.org/Cytoscape_3.
- [20] R. e. a. Saito, "A travel guide to cytoscape plugins," *Nature Methods*, vol. 9, pp. 1069–1076, 2012.
- [21] Cytoscape app store. <http://apps.cytoscape.org/apps>.
- [22] Cytoscape.js. <http://cytoscape.github.io/cytoscape.js>.
- [23] Javascript web apis - w3c. <http://www.w3.org/standards/webdesign/sccr>
- [24] Html5. <http://www.w3.org/TR/html5/>.
- [25] C. T. Lopes, M. Franz, F. K. S. L. D. Q. Morris, and G. D. Bader, "Cytoscape web: an interactive web-based network browser," *BMC Bioinformatics*, vol. 26(18), pp. 2347–8, 2010. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btq430>
- [26] K. Dangoor. Commonjs: Javascript standard library. <http://www.commonjs.org>.
- [27] Joyent Inc. <http://nodejs.org/>.
- [28] D. Ma, "Services computing, 2007. scc 2007. ieee international conference on," in *Services Computing, 2007. SCC 2007. IEEE International Conference on*, July 2007, pp. 701–702.
- [29] The jQuery Foundation. cytoscape.js — jquery plugin registry. <http://plugins.jquery.com/tag/cytoscape.js/>.

Juan J. Díaz-Montaña recibió el título de Ingeniero en Informática por la Universidad de Sevilla en 2012. Estudió un año en la Universidad de Tampere, Finlandia; realizando un Master en Bioinformática. Actualmente, es estudiante de doctorado en la Universidad Pablo de Olavide y centra su investigación en la extracción de conocimiento y la evaluación de redes genéticas.



Cyanide poisoning

Alberto Pineda Santaella

Abstract—Cyanide, such a potent poison throughout all History, is facing opposition as research on antidotes and the relationship with metabolism intensifies.

Key words— Cyanide, poisoning, mitochondrion, respiration, cytochrome c oxidase.



1. INTRODUCTION

1.1. General Characteristics

Cyanide is the way we know a series of chemical compounds that present a set of common features due to the share of cyano group $[C\equiv N]^-$. We can find cyanides in many forms in nature, for instance, hydrogen cyanide (HCN), cyanide as anion (CN^-) as a result of HCN dissociation in aqueous environment (also other polar solvents) or taking part of a wide range of cyanide salts involving alkaline elements, such as potassium cyanide (KCN), sodium cyanide (NaCN) (highly soluble salts) or other non-alkaline metals, such as copper cyanides $(Cu(CN), Cu(CN)_2)$, gold cyanides $(AuCN, Au(CN)_3)$, silver cyanide $(AgCN)$, etc. Cyanide can also be involved in highly contaminating compounds, such as cyanogen bromide (NCBr) or cyanogen chloride (NCCl).

As the cyano group is a very stable charged species, cyanide derived acids easily dissociate and can dissolve in polar solvents as we can see with HCN. For the same reason, cyanide derived salts will (generally) easily dissociate in aqueous environments as we can see with NaCN and KCN. Hydrogen cyanide, most common form of cyanide, is a pale blue liquid completely miscible in water. We can also find it as a colourless gas as its boiling point ($25^\circ\text{-}26^\circ\text{C}$, 1 atm) is relatively low. Its high volatility and solubility confers it a potentially risky capability of spreading, which enhances its already worrying poisoning effects.

2. ENVIRONMENTAL IMPACT

2.1. Sources of Cyanide Release

In nature, the most common form of free cyanide, HCN ($\sim 90\%$), can be found in non-alkaline waters in a pH range of 6 to 8.5 at temperatures between 4 and 10°C [1]. Although cyanide concentrations in water do not tend to be high, several detection and removal techniques have been developed. Absorption spectrophotometry, ion-selective electrodes or gas chromatography are the most used techniques for its detection. On the other hand, for its removal from drinking water, the most popular methods are ozone oxidation, reverse osmosis or destruction by chlorination [2].

But the most relevant source of cyanides comes from human activity. As this compound is highly used in in-

dustrial processes, such as electroplating, photography processes, manufacture of plastics, extraction of ores (gold, silver), etc., the most frequent origin of cyanides are factory waste effluents and mining/milling industries residues (as these two are the main consumers of cyanide-derived products, such as aurocyanide, $Au(CN)_2^-$, used in gold extraction).

Other anthropological activities involving cyanide contamination are fumigations of ships, warehouses and other structures, organic materials combustion (e.g. wool, silk) and the usage of pesticides/fungicides in agriculture, which has a direct impact in vegetables consumption [3].

3. RISK OF CYANIDE EXPOSURE

The most frequent cause of cyanide poisoning is the continuous exposure to cyanide-derived chemical products in factories, industry workers being the main risk group when referring to direct-contact contamination.

However, there are several other pathways in which an ordinary citizen can be exposed to cyanide. Food is an important potential source of cyanide: most foods contain cyanide traces consumed by thousands and thousands of people every day (especially vegetables, such as maize, sweet potatoes, soy, millet, cassava or bamboo). Of course, the ingested doses in this case are very low: for instance, in soy we will find a 0.07 to $0.3\mu\text{g/g}$ cyanide concentration and in cereal grains a 0.001 to $0.45\mu\text{g/g}$ concentration [1], very far away from the critical lethal concentration.

A not-very-common but lethal way of exposure to cyanide is continued exposure in fumigation-related works or, even worse, exposure to fires from industry accidents, which release a fatal chemical mix of HCN and CO (essentially from plastics, such as polyamides and thermoplastic elastomers), causing fatalities to people who come in contact with it [4].

Another parameter to take into account is participation in suicidal behaviour. It is true that cyanide poisoning is a quite rare event, but it has been proved that it is the preferred pathway of self-killing among most suicide victims as it is a rapid action suicide agent. But, on the other hand, it is a not so-easily-accessible chemical; this is the reason why laboratory and chemical industry workers, who can access to the compound, are responsible for the major part of suicides of this type.

In fact, there are several widely spread cases of cyanide poisoning that have conferred a certain popularity to this chemical as suicidal agent. For instance, a shocking case was Steve Parsons', a man from Maryville, Mo who was facing a maximum of 7 years in prison and self-poisoned in the same court room minutes after its guilty verdict, dying because of respiratory failure [5].

4. CYANIDE PROCESSING

4.1. Doses

It has been studied that constant ingestion of low doses of cyanide (2.9 to 4.7 μg) are non-injurious for humans, but effects can vary depending on the weight of the individual and the efficiency of the own natural detoxification system. Related to this, an experiment was designed to prove the capacity of the detoxification system in mammals: during a two-year chronic exposure period a group of female rats were studied in order to study the effects of this persistent ingestion of low cyanide concentrations. A 10.8 mg CN^-/Kg body weight (bw) per day was provided without observing any clinical or histopathological injuries [6]. From this study it was worked out that the maximum tolerable concentration of cyanide in water is 0.2 mg/L, although studies in raw and drinking water have demonstrated that normal levels are below 0.1 mg/L [7].

For humans, it has been calculated that single doses of 50 to 200 mg (0.7 to 2.9 mg/Kg bw) of cyanide can be fatal, leading to an imminent death in a maximum of 1 hour unless immediate clinical treatment is applied to the patient. From this, it was estimated that the average lethal dose is around 1.52 mg/Kg bw (as CN^-) [7].

4.2. Absorption by the Body

Cyanide can be absorbed through both mucus membranes and intact skin. Most common inorganic cyanides are readily absorbed by the stomach and duodenum walls, although absorption through gastro-intestinal tube depends on the circumstantial pH and lipid solubility of the specific cyanide-derived compound [8].

4.3. Distribution along the Body

Once cyanide has been absorbed, it is carried by the bloodstream all along the organism. A higher concentration of the chemical in erythrocytes than in the plasma can be observed due to the strong cyanide's tendency to bind to several compounds found in these cells, such as methaemoglobin. Cyanide can also present a peak affinity for metalloproteins or some enzymes, such as catalase or cytochrome c oxidase, exactly the affected key enzyme when poisoning by cyanide takes place.

It has been proved in several studies that the most affected organs by cyanide are stomach, brain, liver and kidneys. In fact, low acceptable levels of free cyanide (CN^-) can be usually found being distributed all along healthy people's body (most cases involving smokers) due to the breakdown of cyanogenic compounds from foods and tobacco smoke, metabolism carried by gastro-intestinal bacteria and vitamin B_{12} [8].

4.4. Chemical Fundamentals of Cyanide Poisoning

To be precise, what exactly makes cyanide such a toxic chemical compound is its acute affinity to bind cytochrome c oxidase, a key mitochondrial enzyme (concretely, iron cations (Fe^{2+}) taking part of the enzyme complex) [9], which has a leading role in the electron transport chain, the last step in the transport process, just before the start of oxidative phosphorylation.

The chemical process taking place at this stage can be summed up in this diagram:

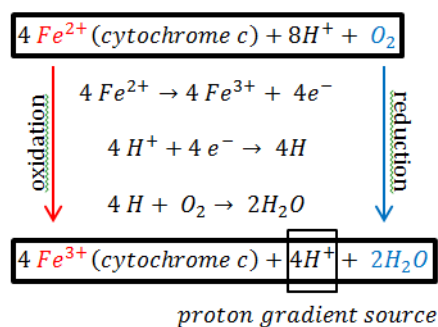


Fig. 1. Redox reactions at cytochrome c.

When cyanide groups bind to iron cations prevent them from oxidation, so oxygen (last electron acceptor in the respiratory chain) is not able to receive the necessary electrons to form water molecules as product. As a result, ATPases do not produce ATP molecules because of the lack of proton electrochemical gradient and no net energy is produced in the mitochondria.

As this process occurs in the mitochondria of cells coming in contact with the chemical, cellular hypoxia is spread all around the affected tissues, causing dysfunction and necrosis to different organs and systems in the body.

Of course, it has to be taken in consideration that the time lapse until death takes place depends on the concentration of ingested cyanide and, over all, the distribution of this dose. If the amount of cyanide concentrates in brain, even if it is small, it produces fatalities in a 30 to 40 minutes time interval. On the other hand, if, for instance, an abundant dose acts in other organs (e.g. kidneys), it will take longer to cause death because of general physiological failure because, this way, poisoning effects are not so drastic and immediate.

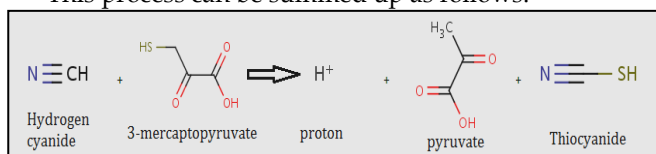
4.5. Cyanide Detoxification and Elimination

As it has been already said, even healthy bodies have to deal with very small doses of cyanide in "daily" metabolism. Although these doses are small enough for organisms not to get in danger in a principle, if these concentrations are not removed, they will raise up, ending up with already worrying doses that could cause serious intoxication.

For this reason, the human body has developed several excretion mechanisms for the removal of cyanide, that occurs at the very low rate of 0.017mg/Kg per minute [10], such as excretion by simple exhalation (in form of HCN) or the binding to cysteine or hydroxocobalamin. But there are metabolic routs much more effective than

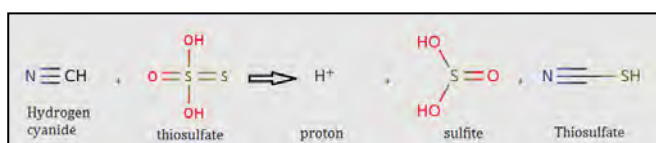
the two previously mentioned pathways. One example could be the detoxification system involving cyanide and 3-mercaptopyruvate (catalysed by β -mercaptopyruvate sulfurtransferase enzyme) [11].

This process can be summed up as follows:



The resultant product is thiocyanate (NCSH), a soluble compound that can be easily excreted with urine.

Actually, this detoxification process was thought to be carried out by a different compound, thiosulfate group (S₂O₃²⁻), which simply donated one sulphur atom to HCN and ended up exactly at the same stage (reaction catalysed by rhodanese enzyme) [12].



However, posterior studies make this hypothesis hardly believable, taking into account that thiosulfate presents a considerable resistance to pass through membranes as quickly as it should to cater the sufficient concentrations for the reaction to take place in an efficient manner. Therefore, thiosulfate was discarded as the main agent involved in cyanide detoxification process [11].

REFERENCES

- [1] Health Canada-Santé Canada, "Cyanide", section: "Occurrence", <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/cyanide-cyanure/index-eng.php#tphp> (Web site).
- [2] Health Canada-Santé Canada, "Cyanide", section: "Analytical Methods and Treatment Technology", <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/cyanide-cyanure/index-eng.php#tphp> (Web site).
- [3] Health Canada-Santé Canada, "Cyanide", section: "General", <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/cyanide-cyanure/index-eng.php#tphp> (Web site).

<http://www.inchem.org/documents/antidote/antidote/ant02.htm#PartNumber:6> (Web site).

- [4] IPCS INCHEM, "Antidotes for Poisoning by Cyanide", section: "1.3 Toxicity of Cyanide in Man", section: "1.3.1 Acute poisoning" <http://www.inchem.org/documents/antidote/antidote/ant02.htm#PartNumber:6> (Web).
- [5] Fox 4 News, "Man who poisoned himself with cyanide in courtroom faced max of 7 years", <http://fox4kc.com/2013/07/01/man-who-fell-over-dead-in-courtroom-faced-7-years/> (Media web site).
- [6] Isea Gerardo, Rodríguez Ilsen, Isea Ernesto, Sánchez Egar, Torres Magaly, Gil Marcelo, "Valoración de la glucosa como antidoto en la intoxicación por cianuro", <http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=120> (Magazine).
- [7] Health Canada-Santé Canada, "Cyanide", section: "Rationale", <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/cyanide-cyanure/index-eng.php#tphp> (Web site).
- [8] Health Canada-Santé Canada, "Cyanide", section: "Absorption, Distribution and Excretion", <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/cyanide-cyanure/index-eng.php#tphp> (Web site).
- [9] IPCS INCHEM, "Antidotes for Poisoning by Cyanide", section: "1.4 Mechanism of Toxicity", <http://www.inchem.org/documents/antidote/antidote/ant02.htm#PartNumber:6> (Web site).
- [10] IPCS INCHEM, "Antidotes for Poisoning by Cyanide", section: "1.7 Biological Detoxification of Cyanide", <http://www.inchem.org/documents/antidote/antidote/ant02.htm#PartNumber:6> (Web site).
- [11] Fiedler H and Wood JL (1956). "Specificity studies on the beta-mercaptopyruvate-cyanide transsulfuration system". J. Biol. Chem. 222 (1): 387-397. PMID 13367011. <http://www.jbc.org/content/222/1/387.long> (Journal).
- [12] Health Canada-Santé Canada, "Cyanide", section: "Absorption, Distribution and Excretion", <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/cyanide-cyanure/index-eng.php#tphp> (Web site).



Alberto Pineda Santaella studies Biotechnology at Pablo de Olavide University.

Monosodium Glutamate, let's have poison for lunch

Marina Sarrió Cañellas

Summary—Eating is a pleasure that everybody enjoys, but, do we really know what we are eating. Have you ever tried to read the ingredients of the product you are eating? How many names do you truly understand in that label? The monosodium glutamate is one of the most common ingredients in all of the industrial products we eat every day. This compound, so common in our daily diet, has a lot of side effects that we are still discovering nowadays.

Key word— Monosodium glutamate, flavor, toxic, brain, addiction.

1. INTRODUCTION

The brain is one of the most important organs of our body. This organ is based on the nervous system, which means that is based in synapses between the neurons. This synapse is realized thanks to neurotransmitters of the nervous system. The glutamate is one of the most important exciting neurotransmitters. This glutamate is synthesized by our own brain and influences learning and the memory by regulating the efficiency of synapses [1]

The monosodium glutamate (MSG) derives from this glutamate (see this relationship in figure 1), meaning that its influence in the brain is the same than the glutamate. That's the reason why the MSG causes the so called "addiction to food" since it has the ability to affect the brain. It is important to mention that most of the products that contain it do not write "monosodium glutamate" in their ingredients label, they use a large variety of other names so as to hide it from the consumers. Some of the names used are: autolyzed yeast extract, hydrolyzed protein, natural flavor, E-621...

2. HISTORY

Since its discovery in the 1908 by Dr. Ritthausen, the monosodium glutamate has been used as the principal enhance food flavoring by the food companies. The MSG is a natural compound that we can find in some products, but since the discovery of its effects as a flavor enhancer, experts all over the world started the research of industrial formation of the MSG d [2].

From 1910 until 1956, the process of production of this compound was very costly and difficult. But, in 1956, Japanese experts succeeded in the industrial formation of the MSG from bacterial fermentation. Since the discovery of this fermentation process, the amount of monosodium glutamate has increased a lot: from 20,000 tonnes produced in 1970 passed to 1,500,000 tonnes in 2005. This rapid growth in the production of monosodium glutamate is correlative to the increase of the obesity in our society.

As we had said before, the MSG is a natural amino acid, which we can find in some protein-containing products. The occidental diet provides 11g of this amino acid and less than 1 g of addictive. Our body is not able to distinguish between natural and non-natural MSG. Jesús Fernández-Tresguerres discovered that this amino acid was able to alter the patterns of fulfilnes and appetite, demonstrating an increase up to 40% [3]. That's the reason why the monosodium glutamate is so bad for our health, due to it causes an uncontrolled voracity, causing that people to eat food without stopping although they are not hungry. If this situation repeats day after day, causes an increase in our fat body giving birth to the so called "obesity epidemic". We've got to add that this "obesity epidemic" started as the same time as the industrialization food came into the market, due to the fact that those big companies prefer to gain more money although the quality of their food decreases, damaging that way our health.

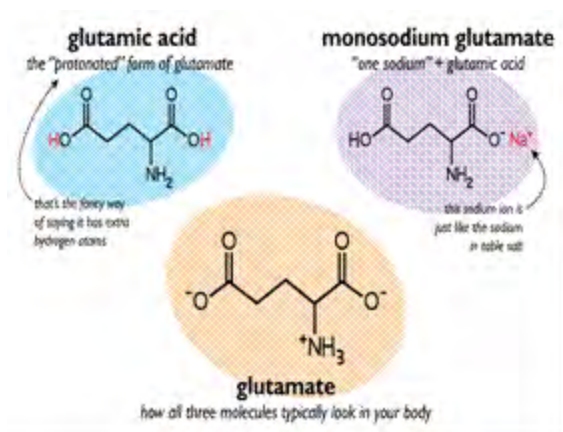


Figure 1: Those are three forms in which the amino acid glutamate can be found in our body

3. MSG CHEMICAL COMPOSITION

The monosodium glutamate is the salt of the glutamate. This MSG is produced by fermentation of products like cane sugar, starch or some cereals. At the beginning it was subtracted from algae and other vegetal products. After this is purified so as to get pure MSG [4].

The MSG is basically glutamate, water and salt. It's found in nature in some products like tomatoes, mushrooms, breast milk... Also, the fermented products are very rich in GMS (rotten tomatoes, Parmesan, Roquefort cheese...). As for its chemical characteristics we should remark:

- Solubility: we can dissolve up to 74g of MSG into 100g of water. When we dissolve it, the glutamate ions are separated from the NaCl ones.
- White-ish color: looks like sugar or salt
- Odorless
- Crystal shape.

Its chemical formula is $C_5H_8NO_4Na$. See the tridimensional structure of this component in figure 2.

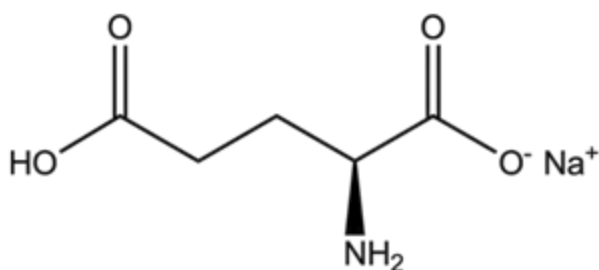


Figure 2. Molecular structure of the Monosodium Glutamate

4. MSG EFFECTS

The Monosodium Glutamate, as we had said, acts in some neurons that we can find in the arcuate brain region (important region of the brain involved in the talk and learning). The MSG affects the good function of the hunger inhibitors, that's why it causes the so called "addiction to food".

At the beginning, the MSG was used as a flavor enhancer. The big food companies used it because of the "addiction to food" sensation, since this amino acid makes the consumers choose their products instead of others, due to the good taste that causes its addition to food, regardless the ingredients used on the production of the so mentioned food. But this addiction to food is what is causing the obesity epidemic because the products where the MSG is added are rich in sugars and fat. Recent researchers have discovered that the MSG increases up to three times the amount of insulin in our body, increasing the obesity epidemic.

But the worst part is not only the "addiction" it causes, it also causes poisoning. Any glutamic acid produced as an individual amino acid by humans (non-natural) used in the food can cause: brain lesions, neuroendocrine dis-

orders, learning disabilities, adverse reactions, neurodegenerative disease... [5] "Not only does it make the brain grow abnormally, but alters the kind of brain cells created" affirmed k. Schlett in June of 2006 [7].

"Monosodium L-glutamate is known to cause intracellular swelling, necrosis, and disappearance of most inner retinal neurons, with concomitant thinning of inner retinal layers within hours after subcutaneous injection into neonatal rodents." [8] affirmation of Reif-Lehrer L, Bergenthal J and Hanninen L, investigators of the side effects of the MSG in chicks embryo.

Hiroshi Ohguro, a researcher of the Hirosaki University in Japan, performed a study that showed that the MSG in big doses can cause blindness. He also remarked the fact that we don't know the side effects that the MSG can have in the future [4]. Today, the only secondary effects known would be: diabetes, headaches, migraines, autism and even Alzheimer. Although knowing all its side effects, the FDA (Food and Drug Administration in the US) refuses to alert the consumers about them and to forbid the use of the MSG. Even more, it has refused to put some limits for the use of this amino acid, the only measure the FDA has taken is to force to the companies that use the MSG to incorporate the "monosodium glutamate" as an ingredient of its product when it contains pure MSG. When the product contains non-pure MSG, the companies aren't forced to write as an ingredient the "monosodium glutamate", they can use any of the many other names by which we can identify this compound. Not even the politicians who are "supposed" to lead us not the media who "always" tells us the truth, are capable of alerting the public of the effects of the MSG. "Sure, I know how bad MSG is. I wouldn't touch the stuff" [6] says the highest government health official to John Erb (assistant researcher in the Waterloo University in Canada), one of the most important persons in the fight against the use of the monosodium glutamate.

5. CURIOSITIES

We have talked a lot about the harms of the Monosodium Glutamate, but like everything, the MSG has its benefits. One of the benefits of the MSG is its used in old people's diet, since most senior citizens tend to not follow a healthy diet due to their lost of part of the sense of smell and taste. By adding the MSG, we increased the flavor of the food so those senior citizens with lack of taste and smell can smell and taste it as if they had those senses properly working. This technique prevents the malnutrition in old people.

Another curiosity about the effects of the MSG will be the called "fifth flavor" or umami (in Japanese means savory flavor). Before the MSG we only knew the traditional four flavors: salt, sweet, bitter and sour. With the discovery of the MSG, we discovered the umami flavor (see figure 3), which could be described as the especial flavor that the receptors in our tongue feel when we

eat some product with the MSG or it [4].

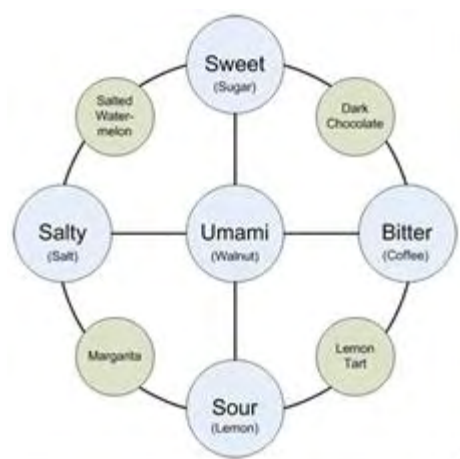


Figure 3: The different flavors we can taste with intermediated examples

6. Conclusions

In this paper we have seen what eating pre-cooked food or just food from big international companies can cause to our health. We must be aware that is not only our health is in danger, but also the health of our kids and grandsons and so on. This is due to the fact that brain damage can affect the embryo and cause permanent damage, leading to diseases like autism. We can't leave our children grow up in an obese society, where fast-food restaurant and pre-cooked food is common and daily, without even knowing what effects will have in thirty or more years on their health.

We have to keep in mind that in this capitalist society, the international companies only take into account their benefits and not really in our health. Those companies only think about the ways they can sell more products while decreasing their cost of production, even though that way the quality of the products we consume decreases as well. And since the government and the media is not willing to take part in the fight against the poison in our food, we have to start to make the people around us aware of what they are eating, of what their money is supporting, so as to make a change in the society. If we do not make a statement in the society, the multinational companies will control our lives, and we will keep living in a capitalist society where the richer man move the ones below them like puppets.

REFERENCES

- [1] Monografías, Tratado: Glutamato Monosodico <http://www.monografias.com/trabajos82/tratado-glutamato-monosodico/tratado-glutamato-monosodico.shtml> (Enlace web)
- [2] The Toxicity of MSG (monosodium-glutamate) <http://www.kisswebpage.com/msg/> (Enlace web)

- [3] Muy interesante, ¿Qué es el glutamato monosódico y por qué aumenta la voracidad?, <http://www.muyinteresante.es/salud/preguntas-respuestas/que-es-el-glutamato-monosodico-y-por-que-aumenta-la-voracidad-861372338838/> (Enlace web)
- [4] En buenas manos, Glutamato Monosódico <http://www.enbuenasmanos.com/articulos/muestra.asp?art=1673> (Enlace web)
- [5] Nueva Salud, GLUTAMATO MONOSODICO el lento veneno (E-621), <http://diabetesstop.wordpress.com/2007/03/07/glutamato-monosodico-el-lento-veneno-e-621/> (Enlace web)
- [6] Naturo-Doc, MSG, a slow poison, http://www.naturodoc.com/library/nutrition/MSG_poisoning.html
- [7] Whale, MSG and Autism, http://www.whale.to/vaccine/john_erb.htm



Marina Sarrió Cañellas
studies nowadays first of Biotechnology at Pablo de Olavide University.

Síntesis y reciclado de materiales verdes con fluidos supercríticos

Cristina Victoria González Fernández

Resumen—En este artículo se presentan algunas aplicaciones del agua como fluido supercrítico, como es la síntesis y el reciclado de materiales verdes. También se destacan algunos ejemplos reales de plantas químicas que comercializan con este tipo de técnicas innovadoras.

Palabras Claves—Agua, Reciclado, Síntesis, Supercrítico, Verde.

1. INTRODUCCIÓN

Para considerar que un material es “verde”, debe haberse sintetizado usando tecnologías que reduzcan la energía empleada y minimice el uso de recursos en el proceso, además de valorar en conjunto el ciclo de vida de los materiales de modo que éstos se reciclen y que los productos obtenidos contribuyan a minimizar problemas ambientales.

Cabe aclarar también que, cuando hablamos de fluidos supercríticos, se suponen aquéllos que se encuentran por encima de sus condiciones de presión y temperatura críticas, tal y como se observa en la Figura 1. El agua es en estos casos el fluido más utilizado [1] porque es capaz de formar una fase homogénea con sustancias orgánicas e inorgánicas, y actúa además como catalizador. En el estado supercrítico varían características del fluido como la densidad, coeficiente de difusión, viscosidad, solubilidad, conductividad térmica, etc. Por ejemplo, un fluido supercrítico es tan buen disolvente como un líquido y tan poco denso como un gas.



Fig. 1. Diagrama de fases del agua.

El uso de fluidos supercríticos puede aplicarse a diversos procesos [1] como son la extracción, el secado, el lavado,

la síntesis y el reciclado. En este artículo, nos centraremos en los dos últimos.

2. SÍNTESIS HIDROTHERMAL

Hoy día, muchas industrias sintetizan materiales mediante este método, en el que se usa como disolvente el agua a altas temperaturas para obtener óxidos metálicos. Si para este proceso se lleva el agua a condiciones supercríticas en un breve espacio de tiempo, aumenta la velocidad de nucleación y las partículas obtenidas serán cristales de buena calidad y tamaño nanométrico [1].

Además de usar el agua y no otro disolvente orgánico, este proceso tiene la ventaja de ser menos costoso desde el punto de vista energético en comparación con una síntesis equivalente que emplease procesos convencionales, y además puede usarse para obtener materiales que a su vez contribuyen a una sociedad sostenible. Por ejemplo: TiO_2 tiene actividad fotocatalítica y se usa en la generación de energía solar; LiFePO_4 es usado en baterías de litio y puede cargarse y descargarse en ciclos sucesivos sin perder su capacidad catódica; CeO_2 se usa en la purificación de gases de escape.

En cambio, la baja afinidad por el agua supone una desventaja [1] ya que el material se dispersará en este medio con bastante dificultad. Para solventar este problema, se ha desarrollado un proceso alternativo que consiste en añadir sustancias orgánicas al agua, que reaccionan con el metal y se colocan así sobre la superficie de la nanopartícula. De este modo se consigue aumentar esta afinidad de la partícula con el disolvente.

3. RECICLADO

3.1. Residuos plásticos

Este proceso consiste principalmente en la conversión del plástico en monómeros que puedan volver a combinarse para formar otro material. Se ha experimentado con distintos plásticos, obteniendo resultados buenos en procesos rápidos y selectivos. Por ejemplo:

- Los plásticos PET se recuperaron al 100% en un proceso bastante eficiente, en el que se usa como disolvente metanol en estado supercrítico.
- Las resinas termorresistentes son usadas en circuitos electrónicos, y su eliminación es muy importante pero normalmente difícil. Aplicando este método se alcanzaron rendimientos del 78%, que pudo elevarse a más del 90% con solo añadir Na_2CO_3 que acelera la reacción.

3.2. Materiales de recubrimiento de residuos

Los FRP son plásticos que contienen fibras de vidrio y/o carbono, que hacen de ellos un material altamente resistente. Sin embargo, quedó totalmente descompuesto al exponerlo a este método de reciclado en condiciones supercríticas.

3.3 Proceso combinado: materiales de recubrimiento y oxidación supercrítica

Este tipo de reciclaje se ha utilizado para aguas residuales, poniendo en contacto aguas que contienen iones metálicos y otra con compuestos orgánicos. En la Figura 2 se presenta un proceso esquemático para el caso de aguas residuales del revestimiento de cobre.

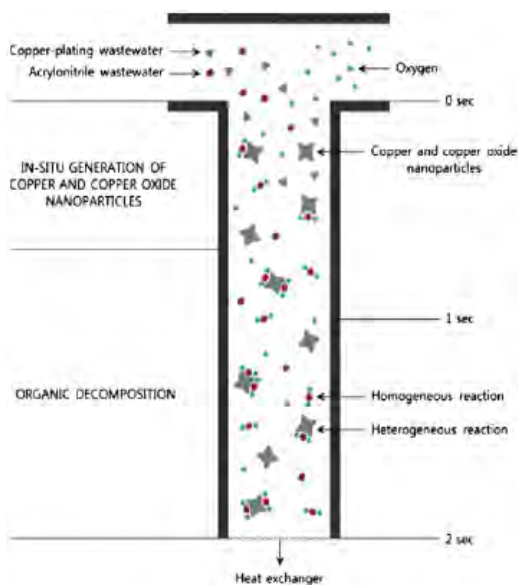


Fig. 2. Ejemplo de reciclado con fluidos supercríticos: aguas residuales del revestimiento de cobre. Se consigue conversión total del carbono orgánico y recuperación del metal.

Se consigue [1], además de sintetizar las nanopartículas y recuperar así el metal, que se oxide el compuesto orgánico y se limpie de este modo el agua residual. Además, esta reacción es exotérmica y proporciona energía suficiente para mantener la temperatura necesaria para la síntesis por sí sola.

4. COMERCIALIZACIÓN

Actualmente estos procesos no son sólo a escala de laboratorio, sino que se ha implantado en industrias a nivel de planta química. Cabe destacar la empresa Hanhwa Chemical, en Korea, que posee industrias para los dos procesos que en este artículo se han destacado [1].

4.1. Síntesis hidrotermal de LiFePO_4

Esta empresa se ha especializado en la síntesis continua en condiciones supercríticas del LiFePO_4 (se presenta fotografía de la planta en la Figura 3), material usado como electrodo en las pilas de litio, sin detectarse impureza alguna.



Fig. 3. Primera planta comercial para la síntesis hidrotermal de LiFePO_4 en condiciones supercríticas.

Durante la síntesis, se efectúa un control que va a determinar el tamaño y la morfología del polvo, de modo que se consigue alcanzar nanopartículas cristalinas con una conductividad óptima. Los resultados son tan efectivos que la estructura conseguida ha sido patentada por esta empresa.

4.2. Reciclado de aguas residuales

Esta misma empresa implantó una industria para el tratamiento de aguas residuales, procedentes de la fabricación de melamina. Esto se implementó primero en condiciones cercanas al punto crítico, y se observó que era posible mejorarse llevándolo a condiciones supercríticas, consiguiendo que su producto se considerase verde. De este modo se obtenía el agua destilada y se recuperaba el amonio y CO_2 en su totalidad. Además, al ser un proceso más eficiente, el coste de tratamiento era menor por lo que se pudo aumentar la operabilidad de la planta y su productividad.

5. CONCLUSIONES

Ambos métodos, síntesis hidrotermal y reciclado, resultan bastante efectivos y pueden suponer un avance para la química verde. Se trata de procesos rápidos y limpios, en los que únicamente se utiliza agua como disolvente y a priori no se producen residuos peligrosos. Además, su

eficiencia podría permitir a las industrias el tratamiento de mayores cantidades.

Desde otro punto de vista, es cierto que se precisa llevar el fluido a condiciones de elevada presión y temperatura, lo cual implica un coste energético. En cada caso concreto, habría que estudiar si a pesar de ello sigue siendo realmente más eficiente que si se realiza el proceso convencional equivalente.

AGRADECIMIENTOS

A Sofía Calero, por darnos a conocer la revista MoleQla y brindar la oportunidad de redactar este artículo científico como actividad incluida en la asignatura de Química Verde.

REFERENCIAS

- [1] A. Tadafumi et al, "Green materials synthesis with supercritical water," *The Royal Society of Chemistry*, 13, pp. 1380-1390, 2011, DOI:10.1039/c1gc15158d.



Cristina Victoria González Fernández cursa actualmente su último año del grado en Ciencias Ambientales en la Universidad Pablo de Olavide.

La química verde desde la perspectiva de los fabricantes farmacéuticos

María José Montes Vega

Resumen— La sociedad americana de química (ACS), el instituto de química verde (GCI) y varias empresas farmacéuticas a nivel mundial, se reunieron en el año 2005 para formar una mesa redonda con el objetivo de integrar en la industria farmacéutica los conceptos de química e ingeniería verde. Elaboraron una lista con las áreas claves de investigación con la intención de mejorar las técnicas de obtención en el futuro.

Palabras Claves— ACS, GCI, Química Verde, Industria Farmacéutica.

1. INTRODUCCIÓN

En el año 2005, la sociedad americana de química, el instituto de química verde y varias empresas farmacéuticas a nivel mundial, se reunieron para formar una mesa redonda con el objetivo de integrar en la industria farmacéutica los conceptos de química e ingeniería verde [1]. Esto se conseguirá a través del descubrimiento, desarrollo y producción de nuevos fármacos, ya que, la industria farmacéutica, no sólo inventa medicinas que nos permitan vivir mejor, durante más tiempo y de una forma más eficiente, sino que lo hacen con un compromiso de sostenibilidad, minimizando los posibles impactos al medio ambiente.

En esta mesa redonda, se recogen una serie de estrategias prioritarias que serán necesarias llevar a cabo [2]:

- Informar e influir en los programas de investigación
- Identificar, diseñar y proporcionar herramientas para la innovación
- Recursos para la educación
- La colaboración global

En primer lugar, informar e influir en los programas de investigación y de este modo, estar implicados en el desarrollo de nuevas oportunidades para obtener productos que se procesen de forma más eficiente, ayudando también a financiar económicamente parte de esa investigación, que va a influir directamente en la industria farmacéutica.

En segundo lugar, identificar, diseñar y proporcionar herramientas para la innovación y ponerlas a disposición de las empresas, minimizándose la duplicación de esfuerzos al compartirlas y centralizar las alternativas.

El tercer punto serían los recursos para la educación, influyendo en cierto modo en la educación de los futuros

líderes farmacéuticos, inculcándoles el valor empresarial y científico de la química verde.

Por último, se destaca la importancia de la colaboración global de todas las empresas farmacéuticas para así facilitar el intercambio de conocimientos entre los miembros [3].

2. PROCESO DE IDENTIFICACIÓN

Una vez definidas las prioridades de la mesa redonda, se pasa a identificar cuáles serían las áreas que deberían ser investigadas para mejorar el futuro empresarial del mundo de la farmacia.

Para ello, se hace una lluvia de ideas por parte de los integrantes de la mesa, que se pueden agrupar en tres bloques principales:

- La investigación de reacciones que se usan habitualmente, pero que sería preferible utilizar otro tipo de reactivos.
- Las reacciones que nos gustaría usar para obtener resultados más simples.
- La disminución del uso de disolventes para así obtener un menor número de productos de desecho finales, así como reemplazar los disolventes apróticos dipolares.

Una vez finalizada la lluvia de ideas, se observa que todos los miembros están de acuerdo en uno de los puntos: la disminución del uso de disolventes y reemplazar los disolventes apróticos dipolares, por lo que directamente pasa a ser dos áreas a investigar. El resto de las ideas se llevan a votación.

En las *Tablas 1 y 2*, que se muestran a continuación, se encuentran los resultados de las votaciones. En rojo se han resaltado los aspectos que se van a investigar debido a que han obtenido la mayoría de los votos.

Reacciones frecuentes pero que son preferibles otros reactivos	
Evitar la formación de amidas en reacciones de baja economía atómica	6 votos
Activación de -OH para sustituciones nucleofílicas	5 votos
Reducciones de amidas sin reacciones hidrogenadas	4 votos
Métodos redox sin usar disolventes clorados	4 votos
Reacciones de Mitsunobu más seguras y respetuosas con el medio ambiente	3 votos
Reacción de Friedel-Crafts en sistemas no activados	2 votos
Nitrificaciones	2 votos

Tabla 1. Resultado tras la votación de las ideas sobre las reacciones frecuentes pero que son preferibles otros reactivos.

Reacciones que nos gustaría usar para simplificar la reacción	
Activación de C-H en aromáticos	6 votos
Aldehído o cetona + NH ₂ + "X" para dar una amina quiral	4 votos
Hidrogenación asimétrica de olefinas/enaminas/iminas no funcionales	4 votos
Nuevos métodos verdes de fluorización	4 votos
Química N-central que evite azidas, hidracinas, etc.	3 votos
Hidraminación asimétrica	2 votos
Fuentes verdes de nitrógeno electrofílico (no TsN ₂ , nitroso, o diimida)	2 votos
Hidrocianuración asimétrica	2 votos

Tabla 2. Resultado tras la votación de las ideas sobre las reacciones que nos gustaría usar para simplificar la reacción.

Por lo tanto, obtendremos doce áreas a investigar con las que se pretende conseguir nuevos métodos y técnicas más sostenibles y que beneficie a la industria farmacéutica al integrar la química verde.

Estas áreas a investigar serían:

- 1) Evitar la formación de amidas que empobrecen la economía del átomo de los reactivos
- 2) Activación de un -OH para sustituirlo por un nucleofílico
- 3) Reducción de amidas sin reacciones hidrogenadas
- 4) Métodos redox sin usar disolventes clorados
- 5) Reacciones de Mitsunobu más "verdes"
- 6) Activación de C-H en aromáticos
- 7) Síntesis asimétrica de aminas a partir de quetonas proquirales
- 8) Hidrogenación asimétrica de olefinas/enaminas/iminas no funcionales
- 9) Nuevos métodos verdes de fluorización
- 10) Química con N-central que evite azidas, hidracinas, etc.
- 11) Reemplazar disolventes apróticos dipolares
- 12) Disminución del disolvente para obtener menos residuos en la reacción

3. CONCLUSIONES

En junio del año 2006, la mesa redonda anuncia en la "10ª Conferencia de Química Verde", en Washington, las doce áreas de investigación, ofreciendo además una serie de becas para que se lleve a cabo el estudio. Un mes después de abrir la convocatoria ya se habían solicitado treinta y dos puestos para investigar sobre ellas.

Como podemos ver, para los miembros de la mesa redonda son muy importantes las ayudas a la investigación, ya que de este modo se aseguran una mejora continua en sus productos.

Para finalizar, resaltar que gracias a ayudas de este tipo se han obtenido grandes avances en los últimos años en el campo de la investigación.

REFERENCIAS

- [1] David J. C. Constable, Peter J. Dunn, John D. Hayler, Guy R. Humphrey, Johnnie L. Leazer, Jr., Russell J. Linderman, Kurt Lorenz, Julie Manley, Bruce A. Pearlman, Andrew Wells, Aleksey Zaks and Tony Y. Zhang, *"Key green chemistry research areas-a perspective from pharmaceutical manufacturers"*, 7- March 2007, The Royal Society of Chemistry.
- [2] www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/industriainnovation/roundtable.html
- [3] www.acs.org/content/dam/acsorg/greenchemistry/industriainnovation/gcipr-informex-2011-pmi-tool.pdf



María José Montes Vega, estudiante de último curso del Grado de Ciencias Ambientales en la Universidad Pablo de Olavide.

HAPs, necesarios pero peligrosos.

Luis Pedro García-San Segundo Jiménez

Resumen— Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y sus derivados (HAPs) son un grupo numeroso de sustancias que se encuentran en el medio ambiente, localizándose con mayor intensidad en las zonas más industrializadas. Existen gran cantidad de productos necesarios hoy día que contienen elevadas concentraciones de HAPs, por ello y debido a su potencial efecto cancerígeno, en este artículo queremos hacer una pequeña recopilación de las características, de las fuentes, de los efectos carcinógenos y de las medidas preventivas que se están llevando a cabo en algunas zonas de nuestro país.

Palabras Claves— Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), genotóxico, carcinogenicidad, prevención, posibles soluciones.



1. INTRODUCCIÓN

Los HAPs son compuestos formados por varios anillos bencénicos unidos. Son lipofílicos y se degradan con la luz [1].

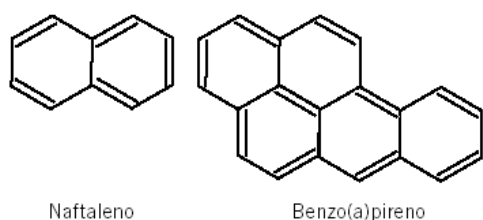


Fig. 1 Estructura química del naftaleno y el benzopireno

2. GENERACIÓN DE LOS HAPs

2.1. Combustión incompleta de la materia orgánica

Se forman principalmente por la combustión incompleta de la materia orgánica y en diversos procesos industriales. Se liberan de la zona de combustión en forma de vapores, condensándose la mayoría de ellos sobre partículas de hollín, produciéndose su diseminación en forma de aerosoles que pueden ser transportados a grandes distancias por los vientos [1].

2.2. Descarga de plantas industriales o tratamiento de aguas residuales

También se pueden encontrar en las aguas de superficie por descarga de plantas industriales o tratamiento de aguas residuales y pueden ser liberados a los suelos. Su degradación puede tardar meses, llevándose a cabo por microorganismos principalmente. En los seres vivos, por su carácter lipofílico, tienen gran afinidad por los tejidos pero no hay incremento de sus niveles en la cadena trófica [2].

3. PRINCIPALES HAPs Y FUENTES DE PROCEDENCIA

Los principales HAPs son mezclas complejas, existiendo más de 100 clases diferentes de HAPs, de entre los cuales se han detectado como genotóxicos y carcinogénicos un grupo de 16 como son el naftaleno, benzopireno o fenantreno [3].

Las fuentes principales de HAPs son los coches, los aviones, los barcos, las industrias del petróleo[Fig.2], el asfalto de las carreteras, los incendios forestales, las erupciones volcánicas, el humo del tabaco, los alimentos ahumados o a la barbacoa y los aceites de origen vegetal refinados entre otros [4].

Entre los productos que contienen HAPs se encuentran el coque, la hulla, el alquitrán, la brea, la creosota, el betún, el asfalto, el negro de carbón y el hollín.



Fig. 2 Planta Petrolífera

4. USOS Y APLICACIONES DE LOS HAPs

Los HAPs tienen importantes usos por ejemplo el fenantreno, que se usa para la fabricación de colorantes y explosivos; el antraceno se usa para fabricación de colorantes rápidos y producción de fibras sintéticas, plásticos y monocristales o el fluoranteno, usado para el revestimiento interior de tuberías de acero [2].

5. RELACIÓN CON LA SALUD HUMANA

En cuanto a la relación que tienen los HAPs con la salud, según el Atlas Municipal de Mortalidad por Cáncer en España [5], se observa que los lugares más industrializados son los que presentan mayor número de casos por cáncer [Fig. 3].

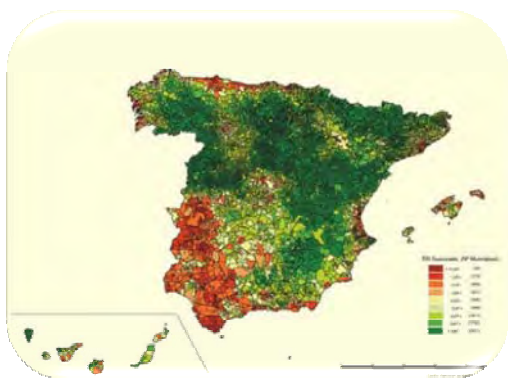


Fig. 3 Mapa de mortalidad por cáncer en España.
(Atlas Municipal de Mortalidad por Cáncer en España)

Según el Doctor Gonzalo López Abente, uno de los responsables del estudio, "los genes no explican estos patrones de distribución, sino que parecen seguir el patrón de industrialización" [6].

En el mapa [Fig.3] se observa como en zonas como en Huelva o el Campo de Gibraltar el índice de personas afectadas es mayor que en zonas no industrializadas.

El primer precedente histórico estudiado que relacionaba los HAPs con el cáncer fue el descubierto en 1775 por el médico británico Percival Pott, que observó una prevalencia anormalmente elevada entre los deshollinadores y el cáncer de piel del escroto, cáncer que no se daba en otros pacientes [2]. A partir de aquí se fueron sucediendo estudios sobre cáncer en determinados grupos de población relacionados con la industria del petróleo y del carbón.

Las vías de exposición a los HAPs son varias: la vía inhalatoria mediante aire contaminado o humo de tabaco, la vía digestiva por alimentos ahumados o a la barbacoa y la vía dérmica por contacto con partículas contaminadas [2].

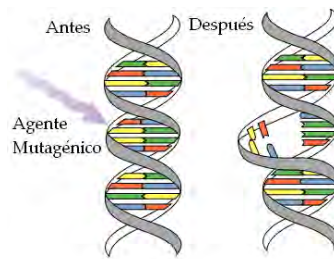


Fig. 4 Mutación en el ADN

El mecanismo propuesto para la carcinogenicidad por exposición ambiental a los HAPs considera que las enzimas de hidroxilación presentes en el ser humano activan los HAPs formando un carcinógeno activo, que formará enlaces covalentes o puentes con los ácidos nucleicos (ADN), dando lugar a la aparición de mutaciones [Fig.4], que tendrán una mayor probabilidad de aparecer cuando haya una predisposición genética [7].

7. PREVENCIÓN Y POSIBLES SOLUCIONES

Para prevenir y paliar los efectos nocivos de los HAPs, tanto los gobiernos como las industrias, están llevando a cabo políticas de remediación, que se han organizado en tres áreas:

-**Aspectos organizativos y tecnológicos**, como medidas de seguridad y de organización e inspecciones para evitar riesgos, así como formación de los trabajadores.

-**Higiene industrial** como ventilación, protección personal, protección y revisión de equipos y controles técnicos.

-**Monitorización de las exposiciones** mediante medición de los HAPs en el ambiente o controles biológicos mediante recogida de muestras de determinados individuos [2,8].

Por parte de la Junta de Andalucía se han elaborado una serie de Planes de Actuación en las Zonas Industriales, como el de Huelva, que integraría una serie de actuaciones como la medición, inspección y reducción de emisiones, guías de buenas prácticas para el manejo de sustancias nocivas, mediciones de la calidad del aire, mejora de infraestructuras, control del tráfico rodado o sensibilización de la población [8].

Otro ejemplo de tales políticas se pone de manifiesto en el Campo de Gibraltar, donde a pesar de haber un núcleo industrial muy grande, se ha observado en los últimos años mediante mediciones de los HAPs volátiles, que sus niveles se han reducido. También se ha detectado una cierta influencia de variables como la temperatura y la velocidad del viento en las concentraciones de HAPs [9].

8. Conclusión

Los HAPs son unos compuestos abundantes en nuestro medio ambiente y su producción es inevitable debido al sistema de vida que llevamos. Se ha demostrado que algunos de ellos son cancerígenos y parece existir un futuro negro sobre este tema, pero gracias a la mayor concienciación de la sociedad por el medioambiente, la aplicación de nuevas tecnologías, los avances en vigilancia ambiental, la detección y control de la exposición de estos hidrocarburos, las medidas en la salud laboral y seguridad industrial que se están implementando en nuestro país, el esfuerzo que están haciendo los gobiernos y las industrias para mejorar la calidad de nuestro medio, así como los avances médicos y tecnológicos, se ha conseguido que las emisiones totales de HAPs hayan empezado a disminuir.

Debemos ser optimistas y pensar que si se sigue así, se conseguirá controlar este problema como ocurrió con el "Amianto" anteriormente.



Luis Pedro García-San Segundo Jiménez cursa actualmente primero de Grado de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide. Realizó el Bachillerato con Matrícula de Honor en el Insituto Menéndez Tolosa en La Línea de la Concepción, Cádiz. Realizó las Pruebas de Acceso a la Universidad en el mismo municipio y se trasladó a Sevilla para proseguir con sus estudios.

REFERENCIAS

- [1] www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v39n1/v39n1a06.pdf
- [2] www.ugt.es/saludlaboral/Hidrocarburos.pdf
- [3] [www.gencat.cat/salut/acsa/html / es/dir1593/.../ edt2008es-cap4.pdf](http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir1593/.../edt2008es-cap4.pdf)Gibraltar
- [4] pagines.uab.cat/tox/sites/pagines.uab.cat/tox/files/PAHacte.pdf
- [5] Atlas de Mortalidad por cáncer y otras causas en España 1978-1992. Ministerio de Sanidad. Instituto de Salud Carlos III [www.iscii.es/Instituto de Salud Carlos III /Servicios Científico-técnicos](http://www.iscii.es/Instituto%20de%20Salud%20Carlos%20III/Servicios%20Científico-técnicos)
- [6] www.fondosaludambiental.org/?q=node/264
- [7] <http://www.elmedicointeractivo.com/ap1/emiold/aula2001/tema4/cancer3.php>
- [8] http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal_web/web/tmas_ambientales/planificacion_ambiental/Planes/Prevencion_y_calidad_ambiental/plan_calidad_huelva_2010_15/documento_pcahe2010_2015.pdf
- [9] Resumen del último informe del CSIC sobre la calidad ambiental del Campo de Gibraltar

La catástrofe medioambiental del petrolero *Exxon Valdez*

Marina Rebollo Amaya

Resumen— La catástrofe que provocó el accidente del buque petrolero *Exxon Valdez* en 1989 en las costas de Alaska es uno de los casos de vertido de petróleo crudo más grave que se han producido hasta la fecha. Tuvo dramáticas consecuencias tanto para la flora como la fauna de este ecosistema, afectando en gran medida a la actividad económica de la zona, eminentemente pesquera. Se emplearon numerosas técnicas de limpieza que incluyen métodos mecánicos, químicos y biológicos. Aunque entre el año 1989 y 1992 se consiguió eliminar la mayor parte del vertido, actualmente, continúan encontrándose sitios con niveles moderados o altos del mismo que siguen afectando a los seres vivos allí presentes.

Palabras Claves— Exxon Valdez, vertido, hidrocarburos, dispersantes químicos, Corexit.

1. INTRODUCCIÓN

El buque petrolero *Exxon Valdez* encalló en la bahía Prince William Sound (Alaska) el 24 de marzo de 1989. Este accidente provocó la liberación al océano Pacífico de aproximadamente 42 millones de litros de petróleo crudo, unas 37.000 toneladas de petróleo. Debido a las condiciones climatológicas de la zona y a las importantes cantidades de hidrocarburos vertidas, el residuo se extendió rápidamente a lo largo de más de 2000 kilómetros de costas (Figura 1) [1-6].

Históricamente, el petrolero partió desde el puerto Valdez (Alaska) llevando consigo 200.962.720 litros de petróleo crudo y con destino Long Beach (California). La ruta de navegación del buque se desvió al sur debido a la acumulación de icebergs y eso provocó su encallamiento en el arrecife de la bahía Prince William Sound.

Las consecuencias para la flora y fauna de la zona fueron dramáticas. Se contabilizó la muerte de un gran

número de especies animales y vegetales. Muchas de estas especies, actualmente, se encuentran en peligro de extinción. Entre ellas, destacan los daños que sufrieron especies animales como el arenque y el salmón rosado que son muy importantes para la economía del país [1,5-6].

2. ¿POR QUÉ FUERON TAN GRAVES LAS CONSECUENCIAS?

El accidente del *Exxon Valdez* se considera hasta la fecha la catástrofe petrolera más grave que ha sufrido Estados Unidos. Cuando se produce un nuevo accidente petrolero, en cualquier zona geográfica, sus daños para la flora y fauna se comparan con los del Exxon Valdez por su magnitud [1,4,7]. Los principales motivos por los que resultaron tan perjudiciales son los siguientes:

- Se liberaron cantidades muy importantes de petróleo crudo al océano Pacífico y, esto, unido a las adversas condiciones climatológicas de la zona aumentaron mucho la dispersión del vertido a lo largo de las costas [1,4,7].
- Transcurrieron más de 72 horas antes de empezar a tomar las medidas de contención y limpieza adecuadas. Por lo que, cuando comenzó a actuarse, ya era imposible minimizar los daños que se acabaron produciendo en el ecosistema [7].

3. TÉCNICAS DE LIMPIEZA QUE SE LLEVARON A CABO

En este caso, se emplearon métodos de limpieza mecánicos, químicos y biológicos. Algunos de ellos solamente se utilizaron en pruebas controladas y no terminaron usándose a gran escala [1-2,5,7-8]. Dentro de las técnicas que se utilizaron destacan las siguientes:

Se emplearon barreras de contención mecánica para frenar el avance del vertido hacia las costas. Los resultados fueron buenos pero, debido al difícil clima y a la gran expansión que se había producido ya del petróleo,

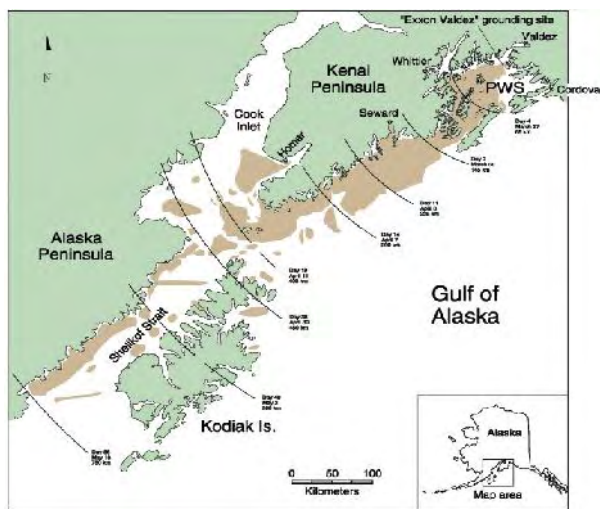


Fig. 1. Expansión del vertido a lo largo de las costas. Imagen adaptada de *The Exxon Valdez Oil Spill* [1]

no se utilizó este método a gran escala.

La Compañía Exxon propuso el empleo de dispersantes químicos como método de limpieza química. Planearon la dispersión de Corexit, que consiste en una mezcla de surfactantes de tipo éster con solventes oxigenados, alcohol isopropílico y agua, sobre la superficie del océano. Hubo una fuerte oposición por parte del Departamento de Conservación de Alaska (ADEC) que decía que los dispersantes empujaban el petróleo hacia las profundidades donde seguía intoxicando a los seres vivos y solamente lo eliminaban de la superficie.

Aun así, el gobierno autorizó una prueba controlada donde se liberó este dispersante sobre la superficie del océano. Sin embargo, los resultados no fueron tan positivos como se esperaba y tampoco demostraban que no resultase tóxico para la flora, la fauna y para los trabajadores que lo manipulaban, por lo que finalmente no se aprobó su utilización a gran escala.

Una de las principales prioridades en los días siguientes al derrame fue trasladar la mayor parte de la carga del buque, que aun se encontraba en su interior, a otro buque petrolero para evitar que continuase liberándose el crudo. De esta forma, se consiguió trasladar el 80% de la carga inicial que se encontraba en el petrolero *Exxon Valdez* y, únicamente, se vertió el 20% restante que aun así fue el peor vertido de petróleo hasta la fecha en EEUU (Figura 2) [1].



Fig. 2. Traslado de la carga del *Exxon Valdez*. Imagen adaptada de *The Exxon Valdez Oil Spill* [1]

La principal técnica de limpieza mecánica que se empleó fue el uso de bombas extractoras o skimmers. El fundamento de esta técnica consiste en succionar el agua que contiene partículas flotantes de hidrocarburos y hacerla pasar a través de un elemento rotatorio, que puede ser un disco o tambor, previamente tratado con una sustancia de alta afinidad por estas moléculas

hidrófobas. De esta forma, las partículas que lleva el agua contaminada quedan adheridas a dicho elemento y lo que se obtiene al otro lado del mismo es agua limpia.

También se llevó a cabo la quema controlada del petróleo en las zonas más cercanas a las costas. Para ello, se aislaron partes del vertido con material resistente al fuego y se quemó el fuel contenido en su interior. Los resultados de varias pruebas controladas fueron muy exitosos y se logró en algunas de ellas una reducción de 100.000 litros de petróleo a 1.000 litros. Sin embargo, debido al mal tiempo climatológico y a lo difícil que era aislar el fuel que se iba a quemar para que no se extendiese a las zonas fuera de la contención no se intentó a gran escala este método (Figura 3) [1].



Fig. 3. Quema controlada del petróleo. Imagen adaptada de *The Exxon Valdez Oil Spill* [1]

La biorremediación como método de descontaminación biológico aportó importantes beneficios. El principal impedimento para el crecimiento de los microorganismos degradadores de hidrocarburos era la limitación de nitrógeno y fósforo presente en el océano. Para solventar este problema, se emplearon fertilizantes como Inipol EAP22 y Customblen que aportaban todos los nutrientes que necesitaban los microorganismos para degradar el petróleo como fuente de carbono [2,5].

Otra de las técnicas de limpieza mecánica que se llevaron a cabo en este accidente petrolero fue la limpieza de costas mediante mangueras de agua a presión a altas temperaturas, llegando a alcanzar incluso los 60°C. Con este método se consiguieron eliminar fracciones significativas de residuo que se encontraban adheridas a rocas y sedimentos pero, debido a la agresividad del método empleado, muchas zonas se vieron más perjudicadas por la propia técnica de limpieza que por la acumulación de hidrocarburos (Figura 4) [7].

4. CONCLUSIONES

En el año 1992 concluyeron oficialmente las tareas de limpieza del vertido del petrolero *Exxon Valdez*. Aunque todavía quedaban zonas costeras afectadas por el residuo se determinó que ninguna medida de limpieza aportaría a esa fecha una mejora neta para el ecosistema, por lo que los métodos anteriormente empleados se llevaron a cabo entre los años 1989 y 1992 [1-2,4,7].



Fig. 4. Limpieza mecánica de las costas. Imagen adaptada de *The Exxon Valdez Oil Spill* [1]

Entre los años 2001 y 2003 se tomaron muestras aleatoriamente en diferentes zonas que se habían visto afectadas por el vertido en mayor o menor medida para determinar cuanto del residuo permanecía en ellas y cuanto se había retirado con las técnicas de limpieza y el paso del tiempo. Estos estudios encontraron que, aproximadamente en un 97.8% de las muestras analizadas, había una completa eliminación del residuo o niveles muy bajos del mismo. Por tanto, se estimó que desde el año 1989 hasta el año 2001 había ido disminuyendo un 22% el residuo cada año [1,7].

Después del año 2001, se continuaron tomando muestras hasta el 2007 y se determinó que en un 71% de ellas no se encontraban restos del vertido, en un 21,8% de ellas había niveles muy bajos de residuo y en poco más del 4.6% de las muestras había niveles moderados o altos de residuo después de todo ese tiempo transcurrido. Estos datos indican que a partir del año 2001 solamente había ido descendiendo un 4% el residuo cada año. Lo cual es lógico ya que lo primero que desaparece son las fracciones más biodegradables del petróleo, quedando actualmente las fracciones más persistentes y recalcitrantes, de ahí que su reducción sea cada vez más lenta [1,7].

Además, se ha mejorado y avanzado mucho desde este accidente petrolero en cuanto a las técnicas de limpieza y contención y a los equipos empleados para ello. De hecho, se ha aprendido de los errores cometidos en dicho caso como el periodo de tiempo que se dejó transcurrir antes de actuar y la descordinación que se produjo entre las agencias y compañías que proponían los métodos de actuación y quienes tenían finalmente que aprobarlos [2].

REFERENCIAS

- [1] Rice SD, Short JW, Carls MG, Moles A, Spies RB. Chapter 5 - The Exxon Valdez Oil Spill. In: Spies RB, editor. Long-term Ecological Change in the Northern Gulf of Alaska Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 419-520.
- [2] Atlas RM, Hazen TC. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. history. *Environ Sci Technol* 2011 Aug 15;45(16):6709-6715.
- [3] Bence AE, Page DS, Boehm PD. 15 - Advances in forensic techniques for petroleum hydrocarbons: The Exxon Valdez experience. In: Wang Z, Stout SA, editors. *Oil Spill Environmental Forensics* Burlington: Academic Press; 2007. p. 449-487.
- [4] Irvine GV, Mann DH, Short JW. Persistence of 10-year old Exxon Valdez oil on Gulf of Alaska beaches: The importance of boulder-armoring. *Mar Pollut Bull* 2006 9;52(9):1011-1022.
- [5] José Luis Rodríguez Gallego. La biorremediación frente al vertido del Exxon Valdez. Universidad de Oviedo.
- [6] Nyman JA, Klerks PL, Bhattacharyya S. Effects of chemical additives on hydrocarbon disappearance and biodegradation in freshwater marsh microcosms. *Environ Pollut* 2007 Sep;149(2):227-238.
- [7] T/V EXXON VALDEZ OIL SPILL. Federal On Scene Coordinator's Report. Volume I. United States Coast Guard. Department of transportation. 1993
- [8] Dan Gilson. Report on the Non-Mechanical Response for the T/V Exxon Valdez Oil Spill. Submitted for the Oil Spill Prevention and Response Committee (OSPR) of the Prince William Sound Regional Citizens' Advisory Council. 2006



Marina Rebollo Amaya, licenciada en Biotecnología por la Universidad Pablo de Olavide en 2013. Actualmente, alumna del máster oficial de Biotecnología Ambiental, Industrial y Alimentaria en la Universidad Pablo de Olavide.

¿Alimentar a personas o envenenarlas?

Cristina Agabo García

Resumen—Debido a la sobrefertilización con nitratos de suelos en la agricultura en ocasiones ingerimos grandes cantidades de los mismos sin darnos cuenta. Los nitratos se convierten en nuestro organismo en nitritos, compuestos nocivos para nuestra salud causantes de la enfermedad de metahemoglobinemia adquirida o de posibles tumores. Un correcto protocolo de fertilización contribuye al control de la presencia de nitratos a niveles no contaminantes en acuíferos y aguas destinadas al consumo humano.

Palabras Claves—Nitrato, Contaminación, Desnitrificación, metahemoglobina, metahemoglobinemia, *N*-nitrosocompuestos.

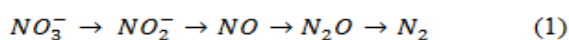
1. INTRODUCCIÓN

Se estima que la población mundial aumente en más de un tercio entre 2009 y 2050 [1]. Esto obliga a un aumento en la producción agraria para un buen abastecimiento alimenticio. Una de las causas que hacen posible el incremento del rendimiento de los cultivos en nuestros días es el uso de fertilizantes. La mayoría de fertilizantes contienen tres elementos esenciales para el buen crecimiento de las plantas: el fósforo, el nitrógeno y el potasio [2]. Dependiendo del estado del terreno se requieren unas proporciones u otras de estos nutrientes aunque por norma general se necesita mayor cantidad de nitrógeno que del resto. Sabiendo esto, muchos agricultores “sobrefertilizan” los suelos con elevadas cantidades de nitrógeno sobre todo con el uso de nitratos [3]. A pesar de ello, las plantas sólo pueden aprovechar el 50% del nitrógeno aportado, lo que supone un exceso de nitratos que se elimina del suelo generalmente cuando es barrido por el agua y es filtrado hacia el subsuelo, llegando a los acuíferos, ríos y embalses, y contaminando, por tanto, las aguas destinadas a consumo humano [4].

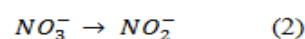
2. DESNITRIFICACIÓN

Los nitratos (NO_3^-) son compuestos iónicos que se encuentran en la naturaleza, formando parte del ciclo del nitrógeno. Son la forma más estable de las estructuras oxidadas del nitrógeno, y a pesar de su baja reactividad química, pueden ser reducidos por acción microbiológica a través de un proceso denominado desnitrificación. La desnitrificación ocurre por acción de bacterias desnitrificantes. Éstas son microorganismos que transfieren equivalentes redox procedentes de la oxidación de una fuente de carbono (organismos heterótrofos) o fuentes inorgánicas (organismos autótrofos) hacia un óxido de nitrógeno en condiciones de falta de oxígeno o anaerobias.

La desnitrificación completa transforma el nitrato a nitrógeno gas de la siguiente forma:



Esta reacción puede ocurrir en el suelo por acción de las distintas bacterias que lo pueblan [5] o también de forma parcial en nuestro organismo por las bacterias colonizadoras del intestino. En este caso se da una reducción incompleta de forma que el nitrato se convierte en nitrito que puede ser absorbido y pasar al torrente sanguíneo [6]:



De esta forma un consumo continuo de agua rica en nitrato puede derivar en el aumento de la concentración en sangre de nitrito que tiene dos consecuencias serias para nuestra salud: la conocida como el síndrome del bebé azul y la formación de *N*-nitrosocompuestos con efectos cancerígenos [7].

2. EFECTOS DEL NITRITO PARA NUESTRA SALUD

2.1. Metahemoglobinemia o síndrome del bebé azul.

La hemoglobina es una proteína sanguínea formada por cuatro cadenas polipeptídicas unidas por un grupo hemo. El grupo hemo lo forman cuatro grupos pirroles y un ión ferroso (Fe^{2+}). Este átomo de hierro es capaz de unir de forma reversible una molécula de oxígeno de forma que lo transporta a través del torrente sanguíneo y lo libera en los diferentes órganos y tejidos.

La molécula de nitrito cuando pasa a la sangre actúa como oxidante aceptando electrones del átomo de hierro (Fe^{2+}) del grupo hemo de la hemoglobina. Por tanto el ión de Fe^{2+} al oxidarse se transforma en Fe^{3+} y da lugar a metahemoglobina.

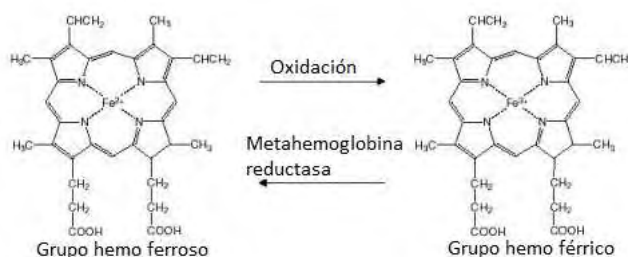


Figura 1. Proceso de oxido-reducción de la hemoglobina.

Esta forma tiene una mayor afinidad por el oxígeno, por lo que se dificulta su liberación en los tejidos reduciendo la oxigenación de los mismos lo que culmina en una coloración cianótica (azul) en ciertas zonas de la piel [8]. A esta enfermedad se le denomina metahemoglobinemia adquirida y afecta sobre todo a niños menores de seis meses provocando una acidosis metabólica que provoca diarrea y deshidratación.

Los niños con ese tiempo de vida son más susceptibles a padecer metahemoglobinemia debido al pH elevado de su principiante intestino que promueve el crecimiento de los organismos que convierten los nitratos en nitritos y presentan niveles más bajos de citocromo-b reductasa (enzima encargada de la conversión de la metahemoglobina en hemoglobina) de los eritrocitos. Además de los casos de metahemoglobinemia adquirida por envenenamiento con nitratos u otros compuestos en altas cantidades, la metahemoglobinemia también puede tener causas genéticas [9].



a. b.
Figura 2. Dos ejemplos de cianosis. a)

Fotografía de bebé cianótico por metahemoglobinemia adquirida.

Hospital San Bartolomé de Londres [6]; b)

Fotografía de la Familia Fulgate con cianosis congénita. Llevaban una vida aislada en las Montañas Apalache y tendían a relacionarse entre ellos favoreciendo la extensión de la enfermedad [7].

2.2. Efectos nocivos de los N-nitrosocompuestos

Otro de los efectos nocivos de la presencia de nitratos en nuestro organismo es la producción endógena de N-nitrosocompuestos. Éstos son agentes teratógenos y mutágenos que se forman por la reacción de las aminas secundarias (aromáticas y alifáticas) con el ácido nitroso de la siguiente forma:

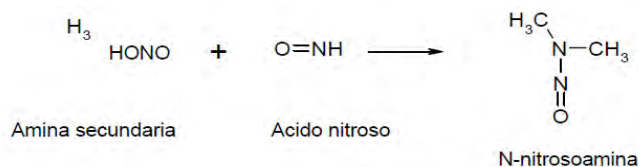


Figura 3. Reacción de formación de las N-nitrosaminas [10].

La formación endógena de N-nitrosocompuestos comienza en la boca donde los microorganismos pobladores de las cavidades bucales transforman los nitratos en nitritos.

En ciertas ocasiones estos nitritos pueden oxidarse en el estómago dando lugar a agentes nitrosantes (N_2O_3 , N_2O_4). Estas moléculas reaccionan con componentes habituales de nuestras dietas como: aminas secundarias (presentes en carnes, pescados, huevos, etc) precursores naturales en los alimentos (como ciertos aminoácidos), alcaloides presentes en especias que se emplean para curar carnes (pimienta negra), o bien otros precursores que aparecen en los alimentos como contaminantes (plaguicidas, aditivos o medicamentos) originando N-nitrosocompuestos con diferentes estructuras.

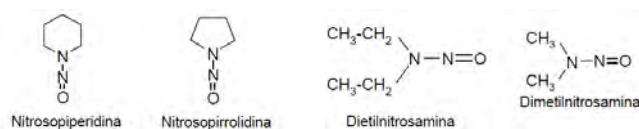


Figura 4. Diferentes representaciones de N-nitrosocompuestos.

Algunos estudios *in vitro* demuestran que la nitrosación produce cantidades suficientes de N-nitrosocompuestos como para representar un peligro significativo en nuestra salud [11]. Algunos de estos compuestos son realmente tóxicos como por ejemplo las nitrosaminas que pueden llegar a producir cánceres hepáticos y, con menor frecuencia, también de pulmón, estómago, riñones, esófago y páncreas [4].

3. CONTROLAR EL EXCESO DE NITRATOS

Debido a esta problemática el gobierno español, en aplicación de las directivas europeas, ha designado algunas zonas de cultivo como vulnerables (Figura 5) de ser contaminadas en sus acuíferos y han elaborado un plan de actuación para evitar la contaminación de sus acuíferos.

Figura 5. Acuíferos contaminados por nitratos en la Península Ibérica.



Este plan, relativo a la protección de aguas contra la contaminación producida por nitratos, recogido en la directiva europea 91/676/CEE, tiene en cuenta factores como la presencia de explotaciones ganaderas intensivas o los períodos de fertilización. Además aporta hojas de control de fertilización, fertirrigación nitrogenada y, en su caso, de producción y utilización de estiércoles y purines [12].

4. CONCLUSIONES

Las contaminaciones por exceso de nitratos producen efectos nocivos para nuestra salud como envenenamiento de la sangre por metahemoglobina y/o generación de agentes que inducen la aparición de tumores en diferentes órganos y tejidos. Por ello, un control previo del contenido en nitratos de los fertilizantes y aguas de regadío así como un protocolo de buenas prácticas de fertilización son necesarios para evitar contaminaciones por exceso de nitratos. Además en zonas vulnerables nitrato-contaminadas se deben hacer análisis continuos de tierra, agua. Es por ello por lo que la unión europea está subvencionando diversos proyectos destinados a obtener un mejor conocimiento del impacto de las actividades agrícola-ganaderas en la contaminación de las aguas continentales, tanto superficiales como subterráneas por nitratos, y así definir y promover buenas prácticas y herramientas que contribuyan a la prevención y reducción de esta fuente de contaminación [13].

- [12] Web de la Junta de Andalucía. Conserjería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/cocow/cumplir_vulnerables.html
- [13] Web Instrumentos Financieros Life de la comunidad Europea. <http://www.life-nitratos.eu/index.php/es/proyecto-life-nitratos>



Cristina Agabo García. Recibió el título de Licenciada en Biotecnología por la Universidad de Pablo de Olavide (Sevilla) en 2013, y actualmente es estudiante del máster de Biotecnología Ambiental, Industrial y Alimentaria en la misma universidad.

REFERENCIAS

- [1] Web de la FAO (Food and Agriculture Organization) . http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/Issues_papers_SP/La_agricultura_mundial.pdf Roma, 12-13 Octubre 2009
- [2] "Nitrogen Fertilizer. Part 1, Section 2: Soil Fertility Management. Crop and Soil Management". *Penn State Extension. Colleges of Agricultural Science*, 2014.
- [3] B. Nolthe., "Nitrogen From Fertilizers" *Chematters*, April 2010
- [4] Web del CRIE (Centro Rural de Información Europea) *Promoción de buenas prácticas agrarias encaminadas a evitar la contaminación del agua.* <http://www.crie.uji.es/agua/>
- [5] W.G. Zumft, "Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 61, No. 4, pp. 533-616, Dec. 1997,
- [6] Roger P. Smith, "The Blue Baby Syndrome", *American Scientist* (Reprint) Vol. 97, pp. 94-96, Mar-Apr 2009
- [7] M.A. Fernández Carrillo, A. Soria Alfonso "La Contaminación de las aguas por nitratos procedentes de fuentes de origen agrario" *CompoRapid*. Dirección General de Industria Agroalimentaria y Capacitación Agraria. Servicio de Formación y Transferencia Tecnológica Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Consejería de Agricultura y Agua, 2011.
- [8] L. Knobeloch et al. "Blue Babies and Nitrate-Contaminated Well Water", *Environ Health Perspect* Vol.108, No. 7, pp:675-678 (2000). [Online 6 June 2000].
- [9] H.U.Rehman, "Methemoglobinemia" *West J Med* Vol. 175:193-196, 2001.
- [10] Web de blogs Wordpress.com <http://kentuckybluepeople.wordpress.com/the-fugate-family-paige-disponette/>
- [11] A. Antón, J. Lizaso "Nitritos, nitratos y nitrosaminas". *Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria Comunicación Personal* 255, Inscripción 1ª, Tomo XXX, pp: 1-25, 2001.

La EDXRF, caracterización de pigmentos presentes en obras pictóricas desde el siglo XVI hasta el XX

Jorgelina Carballo Martínez

Resumen— El conocimiento artístico y material de las obras de arte es una premisa esencial para realizar acciones de conservación y restauración. Sobre la actuación de exámenes y análisis científicos no destructivos podemos conocer los materiales y las características técnicas específicas de obras u objetos de interés histórico-artístico. Este artículo es un resumen de la aplicación e importancia que tuvo la espectrometría de fluorescencia de rayos X dispersiva en energía, en el estudio de los pigmentos presentes en un conjunto de obras correspondientes a pintores portugueses, estando esta investigación encuadrada dentro del proyecto “*Materiais e técnicas dos pintores do norte de Portugal*” llevado a cabo por la Escuela de las Artes, de la Universidad Católica Portuguesa, en Oporto, Portugal. El estudio de pigmentos y su disposición en las obras permitió conocer las técnicas y materiales usados por los artistas portugueses del norte del país en diferentes épocas históricas, así como servir de base para procesos de autenticación, bases de datos y futuros trabajos de investigación.

Palabras Claves— Pigmentos, EDXRF, pintores portugueses, análisis no destructivos.



1. INTRODUCCIÓN

EL desarrollo de técnicas analíticas no invasivas para el estudio de obras patrimoniales, se ha desarrollado desde las últimas décadas del siglo pasado, con el progreso de los microcomponentes, que hacen más factible el empleo de sistemas portátiles de análisis. Una de las técnicas físico-químicas que ha evolucionado en cuanto al empleo de equipos portátiles es la espectrometría de fluorescencia de rayos X dispersiva en energía (EDXRF), con el uso de fuentes de rayos X y detectores semiconductores termoeléctricamente refrigerados de pequeño formato y buenas prestaciones [1]. La importancia de realizar análisis “in situ” y sin toma de muestra, con una rápida respuesta, ha hecho que sea una técnica puntera en la caracterización multielemental de materiales pictóricos y arqueológicos.

El presente trabajo se basa en una investigación llevada a cabo por el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de las Artes (CITAR) de la Universidad Católica Portuguesa (UCP), dentro del proyecto “Materiales y técnicas de los pintores del norte de Portugal” (MTPNP) [2], donde la EDXRF fue una herramienta esencial en el estudio material de varias obras patrimoniales, de carácter colectivo y privado. El proyecto contó con nueve líneas de actuación, que abarcan el estudio de colecciones públicas presentes en museos, instituciones municipales, como las de Aurelia de Sousa, Abel Salazar, Francisco José Resende y privadas localizadas en fundaciones, iglesias, galerías, casas de particulares etc., como las del Marqués de Oliveira, Júlio Pomar, Pedro Cabrita Reis, entre otras, y obras singulares como el tríptico de Pentecostés de la iglesia S. Pedro de Miragaia, que barren un amplio período de tiempo, pasando por obras renacentistas hasta obras con-

temporáneas. Uno de los objetivos fundamentales fue caracterizar por EDXRF gran parte de la paleta cromática de los pintores, conocer las tendencias de la época para obras de grande y pequeño formato de tipologías diferentes y comprender las causas del estado de alteración cromática en algunas obras. Esta técnica instrumental, de igual forma, sirvió de apoyo para la toma de micromuestras, con el fin de complementar los estudios de cargas y pigmentos de difícil caracterización.

2. DESCRIPCIÓN EXPERIMENTAL

Para la identificación de pigmentos se utilizó un espectrómetro portátil de rayos X por dispersión de energía, integrado por: un tubo de rayos X con ánodo de plata; detector Si-PIN de AMPTEK, refrigerado por efecto Peltier, área activa 7 mm², con 7 μm de espesor de ventana de berilio y 180 eV de resolución energética [FWHM]; colimador de aluminio de 5 mm de diámetro; sistema de adquisición multicanal MCA Pocket 8000^a de AMPTEK.

Casi todas las obras fueron analizadas “in situ”, siendo una de las ventajas del espectrómetro portátil, la posibilidad de desplazamiento del equipo hacia el recinto del objeto u obra de arte. Otras obras que precisaban de ser conservadas o restauradas fueron estudiadas en el Centro de Conservación y Restauración (CCR) de la UCP (Figura 1), sirviendo la FRX de base científica para una correcta intervención.

El análisis multielemental se realizó de forma cualitativa y los espectros adquiridos fueron normalizados al número total de cuentas del espectro con el fin de comparar entre obras de un mismo artista y/o época de ejecución.

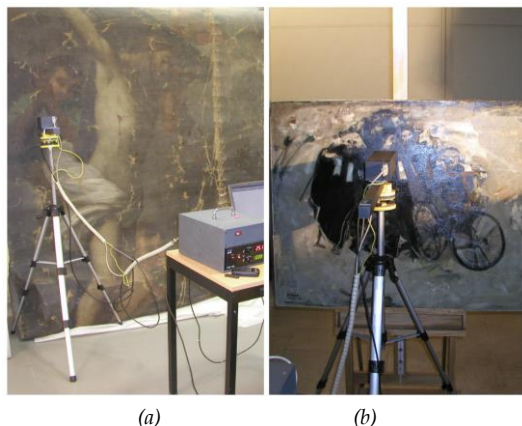


Fig. 1. Obras analizadas por EDXRF. (a) Obra de João Glama Stoberlle, pintura de altar, óleo sobre tela analizada en el CCR (b) Obra de Julio Pomar "Cegos de Madrid", óleo sobre tela 1957, analizada "in situ" Fundación Calouste Gulbenkian

3. RESULTADOS

En todas las obras se siguió la misma metodología de análisis, se seleccionaron tres áreas de un mismo color para obtener datos sobre la forma de aplicación de los pigmentos y por consiguiente poder comparar los resultados entre obras de un mismo artista, época o tendencia pictórica. Como la técnica EDXRF es superficial, debido a la atenuación que sufren los rayos X al atravesar el medio material, solo se detectan aquellos elementos que se encuentran a pocas micras de espesor (aproximadamente $30 \mu\text{m}$), dependiendo de las características del detector y de la matriz en que se encuentran los elementos. Por esta razón la comparación entre obras de diferentes artistas se realizó solo de forma cualitativa.

La detección de los elementos químicos para la identificación de los pigmentos se efectuó partiendo de la determinación de las líneas K de fluorescencia de los elementos con número atómico superior a 16, a partir del S, siendo estos: Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Se, Sr y las líneas L de fluorescencia del Ba, Pb, Cd, Hg y Sn.

Las obras pertenecientes al periodo del siglo XV al XVIII presentan los mismos pigmentos, variando en la forma de aplicación, donde algunos artistas poseen una tendencia a las mezclas de pigmentos para conferir tonos y matices variados y otros a la superposición de capas con el mismo objetivo, estas tendencias varían con la época de ejecución de las pinturas. Las obras estudiadas por orden cronológico son:

- el Tríptico del Espíritu Santo, de la iglesia de San Pedro de Miragaia, es una obra emblemática atribuida a un maestro flamenco desconocido hasta la fecha [3].
- la obra del pintor portugués Francisco Correia del siglo XVI, la cual se encuentra dispersa en gran parte del país. Las obras seleccionadas pertenecen a la Iglesia matriz de Azurara, al núcleo museológico do Baixo Tâmega en la iglesia del Monasterio de San Miguel de Refojos [4] y a la iglesia Matriz de Santo Estêvão [5].
- los techos en forma de cajones de madera de la iglesia del antiguo Convento del Salvador de Braga de 1622-1623 [6].

- Las pinturas de altares de gran formato (forman parte integral del retablo, son una forma específica de estructuras retabulares, singulares en el norte de Portugal) de Pedro Alexandrino (1729-1810) y João Glama Stoberlle (1806-1892) [7].

Los pigmentos identificados se muestran en el esquema de la Figura 2. Como se puede observar en algunos casos no ha sido posible caracterizar el tipo de pigmento que confiere el color al estrato en la obra, y sólo nos limitamos a mencionar el elemento químico que es detectado y que se relaciona con un pigmento en cuestión (teniendo en cuenta color-elemento-pigmento), es el caso del color verde donde se detectan las líneas K del Cu y dependiendo de la época de ejecución de las obras puede corresponder a la malaquita ($\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$) o al verdigrís ($\text{Cu}_3(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)(\text{OH})_2$), y del color azul donde no se detecta ningún elemento químico que confiera el color azul en la obra y por eso se hace alusión a la presencia de un azul orgánico, como el índigo, o al azul ultramar ($\text{Na}_{8-10}\text{Al}_6\text{Si}_6\text{O}_{24}\text{S}_{2-4}$). Las características técnicas del espectrómetro usado no permiten detectar elementos ligeros $Z \leq 16$, siendo esta una de las limitantes del empleo de sistemas portátiles.



Fig. 2. Esquema de los pigmentos identificados en el conjunto de obras analizadas del siglo XV al XVIII.

Los pigmentos identificados en las obras del XIX y XX fueron diferentes, se detectaron nuevos elementos en los espectros de fluorescencia, esto es debido al momento histórico crucial que tuvo en la historia el desarrollo industrial a partir de la centuria del XIX, que fue revelado también en el desarrollo comercial de materiales artísticos. Las obras estudiadas corresponden a los siguientes artistas portugueses:

- Francisco José Resende (1825-1893), artista con obras singulares de diversa naturaleza del soporte, se destacan las obras sobre soportes metálicos, fundamentalmente cobre [8].
- Marqués de Oliveira (1853-1927), fueron estudiadas obras sobre soporte celulósico (papel y cartón) [9].

- Aurelia de Sousa (1866-1922), artista versátil, dotada de gran calidad plástica, las obras estudiadas son esencialmente pinturas sobre tela [10].

- Abel Salazar (1889-1946) aficionado a la pintura, autodidacta en el arte, profesor de medicina, investigador, presenta una obra peculiar. El estudio de su obra se centró en pinturas sobre soportes rígidos (madera y derivados) [11].

- Júlio Pomar (1926) es una figura de referencia de la segunda mitad del siglo XX en Portugal, se estudió gran parte de su obra, principalmente pintura sobre tela [12].

- Albuquerque Mendes (1953) fueron estudiadas obras de diversas tipologías, donde se combina la pintura con *performances* e instalaciones [13].

- Gerardo Burmester (1953) se estudiaron obras de la época de los 80. El artista utiliza materiales de construcción civil, materiales artísticos y tintas fluorescentes [14].

- Pedro Cabrita Reis (1957) artista con una amplia y vasta obra casi siempre relacionada con materiales de construcción civil [15], se estudiaron obras de la colección privada del artista y pertenecientes a la fundación Serralves.

- Ângelo de Sousa (1938-2011) se estudiaron las obras monocromáticas compuestas por mezclas y superposición de estratos pictóricos. Artista con una técnica pictórica singular.

En las obras del siglo XIX y principios del XX están presentes pigmentos usados en siglos anteriores siendo estos: blanco de plomo, pigmentos tierras (rojos, marrones), tierra verde, bermellón y minio, y se identificaron pigmentos propios de la época (XIX y XX) como: litopón, blanco de cinc, blanco de titanio, verde esmeralda, verde de cromo, azul cobalto, azul de Prusia, violeta de cobalto, amarillo de bario, amarillo de cromo y rojo de cadmio.

4. CONCLUSIONES

A través de la EDXRF hemos podido analizar conjuntos de obras pictóricas y obras singulares de diversas tipologías pertenecientes a un recorrido histórico amplio, desde el siglo XV hasta el siglo XX. La versatilidad de esta técnica, su rápida respuesta y al ser no destructiva nos permitió realizar amplios barridos en las obras para conocer la naturaleza de los pigmentos constitutivos, estudiar la paleta de los artistas y optimizar en la toma de muestras para la realización de análisis complementarios. Esta investigación fue un trabajo pionero en el estudio de obras de artistas portugueses situadas en la región del norte del país.

AGRADECIMIENTOS

A Sandra Saraiva, investigadora que trabajó en el análisis conjunto de las obras. A los coordinadores del proyecto MIPNP (Maria Aguiar, Ana Calvo, Carolina Barata, Laura Castro, Gonzalo Vasconcelos), a los investigadores que estudiaron cada uno de los pintores abordados. A las instituciones, fundaciones, galerías, artistas que hicieron posible el acceso a las obras para ser estudiadas.

REFERENCIAS

- [1] Roldán, R. y Ferrero, J. (2008): "Análisis no destructivos. El uso de la fluorescencia de rayos X en arte y arqueología", *Método*, 56: 221-227.
- [2] Calvo, A. (2012): "Introdução Materiais e Técnicas dos Pintores do Norte de Portugal: Conhecer para Conservar" en *Através da pintura: olhares sobre a matéria*, Universidade Católica Portuguesa, Oporto: 3-14.
- [3] Roldán, C.; Ferrero, J.; Juanes, D.; Carballo, J.; Calvo, A.; Aguiar, M. (2013): "EDXRF analysis of the Pentecost Triptych from the Sao Pedro de Miragaia Church (Porto, Portugal)", *Radiation Physics and Chemistry*, 82:7-11.
- [4] Carballo, J y Santos, S. (2012): "A materialidade na obra de Francisco Correia" en *Através da pintura: olhares sobre a matéria*, Universidade Católica Portuguesa, Oporto: 59-70.
- [5] Carballo, J. (2009): "Análisis por EDXRF de cinco panels del pintor manierista portuense Francisco Correia", *VIII Congreso Ibérico de Arqueometría*, Seminario de Arqueología y Etnología Turolense, Teruel: 357-366.
- [6] Rodrigues, R. (2011): «Levantamento do estado de conservação das pinturas do tecto de caixotoes da igreja do antigo convento do Salvador», <<http://artes.ucp.pt/citar/mtpnp>>, [2012].
- [7] Tavares, C. (2011): «O estado de conservação de quatro pinturas de altar de pedro Alexandrino de Carvalho», <<http://artes.ucp.pt/citar/mtpnp>>, [2012].
- [8] Veiga, R. (2012): "A pintura a óleo sobre folha-de-flandres de Francisco José Resende" en *Através da pintura: olhares sobre a matéria*, Universidade Católica Portuguesa, Oporto: 139-151.
- [9] Lopes, A. (2011): «Marques de Oliveira e os retratos de imprensa: composição, materialidade & técnica», <<http://artes.ucp.pt/citar/mtpnp>>, [2012].
- [10] Aguiar, M., Cruz, A. J., Calvo, A., Carballo, J. (2009): "Pintura em cartao no inicio do séc. XX em Portugal: Aurélia de Sousa, uma artista esquecida num tempo de mudanças técnicas", *VIII Congreso Ibérico de Arqueometría*, Seminario de Arqueología y Etnología Turolense, Teruel: 113-122.
- [11] Brito, A. (2011): «A obra pictórica de Abel Salazar, sua técnica e materialidade», <<http://artes.ucp.pt/citar/mtpnp>>, [2012].
- [12] Cudell, A., Carballo, J., Cruz, A. J., Martins, A., Calvo, A., Saraiva, S. (2009): "Conservation of contemporary painting. Scientific analysis and intervention on a neorealist painting by Júlio Pomar" en *Art D'Aujourd'hui. Patrimoine de Derain*, 13 Journées d'études de la SFIIC. Paris: 330-331.
- [13] Cudell, A. (2011): «Estudo de materiais e procedimentos pictóricos na obra Livro de Impedimentos de Albuquerque Mendes», <<http://artes.ucp.pt/citar/mtpnp>>, [2012].
- [14] Rita, A., Cudell, A., Calvo, A., Carballo, J. (2011): "Pigmentos fluorescentes en el arte contemporáneo: utilización e impacto visual en la obra de Gerardo Burmester", *12ª Jornada de Conservación de Arte Contemporáneo*, Museo Nacional Centro de Arte Reina Sofía, Madrid.
- [15] Cudell, A., Moreira, P., Rossi, M., Martins, A., Carballo, J., Pintado, M., Calvo, A., Cruz, A.J. (2010): "Problemas de conservación en pintura contemporánea: estudio de dos pinturas de pedro Cabrita reis con contaminación por microorganismos", *11ª Jornada de Conservación de Arte Contemporáneo*, Museo Nacional Centro de Arte Reina Sofía, Madrid: 271-282.



Jorgelina Carballo, química de profesión y alumna del Máster de diagnóstico del estado de conservación del patrimonio histórico. Llevo varios años vinculada al Patrimonio y actualmente trabajo como investigadora del ICMUV, Universidad de Valencia.

Espectrometría de masas y su aplicación en la datación de algunas obras de interés histórico-artístico

Andrea Gil Torrano

Resumen— La espectrometría de masas es una técnica de gran interés en diversos ámbitos científicos y tecnológicos, ya que permite realizar análisis tanto elementales como moleculares, cualitativos y cuantitativos, presentando además una alta sensibilidad, selectividad y precisión. La asociación de la espectrometría de masas a un acelerador permite realizar dataciones de objetos histórico-artísticos, aportando información no sólo de la edad de éstos, sino que también, a través de una correcta interpretación y comparación con otras muestras conocidas, puede ayudar a situarlos en su contexto histórico, en una determinada época o a si proceden, por ejemplo, de canteras similares. También, a partir de información obtenida por otros estudios multidisciplinarios, esta técnica puede corroborar o no la autenticidad del material objeto de estudio. En este trabajo se mencionan brevemente tres casos en los que se empleó esta técnica: El Sudario de Turín, los Manuscritos del Mar Muerto y Ostzi o el Hombre de Hielo.

Palabras Claves— Espectrometría de Masas, AMS, radiocarbono, datación.

1. INTRODUCCIÓN

La espectrometría de masas desempeña un papel importante en la identificación, caracterización estructural y determinación cuantitativa de un amplio número de compuestos. Esta técnica posee alta sensibilidad y selectividad, así como alta precisión y una gran capacidad para obtener información composicional detallada de mezclas complejas difíciles de analizar con otras técnicas, que a menudo se encuentran en objetos artísticos, históricos y arqueológicos. Los datos obtenidos con esta técnica en este tipo de materiales, pueden proporcionar información muy valiosa en cuanto al uso y función del material, de las costumbres en el pasado (dependiendo del uso que se le dio al objeto), así como la forma de vida, que puede ayudar a reconstruir el contexto histórico, cultural y social de un determinado periodo y zona geográfica.

A menudo esta técnica se encuentra acoplada a técnicas cromatográficas, dependiendo de la información que se busque en un objeto determinado, de este modo, es frecuente encontrarla acoplada a la cromatografía de gases o a la cromatografía de líquidos de alto rendimiento.

En este trabajo se hará un breve comentario sobre la espectrometría de masas acoplada a un acelerador de partículas (AMS), que tiene gran interés a la hora de analizar la relación isotópica presente en una muestra. La importancia de esta técnica radica en la disminución, alrededor de tres órdenes de magnitud, de la cantidad de muestra y un menor tiempo de análisis considerable, frente a otras técnicas convencionales como por ejemplo la datación por radiocarbono tradicional, manteniendo una alta precisión en los análisis. Además, esta técnica puede aplicarse a numerosos tipos de materiales, como por ejemplo: polen

y semillas, inclusiones orgánicas en cerámicas, madera, carbón, huesos, textiles, papiros, pergaminos, papel, etc.

En este estudio se hará, a su vez, una breve mención de algunos casos en los que se ha aplicado ASM en objetos históricos, concretamente, en el Sudario de Turín o Sábana Santa, en los Manuscritos del Mar Muerto y en el Hombre de Hielo u Ostzi, algunos de los cuales generaron grandes discrepancias que aún hoy en día se mantienen.

2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS

2.1. Fundamento

Un espectrómetro de masas es un instrumento que separa los iones según su relación masa/carga.

Se trata de una técnica destructiva puesto que implica toma de muestra, no obstante, ésta no suele ser muy grande, encontrándose en torno a 20-30 mg. Por otro lado, la cantidad de muestra finalmente introducida en la fuente de iones es muy pequeña, del orden de los microgramos, y una vez dentro, los componentes de la muestra se fraccionan en iones gaseosos mediante el bombardeo con electrones, fotones, iones o moléculas.

La señal de salida de la fuente de iones, es un flujo de iones positivos gaseosos por lo general, aunque también pueden ser iones negativos gaseosos, y éstos son acelerados posteriormente en el analizador de masas para poder ser separados de acuerdo a su relación masa/carga. Por último, llegan al detector, acoplado a un sistema de registro, que convierte el haz de iones generado en una señal eléctrica que pueda ser procesada y almacenada en un ordenador, obteniendo de este modo el espectro de masas correspondiente.

Es imprescindible que el espectrómetro de masas posea un completo sistema de vacío, excepto en el sistema

de procesamiento de la señal y lectura, que mantenga una presión baja en todos los componentes. Esto se debe a que las partículas cargadas que se generan, interaccionarían con los componentes atmosféricos, siendo destruidas.

En el caso de que se trate de una muestra sólida no ionizable, la ionización y la fragmentación se puede llevar a cabo a través de una descarga de arco eléctrico entre dos electrodos donde se ha colocado la muestra problema (Matteini y Moles, 2001).

En lo que respecta a objetos de interés del patrimonio histórico, esta técnica permite realizar análisis tanto cualitativos como cuantitativos de aleaciones metálicas, con gran precisión y sensibilidad. También ha sido muy utilizada en el análisis de materiales orgánicos, en el caso de la obras de arte, por ejemplo, adhesivos, aglutinantes y de aceites secantes en pintura. En este tipo de análisis es habitual encontrar esta técnica asociada a la cromatografía, tanto de gases como de líquidos. Por otro lado, también se ha empleado para datar algunos objetos, a través de la determinación isotópica de elementos contenidos, por ejemplo, en aleaciones metálicas y en pigmentos. En este caso, se basa en la comparación entre la relación isotópica de la muestra problema con distintas muestras conocidas (banco de datos de referencia), pudiendo obtener información sobre la procedencia del material y/o si proceden de la misma época.

2.2. Espectrometría de Masas asociada a Acelerador de Partículas (ASM). Datación por Radiocarbono.

Existen diversas técnicas de datación de materiales, por ejemplo, la luminiscencia, la dendrología, las series de uranio, las de K-Ar, y la datación por radiocarbono. Ésta última es la más conocida, no obstante, la ASM ha ido adquiriendo importancia con el paso del tiempo ya que presenta ciertas ventajas frente a la datación por radiocarbono convencional:

- Se requieren cantidades de muestra mucho más pequeñas. Se reduce la muestra necesaria del orden de g al orden de mg.
- Tiempos más cortos de análisis con una buena precisión.
- Alta sensibilidad.
- Eliminación de las interferencias isobáricas, tanto elementales como moleculares.

En AMS, la concentración de radiocarbono se mide directamente por la cantidad de ^{14}C presente en la muestra y no por la radiación emitida de su desintegración, convirtiéndose en una técnica mucho más rápida y con cantidades de muestra más pequeñas. La principal desventaja que presenta, es que requiere equipos mucho más complejos, por lo que la disponibilidad de éstos se puede convertir en una limitación, y además son más costosos.

Esta técnica se utiliza principalmente en la determinación del contenido de carbono-14 en objetos arqueológicos y muestras geológicas, permitiendo la datación en un gran número de materiales, tales como madera, carbón, huesos, textiles, papiros, pergaminos, papel, y en algunos casos, incluso restos de alimentos presentes en cerámicas (Fedi, 2009).

El ^{14}C es el único isótopo natural inestable del carbono. Los otros dos isótopos naturales del carbono son estables (^{12}C y ^{13}C) y constituyen la mayor parte de carbono presente en la tierra. Los organismos vivos van absorbiendo radiocarbono (^{14}C) a lo largo de sus vidas. A la muerte del ser vivo, la captación de ^{14}C se detiene, produciéndose la desintegración radiactiva de éste con un tiempo de vida determinado. De este modo, si se conoce la concentración de radiocarbono presente en la muestra, es posible estimar el tiempo transcurrido desde que se dejó de absorber ^{14}C . Este planteamiento supone que la concentración de radiocarbono en la atmósfera ha permanecido constante a lo largo del tiempo, por lo que para evitar errores en la datación es necesario el uso de curvas de calibrado, a partir de mediciones del contenido de radiocarbono en registros naturales (Calcagnile et al., 2005).

Por otro lado, el método de datación del radiocarbono con AMS requiere un tratamiento previo en la preparación de la muestra que se va a datar. Es importante eliminar todo tipo de contaminación que haya podido sufrir la muestra, tanto de carácter natural como antropogénicas. La contaminación de origen natural se debe a la presencia de carbono exógeno que proviene del entorno, por ejemplo, ácidos húmicos procedentes del suelo, que pueden contaminar la muestra si ésta se hallaba enterrada; el carbonato de calcio, presente en la caliza, que ha podido llegar a la muestra por disolución con el agua subterránea, pudiendo ser depositado en el interior de la muestra. Por otro lado, las fuentes de contaminación antropogénicas pueden deberse a intervenciones de restauraciones anteriores, pudiendo quedar restos de resinas, ceras y/o de otros compuestos orgánicos.

De todas formas, la preparación de la muestra requiere otros tratamientos previos además de la eliminación de la contaminación que pueda presentar, pudiéndose englobar en tres etapas:

- Pretratamiento físico y químico
- Combustión (conversión de la muestra purificada en CO_2 gaseoso)
- Grafitización (reducción del CO_2 a grafito sólido)

Del mismo modo, también es importante la preparación de muestras certificadas de ^{14}C de concentración conocida, para evitar los errores sistemáticos que pudieran tener lugar durante el pretratamiento (Fedi, 2009).

Tras haber obtenido el grafito sólido, éste se ioniza y pasa a través del acelerador, evitando problemas de isótopos isóbaros, llega al analizador donde los iones se separan en función de su masa/carga y finalmente va al detector, que transforma la señal en información interpretable.

3. ALGUNAS APLICACIONES DE AMS

3.1. Sudario de Turín

El Sudario de Turín se trata de una tela de lino en la que se aprecia la imagen de un hombre con signos correspondientes a una crucifixión. Los orígenes del sudario han sido objeto de diversos debates a lo largo de la historia.

En 1988 se procedió a su datación por ASM, análisis

que se realizó con la colaboración de tres laboratorios (Tucson, Oxford y Zurich). Para ello, se tomó una muestra a partir de una tira del tejido, de aproximadamente 150 mg, y se dividió en tres submuestras, destinadas a los laboratorios. Los resultados que se obtuvieron datan al tejido en torno a 1260-1390 d.C., lo que indica que el sudario pertenecía a un periodo medieval y no al periodo de la muerte de Cristo (Fedi, 2009).

3.2. Manuscritos del Mar Muerto

Los manuscritos del Mar Muerto o Rollos de Qumrán (Fig.1), se trata de una colección de unos 800 manuscritos escritos en hebreo y arameo sobre papiro o pergamino y que, según estudios paleográficos, se atribuyeron a los Esenios, uno de los mayores movimientos religiosos del judaísmo. Los primeros manuscritos se encontraron en una cueva cerca de Khirbet Qumran, en los alrededores del Mar Muerto, en 1947. La datación de este conjunto adquirió gran importancia, ya que comprendían algunos libros del Antiguo Testamento, así como también escritos religiosos y transacciones comerciales de los Esenios. Estos documentos han sido datados en un periodo comprendido entre 250 a.C. hasta 70 d.C. aproximadamente. A pesar de que se encontraron ciertas discrepancias, los



Fig.1. Detalle del Manuscrito de Isaías, datado de un periodo anterior a 100 a.C. (<http://www.ao.net/~fmoeller/qb.htm>)

resultados de la datación confirmaban esencialmente los estudios paleográficos planteados (Bonani et al., 1992), (Gunnweg et al., 2005).

3.3. Ostzi, “El Hombre de Hielo”

Se trata de una momia congelada de un hombre hallada en 1991 en los Alpes, en la frontera entre Austria e Italia. Se llevaron a cabo análisis de radiocarbono con AMS de muestras de tejido orgánico y hueso, en los laboratorios de Oxford y Zurich, datándolo entre 3350-3100 a.C. Además, también se tomaron otro tipo de muestras como parte de lo que portaba la momia consigo y restos botánicos del entorno donde se había hallado (Fedi, 2009).

4. CONCLUSIONES

La espectrometría de masas aplicada en objetos del patrimonio histórico puede resultar una técnica de gran interés, permitiendo realizar análisis tanto cualitativos como cuantitativos. A su vez, también aporta información muy interesante sobre su localización geográfica o época de diferentes objetos mediante la relación isotópica presente en éstos, como puede ser en el caso de metales y pigmentos. A la posibilidad de obtener diferentes tipos de información, se le suman la elevada precisión y sensibilidad de la técnica, presentando buenos límites de detección, y la obtención de unos espectros de masas relativamente fáciles de interpretar que conducen a la composición molecular de la muestra. No obstante, presenta algunas desventajas como el elevado coste instrumental, la presencia de interferencias y la complejidad de algunas muestras naturales a analizar.

El empleo de la espectrometría de masas asociada a un acelerador, aporta numerosas ventajas en el campo de la datación frente a otras técnicas como la datación por radiocarbono tradicional, ya que aporta una notable disminución en la cantidad de muestra y genera unos resultados con elevada precisión. AMS además de contribuir con información sobre la edad del objeto y de situarlo en su contexto histórico, puede ayudar a la autenticación de la obra y ser de gran utilidad en otras aplicaciones, como por ejemplo, en el estudio de semillas, que ha contribuido al estudio de los indicios de la agricultura. Se ha de tener en cuenta a su vez, que en muchos casos la datación puede aportar información de cuándo se preparó el soporte, pero no necesariamente de cuando realmente se usó para producir el objeto en sí mismo.

REFERENCIAS

- BONANI, G., IVY, S., WÖFLI, W., BROSHI, M., CARMÍ, I. and STRUGNELL, J. (1992): “Radiocarbon dating of fourteen Dead Sea scrolls”, *Radiocarbon*, no.3 vol.34: 843-849.
- CALCAGNILE, L., QUARTA, G. and D’ELIA, M. (2005): “Radiocarbon-dating by accelerator mass spectrometry: fundamentals and applications to archaeology”, en Adriaens, A., Degriigny, C. and Cassar J. (ed.) *Cost Action G8 - Benefits of non-destructive analytical techniques for conservation*, Cost Office, Italy: 69-76.
- FEDI, M. (2009): “Accelerator Mass Spectrometry for ^{14}C Dating”, en Colombini, M.P. y Modugno, F. (ed.) *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology*, J. Wiley & Sons, Pisa: 475-498.
- GUNNEWEG, J., WOUTERS, J. and BALLA, M. (2005): “Qumran and the Dead Sea scrolls: a jigsaw puzzle”, en Adriaens, A., Degriigny, C. and Cassar J. (ed.) *Cost Action G8 - Benefits of non-destructive analytical techniques for conservation*, Cost Office, Italy: 69-76.
- MATTEINI, M. y MOLES, A. (2001): *Ciencia y restauración: método de investigación*, Nerea, Guipúzcoa.



Andrea Gil Torrano recibió el título de Química por la Universidad de Zaragoza en 2013. Actualmente es estudiante en el Máster de Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico en la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

EDXRF en el estudio de pintura. Limitaciones y técnicas de análisis complementarias

M^a Gertrudis Jaén Sánchez

Resumen—La Fluorescencia de Rayos X Dispersiva en Energías es una de las técnicas más importantes y ampliamente utilizadas en el estudio del patrimonio histórico ya que permite analizar la obra sin contacto físico y sin alterar el objeto. Actualmente se está avanzando con la implementación de varias técnicas complementarias en un solo dispositivo, en el desarrollo instrumental y de software para ir superando las limitaciones que tiene en este momento.

Palabras Claves— EDXRF, no invasiva, pintura.



1. INTRODUCCIÓN

La Fluorescencia de Rayos X Dispersiva en Energías (EDXRF) reúne muchas de las características de la técnica de análisis ideal. Permite analizar la obra sin contacto físico y sin alterar el objeto. Es por ello que es una de las técnicas más importantes y ampliamente utilizada en el estudio del patrimonio histórico desde la década de 1950 [1]. Por este motivo, la EDXRF es actualmente una herramienta de gran utilidad y plenamente establecida como técnica de análisis en los museos y centros de conservación y restauración.

La gran implantación que la técnica EDXRF ha tenido en los últimos años no sólo es debida a sus características que la hacen muy adecuada para el estudio de Bienes Culturales, sino también a la evolución tecnológica que en la última década ha permitido la miniaturización de las fuentes de rayos-X y de los nuevos detectores de semiconductor refrigerados termoelectricamente dando lugar sistemas de análisis EDXRF manejables, versátiles y portátiles [2, 3] que posibilitan la realización de análisis multielementales in situ, sin tomar muestras y evitando así desplazamientos de los objetos que, además de ser extremadamente costosos, pueden atentar contra su integridad. Así pues, podemos considerar que la EDXRF es una técnica de análisis bien consolidada y una herramienta de uso común para el análisis no destructivo, cualitativo y cuantitativo de elementos químicos presentes objetos del patrimonio cultural (pigmentos, cerámica, vidrio, aleaciones metálicas, papel, etc.) [4, 5].

Una de las principales ventajas de los equipos de fluorescencia rayos X es la rapidez en la adquisición del espectro y en el análisis de los resultados, que unido a la configuración portátil, permite realizar amplios barridos de obras de forma no destructiva y sin toma de muestra. Sin embargo, como toda técnica de análisis presenta una serie de limitaciones, que en el campo de los bienes culturales, se pueden enumerar de la siguiente manera:

- Los equipos EDXRF realizan los estudios in situ y sin condiciones atmosféricas especiales, lo que implica que existe una cantidad de aire entre la

zona analizada y el detector donde se producen procesos de absorción de radiación de fluorescencia de rayos X. Este hecho es especialmente crítico para los elementos químicos ligeros cuya radiación X característica es de baja energía y se atenúa fácilmente en la atmósfera, por lo que la técnica tiene dificultades en el análisis de elementos ligeros por debajo del silicio.

- El análisis es elemental por lo que no se obtiene información sobre compuestos químicos.
- El denominado *efecto matriz* que consiste en que los elementos presentes en la muestra pueden dar lugar a efectos de absorción o refuerzo en la emisión secundaria producida por un elemento, lo que complica el uso de esta técnica para el análisis cuantitativo.

Otras limitaciones vienen dadas por la metodología de análisis en bienes culturales. Como se ha mencionado, el análisis se realiza sin contacto y sin alterar el objeto. En los equipos EDXRF se emplea como fuente de excitación un tubo de rayos X compacto que genera un haz de rayos X que incide sobre la superficie del objeto, excitando un volumen interno. Los elementos excitados en ese volumen emiten radiación característica al desexcitarse que es la que se analiza y aporta información sobre los materiales que lo forman. Por tanto resulta bastante complicado determinar la estructura interna del objeto.

Todas estas desventajas se están superando mediante diferentes actuaciones que afectan tanto a equipamiento instrumental como a desarrollo de software de simulación.

2. AVANCES EN LA TÉCNICA EDXRF

2.1. Avances instrumentales

Las limitaciones en cuanto al elemento químico que es capaz de detectar, se están superando desarrollando nuevos equipos EDXRF que incluyen un sistema capaz de

generar una atmósfera de helio entre el detector y el objeto analizado [6]. El helio tiene un coeficiente de atenuación mucho menor que la atmósfera normal, por lo que se gana en eficiencia de detección de los elementos ligeros. También se están diseñando equipos de fluorescencia compuestos de dos tubos de rayos X con distintos ánodos, de modo que se obtenga la máxima eficiencia de excitación en amplio rango de elementos que incluyen los ligeros [7]. En este sentido, también se han desarrollado nuevos detectores con ventanas más delgadas y transparentes que también ayudan a aumentar la eficiencia de detección.

La limitación relacionada con la información que proporciona, únicamente químico elemental, está siendo complementada mediante el uso de técnicas portátiles por separado, como el Raman o la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), o implementando técnicas complementarias en un mismo dispositivo de análisis. En este sentido se ha desarrollado un prototipo que permite el análisis EDXRF y micro-Raman de una superficie [8]. Los primeros ensayos aplicados a una pintura muestran como mediante EDXRF se realiza un estudio de la composición química elemental del volumen excitado y mediante Raman se identifica los pigmentos presente en su superficie.

Otro ejemplo es el desarrollo de equipos XRF-XRD portátiles que realizan el análisis químico elemental de una zona y la identificación de los compuestos a través del análisis mediante difracción de rayos X de las fases cristalinas de la zona. Se han publicado trabajos en los que se ha identificado los elementos químicos de una capa pictórica de un cuadro mediante XRF y la identificación de los pigmentos de las capas externas mediante XRD [9].

2.2. Avances en simulación

Por otro lado, la limitación acerca de la falta de información estratigráfica que presenta la técnica XRF, se está resolviendo a partir del desarrollo de software de simulación. Se han diseñado programas informáticos que proporcionan una información cuantitativa de composición y de espesor de capas a partir de una hipótesis apropiada del material [10]. En este sentido se han realizado trabajos relacionados con el espesor de láminas de oro o pan de oro aplicado sobre una base mediante simulación de la atenuación de distintas líneas de fluorescencia de rayos X.

También se han realizado trabajos más complejos en los que se determinando la estratigrafía virtual de capas pictóricas, en concreto para determinar la técnica del sfumato que utilizaba Leonardo da Vinci en los rostros de diferentes personajes de distintas obras [11].

Mediante simulación de los espectros EDXRF obtenidos se ha puesto de relieve la estratigrafía de las mejillas donde se encuentra esta técnica. En el caso de *La Virgen, Santa Ana y el Niño* hay una capa de preparación e imprimación sobre la que se aplica el sfumato compuesta de un pigmento tierra en una concentración menor al 8% mezclado con un compuesto orgánico cuyo espesor va

aumentando a medida que el tono de la encarnación se va haciendo más oscuro, y recubierta de una capa de barniz. En el caso de la *Mona Lisa* se obtiene una sección estratigráfica similar pero en este caso se empleó óxido de manganeso a una concentración del 1,4 % y pigmento tierra al 1% en una matriz orgánica para la elaboración del sfumato.

3. CONCLUSIONES

La EDXRF es una técnica no destructiva sin toma de muestras que se encuentra consolidada como técnica de diagnóstico y análisis en la conservación de bienes culturales. Como toda técnica de análisis, debe complementarse con otras técnicas y es en esa línea en la que se está avanzando con la implementación de varias técnicas complementarias en un solo dispositivo. También se está trabajando a nivel instrumental y de software para ir superando las limitaciones que tiene actualmente.

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1]. E.T. Hall, "X-Ray fluorescent analysis applied to archaeology," *Archaeometry*, vol. 3, no. 1, 1960, pp. 29-35; DOI 10.1111/j.1475-4754.1960.tb00514.x.
- [2]. J.L. Ferrero, et al., "Analysis of pigments from Spanish works of art using a portable EDXRF spectrometer," *X-Ray Spectrometry*, vol. 31, no. 6, 2002, pp. 441-447; DOI 10.1002/xrs.604.
- [3]. R. Cesareo, et al., "Chapter 9 Portable Systems for Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence Analysis of Works of Art," *Portable X-ray Fluorescence Spectrometry: Capabilities for In Situ Analysis*, The Royal Society of Chemistry, 2008, pp. 206-246.
- [4]. C. Roldán and D. Juanes, "Fluorescencia de Rayos - X mediante equipo portátil aplicada al estudio y conservación del patrimonio cultural," *La ciencia y el arte : ciencias experimentales y conservación del patrimonio histórico*, Ministerio de Cultura, Dirección General de Bellas Artes y Bienes Culturales Instituto del Patrimonio Histórico Español, 2008, pp. 140-150.
- [5]. D. Juanes Barber, "Diseño de sistemas de EDXRF para el análisis de bienes del patrimonio histórico-artístico," *Departamento de Física Aplicada*, Universitat de València, València, 2002.
- [6]. H.B. Bronk, et al., "ArtTAX - a new mobile spectrometer for energy-dispersive micro X-ray fluorescence spectrometry on art and archaeological objects," *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, vol. 371, no. 3, 2001, pp. 307-316; DOI 10.1007/s002160100989.
- [7]. A. Migliori, et al., "A novel portable XRF spectrometer with range of detection extended to low-Z elements," *X-Ray Spectrometry*, vol. 40, no. 2, 2011, pp. 107-112; DOI 10.1002/xrs.1316.
- [8]. K.S. Andrikopoulos, et al., "In vitro validation of a mobile Raman-XRF micro-analytical instrument's capabilities on the diagnosis of Byzantine icons,"

- Journal of Raman Spectroscopy, vol. 37, no. 10, 2006, pp. 1026-1034; DOI 10.1002/jrs.1612.
- [9]. G. Chiari and P. Serrazin, "Portable non-invasive XRD/XRF instrument: A new way of looking at objects surface," Proc. 9th International Conference on NDT of Art, 2008.
- [10]. L. de Viguerie, et al., "Multilayers quantitative X-ray fluorescence analysis applied to easel paintings," Analytical and Bioanalytical Chemistry, vol. 395, no. 7, 2009, pp. 2015-2020; DOI 10.1007/s00216-009-2997-0.
- [11]. L. de Viguerie, et al., "Revealing the sfumato Technique of Leonardo da Vinci by X-Ray Fluorescence Spectroscopy," Angewandte Chemie, vol. 122, no. 35, 2010, pp. 6261-6264; DOI 10.1002/ange.201001116.

Liposomas para generar vectores no virales

María Cecilia Lazarini Suárez

Resumen— El lipoplex es un complejo liposoma-ADN, compuesto por una estructura compleja de lípidos organizada como liposoma o micela que recubre al ADN plasmídico con el fin de protegerlo contra posibles degradaciones durante la transfección; además, facilita su entrada a la célula. Los lipoplexes, por lo general, presentan carga neta positiva para poder asociarse fácilmente a la carga negativa de la superficie celular y promover la entrada en la célula. El mecanismo por el cual el lipoplex entra en la célula es aún un tema en debate y no exento de controversia. Hasta ahora, no se ha encontrado un método de transfección 100% eficiente para los vectores no virales, el mayor reto es mejorar el escape endosomal para estos sistemas, y que la entrega del ADN sea biocompatible y no tóxica.

Palabras Claves— Liposomas, lipoplex, vectores no virales, terapia génica.

1. INTRODUCCIÓN

Desde 1990, año en que se trató al primer paciente con terapia génica, y hasta 2010, se generaron más de 1.500 protocolos de terapia génica en fase clínica, la mayoría para cáncer y enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, hay una amplia brecha entre las esperanzas generadas y los resultados obtenidos. La mayor parte de los fracasos de la terapia génica pueden atribuirse a la ineficiente entrega de los ácidos nucleicos al sitio intracelular correcto, y a la poca información toxicológica de algunos vectores con componentes virales.

La terapia génica se define como la transferencia de material genético a una célula o tejido para prevenir o curar una enfermedad. El material genético puede ser introducido en la célula utilizando un vehículo denominado "vector", y estos sistemas de vectores se dividen en virales y no virales.

Los vectores no virales presentan una serie de ventajas sobre los métodos virales debido a que no hay riesgo de inserción de material genético viral en el genoma de la célula receptora, además, también son ventajosos por su sencilla producción a gran escala y su baja inmunogenicidad. Sin embargo, presentan baja eficiencia de transfección y expresión génica transitoria en comparación con los vectores virales. Por lo tanto, hay una necesidad de avanzar en la tecnología de producción de vectores no virales para lograr una eficacia de transfección y estabilidad de expresión génica similar a la de los virus, pero sin los riesgos que estos conllevan.

2. LIPOPLEX Y LIPOSOMAS

El lipoplex es un complejo liposoma-ADN (Fig. 1) compuesto por una estructura compleja de lípidos, organizada como liposoma o micela, que recubre al ADN plasmídico con el fin de protegerlo contra posibles degradaciones

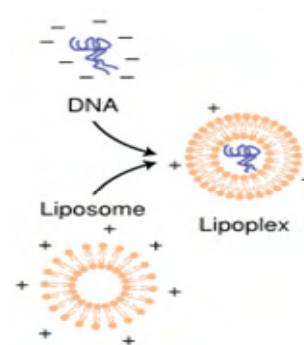


Figura1. Liposoma y lipoplex

durante la transfección y, además, facilitar su entrada en la célula.

Los liposomas consisten, básicamente, en un lípido catiónico que facilita la encapsulación de las moléculas de ADN cargadas negativamente, y un lípido auxiliar, por ejemplo, dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) o dioleoil fosfatidilcolina (DOPC).

El gran reto para los vectores no virales es la entrega del gen. El plásmido a introducir en la célula es una partícula con su superficie cargada negativamente, y presenta un diámetro hidrodinámico de más de 100 nm. Estas propiedades físicas van a influir luego en la distribución de la partícula en el organismo, su interacción con proteínas séricas y superficies celulares. Es importante controlar el tamaño y la carga del ADN a insertar para lograr una entrega del gen efectiva al núcleo.

3. TRANSFECCIÓN Y EXPRESIÓN GÉNICA

La mayor parte del ADN transfectado a la célula no se integra al cromosoma de la célula receptora, y se mantiene como un elemento extra cromosomal en el núcleo. Se ha observado *in vitro*, una integración estable del plásmido a muy baja frecuencia (de 10^{-4} a 10^{-5} células). Esta inte-

gración ocurre en posiciones al azar por acción de las enzimas de reparación de la célula receptora. Sin embargo, no se ha observado ni integración ni replicación del gen administrado en la célula receptora *in vivo*.

La efectividad de la entrega del gen puede ser aumentada encapsulando, junto con el plásmido de ADN, proteínas nucleares dentro del liposoma, esto podría aumentar el tráfico del ADN dentro del núcleo, debido a las señales de tráfico nuclear que presentan estas proteínas.

3.1. Liberación Endosomal

La mayoría de los métodos de entrega de genes involucra la entrada a la célula por endocitosis, otro factor limitante debido a la rápida degradación del ADN en el endosoma. Se ha estudiado la manera de mejorar la liberación del ADN del endosoma, antes de que se produzca la acidificación del compartimento endosomal y la entrada de las nucleasas que degradan el ADN.

Los lipoplexes, por lo general, presentan carga neta positiva para poder asociarse fácilmente a la carga negativa de la superficie celular y promover la entrada en la célula. El mecanismo por el cual el lipoplex entra en la célula es aún un tema en debate y no exento de controversia. Se sabe que hay al menos dos mecanismos por los cuales puede entrar en la célula: fusión directa con la membrana y endocitosis. Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas de los lipoplexes, como la distribución de su tamaño, composición lipídica y carga neta, indican que la unión a la superficie celular, por sí sola, es insuficiente para que los liposomas catiónicos entren en la célula por fusión de membrana en ausencia de endocitosis. Como alternativa se ha propuesto un mecanismo denominado *mecanismo "flip-flop"*, para describir cómo los ácidos nucleicos pueden disociarse de los lipoplexes y escapar de los lisosomas al citosol. Existe una interacción electrostática entre el lipoplex catiónico y los lípidos aniónicos de la membrana endosomal (figura 2.1 y 2.2). Estos lípidos aniónicos difunden lateralmente en el lipoplex, y forman un par iónico neutralizado con los lípidos catiónicos del lipoplex (figura 2.3). Como resultado, los ácidos nucleicos son desplazados del lipoplex, pudiendo ser liberados en el citoplasma (figura 2.4).

La utilización de lípidos neutros como lípidos auxiliares en los liposomas, se atribuye a su actividad endosomolítica. Los liposomas conteniendo DOPE pueden desestabilizar la membrana endosomal, sin embargo, no se ha encontrado el mismo efecto en lipoplexes con DOPC. Esta diferencia se debe a que el grupo etanolamina de DOPE, presenta una fase hexagonal invertida a pH ácido, mientras que el grupo colina de DOPC no lo hace.

3.2 Estrategia Vírica

En el caso de los Adenovirus, la lisis endosomal esta mediada por una proteína pentona ubicada en la superficie

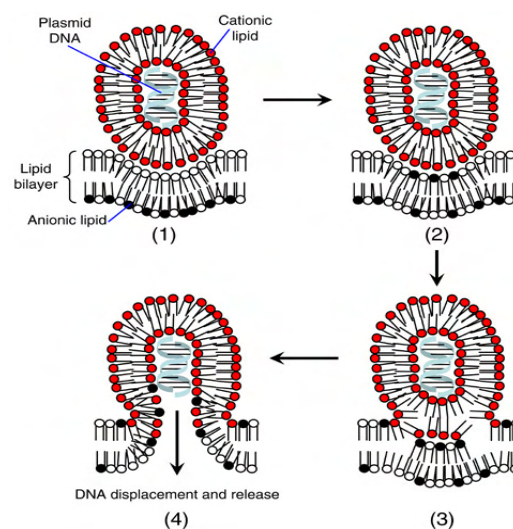


Figura 2. Mecanismo "flip-flop" (imagen: http://www.nature.com/gt/journal/v12/n24/fig_tab/3302592f3.html)

del virus, que cambia la estructura terciaria ante la acidificación del endosoma, este cambio de conformación permite atravesar la membrana endosomal y liberar su contenido al citoplasma.

Una aproximación sería identificar y aislar los dominios de la proteína pentona para lograr propiedades análogas en los liposomas. Otra forma, sería crear con péptidos sintéticos una estructura terciaria similar, para que el liposoma pueda atravesar la membrana endosomal, o utilizar drogas, como la cloroquina, para interrumpir el proceso de acidificación del endosoma y evitar su fusión con el liposoma.

Sin embargo, se ha encontrado que la cloroquina es tóxica para varios tipos celulares, y puede generar en altas dosis efectos adversos a nivel gastrointestinal y al sistema nervioso. A su vez, la utilización de proteínas virales, con potencial inmunogenicidad, complica la producción de este tipo de vectores. Estos métodos no serán aceptables en ensayos clínicos hasta que no se resuelvan estos inconvenientes.

4. SEGURIDAD

Se ha estudiado la toxicidad de los métodos de entrega no virales, y no hay evidencia de la aparición de anticuerpos anti ADN tras administraciones repetidas; tampoco hay evidencia de anticuerpos anti nucleares. Sí se ha observado baja toxicidad con complejos de lípidos catiónicos y ADN, presentando hemólisis y pequeñas alteraciones de las proteínas séricas.

Los métodos no virales en terapia génica, proveen un periodo finito de excreción del producto terapéutico que puede ser aplicado tanto en enfermedades agudas como crónicas, modificando su dosis y la frecuencia de administración.

5. CONCLUSIONES

Hasta ahora no se ha encontrado un método de transfección 100% eficiente para los vectores no virales. El mayor reto será mejorar el escape endosomal para estos sistemas, y que la entrega del ADN sea biocompatible y no tóxica. Estos vectores deben proteger a los ácidos nucleicos de la degradación enzimática y favorecer su entrada en la célula.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Web del European Network for the advancement of Clinical Gene Transfer and Therapy. <http://www.clinigene.eu>
- [2] W. Liang, J. Lam, "Endosomal Escape Pathways for Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems," *Molecular Regulation of Endocytosis*, Ed. Intech, Chapter 17, pp. 429-456, **2012**.
- [3] M.K. Yu et al, "Targeting Strategies for Multifunctional Nanoparticles in Cancer Imaging and Therapy," *Theranostics*, vol. 2, no. 1, pp. 3-44, **2012**, doi:10.7150.
- [4] F. Ledley, "Nonviral Gene Therapy: The Promise of Genes as Pharmaceutical Products". *Human Gene Therapy*, pp. 1129-1144, 1995.
- [5] Mien-ChenHung et al, "Non Viral Vectors for Gene Therapy," Academic Press Chapter 1, pp. 7-12, **1999**.
- [6] S. Akhar, "Beyond Delivery," *Gene Therapy*, vol. 13, pp. 739-740, **2006**, doi: 10.1038.



María Cecilia Lazarini Suarez recibió el título de Bioquímica Clínica por la Universidad de la República de Uruguay en 2012, y actualmente cursa el Máster en Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide. Desde 2008 hasta 2012 fue Responsable de Control de Calidad en un laboratorio de especialidades farmacéuticas veterinarias en Uruguay.

NANOPARTÍCULAS DE JANO

Esperanza Morgado Morales

Resumen- El diseño y la síntesis de nanopartículas de Jano han despertado un gran interés científico en los últimos años. De las dimensiones y morfología de la nanoescala surgen nuevas propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y superficiales. Además, surgen propiedades adicionales, debidas a la distribución espacial binaria de estas nanopartículas, como la anfifilicidad o nuevos efectos catalíticos. En este artículo, vamos a comentar algunos de los avances en los que las protagonistas son las nanopartículas de Jano.

Palabras Claves- Nanopartículas de Jano, direccionamiento de fármacos, nanocatalizadores.



1. NANOPARTÍCULAS DE JANO

En la mitología romana, Jano era un dios bifronte, es decir, un diós con dos caras, cada una mirando hacia lados opuestos. Jano, con su extraordinaria capacidad para ver los opuestos, era el dios de las puertas, el dios de los comienzos y los finales y, por tanto, de las transiciones entre el pasado y el futuro. Como dios de los comienzos, era invocado públicamente el primer día de enero, Ianuarius, el mes que dió lugar a nombre. Jano también era invocado al comenzar una guerra y, mientras ésta durase, las puertas de su templo permanecían siempre abiertas. El hecho de que esta deidad tenga en su perfil dos caras, ha inspirado a los científicos a la hora de bautizar diseños químicos que poseen dos partes bien diferenciadas.

En la funcionalización química de las partículas coloidales, los restos funcionales se distribuyen, generalmente, bastante homogéneamente en la superficie de la partícula. Recientemente, se han desarrollado una serie de protocolos sintéticos en el que la funcionalización de las partículas puede llevarse a cabo de una manera controlada, lo que conduce a la producción de partículas estructuralmente asimétricas. Las partículas de Jano representan el primer ejemplo en el que los dos hemisferios muestran claramente diferentes propiedades químicas y físicas, de ahí la analogía con el dios romano de dos caras, Jano (Fig.1). Las nanopartículas de Jano poseen asimetría funcional, por lo tanto se prevé que permitirán muchas aplicaciones que no son ofrecidas por partículas homogéneas.

La síntesis de nanopartículas de Jano requiere de la capacidad de crear, de forma selectiva, cada lado de una partícula de tamaño nanométrico con diferentes propiedades químicas, de una manera rentable y fiable, para producir la partícula de interés. Inicialmente se trataba de una tarea difícil, pero en los últimos años los métodos sintéticos se han refinado logrando hacerlo más sencillo. Actualmente, se utilizan fundamentalmente tres métodos en la síntesis de nanopartículas de Jano: Masking, autoensamblaje y separación de fases.

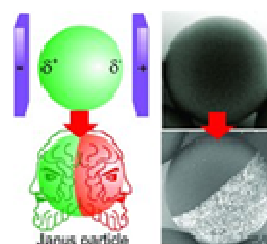


Fig. 1. Nanopartícula de Jano (Imagen: <http://www.particules-janus.fr/en/category/publi/>).

Las nanopartículas de Jano son nanomateriales altamente versátiles, con un gran potencial en diferentes campos científicos y tecnológicos, tales como, por ejemplo, el estudio de interfases y emulsiones, la biomedicina, la catálisis, los coloides moleculares y las superestructuras.

2. NANOESTRELLAS DE ORO Y SÍLICE

Un ejemplo de nanopartículas de Jano son las que están constituidas por óxido de silicio, en una cara, y puntas de oro, en la otra. La fabricación de estas nanopartículas se realiza en varias etapas. Primero se producen nanoesferas de oro, mediante la reducción química de una sal del metal. Después se añaden dos compuestos orgánicos diferentes en caras opuestas de la partícula para que tengan distinta afinidad por el óxido de silicio. De esta forma, el óxido recubre solo una parte, y la otra queda descubierta para hacer crecer las puntas de oro. El concepto de grupos protectores, ampliamente utilizado en química orgánica, se ha aplicado para la síntesis de estas nanopartículas, a las que han denominado nanoestrellas de oro y sílice. Las nanoestrellas de oro y sílice poseen propiedades ópticas y electrónicas que vienen determinadas, en gran medida, por sus pequeñas dimensiones y su morfología.

Las puntas afiladas de oro de las nanoestrellas permiten que sobre estas se puedan generar campos eléctricos muy intensos mediante iluminación. La utilidad de estas nanopartículas de Jano es que esta cara de oro puede detectar contaminantes y marcadores biológicos, lo cual serviría para indicar la presencia de una enfermedad. Otra aplicación es la fototerapia, cuyo objetivo es eliminar células malignas mediante calor, en este caso inducido a

través de la iluminación de las puntas de oro a una longitud de onda adecuada. La cara del óxido se utilizaría para unir la nanopartícula de Jano a receptores biológicos específicos que las lleven hasta las células dañadas para que, entonces, la parte metálica pueda ejercer su función terapéutica o de diagnóstico.

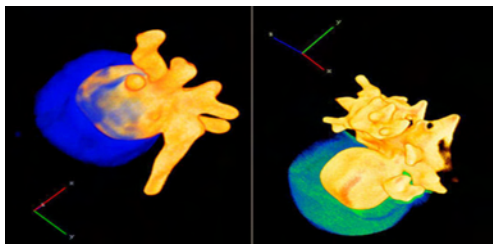


Fig. 2. Nanoestrellas con una cara de óxido de silicio y otra con puntas de oro. (Imagen: <http://www.elmundo.es/ciencia/2014/02/10/52f8a320e2704efb308b456f.html>)

3. NANOCATALIZADORES DE DOS CARAS

Para comprender mejor el comportamiento y potencial de estas nanopartículas pensemos en el siguiente ejemplo: añadimos a un café algo de leche y azúcar, y lo mezclamos. Si queremos obtener de nuevo el azúcar que acabamos de añadir es complicado ¿no? Con este problema se enfrentan los químicos que quieren hacer productos sintéticos más amigables con el medio ambiente. Los compuestos solubles que se utilizan para acelerar las reacciones deseadas, pueden terminar en los productos finales, lo que supone una pesadilla por los problemas de separación que generan. Si estos catalizadores pudieran ser recuperados por completo, podrían ser reciclados y, además, no impurificarían productos, en los que podrían ser tóxicos incluso a niveles traza.

Una característica importante de las nanopartículas de Jano es que puede tener una parte hidrófila y otra hidrófoba. Una de las aplicaciones de las nanopartículas de Jano con estas características es que se ha conseguido una mejora de la catálisis de biocombustibles: A diferencia de los combustibles comunes, que sólo contienen componentes hidrofóbicos, los biocombustibles contienen compuestos oxigenados como los aldehídos, alcoholes y ácidos que son muy solubles en agua. Se requieren catalizadores que sean capaces de catalizar la combustión tanto de los componentes hidrófilos como de los hidrófobos de los biocombustibles. Los investigadores han desarrollado nanocatalizadores con dos caras, una formada por nanotubos (que son hidrófobos) y otra por óxidos de silice (que son hidrófilos). Esto, que parece casi imposible, se ha logrado gracias a los nanocatalizadores con dos caras. La deposición de paladio en la superficie de estas nanoesferas permite que actúen catalizando biocombustibles para refinerías. Estos nanocatalizadores anfifílicos, denominados por sus autores nanohídricos, permiten reducir el número de pasos requeridos para el refinado de biocombustibles.

Por otra parte, disponer de un catalizador recuperable y capaz de estabilizar emulsiones sería muy ventajoso, ya que simplificaría procesos tales como el refinado de la biomasa, en el que la inmiscibilidad y la inestabilidad térmica de los productos en bruto complican en gran medida los procedimientos de purificación. Estas nanopartículas "bifrontes", que son estables tanto en agua como en aceites, son catalizadores que pueden operar en ambas fases y pueden ser recuperados, incluso a partir de mezclas complejas, tales como las que resultan cuando los componentes de la biomasa se transforman en biocombustibles. Este proceso permite la conversión simultánea de todos los productos oxigenados de los biocombustibles de una manera más económica y efectiva. Además, estas nanopartículas están encontrando aplicaciones en otras áreas, como la industria farmacéutica de la que hablaremos a continuación.

4. APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE JANO

Las nanopartículas de Jano se pueden utilizar en muchas aplicaciones en las que las partículas monomórficas son inadecuadas. Así, pueden ser utilizadas como sistemas de administración de fármacos, para vectorizar múltiples cargos útiles que poseen diferentes solubilidades. Un ejemplo concreto son nanopartículas biocompatibles capaces de encapsular un fármaco hidrófobo (paclitaxel), en un lado, y un fármaco hidrófilo (hidrocloruro de doxorubicina) en el otro. Esta estrategia es muy útil cuando los medicamentos, o agentes de diagnóstico, que se quieren vectorizar tienen solubilidades opuestas, ya que es difícil encapsular ambos cargos útiles en una formulación única. También puede haber problemas cuando los cargos tienen diferentes propiedades físico-químicas, debido a la complejidad de los perfiles de liberación.

Los dendrímeros de Jano, basados en el polímero biocompatible polietilenglicol (PEG), también ofrecen un gran potencial para el suministro de fármacos a través de terapias de combinación.

Como ejemplo de nanopartícula de Jano en la terapia contra el cáncer podemos mencionar las que tienen en su superficie ácido fólico, por un lado, y doxorubicina, por el otro, mostradas en la figura 3. El ácido fólico y la doxorubicina se acoplan por separado en una superficie de poliestireno/ Fe_3O_4 @ SiO_2 , formando una estructura de Jano. Este nanocompuesto super-paramagnético permite a la célula tumoral la orientación y la internalización del mismo a través del receptor de folato, e induce la muerte de células cancerígenas mediante una liberación controlada del fármaco.

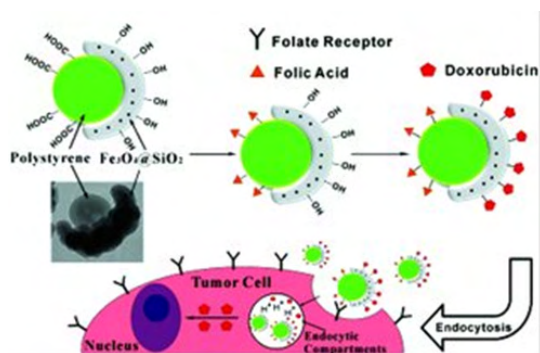


Fig. 3. Nanopartícula con doxorubicina y paclitaxel (Imagen: doi: 10.1002/adma.201301376).

Otra aplicación interesante consiste en mejorar los sistemas de administración transdérmica de fármacos, en los que ya que se había logrado un éxito significativo en la práctica médica, pero que todavía sufrían de pérdida de adhesión, y la reacción de la piel debida a las propiedades oclusivas de adhesivos sensibles a la presión hidrofóbica. Con el fin de resolver estos problemas, se ha creado un parche autoadhesivo con películas de nanofibras de Jano. Este parche multifuncional es una estructura de dos capas: una hidrófila y otra hidrófoba, de modo que tiene propiedades adhesivas adecuadas para la aplicación de fármacos transdérmicos, una excelente capacidad de carga de fármaco y liberación, así como buena apariencia estética y alta seguridad para el uso sobre la piel. Gracias a las estructuras de la red de nanofibras y el gradiente de humectabilidad-hidrofobicidad, las películas de Jano poseen una alta transpirabilidad y monodireccionalidad a la penetración del agua: el agua puede penetrar desde el lado hidrófobo al lado hidrófilo, pero no penetrar a través en la dirección opuesta. Esto puede proporcionar una solución factible a los problemas causados por el agua, el sudor, o al exudado de la herida en la piel.

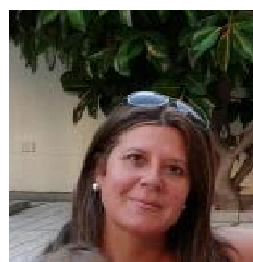
Finalmente, las nanobelts o nanocintas de Jano bifuncionales, magnéticas y fluorescentes, tienen potenciales aplicaciones en las nanobioetiquetas, en los nuevos materiales para entrega a dianas de fármacos, y en futuros nanodispositivos, debido a sus excelentes propiedades magnéticas y fluorescentes, y a su flexibilidad e insolubilidad.

5. CONCLUSIONES

Las nanopartículas de Jano son nanomateriales altamente versátiles, con un gran potencial en diferentes campos científicos y tecnológicos. El poder integrar características multifuncionales en una sola partícula, tiene grandes aplicaciones. Podemos decir que dos es mejor que uno.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Steven Crossley, Jimmy Faria, Min Shen, Daniel E. Resasco "Solid Nanoparticles that Catalyze Biofuel Upgrade Reactions at the Water/Oil Interface", *Science* (2010) dx.doi.org/10.1126/science.1180769.
- [2] Kaewsaneha C, Tangboriboonrat P, Polpanich D, Eissa M, Elaissari A, "Janus colloidal particles: preparation, properties, and biomedical applications", *ACS Appl Mater Interfaces* (2013) 5(6):1857-69. doi: 10.1021/am302528g.
- [3] Yuan Gao and Yan Yu. J. Am, "How Half-Coated Janus Particles Enter Cells", *Chem. Soc.* (2013) 135 (51), 19091-19094. doi: 10.1021/ja410687z
- [4] Kyung-Ho Roh, David C. Martin & Joerg Lahann. "Biphasic Janus particles with nanoscale anisotropy" *Nature Materials* (2005), 4, 759 - 763. doi:10.1038/nmat1486.
- [5] Leroueil PR, Hong S, Mecke A, Baker JR Jr, Orr BG, Banaszak Holl MM., " Nanoparticle interaction with biological membranes: does nanotechnology present a Janus face?" *Acc Chem Res* (2007) 40(5): 335-342. Doi: 10.1021/ar600012y
- [6] Shi Y, Li Y, Wu J, Wang W, Dong A, Zhang J. J "A novel transdermal drug delivery system based on self-adhesive Janus nanofibrous film with high breathability and monodirectional water-penetration" *Biomater Sci Polym Ed.* (2014) 25(7):713-28. doi: 10.1080/09205063.2014.897596.
- [7] Xie H, She ZG, Wang S, Sharma G, Smith JW. "One-step fabrication of polymeric Janus nanoparticles for drug delivery" *Langmuir* (2012) 28(9):4459-63. doi: 10.1021/la2042185.
- [8] Hu J, Zhou S, Sun Y, Fang X, Wu L, "Fabrication, properties and applications of Janus particles", *Chem Soc Rev* (2012) 41(11):4356-78. doi: 10.1039/c2cs35032g.
- [9] Wang F, Pauletti GM, Wang J, Zhang J, Ewing RC, Wang Y, Shi D, "Dual surface-functionalized Janus nanocomposites of polystyrene/Fe₃O₄@SiO₂ for simultaneous tumor cell targeting and stimulus-induced drug release", *Advanced Materials* (2013) 25(25):3485-9. doi: 10.1002/adma.201301376.
- [10] Web de CIC Biomagune. <http://www.cicbiomagune.es/>



Esperanza Morgado Morales obtiene el título de licenciada en Farmacia por la Universidad de Sevilla en 1999. En el año 2000 finaliza el Máster en Atención Farmacéutica Comunitaria por la Universidad de Valencia. Desde el año 1999 hasta el 2007 ha ejercido su labor profesional como farmacéutica adjunta y sustituta. En la actualidad está cursando el Máster Universitario en Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide.

Máquinas moleculares: Entre la realidad y la ficción

Manuel Álvarez de las Heras

Resumen— Cuando decimos máquina molecular, nos referimos a moléculas o conjuntos de moléculas que imitan a los motores y otros dispositivos (interruptores, lanzaderas...) que conocemos a escala macroscópica; sistemas químicos organizados estructuralmente y con funciones integradas. Estos sistemas de moléculas se pueden dividir en dos clases: biológicos y sintéticos (o artificiales). Las máquinas moleculares biológicas son las que podemos encontrar en la naturaleza (las proteínas motoras kinesina y dineína, las bombas iónicas de las membranas celulares...) y las sintéticas son aquellas obtenidas a partir del ingenio humano (rotor basado en el tripticeno y el heliceno...). Pero, si somos capaces de imaginar, este tema puede dar mucho de qué hablar. ¿Y si estas máquinas moleculares se pudieran incorporar en nuestro organismo para aplicaciones como diagnósticos médicos, por ejemplo?

Palabras Claves— Interruptor, máquina molecular, proteínas motoras.

1. NANOTECNOLOGÍA: EL RETO DE LAS MÁQUINAS MOLECULARES

En la actualidad, la nanotecnología se define como la parte de la ciencia que estudia, diseña, crea y manipula materiales, aparatos y sistemas de tamaño nanométrico (10^{-9} m) (Figura 1) [1].

Richard Feynman, físico galardonado en 1965 con el premio Nobel por su teoría de la electrodinámica cuántica (QED), jugó un papel de precursor en el campo de la nanotecnología: en una charla en Caltech llamada “Hay mucho sitio ahí al fondo” apuntó la posibilidad de manipular y controlar cosas muy pequeñas, e incluso, ofreció dos premios de 1000 dolares (uno a quien redujera 25000 veces una página de un libro y otro a quien construyera un motor que cupiera en un cubo de 0,4 mm).

Finalmente, pagó ambos, pero con la satisfacción de saber que estaba dando el pistoletazo de salida a una ciencia que daría mucho que hablar [2].

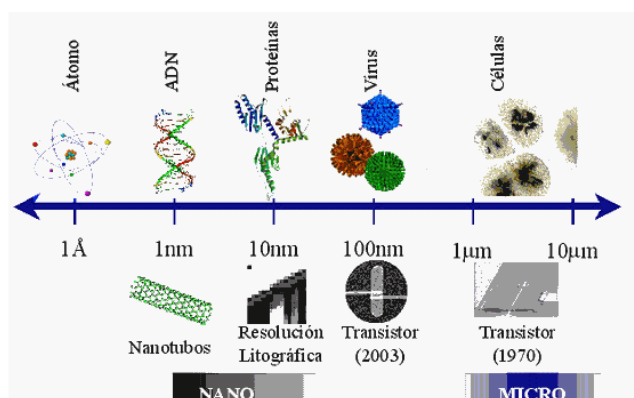


Figura 1. Comparación de escala de tamaños [3].

Así, en las últimas décadas, el desarrollo de dispositivos de tamaño cada vez menor, hasta llegar a alcanzar el ni-

vel molecular, ha cosechado grandes éxitos y ha generado grandes expectativas por sus promesas en diferentes campos de la ciencia, como los materiales, la energía, la medicina, etc. Veamos qué dispositivos, a nivel molecular, ya existen, y lo que ha llegado a lograr la mente humana.

2. MÁQUINAS MOLECULARES

El concepto de máquina molecular no es desconocido para la naturaleza, como veremos a continuación, y los humanos nos hemos inspirado en ella para fabricar las nuestras propias.

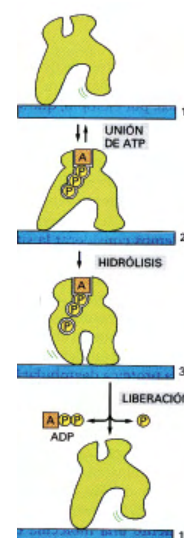
2.1 Máquinas moleculares biológicas

Algunos ejemplos de máquinas moleculares biológicas son:

Proteínas motoras. Existen ciertas proteínas que son capaces de aprovechar cambios alostéricos de forma para generar movimientos ordenados en las células mediante la hidrólisis de ATP y/o otra molécula energética (ya que todo trabajo de esta características ha de consumir energía libre de otra fuente) (Figura 2).

Fig. 2. Esquema de funcionamiento de una proteína motora [4].

Se conocen una docena de proteínas motoras distintas, que se diferencian según el tipo de filamento al cual se unen, la dirección en la que se mueven a lo largo del filamento y en la



“carga” que transportan. Como ejemplos podemos nombrar [4]:

- **Actina y miosina:** Dan lugar, entre otras cosas, a la fuerza necesaria para la contracción muscular. Están dipuestas en filamentos que llevan a cabo interacciones transitorias y deslizamientos para producir la contracción del músculo. La contracción muscular se basa en deslizamientos de filamentos gruesos de miosina a lo largo de filamentos de actina: cuando el ATP no está unido a la miosina, una parte de la miosina está fuertemente unida a la actina. La unión del ATP a la miosina, y la posterior desfosforilación del mismo (pasando a ADP), producen una serie de cambios conformacionales cíclicos coordinados que hacen que la miosina libere una subunidad de la actina y se una a otra subunidad más allá en el filamento (Figura 3) [5].

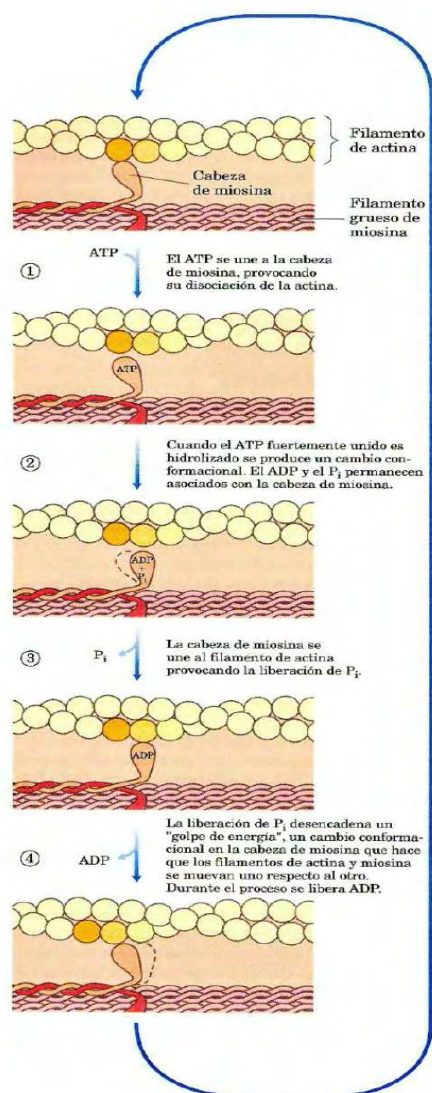


Fig. 3. Esquema del motor actina-miosina en un músculo [5].

- **Quinesinas y dineínas:** Son proteínas motoras que se mueven por los microtúbulos. Las quinesinas siempre se alejan del centrosoma, mientras que las dineínas

siempre se desplazan al centrosoma. Intervienen en el posicionamiento de los orgánulos de la célula y en el transporte de vesículas membranosas, ya que estas proteínas son capaces de “transportarlas” gracias al movimiento de sus “piernas” (Figura 4). [4]

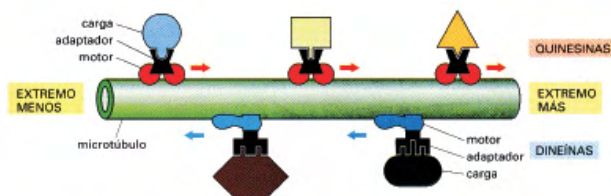


Fig. 4. Quinesinas y dineínas [4].

Bombas proteicas. La energía de la hidrólisis de la molécula adecuada puede ser usada para realizar otras formas de trabajo, como el bombeo de determinados iones al interior o al exterior de la célula, de la misma forma que una bomba hidrostática es capaz de sacar agua del subsuelo.

El ejemplo más famoso es la bomba Na^+-K^+ , que se encuentra en la membrana plasmática y bombea sodio al exterior y potasio al interior.

Estas bombas también pueden actuar “en sentido contrario”: utilizar la energía que provoca el paso de los iones para producir ATP (de la misma forma que la corriente del agua mueve molinos de agua y produce movimiento (una forma de energía). Es el caso de la ATP sintasa (un motor que mediante rotación forma ATP a partir de ADP) [4].

2.2 Máquinas moleculares sintéticas

Algunos ejemplos de máquinas moleculares sintéticas son:

Interruptores moleculares biomiméticos. Son moléculas o sistemas de moléculas capaces de “interconvertirse entre dos o más estados”. Un ejemplo es la familia de los NAPs (sistemas que incluyen una pirrolina N-aquilada), los NAFP (incluyen fluorenpirrolina N-aquilada) y los NAIP (incluyen indaniliden-pirrolina N-aquilada), cuyo mecanismo se basa en el PSB11 de la rodopsina (Figura 5). Su mecanismo es simple: estas moléculas tienen una isomería geométrica determinada (E o Z) (estado off), y cuando se las irradia con luz de una determinada longitud de onda se transforman en el isómero contrario (si es E pasa a Z y si es Z pasa a E) (estado on). Este cambio de isomería se puede usar como desencadenante de una serie de procesos, de la misma forma que “activar o desactivar” un interruptor de la luz conlleva apagar o encender nuestra lámpara, por ejemplo [6].

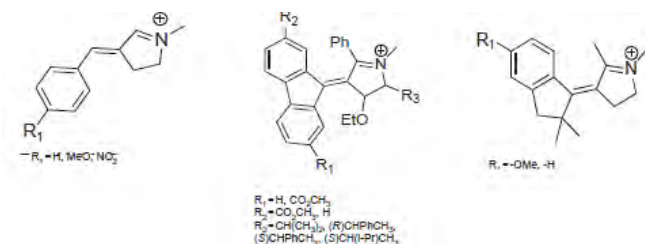


Fig.5. NAP, NAFF, NAIP [6].

Rueda de trinquete tripticeno-heliceno. La quiralidad del fragmento de heliceno (el cual hace de trinquete) permite la rotación de la rueda de tripticeno en una sola dirección si se introduce la formación y ruptura de un uretano como fuente de energía (Figura 6).

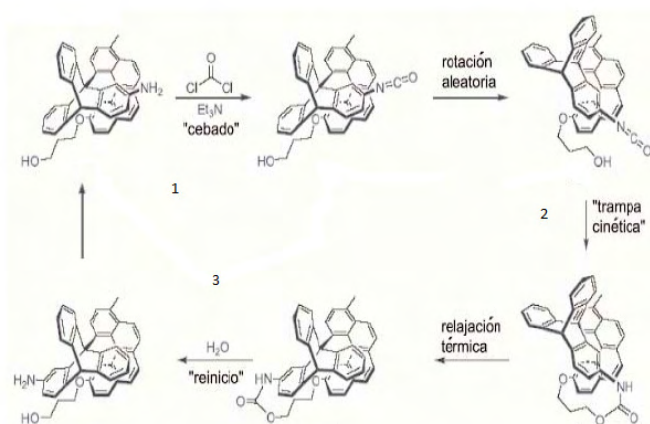


Fig.6: Ciclo rotacional del sistema tripticeno-heliceno: Se produce una reacción con fosgeno que genera isocianato (1), que se acerca al alcohol formando uretano (2), lo que obliga al sistema a girar mediante una hidrólisis (3) [7].

Satélites moleculares. Los rotaxanos son macrociclos "erroscados y atrapados" alrededor de una molécula lineal o "hebra", mediante dos grupos al final de los extremos de la hebra que no permiten que escape. Un satélite molecular es un rotaxano en el que el macrociclo atrapado puede ser trasladado a voluntad del diseñador a lo largo de la hebra mediante determinados estímulos (cambios de pH, fotoquímica, electroquímica...). Aprovechando el movimiento del macrociclo, se pueden realizar funciones como lanzaderas (el macrociclo se "lanza" de un lado a otro), mensajeros (el movimiento del macrociclo de un lado a otro puede desencadenar una serie de sucesos) (Figura 7) [7].

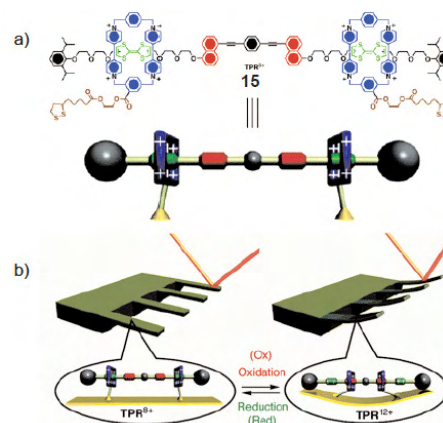


Fig.7. El rotaxano simétrico de dos macrociclos a) permite el plegamiento de una estructura determinada b) [7].

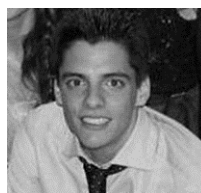
3. FUTURAS EXPECTATIVAS

Por un lado, observamos que estas máquinas tienen un gran potencial, pero aún quedan algunos detalles por pulir; por ejemplo, casi toda esta maquinaria funciona en disolución, habiendo en otros medios (sólido, interfaces líquido-líquido...) un rendimiento mínimo e incluso nulo.

¿Llegaremos algún día a obtener verdaderas máquinas moleculares que funcionen en cualquier medio? Quien sabe, pero de momento, eso se queda en ficción, y la realidad es esta que tenemos.

REFERENCIAS

- [1] Tomás Torres Cebada. Nanoquímica y nanotecnología: Nuevos materiales, polímeros y máquinas moleculares. Encuentros multidisciplinarios, 2002, 4(12), 20-25.
- [2] Los caminos cuánticos. Feynman. Jesús Navarro Faus. Editorial NIVOLA. 2ª edición 2011.
- [3] [Monografias.com: La nanotecnología](http://Monografias.com)
- [4] Biología molecular de la célula. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson. Ediciones Omega. 3ª edición 2002.
- [5] Principios de bioquímica. David L. Nelson, Michael M. Cox. W. H. Freeman and Company. 4ª edición.
- [6] Marina Blanco-Lomas, Pedro J. Campos, Laura Rivado-Casas, Matilde de las Rivas, Diego Sampedro. Interruptores moleculares biomiméticos. Anales de la Real Sociedad Española de Química, 2012, 102(2): 92-99.
- [7] Emilio M. Pérez. Máquinas moleculares artificiales. Anales de la Real Sociedad Española de Química, 2006, 102(3): 5-12.



Manuel Álvarez de las Heras, estudiante del primer curso de biotecnología en la universidad Pablo de Olavide.



9th EUROPEAN CONGRESS OF BIOGERONTOLOGY

Facing challenges in an aging world

Pablo de Olavide University, Seville, Spain.
16-18 October, 2014

Invited Speakers:

- **Michel Bernier.** National Institute on Aging, USA.
- **Alexander Buerkle.** Konstanz University, Germany.
- **James Brown.** Aston University, Birmingham, UK.
- **Rafael De Cabo.** National Institute on Aging, USA.
- **Luigi Ferrucci.** National Institute on Aging, USA.
- **Agnés Grualt.** Pablo de Olavide University, Seville, Spain.
- **Iain Hargreaves.** University College of London, UK.
- **Keiichi Higuchi.** Shinshu University, Japan.
- **Vladimir Khavinson.** St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, Russia.
- **Diana Kuh.** University College London, United Kingdom.
- **Daniel Muñoz.** National Cancer Research Centre, Spain.
- **Plácido Navas.** Pablo de Olavide University, Spain.
- **Graham Pawelec.** University of Tübingen, Germany.
- **Jon J. Ramsey.** University of California Davis, USA.
- **Suresh Rattan.** Aarhus University, Denmark.
- **Carlos Santos-Ocaña.** Pablo de Olavide University, Spain.
- **Rafael Solana.** University of Córdoba, Spain.
- **Steve Söllot.** National Institute on Aging, USA.
- **José Villalba Montoro.** University of Córdoba, Spain.
- **José Viña.** University of Valencia, Spain.
- **Werner Zwerschke.** University of Innsbruck, Austria.

Venue:

Paraninfo:
Pablo de Olavide
University

Collaborating organizations:



Information and inscription:

www.upo.es/9ECB

secretariat9ECB@upo.es

