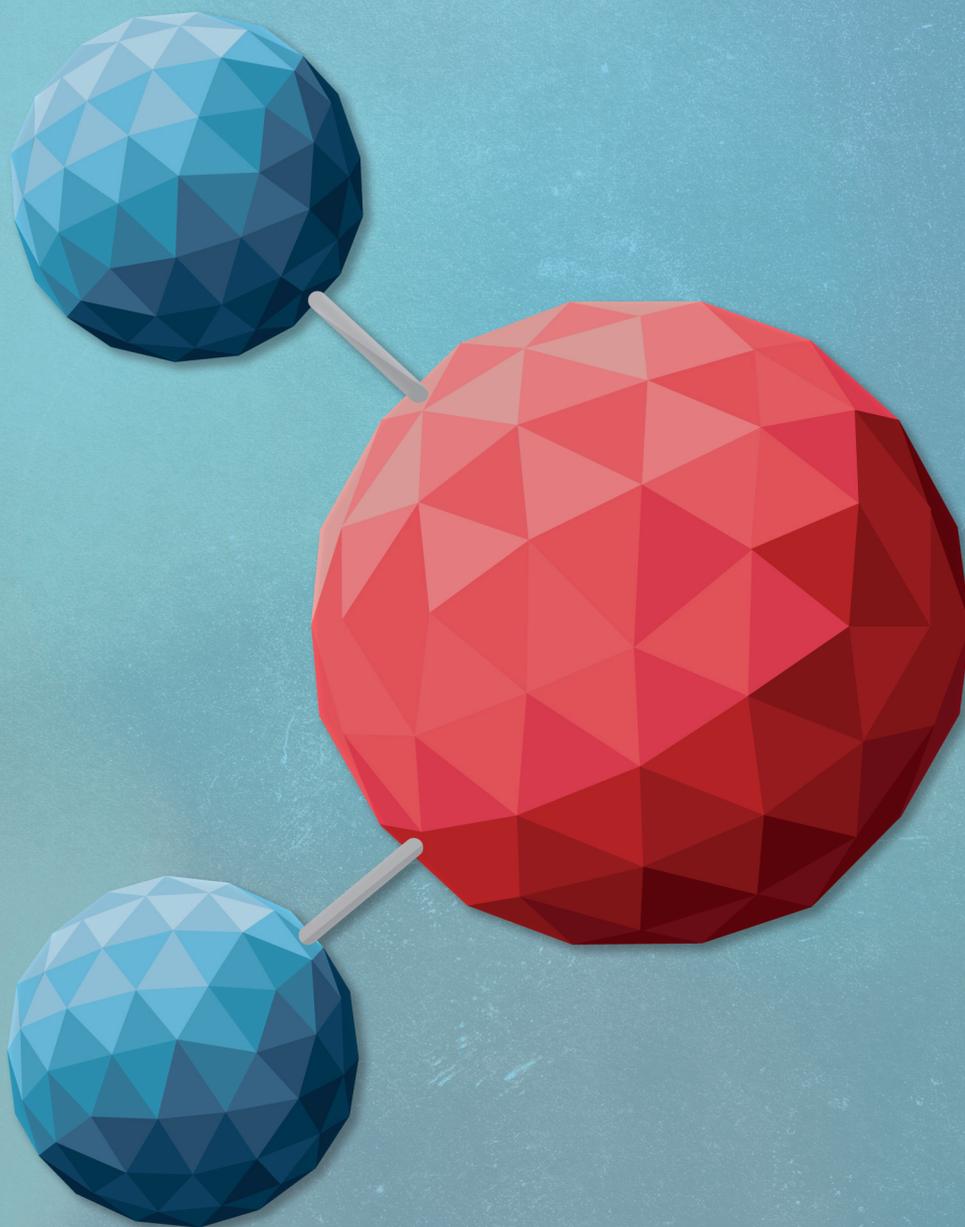


MOLEQLA

Revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide

·Número 19·



Portada

Carmen Santisteban Trigo y María Manuela Valverde

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

Editores de las secciones que aparecen en este número

MoleQla Patrimonio: María Pilar Ortiz Calderón

MoleQla Informática: Norberto Díaz Díaz

MoleQla Industria: Elena García Pérez

MoleQla Gestión: Ester Albelda Pérez

MoleQla Celular: Guillermo López Lluch

MoleQla Instituto: María Reyes de la Vega Sánchez

MoleQla Nanotecnología: Ana Paula Zaderenko Partida

MoleQla Farmacéutica: Matilde Revuelta González

MoleQla Química: Patrick J. Merling

Responsables de maquetación de las secciones que aparecen en este número

MoleQla Patrimonio: Clara Rodríguez Fernández

MoleQla Informática: Juan Humanes Ferrer

MoleQla Industria: Jesús Lavado García

MoleQla Gestión: Alina Georgiana Ioja

MoleQla Celular: David Cabrerizo Granados

MoleQla Instituto: Almudena Sánchez García

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 Septiembre de 2015

Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España

EDITORIAL

Estimados lectores, desde la editorial de MoleQla os damos la bienvenida al curso 2015/2016 con un nuevo número de nuestra revista. En este número, en el que la revista cumple ya **cinco años**, encontrareis una gran variedad de artículos que nos ofrecen una amplia panorámica de la ciencia en nuestra sociedad actual. Si te estás haciendo preguntas como estas: ¿Qué es la homeopatía, cuánto cuesta mantener el software, cómo podemos obtener energía aprovechando la presión osmótica, por qué es medioambientalmente inviable el dragado del Guadalquivir, se puede reparar el tejido óseo con nanopartículas, serán estas últimas la solución a la resistencia a antibióticos que amenaza nuestra salud?, y otras muchas más, los contenidos de este número están pensados para ti.

Este año, además de nuestro quinto cumpleaños, celebramos la Segunda Edición de los **Premios MoleQla**, que se entregarán en la Ceremonia de Apertura del Curso. Los galardonados son Javier Becerra Luna, alumno del Máster de Técnicas de Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico en la UPO, por su artículo “Estudio comparativo entre consolidación por carbonatación bacteriana y nanopartículas de hidróxido de calcio en materiales pétreos”; Diego Montero Larrea, estudiante de cuarto curso del Grado en Criminología de la UPO, por su artículo “El cóctel Molotov”, y la profesora María Marchena y el alumno Miguel Esteban, del Colegio San Francisco de Paula en la modalidad Premio MoleQla al mejor artículo escrito por estudiantes de Educación Secundaria, por su artículo “Modificación de un espectrofotómetro de absorción para el análisis por fluorescencia de la quinina en una disolución de tónica comercial”.



Desde la redacción de molécula os deseamos una feliz lectura.

ÍNDICE

1. MoleQla Patrimonio

- 1.1 *Principales aportaciones de la técnica LIBS al estudio de biomateriales*
- 1.2 *Las obras de arte y su descripción química: el negro de manganeso en la pintura rupestre paleolítica del arco franco-cantábrico*
- 1.3 *El Patrimonio Etnográfico en metal: Propuesta de intervención para una trébede y su sartén*

2. MoleQla Informática

- 2.1 *Calidad Software*
- 2.2 *Ingeniería de requisitos*
- 2.3 *Mantenimiento Software. Su Importancia y Repercusión en Costes*
- 2.4 *Metodologías de Desarrollo Software. ¿Tradicional o Ágil?*

3. MoleQla Industria

- 3.1 *El Poder de la Catálisis Asimétrica*

4. MoleQla Gestión

- 4.1 *El Dragado del río Guadalquivir: Un proyecto medioambientalmente inviable*

5. MoleQla Celular

- 5.1 *La homeopatía: qué es, en qué se basa y cómo la inmunología casi demuestra su eficacia*
- 5.2 *Biología e ingeniería de anticuerpos: inmunoterapia y Alzheimer*
- 5.3 *Revisión sobre la Genética de la especie Canis rufus e Implicaciones para su Gestión y Conservación*

6. MoleQla Instituto

6.1 *Uso de desechos orgánicos urbanos para la producción energética mediante una celda de combustible microbiana de Escherichia coli (generado Abril 2015)*

7. MoleQla Nanotecnología

7.1 *Nanofibras y nanopartículas en la regeneración del tejido óseo*

7.2 *Nanotecnología versus resistencia microbiana*

7.3 *Aplicaciones biomédicas del Grafeno*

8. MoleQla Farmacéutica

8.1 *Lucaha de antidepresivos*

8.2 *Etatinas, ¿medicamento o droga?*

8.3 *Búsqueda de diversidad: ¿Qué opciones tenemos?*

9. MoleQla Química

9.1 *Energía potencial osmótica: Un buen sustituto de los combustibles fósiles*

9.2 *Reconocimiento molecular de la cafeína*

Principales aportaciones de la técnica LIBS al estudio de biomateriales

Estrella Martín Castellano

Resumen—La técnica LIBS está siendo muy empleada en el análisis del patrimonio histórico por las importantes ventajas que ofrece. A pesar de que su aplicación sobre biomateriales no es tan frecuente ni conocida, diversos estudios demuestran la utilidad del método láser en este campo gracias a la valiosa información que puede aportar.

Palabras Claves— LIBS, Biomateriales, Hueso, Fósil, Láser.

1. INTRODUCCIÓN

La aparición del láser en 1960 supuso una gran revolución para el desarrollo de diferentes técnicas analíticas que comenzaron a utilizar este elemento en su metodología [1]. Su aplicación al campo del Patrimonio Cultural se produjo hace unos 20 años y desde entonces han sido cada vez más utilizadas, obteniéndose muy buenos resultados [2], [3]. Dentro de las técnicas basadas en láser una de las más empleadas actualmente es LIBS (Laser-induced breakdown spectroscopy) al ser un método prometedor para análisis elementales. Se valora su capacidad analítica en una gran variedad de materiales en diferentes condiciones ambientales y con una mínima pérdida de material [3]. Si bien el uso de LIBS está bastante consolidado en ciertas áreas del patrimonio como puede ser el material pétreo, cerámico o metalúrgico, en otros materiales ha sido menos empleado y, sin embargo, posibilita el desarrollo de estudios muy interesantes. Un ejemplo de ello son los análisis LIBS realizados sobre biomateriales (huesos, dientes y fósiles). En el siguiente artículo se pretende destacar las numerosas ventajas que presenta esta técnica y relacionarlas con las posibilidades de información que puede aportar en el campo de la paleobiología.

2. LIBS EN EL ESTUDIO DE BIENES CULTURALES

2.1. Fundamento LIBS

Uno de los motivos de la popularidad de esta técnica es la sencillez de su metodología. Realiza un análisis elemental basado en la detección de las radiaciones emitidas por las especies atómicas presentes en un plasma producido como resultado de la ablación láser sobre una superficie [4]. Se parte del uso de un haz láser de alta potencia que se enfoca, mediante un sistema de lentes, sobre un punto de la superficie del material a analizar (figura 1). El láser aumenta la temperatura de esta zona rápidamente hasta alcanzar el punto de evaporación. Si la potencia del láser consigue sobrepasar un umbral de temperatura crítico, que dependerá de la naturaleza de cada material, se inicia

en la superficie un proceso de ionización dando lugar a una serie de especies (iones, fotoelectrones, moléculas neutras, etc.) que se separan de la superficie del material conformando una estructura conocida como plasma o pluma [3]. El plasma se caracteriza por una elevada temperatura y densidad electrónica, lo que genera una banda ancha de emisión en la región UV-visible correspondiente a las diferentes especies presentes en él. El equipo cuenta con un detector espectrográfico que permite analizar la señal emitida. En los primeros instantes la emisión es continua y conjunta, de forma que no se diferencian las emisiones correspondientes a cada especie, pero tras la relajación del plasma los picos de emisión producidos por cada especie comienzan a ser visibles [3].

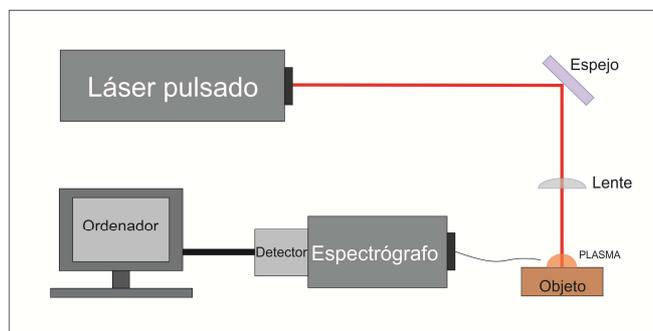


Figura 1. Esquema simplificado de un dispositivo LIBS. El dibujo ha sido realizado por la autora basándose en la referencia [2]

Como resultado, se obtiene un análisis cualitativo que nos informa de la presencia de los diferentes elementos químicos presentes en la superficie del material. Además también pueden llevarse a cabo análisis cuantitativos basados en relacionar la intensidad de la emisión de una especie con la densidad de la misma en el plasma, de forma que ofrecen la concentración de los elementos. Para ello, es necesaria la utilización de métodos complementarios como la calibración de curvas [4].

Una de las características que hacen a esta técnica única es la posibilidad de realizar análisis estratigráficos en profundidad sin necesidad de toma y preparación de muestras. Aumentando el número de pulsos láser en un mismo punto de la superficie se pueden realizar análisis a

diferentes niveles de profundidad. Esta propiedad será determinante para muchas de las aplicaciones de la técnica en estudios del patrimonio histórico.

2.2. Aplicaciones más frecuentes en patrimonio

Los análisis LIBS pueden aplicarse a una gran variedad de materiales con propiedades diferentes. Dentro de las funciones de esta técnica de análisis en el campo del Patrimonio Cultural destacan tres vertientes: la caracterización e identificación de materiales, la datación indirecta [3] y el control de limpiezas láser [4], [9].

La identificación y caracterización de materiales tiene muchas aplicaciones, desde determinar la composición original de las muestras, diferenciar entre materiales originales y añadidos o caracterizar las distintas capas de deterioro presentes en la superficie. Por ejemplo, es muy útil en la detección de los metales que forman una aleación, en la identificación de costras de corrosión o debidas a la contaminación, o para el estudio estratigráfico de obras con varias capas gracias a la posibilidad de realizar análisis en profundidad. Los materiales en los que más se utilizan estos análisis son las piedras y sus productos de degradación (costras), metales y aleaciones, cerámicas o pigmentos.

También pueden emplearse análisis LIBS para realizar dataciones indirectas de ciertas obras basadas en la presencia y detección de algún elemento característico de una época o localización [3]. Por otra parte, esta técnica está empezando a utilizarse como medio de control de las limpiezas mediante láser, con el objetivo de detectar cuando la superficie está limpia de material [4], [9].

En muchos casos, se asocia el uso de técnicas láser al ámbito del material pétreo de gran formato y en exteriores debido a la posibilidad de realizar este análisis in situ, pero esta característica también puede ser provechosa para el uso de LIBS en los materiales procedentes de excavaciones de carácter paleontológico como huesos o fósiles, tal y como demuestran numerosos estudios [5], [6], [7], [8], [9].

3. APLICACIÓN DE LIBS EN ANÁLISIS DE BIOMATERIALES

La aplicación de la técnica LIBS al estudio de biomateriales (huesos, dientes, fósiles, etc.) ofrece la posibilidad de obtener información relevante a cerca de la vida y el comportamiento de los seres vivos en el pasado empleando una metodología sencilla y versátil que, además, minimiza el daño efectuado sobre piezas únicas.

3.1. Análisis de restos óseos y dientes

Los huesos y dientes, al ser tejidos mineralizados, son los principales testigos conservados de vidas anteriores en la tierra de los cuales podemos recuperar datos [5], por lo que pueden aportar información muy importante.

La principal fuente de información que aporta la técnica LIBS es la identificación de oligoelementos, es decir, elementos presentes en pequeñas cantidades (<0,05%) en los seres vivos. Algunos de estos elementos, como el Mg, Cr, Ba, Cu, Sn o Va son indicativos de diferentes hábitos alimenticios y de las condiciones de vida y del entorno [5]. Además, con un análisis elemental y cuantitativo también pueden conocerse las condiciones de enterramiento de los huesos, los procesos de alteración (químicos, físicos o mineralógicos) sufridos durante la diagénesis de los restos e incluso el tiempo de fosilización [6].

La técnica LIBS puede ser de gran ayuda en estos casos al ser mínimamente invasiva y proporcionar análisis en profundidad de los restos encontrados. La posibilidad que ofrece esta técnica para realizar análisis en diferentes puntos de una pieza sin necesidad de dañarla significativamente es una gran ventaja, pues de esta forma se pueden realizar mapas y gráficos que permitan visualizar la localización y distribución de los diferentes elementos detectados [2], [5]. A esto hay que unir el carácter estratigráfico de los análisis realizados mediante varios pulsos [5]; con ellos es posible diferenciar entre los elementos que fueron ingeridos por el ser vivo y que forman parte de su composición (localizados en capas más profundas) y aquellas sustancias que han sido transmitidas por difusión a través del suelo de enterramiento (presentes sólo en capas más superficiales) [7].

3.2. Aplicación en material fósil

Son varias las posibles aplicaciones de esta técnica al estudio y preparación de fósiles. Por un lado, el análisis de la composición elemental de las piezas proporciona información útil para distinguir los diferentes procesos que tienen lugar durante la fosilización.

Por otro lado, D.E. Roberts et al. [9] han desarrollado en su estudio el empleo de esta técnica como método de control en limpiezas láser. Se han basado en la búsqueda de un elemento que funcione como identificador del fósil y que permita distinguirlo fácilmente de la roca matriz. De esta forma, tras cada pulso empleado para la limpieza se realizaría además un análisis elemental que nos indique la naturaleza del material sobre el que está trabajando el láser y así poder controlar de forma más precisa cuando se acaba la matriz terrosa que engloba al fósil y cuando comienza la superficie del mismo. Por otro lado, la técnica LIBS también puede aplicarse a la búsqueda e identificación de fósiles in situ; sin necesidad de hacer excavaciones que dejen totalmente al descubierto el fósil, podría detectarse la presencia de los mismos gracias a los análisis en profundidad que nos aporta este método. Esto supone una gran ayuda en la excavación, pues al saber la posible ubicación de un fósil se trabajará con mayor cuidado en esa zona, minimizando los posibles daños que se le pudieran causar durante la excavación.

4. VENTAJAS E INCONVENIENTES FRENTE A OTRAS TÉCNICAS

La técnica LIBS ofrece la posibilidad de realizar análisis elementales de forma ventajosa con respecto a otros métodos de análisis elemental. De sus numerosas ventajas, destaca su carácter mínimamente invasivo, sin necesidad de preparación de muestra. Esto la coloca por encima de otros métodos elementales que, aportando la misma información, requieren largos procesos de preparación de muestra, que en muchos casos suponen su destrucción total o parcial [5]. El tamaño de las huellas o cráteres que deja esta técnica sobre la superficie del material depende de factores como la calidad y energía del láser o de la respuesta térmica de la superficie. Suele estar entre 50 y 200 μm , pero con unas buenas condiciones se puede llegar a reducir hasta los 10 μm [2]. En cualquier caso, el tamaño no es significativo y las huellas apenas pueden apreciarse a simple vista.

Otra importante ventaja es su capacidad para realizar análisis en profundidad que permiten obtener la misma información que se conseguiría con una muestra estratigráfica pero sin necesidad de dañar significativamente el objeto y sin el gasto económico y temporal que supone la preparación de estratigrafías.

Además, se están desarrollando nuevos equipos que cuentan con la posibilidad de realizar mediciones in situ e incluso a distancia [2].

Como desventajas de esta técnica pueden señalarse la dificultad que conlleva la interpretación de sus resultados y su carácter puntual, si bien esto último se contrarresta con la posibilidad de realizar análisis en numerosos puntos sin dañar el material. Por otra parte, no es aconsejable su uso para analizar materiales orgánicos, pues se producen interferencias con materiales similares presentes en la atmósfera que llevan a interpretaciones erróneas. Estas interferencias pueden reducirse realizando el análisis bajo un ambiente de presión reducida [2], [4].

6. CONCLUSIONES

La técnica de análisis elemental LIBS cuenta con numerosas ventajas que la han convertido en una de las técnicas analíticas más estudiadas y utilizadas en relación con el patrimonio histórico.

Dentro del campo de los biomateriales su uso está menos difundido, pero su aplicación puede aportarnos información sobre los hábitos de vida y los entornos naturales del pasado, así como servir de apoyo a otros tratamientos como la excavación y la limpieza. A pesar de que presenta algunas limitaciones, su carácter mínimamente invasivo, sus análisis en profundidad así como los nuevos prototipos que permiten un análisis in situ o a distancia, hacen que sea una técnica muy prometedora y con gran potencial en el estudio y diagnóstico de bienes culturales.

REFERENCIAS

- [1] J. El Haddad, L. Canioni, B. Bousquet, "Good practices in LIBS analysis: Review and advices", *Spectrochimica Acta Part B*, no. 101, pp. 171-182, 2014, doi:10.1016/j.sab.2014.08.039.
- [2] A. Giakoumaki, K. Melessanaki, D. Anglos, "Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) in archaeological science -- applications and prospects", *Anal Bioanal Chem.*, no. 387, pp. 749-760, 2007, doi:10.1007/s00216-006-0908-1.
- [3] V. Spizzichino, R. Fantoni, "Laser Induced Breakdown Spectroscopy in archaeometry: A review of its application and future perspectives", *Spectrochimica Acta Part B*, no. 99, pp. 201-209, 2014, doi:10.1016/j.sab.2014.07.003.
- [4] A. Nevin, G. Spoto, D. Anglos, "Laser spectroscopies for elemental and molecular analysis in art and archaeology", *Applied Physics A*, vol. 106, Issue 2, pp. 339-361, 2012, doi:10.1007/s00339-011-6699-z.
- [5] F.C. Alvira, F. Ramirez Rozzi, G.M. Bilmes, "LIBS microanalysis of trace elements in Homo sapiens teeth", *Applied Spectroscopy*, vol. 64, no. 3, pp. 313-319, 2010, doi:10.1366/000370210790918328.
- [6] T. Tütken, T.W. Vennemann, "Fossil bones and teeth: Preservation or alteration of biogenic compositions?", *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, no. 310, pp. 1-8, 2011, doi:10.1016/j.palaeo.2011.06.020.
- [7] M.A. Kasem et al., "Effect of the wavelength on laser induced breakdown spectrometric analysis of archaeological bone", *Spectrochimica Acta Part B*, no. 101, pp. 26-31, 2014, doi:10.1016/j.sab.2014.07.010.
- [8] M.A. Kasem, R.E. Russo, M. Abdel Harith, "Influence of biological degradation and environmental effects on the interpretation of archaeological bone samples with laser-induced breakdown spectroscopy", *J. Anal. At. Spectrom.*, no. 26, pp. 1733-1739, 2011, doi:10.1039/C1JA10057B.
- [9] D.E. Roberts et al., "An investigation of Laser Induced Breakdown Spectroscopy for use as control in the laser removal of rock from fossils found at the Malapa hominin site, South Africa", *Spectrochimica Acta Part B*, no. 73, pp. 48-54, 2012, doi:10.1016/j.sab.2012.07.019.



Estrella Martín Castellano recibió el título de Graduada en Conservación y Restauración de Bienes culturales por la Universidad de Sevilla en 2014. Actualmente se encuentra cursando el Máster de Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico en la Universidad Pablo de Olavide.

Las obras de arte y su descripción química: el negro de manganeso en la pintura rupestre paleolítica del arco franco-cantábrico

Olalla T. Canseco Domínguez

Resumen— El pigmento negro empleado en la pintura paleolítica del arco franco-cantábrico tiene un origen mayoritariamente inorgánico. Entre los minerales de manganeso más frecuentemente empleados podemos mencionar la hausmanita, hollandita, pirolusita y la romanechita.

Palabras Claves— Arte franco-cantábrico, Negro de manganeso, Paleolítico, Pigmento, Pintura rupestre.

1. INTRODUCCIÓN

El último tercio del s. XIX marca el inicio del estudio científico del arte rupestre paleolítico. Tanto los espectaculares descubrimientos de pinturas en cuevas europeas como el conocimiento más profundo de paralelos etnográficos bosquimanos y aborígenes australianos permitieron un rápido desarrollo de esta disciplina.

El análisis de los materiales y técnicas empleadas en la ejecución del arte rupestre fue una línea de trabajo de importancia desde los primeros estudios. Entre 1902 y 1903 Henri Moissan, premiado con el Nóbel en química unos pocos años más tarde, realizó una serie de muestras por encargo del Abate Breuil para determinar la naturaleza de los pigmentos [1]. Se fijaron ya entonces unas premisas básicas, los pigmentos rojizos y anaranjados se identificaban como ocre y los negros y grises como óxidos de manganeso o carbones vegetales. Estas afirmaciones se mantuvieron durante décadas sin la práctica de nuevas analíticas, hubo que esperar hasta los años setenta. Será en ese momento, con la aparición de nuevas técnicas en las que el consumo de muestra era menor, cuando se vuelvan a intensificar los estudios en este campo.

2. EL PIGMENTO NEGRO DE MANGANESO: ESTADO DE LA CUESTIÓN

2.1. Líneas de investigación actuales.

Desde los años ochenta se han multiplicado las publicaciones sobre la naturaleza de los pigmentos y su origen geológico. Numerosos “crayons” a los pies de las pinturas han sido inventariados, catalogados y analizados a través de diversas técnicas [3]. Los resultados han permitido desarrollar estudios sobre la procedencia del material e inferir, a través de ello, las estrategias de aprovisionamiento de estos grupos paleolíticos [2]. Los mismos nos indican una selección del material en función de su coloración pero también de sus propiedades físicas y mecáni-

cas [4].

Aunque los estudios en profundidad sobre los minerales de manganeso han sido más tardíos que los aplicados a otros pigmentos, en los últimos años han multiplicado su número y contamos con varios proyectos punteros de investigación, con dos yacimientos a la cabeza Lascaux y Ekain [13].

2.2. Los pigmentos en la pintura rupestre Paleolítica.

Las evidencias arqueológicas han confirmado que la tesis enunciada por Leroi Gourhan “la simplicité et, en même temps, l’efficacité du material de l’artiste du Paléolithique supérieur” [5]. Podemos afirmar que los pigmentos empleados en las pinturas rupestres paleolíticas son mayoritariamente de origen mineral, y por tanto de gran estabilidad, aunque innegablemente se hayan producido virajes en los colores que apreciamos hoy en día. En cuanto a la variedad cromática, hay dos colores principales en el repertorio, negro y rojo. Los marrones y amarillos aparecen de forma residual, suponen tan sólo el 1% de la muestra [6].

Las propiedades de los pigmentos en ocasiones eran modificadas por la adición de cargas, obtenidas de agregados arcillosos, con contenido en cuarcita, calcita, feldespatos, biotitas y yeso, con el fin de variar su fluidez, adhesión y conservación. También se constata la aplicación de pigmentos en crudo sobre la pared. El uso de aglutinantes parece más minoritario, al menos en el caso de pinturas en cueva, siendo el medio más adecuado para el pigmento el agua saturada de carbonatos [7].

El color rojo procede del ocre, una arcilla rica en óxido de hierro. Menos frecuentemente se da el uso de la hematita, mineral de hierro que estado natural se presenta en forma de aglomerado de pequeños cristales rojos o grandes cristales negros [8].

El pigmento negro puede tener un origen orgánico o mineral, siendo más frecuente este último [9]. Entre los orgánicos el más abundante es el carbón vegetal [10]. Este pigmento luminoso y poroso con alto poder cubriente se obtiene de la combustión de elementos leñosos [11]. Pero

no debemos dejar de mencionar otros pigmentos orgánicos cuyo uso es más ocasional, quizás vinculado al alto gasto en su producción. En este grupo se puede enmarcar el negro de hueso, fruto de la combustión de material óseo, y el negro de lámpara, obtenido por la quema de grasa animal [12].

2.3. El negro de manganeso en la pintura rupestre paleolítica.

En estado natural encontramos más de veinte variedades de óxidos e hidróxidos de manganeso. Se dividen en dos grandes familias, por un lado aquellos sin cationes extraños en composición, como la pirolusita (MnO_2) o la hausmanita (Mn_3O_4), y por otro aquellos enriquecidos por barrio y otros cationes en una estructura tipo túnel, como la romanechita ($Ba_2Mn_5O_{16} \times H_2O$) o la todorokita ($(Ca, K, Na)Mn_6O_{12} \times H_2O$) [13]. Es frecuente que los minerales de manganeso se presenten de forma natural agrupados formando psilomelano, masa botroidal mezcla de diversos óxidos, mayoritariamente romanechita, criptomelano y todorokita [14]. Se ha constatado el uso de hollandita y pirolusita en las Cuevas de la Garenne [15]; romanechita, hollandita, hausmanita, pirolusita, todorokita y criptomelano en Lascaux [16]; y hausmanita en Ekain [17].

Por sus propiedades plásticas, debemos destacar dos variedades, el wad, mena de manganeso formada por una mezcla de óxidos hidratados, y la hausmanita. El wad tiene apariencia amorfa y su habitus puede ser reniforme, arborescente, en incrustaciones o masivo. Su uso se justifica por tratarse de un material blando de raya parda oscura-negruzca [18]. La hausmanita, óxido de manganeso poco habitual, formado en las rocas que han sufrido metamorfismo de contacto y también en los filones hidrotermales, presenta un color negro parduzco. La aparición de hausmanita en cuevas muy alejadas del lugar de extracción evidencia su valor para los grupos paleolíticos [19]. Se ha estudiado la posibilidad de la aplicación de tratamientos térmicos para su obtención. Los primeros estudios sobre la hausmanita presente en los paneles de Lascaux han resultado negativos [20], se trataría de un mineral de origen natural no antrópico. Un muestreo más amplio aclarará en los próximos años este respecto.

Al igual que podemos encontrar diferentes minerales de manganeso dentro de un mismo panel, éstos pueden convivir con pigmentos negros de otros orígenes. Así en Lascaux, dentro del mismo contexto estratigráfico encontramos "crayon" de negro de manganeso junto con "débris" de carbón vegetal [21]. En la Cueva de Ekain también se ha evidenciado el uso de negro de manganeso y con carbón vegetal [22].

3. CONCLUSIONES

El conocimiento de los constituyentes del patrimonio histórico es un factor fundamental para su conservación, pero también son de gran importancia los datos que puede aportar en el campo de la arqueología. En la última década los avances en el conocimiento del negro de manganeso han dado como resultado el establecimiento de

protocolos para conocer su preparación como pigmento, la identificación de los minerales empleados y su procedencia. Estos datos pueden ser fundamentales de cara a establecer la existencia de "recetas", que nos permitan inferir la movilidad de estos grupos paleolíticos y la existencia de contactos entre ellos.

REFERENCIAS

- [1] R. de Balbín et J.J. Alcolea, "Les Colorants de l'Art Paléolithique dans les Grottes et en plein air", *L'Anthropologie*, no.113, pp. 559-601, 2009, doi:10.1016/j.anthro.2009.09012.
- [2] J. Brunet et J. Vouve, *La Conservation des Grottes Ornées*. Paris: CNRS Editions, pp. 31-40, 1996.
- [3] C. San Juan, "Les Matières Colorantes Dans les Collections du Musée de Préhistoire des Eyzies", *Paléo*, no. 2, pp.229-242, 1990.
- [4] E. Chalmin, F. Farges, C. Vignaud, J. Susini, M. Menu and G.E. Brown Jr, "Discovery of Unusual Minerals in Paleolithic Black Pigments from Lascaux (France) and Ekain (Spain)", *Contribution to the 13th International Conference on X-Ray Absorption Fine Structure (XAFS13)*, Stanford, July 9-14 2006.
- [5] A. Leroi-Gourhan, *Préhistoire de l'Art Occidental*, Paris: Éditions Mazenod, p.29.
- [6] M. Menu, "L'Analyse de l'Art Préhistorique", *L'Anthropologie*, no. 113, pp. 547-558, 2009, doi: 10.1016/j.anthro.09.011.
- [7] M. Múzquiz, "Análisis del Proceso Artístico del Arte Rupestre", *Complutum*, no 5, pp. 357-368, 1994.
- [8] J. Brunet et J. Vouve, *La Conservation des Grottes Ornées*. Paris: CNRS Editions, pp. 31-40, 1996.
- [9] C. Vignaud, H. Salomon, E. Chalmin, J. M. Geneste et M. Menu,
- [10] "Le Groupe des "Bisons Adossés" de Lascaux. Etude de la Technique de l'Artiste par Analyse des pigments", *L'Anthropologie*, no 110, pp. 482-499, 2006.
- [11] F. Rull, F. Gázquez, J. Medina, A. Sanz, C. de las Heras, A. Prada, J.A. Lasheras y J. M. Calaforra, "Caracterización de pigmentos utilizados en el arte rupestre de la Cueva de Altamira", *Macla*, no. 19, julio, 2014.
- [12] H. David, "Contribución a la Conservación del Arte Rupestre Prehistórico", Tesis Doctoral, Dept. Conservación y Restauración de Bienes Culturales, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 2008.
- [13] E. Tomasini, G. Siracusano and M.S. Maier, "Spectroscopic, morphological and chemical characterization of historic pigments based on carbón. Paths for the identification of an artistic pigment", *Microchemical Journal*, no.102, pp.28-37, 2012, doi:10.1016/j.microc.2011.11.005.
- [14] P. Jezequel, G. Wille, C. Beny, F. Delorme, V. Jean-Prost, R. Cottier, J. Breton, F. Dure and J. Desprée, "Characterization and Origin of Black and red Magdalenian Pigments from Grottes de la Garenne (Vallée Moyenne de la Creuse-France): a Mineralogical and Geochemical approach of the Study of Prehistorical Paintings", *Journal of Archaeological Science*, no. 38, pp.1165-1172, 2011, doi:10.1016/j.jas.2010.12.014
- [15] C. S. Hurbult y C. Klein, *Manual de Mineralogía de Dana*, Barcelona: Editorial Reverte, pp. 291-308, 1989.
- [16] E. Chalmin, C. Vignaud, F. farges et M. Menu, "Heating Manganese Oxihydroxides Used as Black Paleolithic Pigment", *Phase Transitions Journal*, no. 81: 2-3, pp.179-203, 2008, doi:10.1080/01411590701514359.
- [17] N. Aujoulat, E. Chelmin, C. Vignaud, J. M. Geneste et M. Menu, "Lascaux: les Pigments Noirs de la Scène du Puits", *L'Art avant*

- L'Histoire: la Conservation de L'Art Préhistorique. 10es Journées de la Section Française de L'Institut International de Conservation, Paris, 23-24 Mai 2002, pp. 5-14.
- [18] E. Chalmin, F. Farges, C. Vignaud, J. Susini, M. Menu and G.E. Brown Jr, "Discovery of Unusual Minerals in Paleolithic Black Pigments from Lascaux (France) and Ekain (Spain)", Contribution to the 13th International Conference on X-Ray Absorption Fine Structure (XAFS13), Stanford, July 9-14 2006.
- [19] C. S. Hurlbult y C. Klein, Manual de Mineralogía de Dana, Barcelona: Editorial Reverte, pp. 291-308, 1989.
- [20] J. Brunet et J. Vouvé, La Conservation des Grottes Ornées. Paris: CNRS Editions, pp. 31-40, 1996.
- [21] E. Chalmin, C. Vignaud, F. farges et M. Menu, "Heating Manganese Oxihydroxides Used as Black Paleolithic Pigment", Phase Transitions Journal, no. 81: 2-3, pp.179-203, 2008, doi:10.1080/01411590701514359.
- [22] J. Vouvé, J. Brunet et F. Vouvé, "De l'Usage des Minéraux de Manganese par les Artistes de la Grotte Préhistorique de Lascaux, Sud-Ouest de la France", Studies in Conservation, no37, pp.185-192, 1992.
- [23] M. Menu, "L'Analyse de l'Art Préhistorique", L'Antropologie, no. 113, pp. 547-558, 2009, doi: 10.1016/j.anthro.09.011.

Olalla T. Canseco Domínguez se licenció en Historia por la Universidad Autónoma de Madrid en 2005 y diplomó en Conservación y Restauración de Bienes Culturales en la especialidad de Arqueología por la Escuela Superior de Conservación de Bienes Culturales de la Comunidad de Madrid en 2008. Actualmente es alumna del Máster Universitario en Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico de la Universidad Pablo Olavide.



El Patrimonio Etnográfico en metal: Propuesta de intervención para una trébede y su sartén.

Gonzalo Fernández Martínez

Resumen— Se propone en este artículo un protocolo de intervención para un caso de patrimonio etnográfico en metal, una trébede y una sartén. La propuesta consta de varias fases de limpieza, inhibición, consolidación y protección. Los estadios de corrosión por los que se ven afectados estos utensilios pueden limitarse con este tratamiento y conformar una conservación adecuada a este tipo de piezas de nuestro patrimonio etnográfico.

Palabras Claves— Trébede-Corrosión-Oxidación-Inhibición-Consolidación.

1. INTRODUCCIÓN

La trébede es un soporte de hierro formado por un aro sobre tres patas en cuyo hueco encaja el puchero para colocarlo directamente sobre las brasas. Hay una variante para sartenes en el que uno de los pies se ha prolongado lateralmente a través del corro o se desliza una pequeña horquilla vertical donde se apoya el mango de éstas [1].

Se pueden encontrar los primeros ejemplos de trébedes, en tiempos de los Iberos, como en el poblado ibérico del Puig de Sant Andreu, al noroeste de la península ibérica, en Girona, un asentamiento del cual se conservan restos de construcciones, datados entre el siglo VI a.C. hasta el siglo II a.C. [2]. Con respecto a la sartén, ésta pieza también forma parte del ajuar metálico. Este objeto se puede observar en múltiples documentos antiguos, inventarios y testamentos, y se caracterizaba por pasar de generación en generación gracias a su estabilidad.



Figura 1. Estado inicial



Figura 2. Estado final

2. TÉCNICA DE MANUFACTURA

La trébede está formada por seis láminas planas de hierro trabajadas mediante diversas técnicas de forja, que eran ensambladas de forma manual a partir de diferentes sistemas de unión. Estas seis partes corresponden a tres pies, un aro, un asidero del cual sale el cuarto pie, y una horquilla (figura 3).

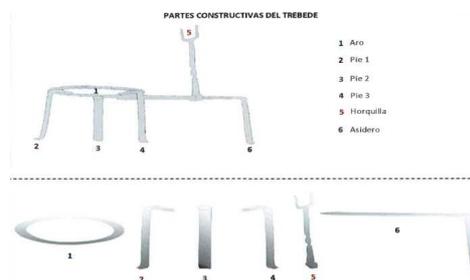


Figura 3. Ensamble e identificación de cada una de las partes constructivas de la trébede.

El sistema de ensamble de la trébede, objeto de estudio, es de unión fija formada por dos láminas con remachado (figura 4). La sartén está formada por dos piezas de hierro: recipiente y mango.

Elaboración del mango:

El mango de la sartén es una lámina delgada de hierro forjado, en la que se emplearon las técnicas de forja como el estirado, ensanchado y doblado o curvado. Esta última se debió usar para realizar la curva que presenta el mango en uno de sus extremos.

Elaboración del recipiente:

El recipiente de la sartén se realizó por medio de la técnica del hierro fundido. Esta técnica, denominada vaciado, requiere en un primer momento de la elaboración de un molde.

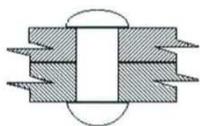


Figura 4. Gráfico explicativo del tipo de unión

3. ESTUDIO DE UNA TRÉBEDE Y SARTÉN DEL MUSEO ETNOGRÁFICO DE REQUENA

Durante el estudio de visu realizado a la trébede, se identificó que no presenta patologías con pérdidas de material graves, como fisuras y grietas que estuvieran afectando su estabilidad estructural, sin embargo poseía una espesa capa de productos de corrosión en la superficie y picaduras, siendo sus principales síntomas de degradación (figuras 1, 4-9). El principal problema para la conservación de esta pieza son los productos de corrosión que se formaron en su superficie, y que se mezclan con suciedad superficial y material biológico acumulado; patologías relacionadas con el abandono de esta pieza.

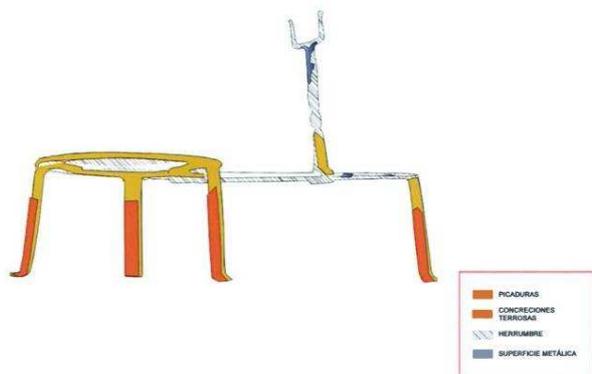


Figura 5. Mapa representativo de daños de la superficie de la trébede

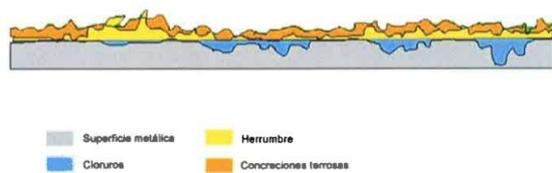


Figura 6. Esquema representativo de la trébede, mostrando las patologías encontradas

Para un mayor conocimiento de los productos de corrosión, se realizó un estudio con ayuda de lupa binocular de la superficie (figura 7), que puso de manifiesto material biológico adherido que constituye un factor importante de biodeterioro y también se identificaron productos de corrosión con un aspecto de concreción terrosa de coloración ocre (herrumbre) y la posible presencia de cloruros en la parte interna.

Cuando se produce un proceso de corrosión de un material de forja aparecen diferentes tipos de productos como por ejemplo óxidos o cloruros de Fe(II) o Fe(III), y cada uno presenta colores más o menos definidos. La coloración de los productos observados en la superficie de la trébede sugería dos posibilidades: por un lado que se

trate de goethita, producto de alteración común para los objetos de aleación de hierro y cloruros de hierro, lo que se deduce al observar pequeñas gotas de color marrón brillante.

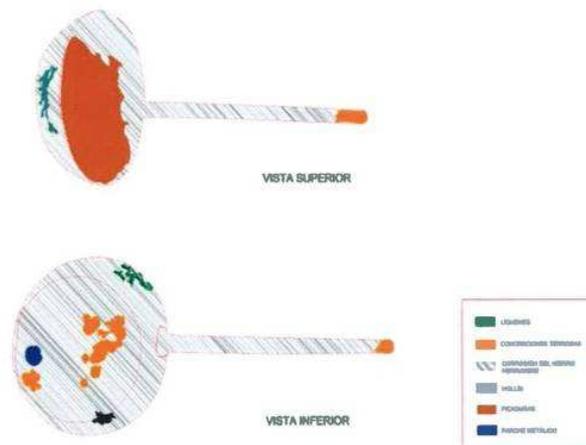


Figura 7. Mapa de daños de la sartén

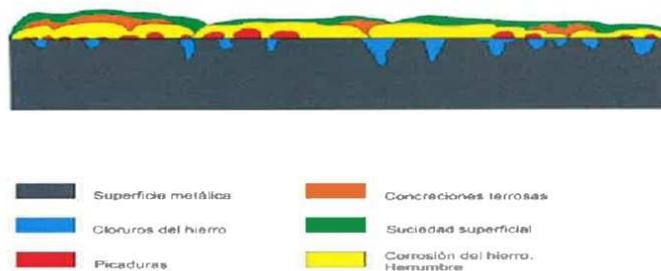


Figura 8. Esquema representativo de los productos que se presentan en la superficie metálica de la sartén

Uno de los pies del aro, zona más deteriorada de la trébede presentaba una pérdida del material, que podría ser consecuencia de la presencia de coluros de hierro.

El estado de conservación de la sartén, a pesar de que se encontraba estructuralmente estable, presentaba varios focos de corrosión que le seguían afectando. En los mapas de daños, figuras 7-8, se pueden observar las patologías que afectaban a la pieza.

La presencia de cloruros de hierro implica generalmente una corrosión localizada o picadura causada por iones cloruro, los cuales al estar activos van a reaccionar con la humedad del medio corroyendo el metal y generando levantamientos de material, patología que se observa claramente en la sartén (figura 9). La presencia de picaduras es muy frecuente en piezas de hierro y debe ser tratada ya que el material que emerge de las picaduras genera levantamientos que pueden desplazar la superficie original del objeto.

Por otro lado, es posible que presente una corrosión intergranular en el borde de la sartén, en la zona donde se aprecia el parche más grande (figura 9).

Esta pieza también presentaba cloruros de hierro (figura 7-9). Estos productos se han podido identificar en la parte inferior de la base de la sartén, ya que se aprecian pequeñas gotas de color marrón brillante, apariencia caracterís-

tica de este producto de corrosión. En esa zona de corrosión localizada, se han identificado picaduras causadas por los iones cloruros, los cuales son muy activos, reaccionando con la humedad y generando levantamientos de material. Por otro lado, se observó una posible corrosión intergranular, en el borde de la sartén.

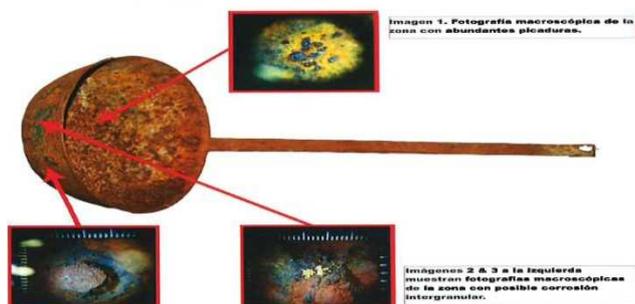


Figura 9. Fotografías macroscópicas de detalles de la sartén

4. INTERVENCIÓN

Dado la presencia de productos de corrosión y de picaduras, se llevaron a cabo los siguientes pasos para restaurar ambas piezas (figura 2):

Pre-consolidación en el borde de la sartén, donde presentaba pérdidas de material con una resina acrílica a baja concentración en disolvente orgánico, aplicándolo por inyección.

Limpieza mecánica con cepillos y brochas de cerdas duras y aspiradora para eliminar suciedad superficial que presenta la pieza.

Para la eliminación de los diferentes productos de corrosión se realizó una segunda limpieza, alternando un proceso mecánico con bisturís o lápices de fibra de vidrio y una limpieza química mediante disolvente orgánico (alcohol etílico) aplicado con hisopo. Con esta limpieza mixta, combinando y alternando disolvente con útiles mecánicos, se consigue un nivel homogéneo cercano a la superficie metálica.

Por último, una tercera limpieza, en la que se rebaja al mínimo el estrato sobrante mediante el uso de microtorno con un cabezal de hilos de alambre finos, a una velocidad 5 rpm.

Se realizó una inhibición de la pieza con una disolución de ácido tánico a pH de 2.5 ajustado con ácido ortofosfórico en solución hidro-alcohólica. Esta solución se aplicó mediante brocas. El ácido tánico se usa para el mantenimiento de metales inestables ya que proporciona una estabilidad iónica combinándose con el hierro y formando una barrera protectora que evita la penetración de nuevos agentes medioambientales agresivos [3]. Esta disolución debe ser aplicada sobre una superficie totalmente desengrasada y seca. Por este motivo, antes se sumerge la pieza en un baño de acetona y luego se deja secar en una estufa de aire forzado durante 45 minutos.

Se llevaron a cabo dos protecciones: la primera capa se realizó con una resina acrílica en disolvente orgánico, y se aplicó con brochas sobre toda la superficie de la pieza e inyección en el remache del borde de la sartén. Por último

se aplicó una segunda capa de protección con cera microcristalina. Las resinas sintéticas son muy utilizadas, ya que son estables en el tiempo y reversibles. Además, es un producto transparente que no altera las propiedades ópticas de la superficie original del objeto. La segunda capa de protección de cera microcristalina, tiene propiedades hidro-repelentes y dota a la superficie con un brillo homogéneo, matizando las zonas brillantes causadas por la resina sintética. Este tipo de ceras son irreversibles [4] y nunca deben aplicarse directamente sobre la superficie sino sobre un estrato intermedio.

5. CONCLUSIÓN

El patrimonio etnográfico en metal, como la trébede y la sartén presentadas en este trabajo, aunque es relativamente abundante y valioso, su naturaleza lo hace susceptible a graves problemas de corrosión. La combinación de limpieza mecánica a varios niveles, con otra química, prepara las piezas para la necesaria inhibición que conseguirá su estabilidad. La durabilidad de este tipo de piezas se puede conseguir mediante dos capas complementarias de protección con resina acrílica y cera microcristalina.

Con el protocolo propuesto de actuación se han obtenido excelentes resultados y se consigue una conservación óptima para estas piezas de nuestro patrimonio etnográfico.

REFERENCIAS

- [1] Trujillano, María Teresa Sánchez y Martínez, José Ramón Gómez. Llares. La cocina popular en la colección etnográfica del museo de la Rioja. Logroño: Museo de la Rioja, 1998
- [2] Buxo, Ramón, y otros. Prácticas alimentarias en la Edad del Hierro en Cataluña. SAGVNTUM. Papeles del laboratorio de arqueología de Valencia. De la cuiana a la taula.IV. Reunión d'economía en el primer mil-lenii Ac. Universitat de Valencia: s-n., 1995
- [3] Keene, S. Real time survival rates for treatment of archeological iron. Ancient and historic metals. Conservation and scientific research. Los Angeles: The Getty Conservation Institute, 1994, Pág.,262
- [4] Oviedo, Trinidad Pasés. Los trabajos de conservación y restauración del material metálico. Valencia: ARSE 39, 2005. Page 60



Gonzalo Fernández Martínez Máster en Diagnóstico del estado de conservación del patrimonio histórico en la UPO. Diplomado en Gestión y administración pública, y enólogo. Actualmente cursa el Máster de conservación y restauración de bienes culturales en la UPV

Calidad Software

Manuel Benítez Sánchez

Resumen—Con el aumento de la demanda software, presente en todo tipo de dispositivos, sistemas de gestión, transporte, banca o comunicaciones, entre otros, ha crecido exponencialmente el número de empresas de software, y con ellas la necesidad de estándares, normas y modelos que ayuden a producir un software de mayor calidad.

Palabras Claves— Desarrollo, software, calidad, Ingenieros software.



1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la demanda software se ha disparado. El software está presente en todo tipo de dispositivos personales, profesionales o del hogar. Este aumento de demanda crea una serie de necesidades muy características.

Se empieza a hablar de factorías de software (empresas encargadas de desarrollo software), parte del desarrollo son muy específicas y con lo que se requiere especialistas para esas tareas. Ésto ha despertado un interés por la calidad y que crece de forma continuada a medida que crecen las exigencias rechazando productos poco fiables.

Ahora bien. ¿Qué es la calidad software?

La Calidad Software es una disciplina dentro de la Ingeniería Software que busca el equilibrio entre los requerimientos funcionales y los requerimientos de rendimiento explícitamente establecidos, basándose en normas o estándares genéricos y en procedimientos particulares [1].

A nivel organizativo, las normas o estándares softwares (descripciones técnicas detalladas, elaboradas con el fin de garantizar la interoperabilidad entre elementos construidos independientemente) facilitan a los profesionales moverse entre proyectos y productos reduciendo el esfuerzo requerido de formación, por el hecho de que todos los miembros conozcan y entiendan la forma estándar de desarrollo y mantenimiento de productos software que permiten una metodología uniforme para la revisión del estado del producto y del proyecto.

A nivel industrial, los estándares permiten profesionalizar una disciplina proporcionando el uso de buenas prácticas tal y como son definidas por los expertos en la industria del software, ayudando a introducir nuevas tecnologías y métodos en la industria como, por ejemplo, los estándares UML ayudaron a introducir una metodología consistente para el modelado de los requerimientos OO (Orientado a Objetos) y diseños en la industria software.

Vamos a ver cómo están organizados estos estándares

detallando alguno de ellos y viendo el impacto de los mismos en la calidad software.

2. ¿CÓMO PODEMOS MEJORAR LA CALIDAD DEL SOFTWARE POR MEDIO DE CERTIFICACIONES, NORMAS O MODELOS?

En términos de calidad, podemos distinguir tres puntos de vista en los que centrar nuestros esfuerzos de mejora. Hablamos de calidad del producto, calidad del proceso y la calidad de las personas involucradas en el proyecto [1].

2.1. Proceso

Los procesos podemos definirlos brevemente como un conjunto de actividades, métodos, prácticas, etc. [3] que las personas usamos para desarrollar el software. Un ejemplo puede ser los planes de proyecto o la documentación del diseño.

Es decir, si mejoramos la calidad de los procesos estamos mejorando la calidad del producto también.

Para este tipo de mejoras están los estándares ISO9001:2000, ISO/IEC 15504, CMMI, TickIT, ISO 20000, etc., entre otros. Dos de las más importantes:

2.1.1. CMMI

Tiene como finalidad proporcionar una única guía unificada para la mejora de múltiples disciplinas tales como Ingeniería de Sistemas, ingeniería del Software y el desarrollo integrado del Producto y del Proceso.

Es un modelo, es decir, refleja una abstracción de la realidad que permite a las organizaciones adoptar prácticas útiles para alcanzar sus objetivos. Es una referencia, no un proceso en sí.

Considera dos enfoques para adoptar las mejoras: [1]

- **Continuo.** Permite seleccionar en qué áreas específicas queremos mejorar y así centrarnos en las metas y prácticas de esa área, siendo muy útil para organizaciones interesadas en la mejora de determinados aspectos de desarrollo.

- **Escalonada.** Divide las áreas en 5 niveles de madurez (Inicial , Gestionado, Definido, Cuantitativamente gestionado, Optimizado)

Tabla 1 - Listado de certificaciones CMMI-DEV año 2013, por país. [6]

Nº	País	Nivel 5	Nivel 4	Nivel 3	Nivel 2	Total
1	China	31	26	558	6	621
2	EEUU	20	2	157	72	251
3	India	36	0	115	4	155
4	México	4	1	27	17	49
5	Brasil	3	1	18	14	36
6	España	4	0	10	21	35

2.1.2 ISO9000

Esta familia de estándares se identifica con 8 principios de gestión de la calidad que conduce a la organización hacia una mejora en el desempeño en diferentes aspectos: Enfoque al cliente, Liderazgo, Participación del personal, Enfoque basados en procesos, Enfoque de sistema para la gestión, Mejora continua, Enfoque basado en hechos para la toma de decisión, Relaciones mutuamente beneficiosas con el proveedor.

Se basa principalmente en la motivación, tanto en los de los trabajadores activos en el proyecto como en la de los clientes.

2.2. Producto

Al igual que para los procesos también hay estándares que se centran en la calidad del producto, mejorando la usabilidad, funcionalidad, fiabilidad, eficiencia, mantenimiento... Una mejora de estas características mejorará la calidad de nuestro producto.

Algunos estándares enfocados a la calidad del producto son: TPI/TMAP, Modelo de Bohem, Modelo de Gilb, Modelo de Dromey, norma ISO 9126-1, Modelo de McGall, ISO 25000 etc.

2.2.1 ISO-9126-1

Describe un modelo de calidad del producto software compuesto por varios conceptos básicos: características, subcaracterísticas, atributos y métricas. [1]

Propone dos modelos de calidad: modelo de calidad para la calidad interna y externa y un modelo de calidad en uso

- Calidad externa evalúa que el software satisfaga las necesidades del usuario teniendo en cuenta las condiciones específicas.
- Calidad interna evalúa el total de atributos que un software debe satisfacer teniendo en cuenta condiciones específicas.
- Calidad en uso permite ver la interrelación entre usuario y el producto desde el punto de vista de la eficiencia y la satisfacción.

2.3. Personas

Al fin y al cabo por muy buenos estándares y normas que usemos para los procesos y productos, la clave en los proyectos son las personas. Las personas son las que hacen al software y esto es un hecho.

Para optimizar este recurso (las personas) se podría hablar de dos formas, informales y formales. Usando técnicas de coaching podemos mejorar la actitud (mejor competencias) y habilidades de las personas.

Otros modelos más formales pueden ser TSP (Team Software Process), este modelo se basa en la creación de equipos a primera hora del proyecto y estos definen conjuntamente sus objetivos, roles y demás. De esta forma se consigue que todo el equipo se sienta parte del proyecto.

Por último, contamos con el PSP (Personal Software Process), que pretende formar a los ingenieros softwares con métodos disciplinarios para mejorar sus habilidades de estimación y planeación, comprometerse con objetivos que se puedan cumplir y administrar la calidad de sus procesos.

3. IMPACTO DE LA CALIDAD SOFTWARE

En 2012 el ratio de que un proyecto terminase satisfactoriamente era del 39 %, es decir, sólo el 39 % de los proyectos llevados a cabo fueron terminados y no solo terminados, decir que fueron terminados a tiempo con los requerimientos y funcionalidades exigidas.

Un 43 % tuvieron que ser modificados durante el proceso, tiempos, costes, requerimientos, funciones... y un 18% fue cancelado.

Si estos datos los comparamos con años anteriores deberíamos pararnos a pensar cuán de importante es mejorar la calidad del software que hacemos, podemos ver cómo con el paso de los años se está tomando conciencia y hace que mejore poco a poco, aun así se estamos lejos de unos porcentajes de éxito razonables.

TABLA 2 Resumen años y porcentajes de proyectos terminados, modificados y fallidos. [2]

Año	Terminados	Modificados	Fallidos
1994	16%	53%	31%
1996	27%	33%	40%
1998	26%	46%	28%
2000	28%	49%	23%
2002	34%	51%	15%
2004	29%	53%	18%
2006	35%	46%	19%
2008	32%	44%	24%
2010	37%	42%	21%
2012	39%	43%	18%

- [6] http://rcs.cic.ipn.mx/2014_79/Analisis%20del%20estado%20actual%20de%20certificaciones%20CMMI-DEV%20ver_%201_3%20ano%202013%20y%202014.pdf



Manuel Benítez Sánchez, Estudiante de la Universidad Pablo de Olavide, cursando 4º del título de Ingeniería Informática en sistemas de información. Interesado en el análisis de datos.

4. CONCLUSIONES

Sin Calidad, el software no progresaría, es necesario una evolución en las técnicas y en la forma de pensar para su mejora, sin planificación, cada uno a su libre albedrío, los costes y tiempos se multiplicasen a la vez que la usabilidad, eficiencia, mantenibilidad, etc. del mismo bajasen.

Además, bajo mi punto de vista, las personas involucradas en el proyecto software son las más interesadas en este tipo de prácticas, pues les hace mucho más fácil la inserción a nuevos proyectos sin dedicar tiempo en aprender un nuevo modo de trabajo y centrándose en lo que saben hacer.

REFERENCIAS

- [1] <http://laboratorios.fi.uba.ar/lisi/scalone-tesis-maestria-ingenieria-en-calidad.pdf>
- [2] <http://www.versionone.com/assets/img/files/ChaosManifesto2013.pdf>
- [3] http://www.academia.edu/11089481/Identifying_the_Reasons_for_Software_Project_Failure_and_Some_of_their_Proposed_Remedial_through_BRIDGE_Process_Models
- [4] <https://www.cs.umd.edu/~basili/presentations/processimprovements.boston.pdf>
- [5] http://tic.uis.edu.co/ava/pluginfile.php/151785/mod_resource/content/4/ESPA%20C3%91A.%20UOC.CARLOTA%20BUSTE-LO.%20NORMAS%20T%20C3%89CNICAS%20REACCIONADAS%20CON%20LA%20GESTI%20C3%93N%20DOCUMENTAL.pdf

Ingeniería de requisitos

Estefanía López García

Resumen— La ingeniería de requisitos es muy importante a la hora de satisfacer las necesidades de los clientes, hay que seguir una serie de directrices para poder intentar realizar un buen estudio de los requisitos. Como vemos esto es una tarea muy difícil de realizar debido a que los propios usuarios no tienen un conocimiento amplio en este sector y resulta muy difícil de transmitir a los expertos lo que verdaderamente necesitan.

Palabras Claves— Ingeniería, requisitos, funcional.



1. INTRODUCCIÓN

La ingeniería de requisitos o Ingeniería de requerimientos comprende todas las tareas relacionadas con la determinación de las necesidades o de las condiciones a satisfacer para un software nuevo o modificado. La ingeniería de requisito toma en cuenta los diversos requisitos de las partes interesadas que pueden entrar en conflicto entre ellos. Muchas veces se habla de requerimientos en vez de requisitos, esto se debe a una mala traducción del inglés. El propósito de esta ingeniería es hacer que los requisitos alcancen un estado óptimo antes de alcanzar la fase de diseño en el proyecto. Los requisitos deben ser medibles, comprobables, sin ambigüedades o contradicciones, etc.

Lo más difícil en la construcción de un sistema software es decidir, precisamente, qué construir. La ingeniería de requisitos puede ser un proceso largo para el que se requiere de habilidades psicológicas. Los nuevos sistemas cambian el entorno y las relaciones entre las personas, por ello es importante identificar a todos los actores involucrados, considerar sus necesidades y asegurar que entienden las implicaciones de los nuevos sistemas.

Los analistas pueden emplear varias técnicas para obtener los requisitos del cliente. Históricamente, esto ha incluido técnicas tales como las entrevistas, o talleres con grupos para crear listas de requisitos, aunque actualmente existen técnicas más actuales como *Concept Mapping*, son grafos en los que los vértices representan conceptos y las aristas representan posibles relaciones entre dichos conceptos. Estos grafos de relaciones se desarrollan con el usuario y sirven para aclarar los conceptos relacionados con el sistema a desarrollar. Las estrategias recomendadas para la especificación de requisitos software están descritas por IEEE 830-1998. Este estándar describe las estructuras posibles, contenido deseable, y calidades de una especificación de requisitos del software [1].

Los problemas que podemos encontrar a la hora de realizar los requisitos son diversos, los usuarios no saben lo que realmente necesitan, un sistema tiene muchos usuarios y ninguno tiene una visión de conjunto, no saben que parte de su trabajo puede transformarse en software.

Los analistas han de tomar en consideración a todos los implicados para que se obtengan y depuren sus requisitos de la forma más fidedigna posible. Entre los stakeholders [2] hay que considerar:

- Organizaciones que integran la organización del analista que está diseñando el sistema.
- Organizaciones o sistemas de respaldo, dirección y usuarios.

2. TIPOS DE REQUISITOS

2.1. Requisitos funcionales

Los requisitos funcionales de un sistema describen lo que el sistema debe hacer, en algunos casos también declaran explícitamente lo que el sistema no debe hacer.

Muchos de los problemas de la ingeniería de software provienen de la imprecisión en la especificación de requisitos. Para un desarrollador de sistemas es natural dar interpretaciones de un requisito ambiguo con el fin de simplificar su implementación. Sin embargo, a menudo no es lo que el cliente desea y se tienen que estipular nuevos requisitos, por lo tanto se debe hacer cambios al sistema, retrasando la entrega de éste e incrementando el costo [2].

2.2. Requisitos no funcionales

Los requisitos no funcionales, como su nombre lo indica, son aquellos requisitos que no se refieren directamente a las funciones detalladas que realiza el sistema, sino a las propiedades de este como el tiempo de respuesta, la capacidad de almacenamiento y otros aspectos como el diseño, aspectos éticos, legales, de seguridad y ese tipo de cosas que no tienen que ver directamente con funciones del sistema. De forma alternativa, definen restricciones

del sistema como la capacidad de los dispositivos de entrada/salida y las representaciones de datos que se utilizan en las interfaces del sistema.

Los requisitos surgen de la necesidad del usuario, debido a las restricciones en el presupuesto, a las políticas de la organización, etc. [3].

3. COSTO DE LOS REQUISITOS EN DIFERENTES ETAPAS

Boehm y Papaccio en 1988 [4], realizan una cuantificación del costo de corregir los errores asociados a requerimientos en las diversas etapas del software.

Tabla 1

Etapas	Costo
Análisis y Esp. Requisitos	1
Diseño	5
Codificación	10
Prueba Unitaria	20
Producción	200

4. PROCESO DE ANÁLISIS DE REQUISITOS

Se trabaja en conjunto con los usuarios y los clientes.

Problemas comunes:

- Los requisitos están en sus términos y con conocimientos implícitos de su propio trabajo.
- Distintos usuarios tienen distintos requisitos, se deben encontrar todas las fuentes.
- Influyen factores políticos.
- La importancia de los requisitos varía en el tiempo.
- Aparecen nuevos requisitos.

El proceso de análisis sigue diferentes etapas:

- **Comprensión del dominio:** el analista debe desarrollar su propia comprensión del dominio de la aplicación. Ej.: Si fuera un sistema para supermercado este debe evaluar cómo funciona un supermercado.
- **Recolección de requisitos:** este es el proceso de interactuar con los clientes y usuarios para descubrir sus requisitos.
- **Clasificación:** considera la recolección no estructurada de requisitos y los organiza en grupo coherentes.
- **Resolución de conflictos:** de forma inevitable, cuando existen muchos stakeholder (cualquier persona o grupo que intervengan en el proyecto) involucrados, los requisitos estarán en conflicto. Pues esta fase se refiere a resolver estos conflictos.
- **Priorización:** Descubrir la importancia de cada requisito. Es útil separarlos en tres categorías:
 - Requisitos que deben ser absolutamente

satisfechos.

- Requisitos que son muy deseables pero no indispensables.
 - Requisitos que son posibles, pero que podrían eliminarse.
- **Verificación de requisitos:** los requisitos se verifican para descubrir si están completos, son consistentes y acorde con lo que realmente quieren los stakeholders.

5. CONCLUSIONES

A pesar de la importancia que tiene la ingeniería de requisitos, ha costado mucho que se le preste una atención adecuada, aun quedan muchos desafíos que deben ser mejorados tales como la integración de requisitos funcionales y no funcionales para la mejora del sistema.

Hay que prestar mucha atención y tener mucho cuidado a la hora de realizar la toma de requisitos como hemos visto en la tabla 1 en fases más avanzadas tiene un costo mayor debido al impacto que estos tienen en dichas fases.

REFERENCIAS

- [1] Estándar IEEE 830-1998 , 22 de Octubre de 2008 <https://www.fdi.ucm.es/profesor/gmendez/docs/is0809/ieee830.pdf>
- [2] Stakeholders son cualquier persona que intervenga en el proyecto.
- [3] Wiegers, Karl E. (2003) *Software Requirements 2: Practical techniques for gathering and managing requirements throughout the product development cycle*, 2nd ed, Redmond: Microsoft Press. ISBN 0-7356-1879-8
- [4] Boehm, B.W. & Papaccio, P.N. (1988). *Understanding and Controlling Software Costs*. *IEEE Transactions on Software Engineering*, 14(10), pp. 1462-1477



Estefanía López García estudiante de segundo año en el grado de Ingeniería Informática en Sistemas de Información en la Universidad Pablo de Olavide.

Mantenimiento Software. Su Importancia y Repercusión en Costes

Juan Antonio López Cano

Resumen—El mantenimiento software es la fase de mayor coste económico de un proyecto software. Existen procedimientos para llevar a cabo una aplicación, que deben ser analizados al máximo para evitar un coste superior al estimado en el análisis ya que un mal análisis puede hacer que nuestro proyecto no funcione. En este artículo se recogen algunas medidas para reducir este alto coste y la importancia que tiene seguir dichos pasos en la elaboración de nuestro proyecto.

Palabras Claves—Aplicación, Coste, Desarrollo, Mantenimiento, Software.



1. INTRODUCCIÓN

El mantenimiento software es después del diseño el proceso más importante de una aplicación [3]. Éste proceso refleja si nuestro proyecto es rentable ya que está estadísticamente comprobado que el coste del mantenimiento software en su vida útil duplica el del proceso de desarrollo [3].

Podríamos definir mantenimiento software al conjunto de actividades destinadas a proporcionar soporte económicamente rentable para un determinado producto software [1]. Estas actividades se realizan tanto antes como después de la entrega del producto. Las actividades previas incluyen la planificación, anticipación y preparación de acciones de mantenimiento que se llevaran a cabo posteriormente. Las actividades posteriores a la entrega incluyen modificaciones del producto software, formación y asistencia al usuario [4].

Las causas de un alto coste del mantenimiento software son variadas como, cambios incontrolados, escasez de métodos, técnicas y herramientas, complejidad de los sistemas, documentación del sistema inexistente o defectuosa. Por todo esto en la actualidad podemos encontrar sistemas con escasa calidad debido a: estructuras de datos con un diseño pobre, mala codificación, lógica defectuosa y documentación escasa o errónea. Estas mismas razones provocan que el coste de solucionar un defecto en la etapa de mantenimiento sea mucho mayor que en la etapa de análisis [3].

Hemos de cuidar que los programas específicos que utiliza una empresa, especialmente si ha sido creado para la empresa, cumplen los objetivos que prometen. Después de satisfacer las fases de implementación y verificación, lo próximo en [desarrollo de software](#) será adoptar medidas de diferentes tipos para comprobar su rendimiento y posibles mejoras. Existen diferentes tipos de mantenimiento software: perfecto, adaptativo, correctivo y preventivo [6].

2. TIPOS Y FUNCIONES DE MANTENIMIENTO SOFTWARE

Con el tiempo las aplicaciones software tienen que ser sometidas a modificaciones que extiendan su vida útil o

mejoren sus características. Adaptaciones a nuevos sistemas operativos, agregar funcionalidad son las tareas principales del mantenimiento software, las cuales se llevan a cabo mediante diferentes tipos de mantenimiento[5].

Mantenimiento preventivo. Consiste en la revisión constante del software para detectar posibles focos de problemas que puedan surgir en el futuro.

Mantenimiento predictivo. Evalúa el flujo de ejecución del programa para predecir con certeza el momento en el que se producirá la falla, y así determinar cuándo es adecuado realizar los ajustes correspondientes.

Mantenimiento correctivo. Corrige los defectos encontrados en el software, y que originan un comportamiento distinto al deseado. Estas fallas pueden ser de procesamiento, rendimiento (por ejemplo, uso ineficiente de los recursos de hardware), programación (inconsistencias en la ejecución), seguridad o estabilidad, entre otras.

Mantenimiento adaptativo. Si se requiere cambiar el entorno de uso de la aplicación (que incluye al sistema operativo, a la plataforma de hardware o, en el caso de las aplicaciones web, al navegador), puede ser indispensable modificarla para mantener su plena funcionalidad en estas nuevas condiciones.

Mantenimiento evolutivo. Es un caso especial donde la adaptación resulta prácticamente obligatoria, ya que de lo contrario el programa quedaría obsoleto con el paso del tiempo. Por ejemplo, el cambio de versión en un navegador (muchas veces impuesto sin el consentimiento del usuario) suele obligar a realizar ajustes en plugins y aplicaciones web.

Mantenimiento perfecto. Por distintas razones, el usuario puede solicitar el agregado de nuevas funcionalidades o características no contempladas al momento de la implementación del software. El mantenimiento perfecto adapta la aplicación a este requerimiento [2].

El constante mantenimiento asegurara su funcionalidad, ahorrando tiempo y coste económico de una migración total hacia otra aplicación.

3. COSTE, IMPORTANCIA Y SOLUCIÓN

Las fases de una aplicación software constan de cinco estados [3]: análisis, diseño, implementación, pruebas y mantenimiento (Fig1).



Fig. 1. Fases de una aplicación software.

El mantenimiento es un proceso de suma importancia por su repercusión económica, temporal y de recursos. Estudios como el desarrollado por Pressman [7] nos indican que el mantenimiento es la fase mas costosa del ciclo de vida de una aplicación software (Fig2). A la hora de planificar los costes de mantenimiento, los analistas se encuentran con el llamado Efecto Iceberg (no saben cuales serán los costes). Este efecto hace percibir el mantenimiento como algo descontrolado por problemas y costes encubiertos. Algunas de las causas del alto coste son los cambios incontrolados. Los programas necesitan migraciones a nuevas plataformas o sistemas operativos, experimentan mejoras y adaptaciones para satisfacer las nuevas necesidades de los usuarios.

Uno de los problemas a los que nos enfrentamos en el mantenimiento es el del código heredado. La mayor parte del software en la actualidad esta formado por código antiguo. Una posible solución al coste elevado del mantenimiento seria la utilización de técnicas como ingeniería inversa, reingeniería, reestructuración y transformación [3].



Fig. 2. Porcentaje del costo de las fases de una aplicación software.

La ingeniería inversa consiste en la reconstrucción del proceso de ingeniería de un producto a partir de ciertos

artefactos de dicho producto.

La reingeniería consiste en examinar y modificar un sistema para reconstruirlo de nuevo, puede precisar de un proceso de ingeniería inversa para reconstruir el proceso de ingeniería del producto.

La reestructuración es la modificación del software para hacerlos mas fácil de entender y cambiar o menos susceptible de incluir errores en cambios posteriores.

La transformación es el proceso de manipulación por medio de transformaciones automáticas ejecutadas por un ordenador, del código o modelo de un sistema para añadirle, modificarle o eliminarle elementos [4].

Con estas soluciones se estima que podemos recortar en un 50% el coste de mantenimiento software.

4. CONCLUSIONES

En el mundo en el que nos toca vivir actualmente, lleno de tecnología a nuestro alrededor es necesario hacer más hincapié en las fases de desarrollo de software. El diseño es fundamental pero debemos exprimir al máximo qué futuro es el que queremos para nuestra aplicación, así el coste en mantenimiento se reducirá muy considerablemente. Para ello debemos aplicar nuevos métodos de análisis y recalcar la importancia que tiene el mantenimiento en nuestra aplicación y sobre todo el coste.

REFERENCIAS

- [1] ISO/IEC 14764 IEEE Std 14764-2006 - International Estándar - ISO/IEC 14764 IEE Std 14764-2006 Software Engineering Software Life Cycle Processesg \ Maintenance.
- [2] <http://www.4rsoluciones.com/tipos-de-mantenimiento-de-software/>
- [3] Santiago Moral García. Mantenimiento del Software. Kybele, grupo de investigación research group.
- [4] Pablo Sánchez Barreiro, Dpto. de Matemáticas, Estadística y Computación. Universidad de Cantabria.
- [5] Francisco Ruiz, Macario Polo. Mantenimiento del Software. Dep. de Informática. Universidad de Castilla-La Mancha.
- [6] <http://www.gadae.com/blog/tipos-de-mantenimiento-de-software/>
- [7] Pressman R.(1993): Ingeniería de Software. Un enfoque práctico. Mc Graw Hill.



Juan Antonio López Cano, estudiante de segundo curso del grado en Ingeniería Informática en Sistemas de Información en la Universidad Pablo de Olavide.

Metodologías de Desarrollo Software. ¿Tradicional o Ágil?

Ismael Morales García

Resumen—En este documento se abordara el concepto de metodologías de desarrollo software, analizando diferentes alternativas para ello. En este sentido se comparará la aproximación tradicional con las metodologías ágiles, las cuales están basadas en un desarrollo iterativo e incremental siendo muy importante la actitud y la iniciativa de todos los implicados.

Palabras Claves—Agilidad, Desarrollo Software, Procedimientos, Metodología, Proyecto.



1. INTRODUCCIÓN

Una metodología es un conjunto de procedimientos que se estructuran y realizan con la función de conseguir unos objetivos. Como estilo de desarrollo y alternativa a la metodología tradicional de desarrollo software, aparece la metodología ágil [referencia]. El gran cambio que supone la aproximación ágil radica en que en lugar del equipo de trabajo basarse en procesos y herramientas, como se hacía en la metodología tradicional, ahora se le da más importancia a la forma de trabajar de los propios miembros del equipo y a la forma que estos tienen de realizar las tareas.

Las metodologías ágiles son usadas en proyectos cuyo objetivo es tener el software funcionando lo antes posible, ya que así el cliente tendrá primeras versiones donde podrá comprobar y aportar su idea de negocio. Con este objetivo, se trabaja sobre las versiones previas, siendo el desarrollo de la siguiente iteración una mejora de la anterior. Este cambio de enfoque se consigue mediante la constitución de grupos de desarrolladores más autónomos. Así mismo, para organizar la forma de desarrollar el producto, se elaboran pequeños paquetes de trabajo, los cuales contendrán diferentes tareas que se deberán realizar. El tamaño de estos paquetes dependerá de la carga de trabajo que el equipo de desarrollo puede hacer frente. En las reuniones con los clientes y el equipo se organizan todas las tareas que hay que realizar, formando estos paquetes, así se agiliza también la toma de requisitos ya que será un trato más directo entre todo el equipo y el cliente.

La metodología ágil propone una forma de trabajo flexible cuya planificación se actualiza continuamente. Esto contrasta con las metodologías tradicionales, las cuales siguen una planificación precisa desde el principio. Para ésto aparece el rol del cliente el cual tiene mucha importancia. Ahora al no haber contratos cerrados, el cliente es uno más del equipo, que indica cual es su idea continuamente, y a cada versión que se le muestra este va modificando, mejorando y puliendo los detalles mas importantes para él, al ser software todo se puede modificar sin un

costo demasiado elevado.

El desarrollo del proyecto se comienza con una visión muy general, y se empieza buscando una iteración para llegar a una entrega en la cual se realice la función principal del proyecto, aunque no la haga completa, esta sería la primera iteración entregable al cliente. Después se trabaja sobre esta primera iteración actualizándola y mejorándola con los detalles que nos ha mostrado el cliente. Esto es muy importante, ya que, si el cliente presenta algunos problemas graves será al mucho mas económico reconducir el proyecto, o si en el peor de los casos, el proyecto no se terminase por cualquier motivo, el cliente tiene una versión que funciona, esta versión no tendría la máxima calidad y a lo mejor tampoco cumple todos los objetivos pero sí una versión que cumple con el objetivo principal.

Además la parte más importante del proyecto, cuando llega a la hora final del desarrollo esta parte esta muy madura, ya que ha sido muy comprobada y mejorada desde las primeras iteraciones.

Puede llegar a haber un problema al estar interviniendo mucho con el cliente, ya que las pruebas que él realiza, puede pasar a ser todo un codifica y prueba. Esto conllevaría al final un retraso para sacar el producto y perderíamos agilidad.

Se mejora mucho en los testing ya que el producto en cada fase va siendo probado y mejorado en todos los temas que se hayan detectado errores o mejorar, por lo tanto esto debería conllevar a unas pruebas finales mas efectivas.

2. METODOLOGÍAS TRADICIONALES VS METODOLOGÍA ÁGILES

Las metodologías ágiles es una evolución de las metodologías iterativas, ya que ambas se basan en objetivos a corto plazo. La metodología iterativa consiste en realizar lo mismo que en la metodología en cascada pero de pequeñas partes del producto, mostrando la resolución de cada una de ellas al cliente. Ahora la diferencia con la metodología ágil es que se realizan prototipos periódicamente en un periodo mucho más corto de tiempo, siendo este espacio de tiempo tan comprimido que las fases toma

de requisitos, diseño, codificación y pruebas, se realizan todas simultáneamente.

Anunciamos también las diferencias más destacables entre ambas metodologías:

Organización: En la metodología ágil se trabaja sobre una constante evolución del proyecto basado en pequeños objetivos a corto plazo, en lugar de todo un proyecto pre-diseñado.

Presupuesto: A la hora de gestionarlo, el tema queda más dinámico, ya que se elaboran mediante números de iteraciones, y esto dependerá de como transcurra el proyecto. En vistas de algún fallo en el presupuesto, es mejor encontrárnoslo en las primeras iteraciones que al final de un proyecto.

Velocidad y gestión: Se gana velocidad a la hora de realizar el proyecto, aunque es más difícil la gestión al no estar todo tan estudiado siendo consientes de una mayor probabilidad de error al principio que se pueden ir acumulando, los cuales se subsanarán en las siguientes iteraciones.

Rentabilidad y pruebas: Al tener una primera versión muy rápida en desarrollos realizados ágilmente, el cliente podrá sacar si lo desea a producción estas primeras versiones y empezar a rentabilizar su producto, sin tener terminado su producto por completo e ir mejorándolo y comprobando la aceptación o rechazo de su producto.

Para tomar la decisión de con qué tipo de metodologías realizar nuestro desarrollo dependerá del tipo de proyecto que sea y del equipo de trabajo del que se disponga. En proyectos donde los requisitos están perfectamente definidos en los que no va a ver grandes cambios es mejor usar una metodología tradicional.

3. DESARROLLO CON UNA METODOLOGÍA ÁGIL

Dentro de las metodologías ágiles existen varios métodos ágiles, como puede ser Scrum, Kanban o programación extrema. La elección de con qué método ágil trabajar dependerá del tipo de proyecto que se vaya a realizar y del equipo de trabajo que dispongamos, para cada proyecto hay que tomar decisiones e ir adaptando al desarrollo que y como se necesita, en definitiva adoptar nuestra propia metodología.

En una metodología ágil no significa que no se tenga que documentar aunque se le da más importancia a otras cuestiones como la información que conseguimos interactuando con el cliente. Para conseguir que nuestro proyecto se desarrolle de manera eficiente, el rol del cliente es el más importante. Principalmente éste tiene dos operaciones que realizar: Intervenir en la discusión para indicar qué se desea en las reuniones con el equipo, y confirmar e indicar qué se desea mejorar o qué no le vale en las versiones que le van llegando del equipo y las pruebas que él mismo va realizando.

Las metodologías ágiles están principalmente ideadas para equipos de trabajo ya que se logran mejores resulta-

dos gracias a la diversidad de opiniones por ejemplo, pero se pueden usar estas metodologías para equipos de trabajos individuales y solucionar estas restricciones involucrando más al cliente. También al trabajar autónomamente será más fácil la organización con el cliente.

6. CONCLUSIONES

Todas las tecnologías avanzan velozmente, cada segundo vale oro, con este tipo de metodologías bien aplicadas podemos conseguir que nuestro producto este en el mercado mucho más rápido rentabilizándose. El cliente también tendrá mayor flexibilidad a la hora de exponer su idea gracias a la planificación continua a la que está sometido el proyecto. Mejoras y solución de problemas más económicos son una de sus principales ventajas.

AGRADECIMIENTOS

Agredecer la oportunidad y la ayuda al profesor Norberto Díaz, a los compañeros del Grado en Ingeniería Informática En Sistemas De Información, como a profesionales por el comportamiento y la colaboración en todos los temas necesitados. Por último el apoyo y ánimo incondicional de la familia y amigos.

REFERENCIAS

- [1] Javier Garzás, 2014. Gestión de proyectos ágil. y las experiencias después de más de 12 años de proyectos ágiles. Madrid: 233 grados de TI.
- [2] 2001. Manifiesto por el desarrollo ágil de software.



Ismael Morales García estudiante de 3º en Ingeniería Informática en Sistemas de Información en la Universidad Pablo de Olavide. En la experiencia profesional destacar un año dedicado a la administración de sistemas Linux y Oracle en Ayesa. Personalmente las características que le destacan son el compromiso, la actitud positiva, aprendizaje autónomo, responsabilidad y capacidad de superación, a estos puntos le aumenta la calidad de su trabajo con las ganas de trabajar y aprender que siempre predispone. De esta manera y tras una estancia de un año en Italia se adapta a cualquier situación y tiene facilidad de integrarse en un grupo.

El poder de la Catálisis Asimétrica

María Gallego-García

Resumen—Hay moléculas que presentan simetría pero que no son superponibles, puesto que una es el reflejo de la otra, y por ello tienen actividad biológica diferente. Como estas moléculas se usan por ejemplo, en fármacos, se persigue la manera de generar solo la forma molecular que tiene el efecto deseado, siendo la catálisis en síntesis asimétrica el mecanismo elegido para este fin.

Palabras Claves—Asimétrica, Catálisis, Enantiómero, Quiralidad, L-DOPA.



1. INTRODUCCIÓN

Entre 1958 y 1963, fue comercializado un fármaco conocido como talidomida, que fue suministrado a mujeres como calmante de náuseas en los primeros meses de embarazo. Fármaco conocido también por su efecto sedante, por lo que se usó para otro tipo de tratamientos. En un principio, la talidomida no parecía tener efectos secundarios, pero en torno a esos años, se dieron numerosos casos de niños nacidos con malformaciones; descubriéndose con el tiempo que esos defectos congénitos eran debidos a este medicamento, pues presentaba efectos teratogénicos [1]. Sin embargo no fue la misma molécula de talidomida que producía efecto sedante la que condujo a esos problemas de desarrollo fetal, sino que fue su isómero óptico, más concretamente el enantiómero S.

Los enantiómeros son moléculas que presentan quiralidad, y un ejemplo que refleja esta propiedad son las manos, elementos simétricos pero no superponibles, que son imagen especular uno del otro. Los enantiómeros se nombran siguiendo la regla de prioridad llamada Cahn-Ingold-Prelog [2] donde R deriva del latín *Rectus* (derecha) y S del latín *Sinister* (izquierda). Además tienen la misma fórmula molecular y la misma secuencia de enlaces atómicos, compartiendo las mismas propiedades físicas, salvo que desvían el plano de luz polarizada en direcciones distintas, nombrándose como levógiro si lo desvía hacia la izquierda y dextrógiro hacia la derecha [3]. Es por la quiralidad, por lo que tienen actividad biológica diferente, pudiéndose unir a receptores quirales del medio ambiente o cuerpo humano dando respuestas y efectos distintos, algunos de ellos, perjudiciales como en el caso de la S-talidomida.

Hay otros casos, donde como se ha observado anteriormente, un enantiómero da una respuesta deseada y el otro o bien no da respuesta (inactivo biológicamente) o bien la respuesta es no deseada. Está el ejemplo del levorfanol que es una droga opioide y el del Dextrorfanol que es un antitusivo. Este último ha llegado a dar falsos positivos en test de detección de drogas como el levorfanol, ya que puede interactuar con los receptores donde se une el opioide [4]. Siendo muy conocido el caso de la DOPA, compuesto usado como tratamiento para el Parkinson,

que puede encontrarse en forma de L-DOPA (activo biológicamente) y D-DOPA, tema que se tratará posteriormente.

2. CATÁLISIS EN SÍNTESIS ASIMÉTRICA

2.1. Objetivo

Al encontrarse en la naturaleza gran variedad de moléculas quirales, y al usarse éstas, en campos variados como el campo de la medicina o medioambiental, el objetivo principal a perseguir sería el de obtener solo aquel enantiómero que ofrece el efecto deseado, y no aquel que produce efectos perjudiciales, desconocidos o simplemente que no da respuesta, pero que su síntesis requiere un coste determinado y además se generan residuos. Así pues, lo ideal sería obtener enantiómeros puros [5].

Este objetivo es posible, y se consigue mediante la catálisis en síntesis asimétrica, también conocida como síntesis enantioselectiva. Este mecanismo forma parte del tercer “mandamiento” de la Química Verde, el cual hace alusión a la síntesis química no contaminante.

2.2. Proceso

La síntesis asimétrica catalítica consiste en diseñar y desarrollar catalizadores quirales que permitan obtener enantiómeros puros. Para ello, estos catalizadores también deben ser enantiopuros, y es por esta razón, por la que su diseño es muy importante. Para la realización de la síntesis enantioselectiva es necesario un sustrato aquiral, pero proquiral, es decir, que en un principio no presente ningún átomo quiral pero que el cambio de uno de sus sustituyentes genere quiralidad en la molécula. Además es necesario un reactivo, catalizador o auxiliar quiral, para acelerar la reacción o ayudar a que se lleve a cabo [6].

Una propiedad muy importante de este proceso es la pureza óptica, definida a partir del exceso enantiomérico (e.e.): $e.e. = \% \text{isómero mayoritario} - \% \text{isómero minoritario}$. Si se obtiene $ee = 0$, estaríamos ante una mezcla racémica (mezcla 1:1), 50% de un enantiómero y 50% del otro; en cambio si se obtiene $ee = 100$ estaríamos ante un producto homoquiral, que es lo que se persigue en este proceso.

2.3. Premio Nobel de Química

En 2001, el Premio Nobel de Química tuvo que ser compartido por tres científicos. William Standish Knowles y Ryoji Noyori por el uso de catalizadores quirales en reacciones de hidrogenación y Karl Barry Sharpless por el uso de catalizadores quirales en reacciones de oxidación [7], [8], [9], [10]. Knowles destaca por sus investigaciones en la producción de L-DOPA usando catalizadores quirales y por conseguir finalmente producir esta variante. El catalizador usado para este proceso fue DIPAMP (figura 1) [11] (compuesto organofosforado) cuyos centros de fósforo son piramidales, unidos a tres sustituyentes diferentes (grupo anisilo, fenilo y etileno).

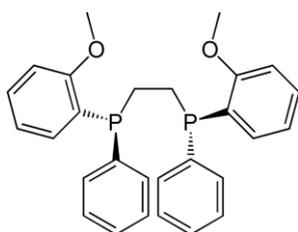


Fig. 1. DIPAMP(Difosfina quelante)

Knowles la utilizó como catalizador junto al metal rodio (Rh) [12] para llevar a cabo la hidrogenación asimétrica de un sustrato para dar finalmente levodopa.

Noyori también destacó en el campo de las hidrogenaciones asimétricas, siendo uno de los catalizadores usados por él, BINAP (compuesto organofosforado) junto con diamina y el metal rutenio (Ru) [12] (figura 2) [13].

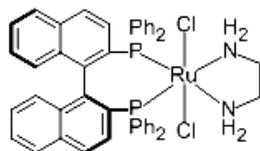


Fig. 2. (S)BINAP/(S)diamina-Ru

Además Noyori es un gran defensor del “poder de la catálisis” para realizar química sostenible [14].

Sharpless en cambio, destacó por usar catalizadores enantioselectivos en la reacción conocida como Epoxidación de Sharpless, donde se producen 1,3-epoxialcoholes a partir de alcoholes alílicos primarios y secundarios, formando el metal de transición titanio (Ti) [12] parte del complejo catalizador.

2.4. L-DOPA

Como se comentó en el primer apartado de este artículo, DOPA es una molécula que presenta dos enantiómeros (L-DOPA y D-DOPA) y se usa en pacientes que tienen Parkinson. La dopamina, es el principio activo, pues es el neurotransmisor deficitario en estos enfermos; pero no puede suministrarse de forma directa, ya que no puede atravesar la barrera hematoencefálica. Debido a esto, se usa DOPA, que una vez atraviesa esa barrera, pasa a dopamina por acción del enzima dopamina descarboxilasa. Pero este enzima solo actúa sobre el enantiómero L-

DOPA, y por consecuencia se acumula D-DOPA que carece de actividad biológica. Esta acumulación puede producir efectos indeseados como toxicidad. Además el usar una mezcla racémica hace que se acumule el 50% de este compuesto sin actividad alguna, haciendo que el tratamiento no sea tan efectivo, aumentando el coste del proceso y disminuyendo rendimientos en general. De ahí, la importancia que tiene el producir moléculas ópticamente puras, en este caso, solo L-DOPA [15], [16], usando para este fin catalizadores enantioselectivos, como el que utilizó Knowles, obteniendo un 95% ee en la producción de levodopa.

3. CONCLUSIONES

Concluimos destacando la relevancia y el poder de la Catálisis en Síntesis Asimétrica aplicada a la producción de compuestos como fármacos, herbicidas, insectidas y aditivos, entre otros, consiguiéndose obtener moléculas cuya actividad resultará conocida y de efecto deseado. Para alcanzar este fin son fundamentales los catalizadores quirales, que presentan un futuro prometedor en el campo de la química, buscando como dijo Noyori “Elegancia práctica en síntesis”.

REFERENCIAS

- [1] S. Tseng, G. Pak, K. Washenik, M.K. Pomeranz, J.L. Shupack, “Rediscovering thalidomide: A review of its mechanism of action, side effects, and potential uses”, *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 35, no. 6, pp. 969-979, 1996, doi:10.1016/S0190-9622(96)90122-X.
- [2] R.S. Cahn, S.C. Ingold, V. Prelog, “Specification of Molecular Chirality”, *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 5, no. 4, pp. 385-415, 1966, doi: 10.1002/anie.196603851.
- [3] L. C. Cross, W. Klyne, IUPAC. Rules for the Nomenclature of Organic Chemistry: Section E: Stereochemistry, Pergamon, pp. 13-24, 1974.
- [4] G. Burillo-Putze, A. Aldea-Perona, C. Rodríguez-Jiménez, M.M. García-Sáiz, B. Climent, A. Dueñas, P. Munné, S. Nogué, R.S. Hoffman, “Emergent drugs (II): the Pharming phenomenon”, *An. Sist. Saint. Navar.*, vol. 36, no. 1, pp. 99-114, Jan/ Apr 2013.
- [5] J. Halpern, B.M. Trost, “Asymmetric Catalysis”, *PNAS*, 101 (15), Apr 2004, doi: 10.1073/pnas.0401811101.
- [6] H. Pellissier, “Asymmetric organocatalysis”, *Tetrahedron*, vol. 63, pp. 9267-9331, 2007, doi:10.1016/j.tet.2007.06.024
- [7] W.S. Knowles, “Asymmetric hydrogenations (nobel lecture 2001)”, *Advanced Synthesis & Catalysis*, vol. 345, no. 1-2, pp. 3-13, 2003.
- [8] H.-Y.T. Chen, D. Di Tommaso, G. Hogarth, C.R.A. Catlow, “Correlating Enantioselectivity with Activation Energies in the Asymmetric Hydrogenation of Acetophenone Catalysed by Noyori-Type Complexes”, *Catal Lett*, 141, pp. 1761-1766, 2011, doi: 10.1007/s10562-011-0704-1.
- [9] C. Murruzzu, A. Riera, “Enantioselective synthesis of hydroxylated pyrrolidines via Sharpless epoxidation and olefin metathesis”, *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 18, no. 1, pp. 149-154, 2007, doi: 10.1016/j.tetasy.2006.12.023.
- [10] A. Pizzano, E. Carmona, “Premio Nobel de Química 2001: Síntesis asimétrica catalítica”, *Anales de la Real Sociedad Española*

- de Química, Oct-Dic 2001.
- [11] Web-de-Wikipedia.
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DIPAMP.png#/media/File:DIPAMP.png>
- [12] B.C.G. Söderberg, "Transition metals in organic synthesis: Highlights for the year 2005", *Coordination Chemistry Reviews*, 252, pp. 57-133, 2008, doi: 10.1016/j.ccr.2007.03.011.
- [13] Web-de-Wikipedia.
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:BINAPdiamineRuscope2.png#/media/File:BINAPdiamineRuscope2.png>
- [14] R. Noyori, "Pursuing practical elegance in chemical synthesis", *Chemical Communications*, 2005, doi: 10.1039/B502713F.
- [15] K. Min, K. Park, D.-H. Park, Y.J. Yoo, "Overview on the biotechnological production of L-DOPA", *Appl Microbiol Biotechnol*, 99, pp. 575-584, 2015, doi: 10.1007/s00253-014-6215-4.
- [16] R.H. Valdés, L. Puzer, M.G. Jr., C.E.S.J. Marques, D.A.G. Aranda, M.L. Bastos, A.L. Gemal, O.A.C. Antunes, "Production of L-DOPA under heterogeneous asymmetric catalysis", *Catalysis Communications*, 5, pp. 631-634, 2004, doi: 10.1016/j.catcom.2004.07.018.



María Gallego-García recibió el título de Graduada en Biología por la Universidad de Sevilla en 2014. Estudiante de primer curso de Máster de Biotecnología Ambiental, Industrial y Alimentaria en la Universidad Pablo de Olavide (2014/2015).

El Dragado del río Guadalquivir: Un proyecto medioambientalmente inviable

Enrique Mesa Pérez

Resumen—Desde 1999, que se iniciaran los procedimientos del Proyecto de Dragado del río Guadalquivir, hasta nuestros días, el caso, enviado en numerosas ocasiones a los Tribunales de Justicia, ha dado enormes vuelcos. Hace apenas 3 meses, una Sentencia en firme del Tribunal Supremo parece haber sentenciado definitivamente el proyecto, ¿Cuáles son los obstáculos ambientales que hacen este proyecto polémico e inviable?

Palabras Claves— Sevilla, Guadalquivir, Dragado, Sentencia, Sostenibilidad.

1. INTRODUCCIÓN

El pasado mes de marzo de 2015 el Tribunal Supremo, en una sentencia esperada por muchos, decidió anular el Proyecto de Profundización del Río Guadalquivir. Esta sentencia puso punto y final a todo el contencioso, no sólo judicial, que mantenían ecologistas, Autoridad Portuaria del Puerto de Sevilla, Ayuntamiento y arroceros, entre otros, alrededor del proyecto de Dragado del Guadalquivir.

Lo cierto es que hace apenas unas semanas acababa el plazo para interponer el correspondiente recurso a la sentencia del Tribunal Supremo y cuando parecía que el contencioso acabaría sin más noticias, el colectivo: “Sevilla por su Puerto” (formado por la Confederación de Empresarios de Sevilla (CES), la Cámara de Comercio y los sindicatos CCOO y UGT) presentó un recurso a la mencionada sentencia, con un total de más de 500 alegaciones.

¿Puede este recurso volver a activar el proyecto? Juan Espadas, recién elegido alcalde de Sevilla, preguntado por el asunto estimaba que “*era perder el tiempo hablar del Dragado sin resolver el problema medioambiental de fondo*”. Los arroceros por su parte, declaraban que antes de proseguir con el proyecto del Dragado debería establecerse un plan para solucionar las deficiencias del río, ya sea en los márgenes como en el regadío de los campos de cultivos colindantes al mismo.

Las partes parecen resignarse al fin del proyecto debido a las numerosas trabas medioambientales del mismo, al menos todas las partes menos las integrantes de “Sevilla por su Puerto”. Pese a todos los intentos de la Autoridad Portuaria, empresarios y Ayuntamiento de Sevilla de sacar adelante el proyecto, son demasiado numerosos los obstáculos ambientales que hacen de este proyecto un proyecto al borde de su ocaso definitivo.

2. ORIGEN DEL PROYECTO DE PROFUNDIZACIÓN DEL RÍO GUADALQUIVIR

Para encontrar el origen de este proyecto debemos remontarnos al año 1999 cuando la Autoridad Portuaria del Puerto de Sevilla promovió el proyecto bajo el nombre de “Proyecto de Actuaciones de Mejora en accesos marí-

timos del Puerto de Sevilla”. Este proyecto fue respaldado tanto por el Ayuntamiento de Sevilla, como por los empresarios de la ciudad.

Sus inicios no estuvieron exentos de polémica pues la Declaración de Impacto Ambiental (a partir de ahora DIA) positiva tuvo que ser paralizada por la entonces ministra de Medio Ambiente, Cristina Narbona, la cual determinó que existían importantes lagunas en los datos incluidos en la misma. Paralización a raíz de las alegaciones a la DIA interpuestas por los grupos contrarios al proyecto.

Aparte de los ecologistas (el más destacado y activo en todo el proceso: WWF), siempre contrarios al dragado del río, mostraron su negativa al proyecto en las correspondientes alegaciones a la DIA los arroceros (representados por las Federaciones de Arroceros de Sevilla y del Bajo Guadalquivir), que se han situado contrarios al proyecto debido a la subida del tapón salino (término que explicaremos más adelante), los ayuntamientos de los municipios del Bajo Guadalquivir (Isla Mayor y Sanlúcar de Barrameda), La Confederación Hidrográfica del Guadalquivir, la Junta de Andalucía (a través de las Consejerías implicadas en el proceso) y el Parque Nacional y el Parque Natural de Doñana.

Durante todos estos años, el conflicto ha estado seguido de informe tras informe, discutiendo el alcance ambiental sufrido por el río en caso de llevarse a cabo el proyecto, hasta que el pasado mes de marzo el Tribunal Supremo resolviera que mientras la sostenibilidad del río Guadalquivir no estuviera garantizada no habría ningún proyecto de profundización.

3. ¿EN QUÉ CONSISTE EL PROYECTO DE DRAGADO DEL RÍO GUADALQUIVIR?

El proyecto debería separarse en dos partes para entenderlo de forma clara. Por un lado, el proyecto de profundización en sí, que como explicamos en el párrafo siguiente se limita a la profundización del río. Por otro lado, todas las actuaciones complementarias y proyectos paralelos a esta profundización del río.

El proyecto de dragado, entendiendo como tal la profundización del río, únicamente pretende aumentar el

calado del río. Esta profundización se llevaría a cabo en el tramo central del cauce (cuando decimos tramo central del cauce nos referimos a aquel entre ambas riberas del río, en vez del tramo situado a medio camino entre Sevilla y la desembocadura).

Este incremento de la profundización iría por zonas. En la zona de la desembocadura, en Sanlúcar de Barrameda, la profundidad aumentaría desde los 6,8 metros hasta los 8 metros de profundidad, mientras que en el resto del cauce el aumento sería desde los 6,5 hasta los 7,6 metros de profundidad.

Este incremento de la profundización conlleva una serie de actuaciones complementarias, como bien dijimos anteriormente. La primera de ellas es la construcción de la nueva esclusa de entrada al Puerto de Sevilla, obra ya realizada y operativa. Esta esclusa, a su vez, conlleva que el Puerto de Sevilla se desplazase hacia la zona en la que ésta se encuentra situada, dejando libre las zonas colindantes al Puente de las Delicias, zona actual de algunos muelles del puerto.

Con la nueva esclusa y la profundización se prevé un aumento de la actividad del Puerto de Sevilla, de modo que se incluirían como actuaciones complementarias la finalización de la SE-40, circunvalación de Sevilla, que incluye un acceso directo al puerto por la zona de la nueva esclusa.

También se llevarían a cabo mejoras férreas, entre las que destacamos la conexión de Majarabique, tramo férreo que une el norte de la ciudad con el puerto. La obra evitaría que el tren proveniente de Madrid (por Majarabique) debiera esperar al paso de los trenos provenientes de Cádiz para poder acceder al puerto, ya que el acceso comparte la vía con estos. Esta obra reduciría el tiempo de paso de los trenos de Madrid hacia el Puerto de Sevilla de 2,5 horas a apenas 20 minutos. Sería una importante mejora de la accesibilidad del puerto en el caso del incremento de la actividad.

Igualmente a las actuaciones complementarias, la nueva zona del Puerto de Sevilla situado al lado de la nueva esclusa recibiría la catalogación de Zona Franca, de modo que fomentaría la implantación de empresas, especialmente aquellas dedicadas a la logística en el puerto. Y finalmente, existe un proyecto sobre la zona que ocupa actualmente el Puerto de Sevilla al lado del puente de las Delicias conocido como "Sevilla Park", que contempla la construcción de una zona de ocio con un auditorio, zonas comerciales y diferentes aparcamientos.

4. PROBLEMAS AMBIENTALES DEL PROYECTO

Los problemas que encontramos con este proyecto son de dos tipos: por un lado están los ambientales y por otro los económico-sociales. En el caso de los segundos estamos ante un incremento importante de la actividad del puerto sevillano, lo que podría repercutir negativamente en la actividad de puertos cercanos como Cádiz o Huelva, restando competitividad exterior y solapando actividades. Esta situación cuestionaría la viabilidad económico-social de una provincia mermada por el paro como es Cádiz. Sin embargo, en este artículo solo vamos a

centrarnos en el problema principal del proyecto de dragado: los problemas ambientales.

El primero de los problemas ambientales surge con el mero aumento de la profundidad del río. Al existir mayor profundidad en el río, la cantidad de agua que puede contener el río aumenta, si este incremento de agua fuera compensado con un incremento de agua dulce, no habría problema alguno, en cambio, la escasa pendiente del río entre la desembocadura y la ciudad de Sevilla provocaría que ese incremento de agua se llevase a cabo con recursos hídricos salados, la presencia de este tipo de agua pone en peligro las especies que habitan en agua dulce, deteriorando enormemente el ecosistema del río.

Este incremento de agua salina afecta al conocido como tapón salino – punto del cauce del río donde el agua salina da paso a la dulce – el cual se desplazaría hacia un punto superior en el cauce del río, de modo que en zonas donde antes había agua dulce tras el dragado habría agua salada. Esto afectaría, en un primer lugar a las marismas del Parque Nacional de Doñana (por como dijimos antes, la subsistencia de las especies que en el agua dulce del parque viven), pero también a los campos de cultivos de arroz del bajo Guadalquivir, los cuales necesitan de agua dulce para crecer.



Fig. 1. Afectación del río Guadalquivir por el Proyecto de Dragado (WWF)

La imagen 1 nos ilustra los principales efectos a los que se sometería el río con el dragado, la subida del tapón salino, señalado con flechas naranjas, muestra zonas de predominio de agua dulce que se verían cubiertas por agua salada.

En segundo lugar, a la subida del tapón salino debemos añadir el aumento de la erosión de los márgenes. Los márgenes del río son considerados de especial importancia pues en ellos se encuentran especies protegidas.

El incremento del tapón salino trae consigo que estos nuevos tramos del río cubiertos con agua salada sean afectados por las mareas provenientes del mar. Es decir, los márgenes que antes mantenían un nivel estable, se verán afectados por las variaciones del nivel de agua provocadas por el incremento y disminuciones de las mareas a lo largo del día.

Y el tercer problema ambiental que acarrea la profun-

dización del río es la creación de vertederos de sedimentos a lo largo del cauce del río. Los sedimentos que normalmente porta el agua tienen tendencia a depositarse creando vertederos en diferentes puntos del río – el mapa de la imagen 1 nos puede servir como indicativo de cuales son dichos puntos – a lo largo del cauce. Con el dragado, la turbidez del agua, según los ecologistas, aumentaría de modo que estos vertederos de sedimentos también se incrementarían.

La turbidez del agua hace más difícil la subsistencia de las especies que existen en el río, luego un aumento de la turbidez y de los vertederos provocaría, por ende, un riesgo mayor para la subsistencia de las mismas, como por ejemplo las pertenecientes a las piscifactorías de las aguas de Doñana, donde se cría el langostino, boquerón o acedía, entre otros.

Podemos resumir en tres los principales problemas ambientales del proyecto de dragado: el incremento del agua salina y por ende, subida del tapón salino; el incremento de la erosión sobre los márgenes; y el aumento de los vertederos de sedimentos a lo largo del cauce del río, empeorando la turbidez del agua.

5. CONCLUSIONES

Una vez vistos los problemas ambientales que acarrea el proyecto de dragado del río Guadalquivir podemos determinar, sin riesgo a equivocarnos, que el proyecto es, medioambientalmente hablando, inviable.

Son numerosos los informes emitidos tratando de revertir los efectos negativos, el último solicitado por la Autoridad Portuaria de Sevilla a finales de 2014 a las Universidades de Cádiz y Huelva en conjunto con el CSIC para encontrar una solución al problema de la turbidez.

Ninguno de estos informes a día de hoy ha dado una solución a dichos problemas sin descartar previamente el dragado del río, luego el continuar con el proyecto parece una decisión inviable desde un prisma ambiental.

El último gesto de una institución en pro de proteger el río ha sido el requerimiento que el pasado mes de julio emitía la UNESCO en el cual solicitan al Gobierno de España dar por concluido el proyecto de forma definitiva impidiendo que en un futuro pueda volver a darse la posibilidad de abrirse ningún proyecto de profundización del Guadalquivir.

El motivo que alegan es la supervivencia del Parque Nacional de Doñana el cual, como dijimos anteriormente, se vería afectado por el incremento de la erosión, pero sobre todo por el aumento de la salinidad de sus aguas.

En palabras de WWF: “Unesco y el Tribunal Supremo han hablado, falta que el gobierno dé carpetazo final a este proyecto”. Podemos decir que el proyecto está en su punto más cercano al fin desde 1999, pero este proyecto ha sobrevivido y dado giros inesperados, habrá que esperar acontecimientos y sobre todo voluntades políticas para ver si el dragado del río Guadalquivir es pasado o futuro del río andaluz.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea agradecer enormemente la oportunidad de

publicar este primer artículo en la revista MoleQla al profesor y tutor de su Trabajo Fin de Grado, que en su día le propuso este tema tan apasionante y sin el cual no podría estar escribiendo estas líneas, Francisco Carrasco.

REFERENCIAS

- [1] Ruesga, M. (1 de julio de 2015). “El dragado del río vuelve a la palestra”. Diario de Sevilla. Recuperado de <http://www.diariodesevilla.es>
- [2] Redacción (2 de julio de 2015). “La Unesco urge a cancelar «de forma permanente» el dragado del Guadalquivir”. Diario ABC. Recuperado de <http://sevilla.abc.es/>
- [3] Redacción (2 de julio de 2015). “Espadas: «Sin cumplir los requisitos ambientales, hablar del dragado es perder el tiempo»”. Diario ABC. Recuperado de <http://sevilla.abc.es/>
- [4] Mesa Pérez, E. (2015). “El Dragado del río Guadalquivir: Posibles alternativas desde un enfoque de la sostenibilidad”. Trabajo Fin de Grado, Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.



Enrique Mesa Pérez recibió el título de Derecho y el de Finanzas y Contabilidad por la Universidad Pablo de Olavide en 2015. En dicho curso académico presentó el Proyecto Fin de Grado: *El dragado del río Guadalquivir: Posibles alternativas desde un enfoque de sostenibilidad*, en cuya primera parte se basa el presente artículo. En la actualidad es Editor en la web QueAprendemosHoy.com en la sección jurídica.

EDITORIAL MOLEQLA CELULAR.



La diversidad de temas es una de las características de la sección de Moleqla celular en este número de otoño. Abordamos temas tan dispares como la homeopatía, el uso de técnicas biotecnológicas para el diseño de anticuerpos en el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer y los problemas de la diversidad genética en la reinserción de una especie en peligro de extinción como el Lobo Rojo en Estados Unidos de Norteamérica.

En MoleQla celular pretendemos abordar temas que sean motivo de discrepancia o aporten novedades a situaciones novedosas y de actualidad. La homeopatía es uno de esos temas candentes donde detractores y seguidores utilizan argumentos científicos en muchos casos carentes de base lógica. Rafael Hoyos nos ofrece una visión del problema apoyándose en un estudio científico serio publicado en la prestigiosa revista Nature. Un estudio que hubo de ser corroborado posteriormente con suerte nefasta para su autor. La ciencia no debe basarse en prejuicios y, por ello, los argumentos en pro o en contra de una hipótesis o hecho deben basarse en los datos obtenidos en experimentos bien diseñados. El artículo de Rafael ofrece una visión de cómo se debe actuar en estos casos.

Dentro de una línea ya común en esta sección, Alejandro Salguero nos presenta diversas opciones a la hora de diseñar terapias encaminadas a afrontar el tratamiento de enfermedades tan complejas como el Alzheimer. Durante los últimos años el uso de anticuerpos diseñados para unirse y marcar dianas específicas relacionadas con enfermedades concretas está dando frutos en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la autoinmunidad o el cáncer. Alejandro nos ofrece una visión general de las técnicas utilizadas para la consecución de estas herramientas terapéuticas y de cómo el conocimiento básico del funcionamiento del organismo nos ayuda a diseñar tratamientos de futuro.

Finalmente, en una línea algo nueva abordamos el problema genético que sobreviene con los intentos de recuperar especies animales prácticamente extintas. En su artículo, Elena Millán, nos describe la relación genética entre el Lobo Rojo americano y sus familiares más cercanos, el Lobo Común y el Coyote. La preservación de una especie prácticamente desaparecida y los problemas genéticos de endogamia o hibridación con otras especies nos permite conocer el complejo problema que la recuperación de especies supone.

Guillermo López Lluch

Editor de la Sección MoleQla Celular

La homeopatía: qué es, en qué se basa y cómo la inmunología casi demuestra su eficacia

Rafael Hoyos Manchado

Resumen— La homeopatía es una de las pseudociencias que la Ciencia aún no ha sido capaz de desmontar ni probar. Sus fundamentos, extravagantes y poco convencionales desde un primer momento se han apoyado en fenómenos inexplicables y ciertamente fantásticos. Desde Hahnemann, el padre de la homeopatía, hasta Benveniste, pasando por Kent y muchos otros, se ha intentado dar una explicación racional que a veces, incluso, se ha apoyado en la experiencia. Ese fue el caso en el que se usó la inmunología para llevar a cabo ensayos con muestras altamente diluidas.

Palabras Claves— Basófilos, Desgranulación, Inmunología, Homeopatía, Pseudociencia.



1. INTRODUCCIÓN

Muchas veces la Ciencia se mueve en terreno resbaladizo; es parte de su encanto. Hay veces que, de hecho, cuesta separar lo que es ciencia de lo que es superchería y uno espera una respuesta contundente y sería que esclarezca la situación y establezca la verdad. Este es el caso de la homeopatía. Citando a la Real Academia Española, la homeopatía es un “Sistema curativo que aplica a las enfermedades, en dosis mínimas, las mismas sustancias que, en mayores cantidades, producirían al hombre sano síntomas iguales o parecidos a los que se trata de combatir” [1]. Esas dosis mínimas a las que aluden los académicos se consiguen (supuestamente, ya veremos que en este aspecto hay mucha tela que cortar) realizando grandes diluciones seriadas.

Aunque la mayoría de la comunidad científica se muestra escéptica a esta disciplina, no faltan voces (y no pocas) que defienden la eficacia de los remedios homeopáticos e incluso intentan dar una explicación a su utilidad. ¿En qué se basa la homeopatía? ¿Hablamos sólo de un efecto placebo? ¿Intenta la homeopatía curar enfermedades suministrando agua del arroyo claro? Si nos remitimos a la literatura científica que existe al respecto, descubriremos algunas ideas interesantes.

2. LA HOMEOPATÍA. RESEÑA HISTÓRICA

2.1. El organón de Hahnemann. La ley de la similitud

La homeopatía no es algo novedoso. De hecho, el término y sus bases fueron introducidos por el alemán Samuel Hahnemann, que desencantado con la medicina

convencional de la época (a la que denominó alópata) publicó en 1810 la primera edición de su *Organon der rationellen Heilkunde* (organón del arte racional de curar). En él se describía cómo la enfermedad no era sino la alteración dinámica (inmaterial) morbosa (malsana) del principio vital del organismo (algo así como el espíritu). De esta forma, un niño sano enferma de viruela al estar junto a uno enfermo sin que haya transmisión material alguna, sino porque le transmite esa alteración dinámica. También según Hahnemann, al administrar una sustancia que produjera los mismos síntomas (en sus palabras, que produzca una enfermedad artificial), pero con una magnitud mayor, el principio vital se afanaría únicamente en esta alteración artificial, olvidando la alteración menor y natural. De este modo, al retirar el remedio homeopático el paciente recobraría la salud. Este principio es lo que ha venido a conocerse como “ley de la similitud” (que según Hahnemann se basaba en la experiencia y poco importaba averiguar su fundamento) según la cual *similia similibus curantur*, es decir, lo similar cura a lo similar. [2]

2.2. La dinamización

Aún más discutible es el tema de las diluciones. Es evidente que si se diluye una sustancia 1030 veces es muy probable que no quede ni una sola molécula de ella en la disolución final (si es que puede llamarse ya disolución) [3]. Lo mejor es que aunque Hahnemann hubiese intuido este hecho, tampoco pretendía evitarlo. Con las diluciones (que son verdaderas recetas, no sólo con agua sino también con alcohol, por ejemplo), la sustancia homeopática se dinamizaba y potenciaba, de tal forma que, de ser algo material, se convirtiera en un poder curativo inmaterial (dinámico) y por lo tanto potente y efectivo. Con cada dilución (de 1/100), el preparado adquiriría una potencia más, hasta llegar a una determinada (por ejemplo la 30°). Ahí no queda la cosa,

sino que en cada paso debían darse cien golpes secos (denominados sucusiones) que permitieran la correcta dinamización del compuesto [2].

2.3. El repertorio de Kent

El otro gran gurú de la homeopatía es James Tyler Kent, un estadounidense que incluyó numerosísimos remedios y aplicaciones homeopáticas en su *Repertory of the Homoeopathic Materia Medica* (1897). Para entonces ya tuvo que luchar contra el concepto de enfermedad infecciosa y los conocimientos microbiológicos que se iban imponiendo en la comunidad científica.

3. EL TEST DE DESGRANULACIÓN DE BASÓFILOS HUMANOS (HBDT) DE BENVENISTE

3.1. La aparición del test

En 1981, el inmunólogo francés Jacques Benveniste publicó en *Clinical Allergy* un test que había patentado y comercializado en un kit: el test de desgranulación (o activación) de basófilos humanos [4]. Como es sabido, los basófilos son un tipo de granulocitos, implicados en la respuesta alérgica y contra parásitos, para lo que tienen en su membrana receptores de inmunoglobulina E (IgE). Cuando la IgE reconoce un antígeno (alérgeno, en muchos casos) se une su receptor en la membrana de los basófilos. Estos experimentan entonces su desgranulación, es decir, la migración de sus gránulos hacia la membrana para liberar su contenido: mediadores como la histamina y receptores como el CD63. Aunque lo que Benveniste realiza en un principio es un conteo de basófilos desgranulados frente a los intactos (ya que la forma en que se tiñen cambia), en la actualidad se analiza por citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales si se han expuesto receptores como el mencionado CD63 [5].

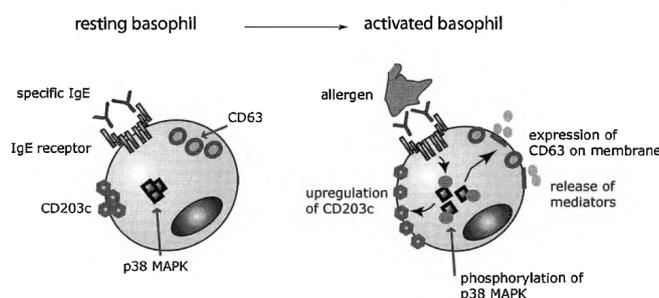


Fig. 1. Activación (desgranulación) de un basófilo en respuesta a la presencia de un alérgeno (un antígeno). [5]

El HBDT se ha usado y se usa para descubrir alergias con pequeñas muestras de sangre del paciente. Sin embargo, el propio Benveniste ingenió otra aplicación para su test. En junio de 1988 publica en *Nature* un artículo en el que usa el test para comprobar cómo altas diluciones de anti-IgE (anticuerpos obtenidos a partir de la inyección de IgE humana en cabras) pueden disparar la

desgranulación de los basófilos [3]. Como coautores del estudio figuraban otros nombres relacionados con la defensa de la homeopatía como Sainte-Laudy [6] u Oberbaum [7]. En el artículo se concluía que aunque no quedara ni una sola molécula de la sustancia inicial en la disolución final, el agua debía actuar como una plantilla y conservar la capacidad de producir la respuesta del basófilo. Esta hipótesis es lo que ha trascendido, no sin ironía, como “memoria del agua” [3].

3.2. El acuerdo con Nature

Pero, ¿cómo es que Nature accedió a publicar un artículo tan controvertido? A pesar de las muchas reservas que los revisores y editores tenían sobre la investigación de Benveniste, se accedió a publicar el artículo con la condición de que los experimentos serían realizados nuevamente en los laboratorios franceses, bajo la implacable mirada de tres sujetos elegidos por *Nature* para tal fin [3]: John Maddox, físico y por entonces editor de la revista, James Randi, un conocido mago (famoso por su lucha contra los defensores de lo paranormal y la pseudociencia) y Walter W. Stewart, que años antes había señalado errores e inconsistencias en otras investigaciones [8].

La visita de los tres enviados de *Nature* al laboratorio de Benveniste desencadenó una verdadera batalla mediática por cartas (decenas de ellas) que la revista publicó en su sección “News and Views”. Tras una estancia de tan sólo cinco días, los tres expertos tuvieron claro, y así lo escribieron, que los métodos por los que se habían obtenido tales resultados no eran lo suficientemente rigurosos como para hacer tamañas declaraciones, que los experimentos eran estadísticamente poco ortodoxos y que, de hecho, no se había hecho un esfuerzo serio para evitar el error sistemático ni el sesgo del observador [8]. Como cabía esperar, el profesor Benveniste quedó poco contento con la forma en que su investigación había sido publicada por la revista para ser sometida al escarnio público semanas después (con la consiguiente desprestigiación del equipo francés) [9]. Así lo hizo ver no sólo en la contestación que hizo al artículo de Maddox, Randi y Stewart [9] sino en muchas ocasiones.

4. CONCLUSIONES

A pesar de las excepcionales conceptos que plantea la homeopatía, desde el mismísimo Hahnemann, mucha gente cree en ella y atestigua que funciona. Entre ellos se encuentran, incluso, científicos de renombre. Hasta la fecha ningún estudio ha sido capaz de demostrar de forma intachable y definitiva que algún remedio homeopático, una sustancia diluida miles de veces hasta el punto de no estar presente, pueda ejercer un efecto sanador (o al menos otro que no sea el de hidratar) en un paciente enfermo. Y es que una afirmación en este sentido haría replantearnos todo el modelo no sólo biológico sino físico-químico por el que nos regimos. Esto tampoco debe

asustarnos pues no sería la primera vez ni la última en ocurrir: un modelo nunca recoge toda la verdad de un sistema.

Técnicas altamente precisas y valiosas como las inmunológicas abren muchas puertas al conocimiento y la investigación y permiten desarrollar numerosas aplicaciones destinadas al diagnóstico y al tratamiento de enfermedades. Pero su uso no debe hacernos perder de vista que la calidad de los datos se mide por otros muchos parámetros como el muestreo, la minimización de errores, sesgos y control de las desviaciones. No en vano se dice aquello de “*the plural of anecdote is not data*”.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar las gracias a la profesora Ana Paula Zaderenko Partida, a la que por vez primera escuché una opinión meditada sobre la homeopatía. Al profesor Guillermo López Lluch, por instarme a escribir este artículo durante su asignatura de Inmunología en 4º de grado. Y especialmente a Félix Reyes Martín, quien me ha demostrado ser un convencido anti-“magufos”.

REFERENCIAS

- [1] *Diccionario de la lengua española* de la RAE, <http://lema.rae.es/drae/?val=homeopat%C3%ADa>. 2013.
- [2] S. Hahnemann, *Organon de la medicina*. Edición 6b. Disponible en <http://www.homeovet.cl/BRIONES/EI%20Organon%20de%20la%20medicina.pdf>
- [3] E. Dayenas *et al.*, “Human basophil degranulation triggered by very dilute antiserum against IgE”, *Nature*, vol. 333, 816-818, 30 Junio 1988, doi:10.1038/333816a0.
- [4] J. Benveniste, “The human basophil degranulation test as an *in vitro* method for the diagnosis of allergies”, *Clinical Allergies*, vol 11, 1-11, 1981, doi:10.1111/j.1365-2222.1981.tb01559.x
- [5] D.G. Ebo, M.M. Hagendorens, C.H. Bridts *et al.*, “The basophil activation test in immediate drug allergy”, *Immunology and Allergy Clinics of North America*, vol. 29, 64, 129–35, 2009, doi:10.1016/j.iac.2009.04.011
- [6] J. Sainte-Laudy y P. Belon, “Inhibition of basophil activation by histamine: a sensitive and reproducible model for the study of the biological activity of high dilutions”, *Homeopathy*, vol. 98(4), 186-197, octubre 2009, doi:10.1016/j.homp.2009.09.009.
- [7] M. Oberbaum, R. Schreiber, C. Rosenthal, M. Itzhaki, “Homeopathic treatment in emergency medicine: a case series”, *Homeopathy*, vol. 92(1), 44-47, enero 2003, doi:10.1054/homp.2002.0071.
- [8] J. Maddox, J. Randi y Walter W. Stewart, ““High-dilution” experiments a delusion”, *Nature*, vol 334, 287-290, 28 julio 1988, doi:10.1038/334287a0.
- [9] J. Benveniste, “Dr Jacques Benveniste replies:”, *Nature*, vol. 334, 291-291, 28 julio 1988, doi:10.1038/334291a0.



Rafael Hoyos Manchado es graduado en Biotecnología por la Universidad Pablo de Olavide. Actualmente cursa el Máster en Biotecnología Sanitaria de dicha universidad. Es autor del logo del caldero de MoleQla.

Biotecnología e ingeniería de anticuerpos: inmunoterapia y Alzheimer

Alejandro Salguero Jiménez

Resumen—El desarrollo de inmunoterapias, sobretudo el uso de anticuerpos monoclonales, se ha producido principalmente en los últimos 10 años y en la actualidad representa una alternativa y un tratamiento eficaz para distintas y numerosas enfermedades como el Alzheimer. En el caso de esta enfermedad neurodegenerativa, se ha conseguido obtener un amplio abanico de posibilidades en cuanto al uso de anticuerpos como inmunoterapia, contando ya con distintos fragmentos de anticuerpos y mecanismos de acción que pueden ser usados individualmente para tratar la enfermedad.

Palabras Claves— Inmunoterapia, anticuerpos, Alzheimer

1. INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) son glicoproteínas producidas por los linfocitos B usadas por el sistema inmunitario para unirse específicamente a un determinado antígeno e iniciar una respuesta inmunológica contra este por parte de otras células y moléculas del sistema inmune. Las Igs identifican y neutralizan así elementos extraños al organismo como bacterias, virus o parásitos.

Estos anticuerpos, englobados dentro del sistema inmune humoral, son capaces de reconocer y unirse de forma específica a cualquier proteína considerada como extraña, que no es producida por el propio organismo. Además, sucesivas exposiciones al antígeno hacen que se produzca una respuesta más intensa, produciendo más anticuerpos más rápidamente.

Esto hace de los anticuerpos una potente herramienta en el campo clínico, desde la producción de vacunas hasta el tratamiento con anticuerpos de distintos tipos de cáncer [1].

2. ESTRUCTURA DE LOS ANTICUERPOS

Los anticuerpos son glicoproteínas plasmáticas globulares que en su forma de monómero presentan una estructura tridimensional que recuerda a una "Y". Poseen dos cadenas peptídicas pesadas y dos ligeras idénticas. En esta estructura se diferencian dos dominios importantes: el fragmento de unión al antígeno (Fab) y el fragmento cristizable (Fc), que activa y regula los distintos mecanismos que va a llevar a cabo el sistema inmune sobre esa unión antígeno-anticuerpo [2].

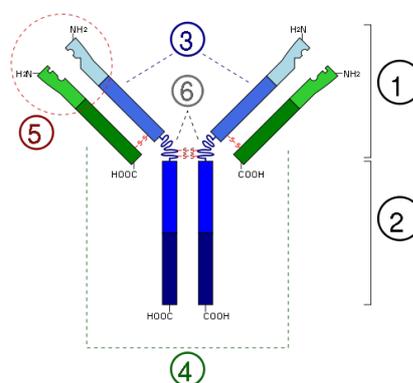


Fig. 1. Imagen esquemática de un anticuerpo donde se señalan sus principales partes o componentes: Fab (1), Fc (2), cadenas pesadas (3), cadenas ligeras (4), sitio de unión al antígeno (5) y las regiones bisagra (6) [3].

3. ANTICUERPOS MONOCLONALES E INMUNOTERAPIA

Cuando el sistema inmune del organismo reconoce un péptido o estructura extraña, que no reconoce como propia, puede desarrollar una respuesta humoral, llevada a cabo por los linfocitos B que producen anticuerpos contra esa molécula o estructura. Todos los anticuerpos que reconocen esta molécula forman un conjunto de anticuerpos policlonales, ya que distintos linfocitos B producen distintos anticuerpos que pueden reconocer, con mayor o menor afinidad, la molécula diana [4].

A la hora de usar anticuerpos en inmunoterapia, estos deben ser anticuerpos monoclonales: anticuerpos homogéneos e idénticamente iguales en cuanto a secuencia y estructura ya que provienen de un único tipo o clon de linfocito B. La producción de estos anticuerpos pasa por la obtención de una célula híbrida como producto de la fusión de un linfocito B y una célula plasmática tumoral.

4. INMUNOTERAPIA CONTRA EL ALZHEIMER

El uso de estos anticuerpos policlonales ya descritos se presenta, cada vez más, como una alternativa a las terapias ya existentes y a veces como la única opción efectiva. Existen ya decenas de anticuerpos monoclonales aprobados para su uso clínico en distintas enfermedades: diversos tipos de cáncer, alergias, enfermedades autoinmunes, para evitar rechazos en transplantes de órganos, etc.

Una de estas enfermedades es también el Alzheimer, enfermedad neurodegenerativa que representa la forma más común de demencia, que afecta a un alto porcentaje de la población mundial y para la que no existe cura actualmente, siendo una enfermedad terminal.

Sus principales causas es la acumulación de la proteína β -amiloide así como de proteínas TAU hiperfosforiladas, formando agregados en el tejido neuronal del cerebro. Esto acaba produciendo en el paciente una pérdida paulatina de la memoria y del resto de las funciones cognitivas (problemas de atención, de orientación, cambios de personalidad, etc.) [5].

Hasta el comienzo del uso de la inmunoterapia, los tratamientos convencionales consistían principalmente en el uso de inhibidores de colinesterasa, que disminuye los síntomas pero no así las causas primeras de la enfermedad ya nombradas.

Al emerger los anticuerpos monoclonales como potencial tratamiento inmunoterapéutico contra esta enfermedad se abrió un amplio abanico de posibilidades a la hora de diseñar y dirigir estos anticuerpos contra los acúmulos de proteína β -amiloide ($A\beta$) causantes de la enfermedad.

4.1. Mecanismos de acción de los anticuerpos

El objetivo de todas las estrategias que se van a mencionar a continuación es el mismo: conseguir, en última instancia, la eliminación de los acúmulos (protofibrillas o fibrillas) de la proteína $A\beta$. Estas estrategias, características de esta enfermedad, nos valen también para ejemplificar las numerosas posibilidades existentes en la inmunoterapia de manera general:

- Disgregación de los fibrillas de $A\beta$: El anticuerpo disgrega los fibrillas de $A\beta$ preformadas y previenen de la neurotoxicidad provocada por la acumulación de esta proteína. Estos anticuerpos deben ser capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) y unirse a la región N terminal de la proteínas $A\beta$.
- Activación de una respuesta inmune contra la proteína $A\beta$: En este caso el anticuerpo también atraviesa la BBB pero las placas de proteína $A\beta$ son eliminadas gracias a una respuesta inmune contra ellas provocada por la unión de los anticuerpos a

las mismas. Ocurre por la activación de la microglía y fagocitosis por parte de la Fc del anticuerpo, que consigue provocar una respuesta inmune celular contrar las placas de $A\beta$, ya que este fragmento Fc el que es reconocido por las células de la microglía.

- Secuestro de la proteína $A\beta$ en sangre: En el tercer mecanismo los anticuerpos se unen a la proteína $A\beta$ circulante en la sangre secuestrándola (ya que el anticuerpo evitan que atraviese la BBB). De esta forma, se produce un flujo de proteína $A\beta$ del cerebro a la sangre para mantener el equilibrio de concentración, evitando la acumulación en el cerebro.

Además de por los mecanismos de acción mencionados, los anticuerpos se pueden dividir en función del epítipo que reconozcan dentro de la proteína diana. En concreto en el caso del Alzheimer, los anticuerpos se pueden dirigir contra la región N- terminal (como lo hace el anticuerpo *bapineuzumab*, un ejemplo de anticuerpo usado en terapia), la región central o la región C-terminal de la proteína $A\beta$. Al cuarto y último tipo de anticuerpos pertenecen aquellos que reconocen un epítipo conformacional de la proteína, que aún están en fase experimental debido a la complejidad de su síntesis [7].

4.2. Fragmentos de anticuerpos

La versitalidad de los anticuerpos monoclonales va más allá de los tipos y mecanismos de acción explicados, ya que se pueden diseñar fragmentos de anticuerpos sin la necesidad de obtener un anticuerpo completo y valiéndonos de las características específicas de las estructuras que lo conforman, lo que supone una gran ventaja [8].

Así, es posible diseñar los siguientes fragmentos de anticuerpos:

- Anticuerpos de cadena única variable (scfvs): Es el formato más común. Suelen tener un tiempo de vida medio en el organismo mucho menor que las estructuras completas, por lo que su dosis es diferente. Los mejores resultados se han obtenido usando adenovirus como vector, consiguiendo una gran expresión del fragmento de anticuerpo y una larga duración de la misma tras la administración inicial.

Normalmente estos fragmentos suelen reconocer alguna de los tres epítopos lineales principales.

- Fragmento de unión al antígeno: Son pequeños y más estables que los scfvs, pero sin embargo se han desarrollado pocos fab con potencial inmunoterapéutico para tratar AD.
- Dominio V: Están formados por un único dominio

(sdAb) derivado de un dominio de cadena pesada o de cadena ligera de una inmunoglobina.

- Intrabodys: Son anticuerpos expresados en el interior celular y se digieren contra moléculas intracelulares. En el tratamiento del Alzheimer son usados contra la región N-terminal de la A β que se acumula en el citoplasma de las neuronas
- Fracción constante: Su desarrollo se basa en reducir

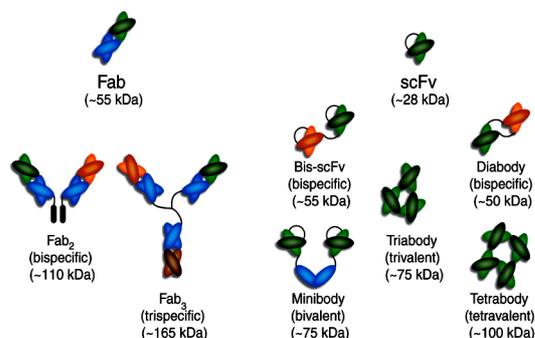


Fig. 2. Esquema de los distintos fragmentos de anticuerpos y sus combinaciones que se pueden usar en inmunoterapia [9].

la afinidad de la región constante por el receptor de estas que presentan las células del sistema inmune como los macrófagos, evitando así efectos secundarios como las hemorragias cerebrales.

4.3. Anticuerpos biespecíficos

Por último, existe un grupo de anticuerpos monoclonales usados en inmunoterapia cuya principal característica es que presentan la capacidad de reconocer dos antígenos distintos. Estos son los anticuerpos biespecíficos.

En el caso del Alzheimer, su uso pasa por obtener anticuerpos que reconozca en primer lugar un receptor endógeno que facilite el traspaso de la BBB (como el receptor de la insulina); y en segundo lugar que reconozca por supuesto la proteína A β . Con esta biespecificidad se consigue dirigir el anticuerpo a la

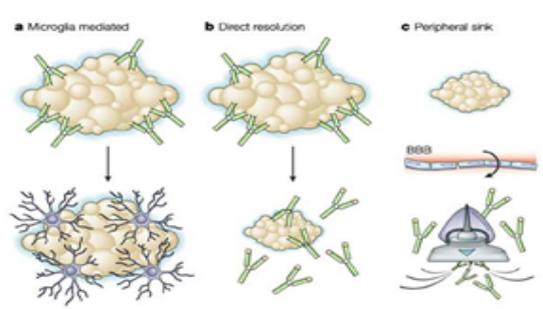


Fig. 3 Distintos mecanismos de acción de los anticuerpos monoclonales usados en la terapia de la enfermedad de Alzheimer [6].

proteína de forma mucho más eficiente y mejorar la eliminación de los complejos anticuerpo-antígeno. Como desventaja principal cuentan con que su diseño e ingeniería es sumamente más complicado que los anticuerpos mono-específicos.

5. CONCLUSIONES

El desarrollo de la inmunoterapia se ha producido principalmente en los últimos 10 años, tiempo suficiente para obtener resultados esperanzadores y realmente satisfactorios en algunos tratamientos; aunque con el conocimiento de que este tipo de terapia, que ha girado principalmente alrededor del uso de anticuerpos y su ingeniería, tiene un amplio margen de mejora y desarrollo con muchas posibilidades futuras.

Actualmente se están destinando una gran parte de los esfuerzos a mejorar la seguridad y tolerabilidad de la inmunoterapia por parte de los pacientes, principalmente mediante el uso de fragmentos de anticuerpos recombinantes.

El otro gran caballo de batalla lo constituye el desarrollo de los sistemas de administración, que están también fuertemente ligados a la seguridad del fármaco así como a su efectividad. En este aspecto se están centrando los esfuerzos en obtener anticuerpos biespecíficos para que las dosis efectivas del fármaco sean correctas y proporcionadas.

REFERENCIAS

- [1] Inbal Sela-Culang, Vered Kunik and Yanay Ofran, "The structural basis of antibody-antigen recognition", *Frontiers in Immunology*, October 2013, Volume 4.
- [2] Wikipedia - <http://en.wikipedia.org/wiki/Antibody>
- [3] Wikipedia - <http://en.wikipedia.org/wiki/Antibody>
- [4] José Golay, Martino Introna, "Mechanism of action of therapeutic monoclonal antibodies: Promises and pitfalls of in vitro and in vivo assays", *Archives of Biochemistry and Biophysics* 526 (2012) 146–153.
- [5] Alzheimer's Association - <http://www.alz.org/>
- [6] Martin Citron, "Strategies for disease modification in Alzheimer's disease", *Nature Reviews Neuroscience* 5, 677-685 (September 2004)
- [7] Remy Robert, Kim L. Wark, "Engineered antibody approaches for Alzheimer's disease immunotherapy", *Archives of Biochemistry and Biophysics* 526 (2012) 132–138
- [8] Takao Hamakubo, Osamu Kusano-Arai, Hiroko Iwanarim, "Generation of antibodies against membrane proteins", *Biochimica et Biophysica Acta* 1844 (2014) 1920–1924
- [9] Martin Citron, "Strategies for disease modification in Alzheimer's disease", *Nature Reviews Neuroscience* 5, 677-685 (September 2004)



Alejandro Salguero Jiménez, estudiante de 4º curso del Grado en Biotecnología de la Universidad Pablo Olavide.

Revisión sobre la Genética de la especie *Canis rufus* e Implicaciones para su Gestión y Conservación

Elena Millán Ordóñez

Resumen—En este artículo se aborda la problemática principal que presenta la especie de lobo rojo (*Canis rufus*): la pérdida de su diversidad genética, debido a una fortísima disminución de sus efectivos en el pasado, así como a la introgresión genética por parte de otros cánidos. Éste análisis se realiza en base a los datos genéticos de los que se dispone actualmente, donde se analizan fundamentalmente las siguientes cuestiones: el cuello de botella sufrido por la especie, el riesgo de la hibridación con otras especies de cánidos y su nivel de endogamia; así como las consecuencias que estos procesos implican. Además se exponen las actuaciones que se han llevado a cabo y los aspectos que deberían tenerse presentes para que éstas conduzcan a la correcta gestión y conservación de la especie.

Palabras Claves— *Canis latrans*, *Canis rufus*, Conservación, Endogamia, Genética, Hibridación.

1. INTRODUCCIÓN

El lobo rojo, *Canis rufus*, es una especie endémica del este de Estados Unidos que se encuentra actualmente catalogada en peligro crítico (“Critically endangered” según la IUCN) al existir únicamente como una población reintroducida (IUCN Red List of Threatened Species. 2014) (Figura 1). Tiempo atrás llegó a ocupar gran parte del este de Estados Unidos, pero a principios del siglo XX su área de distribución se redujo drásticamente debido a la enorme disminución que sufrió su población. Ésta fue consecuencia de la acción de varios factores como fueron: la destrucción y fragmentación de su hábitat, programas de erradicación, parasitismo y la hibridación con otra especie de cánido: los coyotes (*Canis latrans*) [2]. Actualmente el tamaño poblacional es inferior a 150 individuos en la población reintroducida, de los cuales además solamente en torno a 50 son individuos maduros, aunque cabe decir que la tendencia es al incremento de la



Fig. 1. *Canis rufus* [1].

población [3].

En 1970, su presencia se redujo a una pequeña área en Texas y Luisiana, lo cual llevó al desarrollo de un plan de cría en cautividad en 1974 por parte del Servicio de Pesca y Vida Silvestre de EEUU (USFWS) que contó con catorce individuos de la reducida población [2].

La especie incluso llegó a ser declarada extinta de forma salvaje en 1980. Por tanto, el siguiente paso fue su reintroducción a partir de la población conservada en cautividad. La primera liberación de individuos criados en cautividad se realizó en 1987 en el Alligator River National Wildlife Refuge al este de Carolina del Norte [1]. El área de reintroducción constituye en torno a 6.000 km², y no se ha documentado la presencia de la especie fuera de dicha área. Está clasificada en peligro en EEUU, estando prohibida su caza (IUCN Red List of Threatened Species. 2014). Así, la protección federal que ha recibido ha sido suficiente para permitir la adecuada reintroducción.

2. DATOS GENÉTICOS, INTERPRETACIÓN E IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN DE LA ESPECIE

Debido a que toda la población actual de lobos rojos tienen como base los catorce individuos que formaron parte del programa de cría en cautividad, siendo realmente solo doce de éstos los que tienen representación genética en la población actual lo que podría deberse a los mecanismos propios de esta especie para evitar la endogamia, estamos ante un especie que ha sufrido un cuello de botella brutal, quedando así disminuida drásticamente su diversidad genética [5].

Una de las principales amenazas para el lobo rojo es la hibridación con los coyotes (*C. latrans*) la cual está favorecida por el contacto existente entre ambas especies (Figura 2). La interacción podría definirse como un modelo de flujo génico de continente-isla donde el continente está constituido por la gran población de coyotes, y la isla está formada por las pequeña población de lobos rojos, coyotes inmigrantes e híbridos. Estudios demuestran que la probabilidad de hibridación de los lobos rojos con los coyotes disminuye conforme aumenta el número de lobos rojos e híbridos; así como, el hecho de que un lobo rojo elegirá a un lobo rojo y al igual ocurre con los híbridos cuando existan varias posibles parejas, lo cual disminuirá la tasa de introgresión constituyendo una barrera reproductiva precigótica [7].



Fig. 2. *Canis latrans* [4].

Por otra parte, el origen de la especie está en entredicho; no existe consenso sobre si se debería declarar como una especie aparte o en cambio como el resultado de la hibridación de las especies *C. lupus* (lobo gris) y *C. latrans*. Hay estudios genéticos que avalan esta última opción ya que *C. rufus* no presenta características moleculares específicas que no se encuentren en las dos especies consideradas como parentales. Incluso se ha encontrado mayor parentesco con *C. latrans*, lo cual da lugar a otras interpretaciones sobre el origen de la especie, que aunque diferentes entre sí, tienen en común el restarle importancia al aporte de *C. lupus* (Figura 3) [2].



Fig. 3. *Canis lupus* [6].

Por ejemplo, una muestra del mayor parentesco con *C. latrans* se encuentra en un estudio sobre el complejo mayor de histocompatibilidad (uno de los sistemas genéticos para la resistencia ante enfermedades infecciosas) el cual halló 4 alelos de *C. rufus*, de los cuales 3 se encontraban entre los alelos hallados en *C. latrans* (uno de éstos 3 además fue previamente encontrado en *C. lupus*). El cuarto alelo de *C. rufus* no se encontró en ninguna muestra de *C. latrans* pero sí se localizó un alelo que difería de éste únicamente en un nucleótido. Éste alelo era el único que podría considerarse como único de la especie *C. rufus*, pero debido a esta mínima diferencia con otro alelo de *C. latrans* y siendo el más frecuente de ésta, lleva a pensar que podría ser el resultado de la reciente divergencia del alelo de *C. latrans* [2].

Además, en este mismo estudio, se detectó un exceso de heterocigotos en comparación con los esperados según el equilibrio de Hardy-Weinberg (contemplando en éste la endogamia). Según dicha ley, las frecuencias alélicas en una población se mantendrían constantes, o lo que es lo mismo en equilibrio, a través de las generaciones, siempre y cuando se dieran ciertas condiciones: que el tamaño de la población sea infinito y los apareamientos ocurran al azar, así como que no exista selección, flujo génico o migración con otras poblaciones ni mutaciones. Por lo tanto, el exceso de heterocigotos sugiere la existencia de una importante selección en este gen. Pero debido al manejo de la especie, con el objetivo de disminuir el parentesco en la población cautiva, es posible que se hayan alterado las frecuencias alélicas. Para comprobarlo, podría ser comparado con otro locus que se considere neutral. Estudios realizados con este objetivo, concluyen que no hay efectos significativos sobre locus neutrales debidos al programa de cría [2].

Asumiendo que la especie *C. rufus* es el resultado de una hibridación, la siguiente cuestión que se pretende resolver es la fecha en que se produjo. Existen dos hipótesis: la primera es que se trate de una hibridación reciente ocurrida hace unos cientos de años; y la segunda sería que ocurrió hace decenas de miles de años. Un estudio de la Universidad de California analizó polimorfismos en 10 microsatélites de dos nucleótidos de *C. rufus*, *C. latrans* y *C. lupus* para discernir entre ambas teorías. Entre los 111 alelos encontrados, algunos eran específicos de *C. latrans* y otros de *C. lupus* pero ninguno de *C. rufus*. Esto sirve para establecer el límite superior en la fecha de la hibridación, ya que indica que pocas mutaciones han ocurrido desde entonces. Finalmente, se demuestra así un origen reciente, con un límite superior en 12.800 años, siendo más probable que ocurriera durante los últimos 2.500 años.

Por otra parte, al tratarse de una población con un tamaño poblacional tan reducido los niveles de endogamia incrementaron drásticamente desde que fue reintroducida en 1987, como muestra el coeficiente de

endogamia cuyo valor medio es $f = 0,154$. Dos motivos son los principales causantes de que los niveles de endogamia fuesen tan elevados: en primer lugar, los antecesores partían de un pequeño grupo de fundadores; y en segundo lugar, se producen muchos emparejamientos entre parientes cercanos [5].

En cambio, la depresión por endogamia sufrida en la población no afecta directamente a las medidas de aptitud o eficacia biológica o *fitness* (éxito reproductivo y supervivencia). Es sorprendente debido a que es lo esperable en una población que está sufriendo una gran presión selectiva. Sin embargo, el tamaño corporal de los adultos sí que se ve afectado, siendo menor debido a la endogamia, lo cual disminuye la probabilidad de dominar un territorio, algo fundamental a la hora de la reproducción, por tanto puede afectar indirectamente a los valores de *fitness* [5]. Esto podría deberse al efecto fundador o simplemente al hecho de que no se cuenta con una población no consanguínea para poder comparar.

3. DIRECTRICES PARA EL MANEJO Y LA GESTIÓN DE LA ESPECIE

Los niveles de endogamia han ido creciendo, por lo tanto, el manejo que actualmente se lleva a cabo está orientado al emparejamiento premeditado de los individuos con el objetivo de reducir al máximo la endogamia, al evitar que se emparejen individuos muy estrechamente relacionados, y así mantener la diversidad genética de la especie lo más alta posible [5].

La depresión por endogamia constituye la principal preocupación en biología de la conservación. Afecta a aquellas poblaciones con un tamaño poblacional reducido, siendo sus principales efectos negativos: la expresión de alelos deletéreos recesivos debido al aumento de homocigotos, y la pérdida de las ventajas aportadas por los heterocigotos. En cambio, en la población de lobo rojo, los equivalentes letales (genes que en homocigosis resultarían letales) son cercanos a cero, lo cual indica que existe un mínimo riesgo de depresión por endogamia, a pesar de su trayectoria. Aun así, el control de éstos es importante ya que, como hemos visto, suponen una medida estandarizada del efecto de la endogamia que sufre la población [7].

Por otro lado, en la naturaleza los individuos se emparejan libremente, por lo que son esperables niveles mayores de endogamia en las poblaciones salvajes frente a las cautivas. Aun así, en la naturaleza existen evidencias de evasión de la endogamia, lo cual también ocurre en el lobo rojo aunque para éste es prácticamente imposible evitarla debido a que solo cuenta con una población aislada y pequeña. Por lo tanto, la liberación de individuos nacidos en cautividad y el fomento del cruce entre individuos menos relacionados, con el objetivo de reducir la endogamia y los niveles de parentesco, serán

un pilar fundamental en el plan de recuperación de la especie [3].

Además, sería conveniente la aplicación de técnicas que permitieran controlar los niveles de endogamia en las poblaciones salvajes como datos sobre el pedigrí del lobo rojo, evaluando la depresión por endogamia sufrida y mejorando el conocimiento de cuáles son los patrones de endogamia en poblaciones silvestres [5].

Finalmente, una de las grandes amenazas para la recuperación del lobo rojo es la posibilidad de hibridación con los coyotes (*C. latrans*) sobre todo en las zonas de contacto donde las poblaciones son simpátricas, es decir, donde comparten un mismo espacio geográfico, lo cual implica que la estrategia de gestión debe tener como prioridad la prevención de la introgresión del material genético de éstos en las población salvaje de lobo rojo [5].

La primera vez que se documentó la hibridación con coyotes tras la reintroducción fue en 1993. El tamaño poblacional tan pequeño y el declive que estaba sufriendo la población indicaban que era necesaria una gestión de la población de coyotes, en caso contrario, acabaría formándose un escuadrón híbrido [2]. Por tanto era importante la identificación de los individuos híbridos (mediante el empleo de marcadores de mtADN o de nADN muy variables, así como los métodos de agrupamiento bayesianos) y los coyotes emparejados, con el objetivo, entre otros, de esterilizarlos. Esta es una medida más incluida en el plan de gestión, pero cabe decir que implica que algunos individuos de lobo rojo tendrían parejas estériles lo cual afectaría a su éxito reproductivo [5].

Por último, es importante que se lleven a cabo estudios sobre esta introgresión genética para comprender exactamente la influencia de la hibridación en la población de *C. rufus*, puesto que uno de los principales inconvenientes a la hora de aplacar los efectos de la hibridación es el desconocimiento sobre las interacciones entre las especies con potencial de hibridación [8].

REFERENCIAS

- [1] Wikispaces: <https://biodiversitywarriors.wikispaces.com/>
- [2] Hedrick, P. W., Lee, R. N. y Garrigan, D. (2002). Major histocompatibility complex variation in red wolves: evidence for common ancestry with coyotes and balancing selection. *Molecular Ecology*, 11, 1905-1913.
- [3] Kelly, B.T., Beyer, A. & Phillips, M.K. 2008. *Canis rufus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. <www.iucnredlist.org>.
- [4] Wildlife: : <http://wildlife.ohiodnr.gov/>
- [5] Brzeski, K. E., Rabon JR, D. R., Chamberlain, M. J., Waits, L. P. y Taylor, S. S. (2014). Inbreeding and inbreeding depression in endangered red wolves (*Canis rufus*). *Molecular Ecology*, 23, 4241-4255.

- [6] Google: <http://photos.alphacoders.com/>
- [7] Fredrickson, R. J. y Hendrick, P. W. Dynamics of hybridization and introgression in red wolves and coyotes. (2005). *Conservation Biology*, 20 (4), 1272–1283.
- [8] Bohling, J. H. y Waits, L. P. (2011). Assessing the prevalence of hybridization between sympatric *Canis* species surrounding the red wolf (*Canis rufus*) recovery area in North Carolina. *Molecular Ecology*, 20, 2142–2156.



Elena Millán Ordóñez, graduada en Ciencias Ambientales, Universidad Pablo de Olvide, Sevilla. (2014-15).

Uso de desechos orgánicos urbanos para la producción energética mediante una celda de combustible microbiana de *Escherichia coli* (generado Abril 2015)

Concepción Gago Torres

Resumen—Las celdas de combustible microbianas son uno de los medios con los que en la actualidad se está intentando reemplazar los métodos contaminantes de obtención de energía. Estas “bio-baterías” utilizan biomasa para obtener energía mediante el metabolismo de los microorganismos que hay en ellas. Al mismo tiempo que se obtiene energía, el mismo metabolismo de los microorganismos hace que se limpie el entorno en un proceso que se llama biorremediación. En este trabajo se investiga el efecto que tienen distintos desechos urbanos en una celda de combustible microbiana de *E.coli* en función de la concentración de glucosa en ellos.

Palabras Claves— *E.coli*, MFC, celda de combustible microbiana, voltaje, residuos.

1. INTRODUCCIÓN

La actual crisis energética está afectado a dos niveles. Así, al ya consabido problema de la limitación de combustibles fósiles, se une el hecho de que su combustión está aumentando la concentración atmosférica de CO_2 , con el consiguiente efecto sobre el calentamiento global que estamos experimentando. Es por tanto necesario buscar fuentes alternativas de energías limpias.

En este sentido, las Celdas de Combustible Microbiana, también conocidas como MFC, son semejantes a las baterías, en las que compuestos químicos (sustratos de las bacterias) se oxidan y reducen produciendo así electricidad, con la excepción de que en las celdas de combustible microbianas estas reacciones ocurren durante el metabolismo microbiano [7]. En estas celdas se hallan dos cámaras, una correspondiente al ánodo con el cultivo bacteriano, el sustrato y un electrodo, y otra al cátodo, con una solución iónica y un electrodo, separadas por una membrana de intercambio de protones (que puede sustituirse con un puente salino aunque con una deficiencia en la producción colúmbica [3]) a través de la cual se mueve el catión H^+ . Los dos electrodos están conectados entre sí mediante un cable conductor para formar un circuito cerrado y así producir voltaje [8]. Ejemplos de celdas se pueden ver en la Fig. 1 y la Fig. 2.

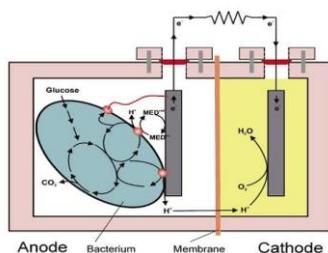


Fig. 1. Esquema de una MFC con membrana de intercambio de protones [8].

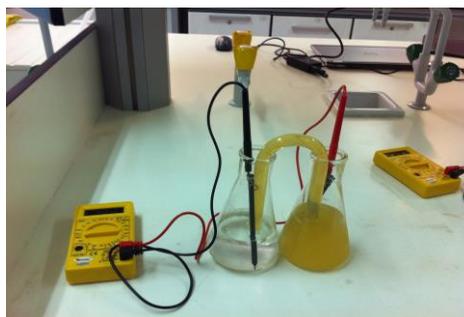


Fig. 2. Celda de combustible microbiana con puente de agar como puente salino fabricada para esta investigación.

Los primeros trabajos sobre las MFCs se iniciaron con *E. coli*, sin embargo, por los bajos resultados obtenidos por las limitaciones científicas del momento (desconocimiento de la necesidad de un mediador Redox), hicieron que no obtuvieran el respaldo de la comunidad científica. Sin embargo, en la actualidad este experimento obtendría mejores resultados por los conocimientos actuales, además de las innovaciones existentes.

La energía que se obtiene en estas celdas microbianas se obtiene a partir de las reacciones metabólicas bacterianas dadas por distintos procesos de fermentación; en el caso de la *E. coli* es la fermentación ácido mixta, metabolismo quimioheterótrofo cuyo sustrato es la glucosa (EcoCyc.com, n.d.). Este proceso se traduce en varias reacciones químicas que oxidan los compuestos orgánicos hasta obtener pequeños compuestos inorgánicos y energía en forma de electrones (como se muestra en la Fig. 3). Entre los pequeños compuestos inorgánicos que se generan está el H_2 que se puede usar como combustible limpio para automóviles.

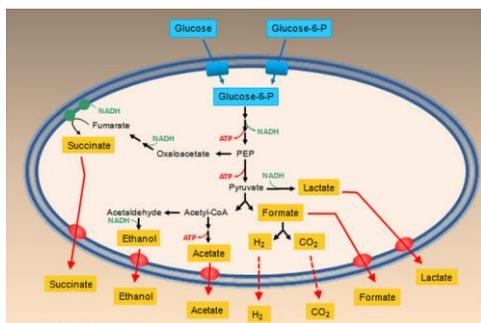


Fig. 3. Fermentación ácido mixta de la *E. coli* y sus productos [1].

2. PARTE EXPERIMENTAL

Los distintos sustratos orgánicos usados en la investigación son barro de un arrozal de la provincia de Sevilla (sur de España), una mezcla de frutos secos (paquetes de la marca Borges), carne de filete de ternera magra, zumo de naranja y hojas de una planta gimnosperma. De ellos se medirá la concentración de glucosa ($C_6H_{12}O_6$) mediante una curva patrón y una reacción enzimática mediante glucosa oxidasa.

Se medirá el voltaje producido por las bacterias *E. coli*, a raíz de las reacciones metabólicas según la cantidad de glucosa en el medio, con un multímetro ($\pm 1mV$).

Un sistema se formó usando dos matraces de Erlenmeyer unidos con un puente salino y unos electrodos de grafito conectados con cables a un multímetro para completar el circuito (Figura 2). Los puentes salinos se rellenaron con medio LB con agar. Las bacterias y una disolución del sustrato ($0,1gmL^{-1}$) están en el matraz correspondiente al cátodo y en el matraz correspondiente al ánodo tenemos una disolución salina (2,85 M). Las mediciones de voltaje se realizaron periódicamente cada 5 minutos durante un total de 180 minutos.

Una parte del sustrato se separó para analizar la concentración de glucosa con un espectrofotómetro. El espectrofotómetro utilizado fue el SpectroVisde Vernier con el software Logger Pro 3. Las mediciones para la glucosa se medieron en la longitud de onda de 420 nm. Los cálculos para la concentración de glucosa se realizaron mediante una curva patrón de glucosa hecha en el mismo proceso.

3. RESULTADOS

3.1. Resultados

En la Figura 4 se muestra la producción media de voltaje según los distintos sustratos durante 3 horas medida cada 5 minutos. Como puede observarse, el voltaje medido no cambia a lo largo del tiempo.

En la Figura 5 y Figura 6, los datos brutos son procesados para comprobar el grado de correlación entre las dos variables de los datos (la producción media de voltaje y la concentración de glucosa en los sustratos) de los datos por su disposición en el gráfico y por el valor de R^2 .

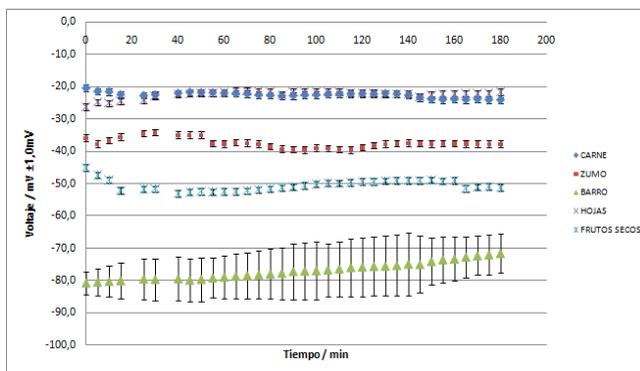


Fig. 4. Gráfico que muestra la producción de voltaje media cada 5 minutos durante 180 minutos según los distintos sustratos.

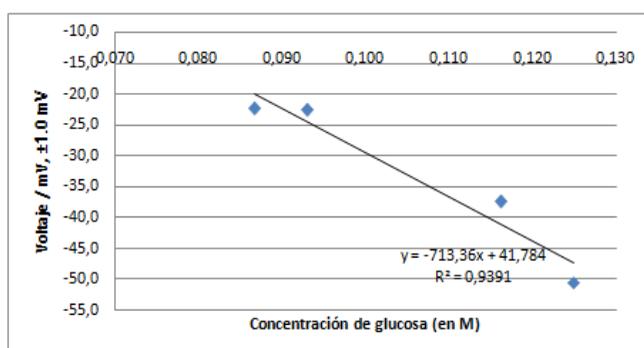


Fig. 5. Gráfico que muestra la producción de voltaje media según la concentración de glucosa de los sustratos.

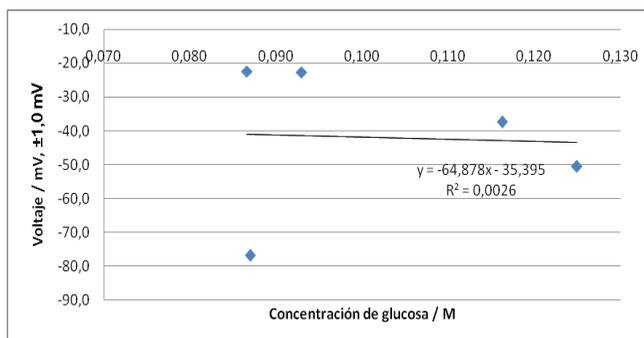


Fig. 6. Gráfico que muestra la producción de voltaje media según la concentración de glucosa de los sustratos salvo por el dato correspondiente con el barro.

3.2. Test de Spearman

Con objeto de determinar la existencia de una correlación estadísticamente significativa entre ambas variables, se realizó el test de Spearman. Como hipótesis nula (H_0), suponemos que no hay correlación entre las dos variables. La fórmula del test de Spearman es la Ecuación 1.

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n(n-1)(n+1)} \quad (1)$$

El coeficiente de Spearman es 0,4. Este valor está por debajo del nivel crítico para un nivel de significatividad ($p=0,05$), lo que indica que la correlación entre las variables no es suficientemente fuerte, aceptándose la hipótesis nula. Sin embargo, se puede observar en la Figura 5 que el valor del barro es el que hace que se acepte esta hipótesis por lo que podríamos comparar este resultado del test con uno sin el barro.

Si calculamos el test de Spearman obviando el valor correspondiente con el barro, el coeficiente de Spearman es 1, lo que demuestra la completa correlación de las variables.

3.3. t-Test

Al igual que en el Test de Spearman partimos de la hipótesis nula (H_0), en la que decimos que las diferencias entre los distintos grupos de datos se deben al azar y no a las diferencias en la concentración de glucosa. El valor que se calculará será entre las medias de dos variables independientes cuyas producciones de voltaje tengan la menor diferencia, usando la Ecuación 2.

$$t = \frac{\bar{x}_T - \bar{x}_C}{\sqrt{\frac{var_T}{n_T} + \frac{var_C}{n_C}}} \quad (2)$$

La probabilidad de que las diferencias observadas no sean debidas a la concentración de glucosa en los sustratos, son los siguientes:

- Entre la media de las hojas y la carne: 0,385.
- Entre la media de la carne y el zumo: $5,03 \cdot 10^{-56}$.
- Entre la media del zumo y los frutos secos: $2,11 \cdot 10^{-44}$.
- Entre la media de los frutos secos y el barro: $1,49 \cdot 10^{-54}$.

Vemos que en todos los casos salvo en el primero, se rechaza la hipótesis nula por lo que todos los grupos de datos son distintos entre sí, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ellos, salvo los grupos de datos producidos por las hojas y la carne, en cuyo caso se acepta la hipótesis nula.

4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En primer lugar, podemos observarse que las desviaciones típicas de los datos obtenidos en el experimento principal no son mayores que el 14,8% de los voltajes medios obtenidos; mostrando ser bastante precisos. Además, la mayor desviación se encuentra en los datos proporcionados por el barro, lo que se explica al ser desigual la distribución de las bacterias anaerobias autóctonas del barro. Más allá, la presencia de otras bacterias en el barro se confirma gracias a los dos tests de Spearman aplicados a los datos en los que se revela una fuerte correlación entre la concentración de glucosa y la producción de voltaje que cumplen todos los sustratos salvo el barro, que produce un voltaje anormalmente elevado según la relación estadística hallada por el segundo test de Spearman entre las dos variables.

La excepción del barro también se puede apreciar claramente en la Figura 5. Seguidamente, con los valores obtenidos en el t-test podemos concluir que los grupos de datos son distintos unos de otros excepto en el caso de las hojas y la carne (claramente apreciable en la Figura 4). Al ser la diferencia en la producción de voltaje significativa, podemos concluir que este cambio en la producción de voltaje es debido realmente a la variable independiente y no al azar.

5. CONCLUSIONES

Los resultados muestran que el sustrato que produce un mayor voltaje es el barro, produciendo una media de 76,9 mV, un 152% con respecto al segundo mayor voltaje producido (frutos secos) y un 343% con respecto al menor voltaje producido (carne). Los resultados obtenidos con todos los sustratos menos el barro también muestran una correlación entre la concentración de glucosa en el sustrato y la producción de voltaje. Esta correlación se comprobó mediante el test de Spearman, y mediante el t-test se comprobó que los grupos de resultados correspondientes a los distintos sustratos no se debían al azar sino que eran significativamente distintos, estadísticamente hablando. En respuesta a la pregunta de investigación, el voltaje producido por el metabolismo bacteriano depende de la concentración de glucosa en los sustratos y de la presencia o no de otras bacterias que al ser esos sustratos su hábitat natural estén seleccionadas para producir un mayor voltaje en esos medios.

En la actualidad hay muchos proyectos que estudian la producción de energía con celdas de combustible microbiano por las ventajas que puede llegar a ofrecer este sistema de producción de energía. Estudios recientes han obtenido voltajes muy superiores, hasta cuatro veces mayores, mediante un método poco complejo, similar al utilizado en este trabajo. Sin embargo, estos estudios utilizaron una concentración fija de glucosa o aguas residuales de cervecerías, que resultaba en una concentración superior a la que se obtiene de los residuos orgánicos urbanos utilizados en este trabajo. El hecho de que se obtuviese una mayor producción de voltaje con una mayor concentración de glucosa corrobora la conclusión de que la producción de voltaje es proporcional con respecto a la concentración de glucosa de los sustratos. Por otro lado, la producción de voltaje del segundo día fue un 180% con respecto a los resultados del día anterior en este trabajo mientras que en otros estudios la producción del segundo día fue un 112% con respecto al primero [7].

En otro trabajo en el que también se obtuvo una alta producción de voltaje, se utilizó un método mucho más complejo y unas cepas de *E. coli* genéticamente modificadas. El método utilizado en este trabajo indica vías en las que se podría mejorar la producción de voltaje. Se podrían seleccionar "darwinianamente" cepas de *E. coli* que produzcan más voltaje, tengan un metabolismo más rápido o resistan una mayor concentración de glucosa. También se pueden utilizar materiales más avanzados como la membrana de intercambio de protones para incrementar el rendimiento colúmbico de la celda [10].

Respecto al plano energético-ecológico, estas celdas están, en la actualidad, todavía lejos de poder desempeñar un papel significativo en la vida diaria por varias razones. En primer lugar, el mayor voltaje producido hasta el momento por estas celdas es de 6V [10], una cantidad menor a la necesaria para cualquier electrodoméstico o aparato electrónico aunque la resistencia en el circuito sea mínima. En segundo lugar, los materiales que maximizan el rendimiento de las celdas de combustible son costosos (como la membrana de intercambio de protones) por lo que el beneficio económico obtenido de las celdas se minimizaría.

Finalmente, los resultados obtenidos en la presente investigación abren la puerta no a la utilización de aguas residuales agrícolas, sino a la utilización de la tierra de los campos de cultivo con su propia población de bacterias para una nueva forma de producción energética, proponiendo así una forma de producción de energía renovable complementaria al espacio necesario para las actividades agrícolas y beneficiándose de esta.

REFERENCIAS

- [1] EcoCyc.com (n.d.) THE ESCHERICHIA COLI STUDENT PORTAL. Disponible en: http://ecolistudentportal.org/article_fermentation#_ [Accedido el: 19 Sep. 2014]
- [2] Esteve-Núñez, A. (2008) Bacterias productoras de electricidad. Actualidad SEM (Vol. 45) 36-39
- [3] Hernández Arroyo, V.A.; Estrada Román, E.; Gallardo Onesto, V. (2012, 20 de noviembre) ELABORACIÓN DE LA CELDA GALVÁNICA. Disponible en: <https://prezi.com/zov5pfwuwuof/trabajo-final/> [Accedido el: 20 May. 2014]
- [4] Kim, S.; Kyu-Jung, C.; Mi-Jin, C.; Verstraete, W. (2008, mayo) Microbial Fuel Cells: Recent Advances, Bacterial Communities and Application Beyond Electricity Generation. Environmental Engineering Research (Vol. 13, nº 2) 51-65
- [5] Lovley, D. (2006, julio) Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. Nature Reviews Microbiology (Vol. 4) 497-508
- [6] Panto, S. (n.d.) REDOX Y SEDIMENTOS. Disponible en: <http://www2.udec.cl/geoquimica/en/education/redox.pdf> [Accedido el: 30 May. 2014]
- [7] Rohan, D.; Deepa, V.; Rohan, G.; Satish, B. (2013, 18 de mayo) Bioelectricity Production from Microbial Fuel using Escherichia Coli (Glucose and Brewery Waste). International Research Journal of Biological Sciences (Vol.2, nº 7) 50-54
- [8] Singh, D., Pratap, D., Baranwal, Y., Kumar, B. and Chaudhary, R. (2010). Microbial fuel cells: A green technology for power generation. Annals of Biological Research (Vol.3) 128-138
- [9] Yarris, L. (2010, 27 de enero) Microbes Produce Fuel Directly From Biomass. Disponible en: <http://newscenter.lbl.gov/2010/01/27/microbes-produce-biofuels/#sthash.UlQ7uz62.dpuf> [Accedido el: 6 Oct. 2014]
- [10] Zhang, T.; Cui, C.; Chen, S.; Ai, X.; Yang, H.; Shen, P. and Peng, Z. (2006, 25 de abril). A novel mediatorless microbial fuel cell based on direct biocatalysis of Escherichia coli. Chem. Commun. (21) 2257-2259



Concepción Gago Torres. Alumna de 2º de Bachillerato Internacional y de Bachillerato Español en la modalidad de Ciencias de la Salud en el Colegio San Francisco de Paula en el curso de 2014/2015. Este proyecto fue presentado como su Monografía de Biología Nivel Superior para el Bachillerato Internacional.

Nanofibras y nanopartículas en la regeneración del tejido óseo

Alegría Martínez Chacón

Resumen— Han sido muchos los intentos que se han realizado en orden a regenerar el tejido óseo, dadas las múltiples aplicaciones que esta regeneración tendría sobre distintas enfermedades humanas. Una de las apuestas más prometedoras es el uso de nanocomposites para obtener matrices ideales que mimeticen la estructura de los huesos nativos y, entre ellos, los fabricados a partir de nanopartículas compuestas por bifosfato cálcico. Estas nanopartículas se engloban en los nanomateriales biocerámicos, y permiten generar matrices a partir de nanofibras poliméricas obtenidas por electrospinning. Las nanopartículas de bifosfato cálcico representan una mejora frente a los resultados obtenidos anteriormente, debido a las propiedades que aportan a las nanofibras. Estas nanofibras han demostrado tener mejores propiedades mecánicas y presentan una gran biocompatibilidad que permite una mayor adhesión y proliferación de los osteoblastos, además de mostrar una mayor expresión de colágeno respecto a otras fibras que carecen de dichas nanopartículas.

Palabras Claves— Nanopartículas, nanofibras, bifosfato calcico, polivinil alcohol, gelatina, tejido óseo, regeneración.

1. INTRODUCCIÓN

El tejido óseo es un tejido firme, duro y resistente, que forma parte del endoesqueleto de los vertebrados.

Para poder llevar a cabo la regeneración de un tejido, como en este caso es el tejido óseo, es necesario entender su estructura sus características y su composición química [1]. El tejido óseo está formado por componentes orgánicos (mayoritariamente colágeno) e inorgánicos (hidroxipatito) y cuenta con una estructura que va desde la nanoescala hasta la macroescala. A nivel macroscópico el hueso consta de una cáscara densa de hueso cortical, que proporciona soporte y protege, y cuenta, además, con hueso esponjoso poroso en ambos extremos, el cual optimiza la transferencia de peso y minimiza la fricción de las articulaciones [2]. Las propiedades del tejido óseo están fuertemente relacionadas con la estructura y la organización de la matriz extracelular (ECM), de tal forma que la reparación, o reconstrucción, de este tejido es muy compleja y requiere de estrategias innovadoras que consigan un ensamblaje jerárquico que mimetice la estructura de la matriz extracelular del tejido óseo desde la nanoescala hasta la macroescala. Si se presta atención a las necesidad de regenerar dicho tejido, lo ideal sería obtener un trasplante de hueso que tuviera características tales como, osteoconductividad, osteoinducción y osteogénesis. Para ello, la elección del material para regenerar este tejido es esencial. Se pretende generar un andamiaje que no sólo proporcione soporte estructural para la integración celular, sino que también regule la proliferación, diferenciación y migración para generar un tejido funcional.

La reparación y reconstrucción del tejido óseo, consta de

una estructura biodegradable, compuesta por biomateriales, que reemplazarán la forma y la función del tejido nativo, mientras proporciona la regeneración del mismo sin necrosis y sin la formación de postillas. Aunque esto aún es un reto para la ciencia, los nanomateriales y los nanocomposites están permitiendo generar una organización natural de la matriz extracelular para fabricar el tejido óseo, ya que las nanoestructuras proporcionan una aproximación muy cercana a la arquitectura real del hueso.

Al implantar los biomateriales, estos deben proporcionar soporte estructural, al menos hasta que se consiga regenerar el tejido. Las modificaciones en la superficie se han adaptado a la estructura mediante el uso y desarrollo de los nanomateriales, que se han elegido específicamente para la estructura que se pretende generar. Por otro lado, las nanopartículas promueven la mineralización y la osteogénesis.

En este artículo revisaremos trabajos recientes sobre nanopartículas compuestas por bifosfato cálcico (BCP) en unas fibras formadas por polivinil alcohol/gelatina (PVA/GE) mediante electrospinning. De esta forma se combinan dos materiales, una cerámica sintética y un polímero natural para garantizar y optimizar la biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoconductividad y estabilidad mecánica para la regeneración del hueso [3].

2. CARACTERÍSTICAS DE LAS FIBRAS FORMADAS POR PVA/GE, CARGADAS CON NANOPARTÍCULAS DE BCP

Las nanopartículas de BCP presentan una alta tasa de regeneración en comparación con aquellos casos donde no son utilizadas, pero no se han elegido solo por dicha capacidad, sino porque además poseen unas características adecuadas para el uso que se les quiere dar, proporcionando todas las especificidades descritas para dicha función. Las nanopartículas de BCP, que son biocerámicas y esféricas, pertenecen a un grupo de biomateriales que sustituyen al hueso presentado una excelente biocompatibilidad y osteoconductividad. Consisten en una mezcla homogénea de hidroxiapatito (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, y β -fosfato tricálcico (TCP), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, en la que la relación HA/ β -TCP es variable pudiendo llegar hasta un 50%. La relación de HA/ β -TCP se determina por la deficiencia de calcio, y esta depende del método de preparación, que puede ser por hidrólisis o mezcla mecánica, donde el pH del medio y la temperatura juegan un papel importante [4].

Las propiedades de las partículas BCP biocerámicas están relacionadas con sus aplicaciones biomédicas. Estas propiedades incluyen estabilidad, microporosidad y un aumento del área superficial, fuerza compresiva, bioreactividad y osteoconductividad, así como biodegradabilidad, biocompatibilidad y que no presentan toxicidad, por lo que no generan reacción inmune durante la implantación en el hueso. Además, estas partículas se encuentran uniformemente empaquetadas y ordenadas, lo que contribuye a la migración celular y el crecimiento de la matriz extracelular a través de los espacios entre las partículas esféricas de BCP [3].

Las nanopartículas de BCP son prometedoras para remodelar el tejido óseo, ya que son un material cerámico ideal por sus propiedades, como la estabilidad y biocompatibilidad, sobre todo con el HA. Aún así, hay muchos requerimientos que se han de tener en cuenta antes de utilizar o validar cualquiera de estas estructuras artificiales.

Distintos grupos de investigación han demostrado el potencial de las cerámicas BCP en andamiajes para la ingeniería de tejidos, sistemas de liberación de fármacos y como transportador de factores de crecimiento. A pesar de todas las ventajas que estas presentan, también tienen limitaciones, ya que es complicado incorporar agentes terapéuticos sin romper la estructura y, por consiguiente, su biofuncionalidad. En cuanto a la ingeniería de tejidos, estas nanopartículas se pueden cargar en nanofibras compuestas por polivinil alcohol y gelatina (PVA/GE), muy usadas en este campo ya que son biode-

gradables, biocompatibles y no son tóxicas (Figura 1). Las fibras poliméricas se generan por una técnica denominada electrospinning, un proceso muy versátil que permite la formación de nanofibras mediante la aplicación de una corriente de alto voltaje que actúa sobre una disolución polimérica definida aún en estado líquido. Este sistema, acoplado a una fina aguja, facilita la formación de un entramado de hilos poliméricos, nanofibras, que constituyen una matriz con gran área superficial ideal para la adhesión y proliferación celular [6]. Dichas fibras se usan para recubrir, en este caso, la superficie de una estructura de cerámica. Este sistema se ha mejorado con la agregación de las nanopartículas BCP, para dar estabilidad y mejorar las propiedades biológicas [5].

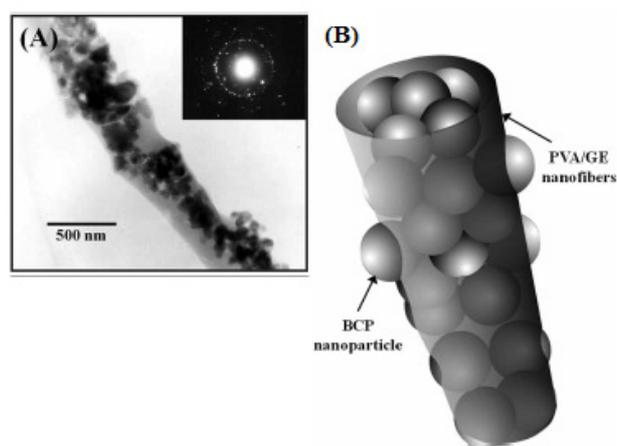


Figura 1. (a) Imagen TEM de una fibra 50% BCP-PVA/GE. (b) encapsulación parcial o total de nanopartículas BCP, en la nanofibra. Imagen tomada de [5].

2.1. Morfología

Las fibras obtenidas presentan una morfología que se ve modificada al cargarlas con nanopartículas compuestas por BCP. El diámetro de las fibras, junto con las nanopartículas, se ve incrementado desde 100 a 400nm, conforme se incrementa desde un 0 a un 50% el contenido de BCP (figura 2). Además, por TEM se observó la microestructura interna de la membrana compuesta por BCP-PVA/GE, y se vio que las nanopartículas estaban bien dispersas dentro de la nanofibra. El aumento en la concentración de BCP también repercute sobre las propiedades mecánicas de la estructura formada. Para comprobar su efecto se midió el grado de tensión-deformación de las membranas fibrosas de PVA/GE. La fuerza de extensión y la tensión de BCP-PVA/GE incrementa desde 4.2 ± 0.5 hasta 8.4 ± 0.6 MPa, conforme incrementa la concentración de BCP, además de mejorar el porcentaje de rotura de las fibras.

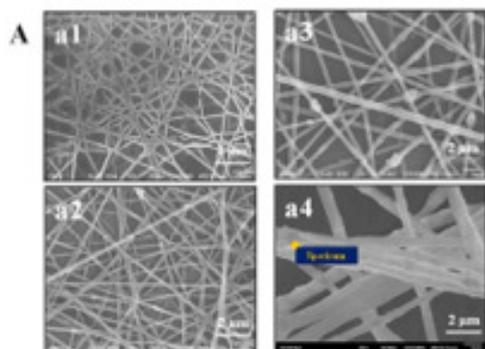


Figura 2. (a) Morfología de las fibras observadas por SEM. (a1) fibras de PVA/GE. (a2) 20% BCP-PVA/GE. (a3) 40% BCP-PVA/GE. (a4) 50% BCP-PVA/GE. Imagen tomada de [5]

2.2. Adhesión celular y proliferación

La adhesión de las células a los biomateriales es un factor indicativo de su biocompatibilidad, de manera que cuanto más biocompatible es la superficie del material mayor es la cantidad de células que se unen a esta.

Se ha estudiado la adhesión de células MG-63, derivadas de osteoblastos humanos, a fibras con y sin nanopartículas BCP. Los resultados obtenidos muestran que las células MG-63 adheridas a fibras compuestas por un 50% BCP-PVA/GE presentan más firmeza, y la unión es más rápida. También se estudiaron la viabilidad y la proliferación, mediante ensayos colorimétricos e inmunomarcaje. La línea celular, MG-63, proliferaba en ambas fibras, viéndose un aumento de estas en la membrana de las fibras formadas por un mayor porcentaje de BCP (Figura



3).

Figura 3. Observación al microscopio de la proliferación celular comparando fibras de PVA/GE con fibras de 50%BCP-PVA/GE tras 1,3 y 7 días de incubación. Imagen tomada de [5].

Un tejido sólo puede ser funcional si las células, además de quedarse sobre la superficie del andamiaje generado, también son capaces de migrar dentro de este. Para favorecer la penetración de las células a través de la membrana el tamaño mínimo del poro tiene que ser $10\mu\text{m}$. El tamaño del poro de la fibra con un 50% BCP-PVA/GE tiene alrededor de $20\mu\text{m}$, lo que proporciona espacio

suficiente para migrar hacia el interior. Mediante microscopía electrónica se ha comprobado que las células MG-63 estaban bien dispersas y habían penetrado entre los poros, indicando esto que el tejido generado era funcional.

2.3. Colágeno y expresión de osteoponina

El colágeno tipo 1, que constituye el 90% de las proteínas del hueso, sirve como plantilla para la matriz del hueso y controla el sitio de nucleación y espacio para el crecimiento del hidroxiapatito. Como se muestra en la figura 4, en las membranas de BCP-PVA/GE la expresión de colágeno tipo 1 aumenta con el paso de los días.

Por otro lado, la osteoponina tiene una matriz extracelular multifuncional, y contiene proteínas involucradas en la adhesión y migración celular. En la figura 4 se observa una mayor expresión de osteonina en las fibras de BCP-PVA/GE, lo que demuestra que existe una mayor proliferación de las células, generando nuevos osteoblastos.

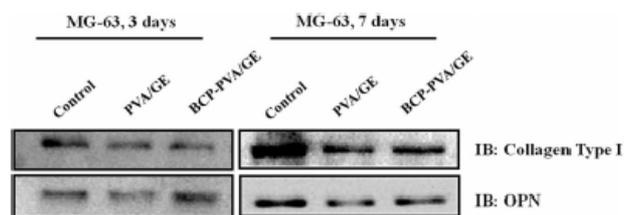


Figura 4. Expresión de colágeno y osteonina (OPN) en fibras de PVA/GE y 50% BCP-PVA/GE tras 3 y 7 días después de ponerlos en cultivo, se observa mediante un Western blot. Imagen tomada de [5]

3. CONCLUSIONES

Las nanofibras PVA/GE soportan la unión y permiten la proliferación de los osteoblastos a través del andamiaje generado, no obstante, la nueva formación del hueso mejora con la carga de las nanopartículas de BCP. De las concentraciones de BCP ensayadas la que obtuvo mejor resultado fue la que contenía un 50%. En este caso, el diámetro de las fibras aumentó hasta 400 nm , cifra significativamente mayor que el diámetro de las nanopartículas, observándose una encapsulación total. La inclusión de las nanopartículas mejora las propiedades mecánicas de las fibras y hace de estas un material más biocompatible. Además, la carga con BCP de las nanofibras también aumenta significativamente la adhesión y proliferación celular, aspectos fundamentales para determinar la funcionalidad del tejido creado. Los nanocomposites BCP-PVA/GE son, por tanto, muy prometedores en terapias óseas regenerativas.

REFERENCIAS

- [1] I. Natali, P. Tempesti, E. Carretti, M. Potenza, S. Sansoni, P. Baglioni, and L. Dei, "Aragonite crystals grown on bones by reaction of CO₂ with nanostructured Ca(OH)₂ in the presence of collagen. Implications in archaeology and paleontology," *Langmuir*, vol. 30, pp. 660–668, 2014.
- [2] R. E. McMahon, L. Wang, R. Skoracki, and A. B. Mathur, "Development of nanomaterials for bone repair and regeneration," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 101 B, pp. 387–397, 2013.
- [3] J. S. Son, K. B. Lee, S. G. Kim, T. Y. Kwon, and K. H. Kim, "Porous calcium phosphate granules containing drug-loaded polymeric nanoparticles for bone regeneration," *Mater. Lett.*, vol. 76, pp. 243–246, 2012.
- [4] R. Z. Legeros, R. Z. Legeros, S. Lin, S. Lin, R. Rohanizadeh, R. Rohanizadeh, D. Mijares, D. Mijares, J. P. Legeros, and J. P. Legeros, "Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications," *J. Mater. Sci. Med.*, vol. 14, pp. 201–209, 2003.
- [5] N. T. Ba Linh, K. H. Lee, and B. T. Lee, "Functional nanofiber mat of polyvinyl alcohol/gelatin containing nanoparticles of biphasic calcium phosphate for bone regeneration in rat calvaria defects," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 101 A, pp. 2412–2423, 2013.
- [6] G. P. Paola, "Matrices biomiméticas y factores de crecimiento: aplicación en la curación de heridas," *Moleqta*, vol. 15, pp. 60–62, 2014.

Alegría Martínez Chacón obtuvo el título de Bioquímica por la Universidad de Córdoba en 2014, y actualmente cursa el Máster de Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide.



Nanotecnología Versus Resistencia Microbiana

Elena Romero Ben

Resumen—Debido al abuso de los antibióticos en la sociedad actual, existe una creciente preocupación ante la formación de múltiples cepas bacterianas resistentes a multitud de fármacos. Esto supone un nuevo reto para la medicina, la cual se apoya en la nanotecnología para resolver este problema. Existen multitud de nanomateriales denominados nanoantibióticos con capacidad bactericida intrínseca, o que pueden usarse como nanovehículos dirigidos al lugar de la infección. La combinación de ambas propiedades hace de la lucha de la nanobiotecnología contra la resistencia bacteriana una realidad. En este trabajo se ofrece una visión actualizada de todos los mecanismos que involucran el uso de nanomateriales para combatir la resistencia microbiana.

Palabras Claves— Nanomateriales, resistencia microbiana, actividad bactericida, antibióticos.

1. INTRODUCCIÓN

A través de los años, la resistencia de los microorganismos a los antibióticos se ha convertido en uno de los grandes problemas de la medicina moderna.

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 el uso indiscriminado de antibióticos ha facilitado la continua aparición y proliferación de microorganismos resistentes/multi-resistentes, provocando una alarma global debido a la amenaza que estos representan para la salud pública. La mayoría de las cepas resistentes a medicamentos se encuentran en los hospitales, ocasionando numerosos peligros a la hora de realizar intervenciones quirúrgicas. Estas infecciones por bacterias resistentes a fármacos tienen como consecuencia una mayor toxicidad para el paciente debido a la necesidad de administrar mayores dosis de antibióticos tras una intervención.

Una de las causas de la resistencia microbiana es la exposición a dosis bajas del antibiótico, o la utilización de medicamentos microbiostáticos que inhiben pero no matan al microorganismo, lo que ejerce una presión selectiva en favor de los microorganismos resistentes [1].

Las ventajas que poseen los microorganismos capaces de resistir las drogas antimicrobianas consisten en que logran disminuir la captación del fármaco y aumentar el eflujo del mismo, es decir, son capaces de modificarlos covalentemente o aumentar la producción de inhibidores competitivos para el antibiótico y, por último, la formación de biopelículas les supone una ventaja adaptativa. [2] En este artículo se tratan los diferentes nanomateriales que existen actualmente con capacidad de combatir la resistencia microbiana, y su actividad bactericida.

2. NANOTECNOLOGÍA PARA COMBATIR LA RESISTENCIA MICROBIANA

La nanotecnología ofrece una buena plataforma que altera las propiedades físico-químicas de diferentes materiales,

abriendo las puertas a una multitud de aplicaciones biomédicas. Concretamente, el uso de la nanotecnología en el diagnóstico y el control de infecciones por patógenos resistentes a fármacos se está explorando actualmente como una alternativa prometedora [3,4].

Los mecanismos por los que las nanopartículas son capaces de combatir la resistencia microbiana son [1]:

- Utilizan múltiples estrategias simultáneamente para combatirlos y, de esta forma, evitar su supervivencia.
- Combaten aquellas características que los hacen resistentes, como la absorción disminuida del fármaco, el eflujo y la formación de biopelículas.
- Finalmente, su mayor ventaja es que permiten dirigir los fármacos directamente a la zona de infección y, de este modo, las dosis de medicamento necesarias son más bajas, disminuyendo los efectos secundarios sobre el paciente.

Podemos distinguir dos tipos de nanomateriales, los que muestran actividad antimicrobiana por sí mismos y los que permiten elevar la efectividad y seguridad de la administración de los antibióticos, y ambos son considerados nanoantibióticos [4].

2.1. Nanopartículas y nanovectores utilizados como bactericidas.

Existen diferentes nanomateriales con actividad bactericida que podemos clasificar en metales y óxidos metálicos o aquellos basados en estructuras de carbono. La capacidad bactericida intrínseca que poseen (Figura 1) se debe tanto a su elevada área de superficie, que aumenta el contacto con los microorganismos, como a sus propiedades físicoquímicas únicas, como la producción de especies reactivas de oxígeno, que comprometen la integridad de la membrana celular bacteriana mediante la formación de poros e interrumpen las vías enzimáticas metabólicas y de síntesis de ADN [5]. A continuación se exponen ejemplos de los nanomateriales antibacterianos más potentes que existen.

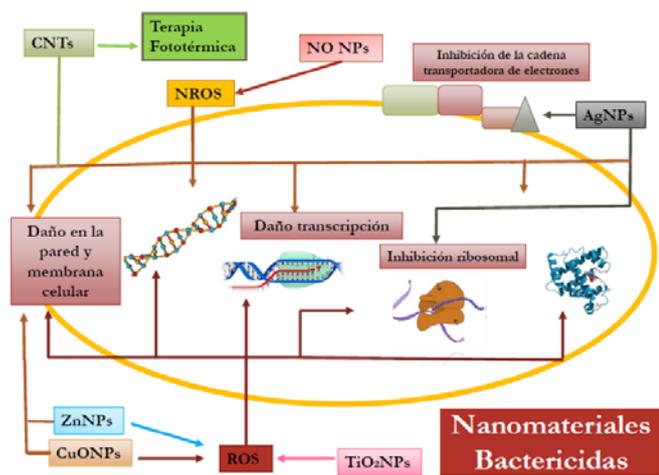


Fig. 1. Mecanismos antimicrobianos de las nanopartículas bactericidas. Imagen modificada de Pelgriff and Friedman, 2013, [1].

2.1.1 Nanopartículas de Plata (AgNPs)

Las nanopartículas de Plata podrían considerarse el nanomaterial metálico con mayor potencial bactericida por excelencia. Muchos artículos apoyan la utilización de nanopartículas de plata para el tratamiento de heridas y enfermedades infecciosas, y ya son utilizadas en instrumental quirúrgico y vendajes [6]. En la Figura 2 se muestra la capacidad bactericida de las nanopartículas de plata contra diferentes especies bacterianas [7].

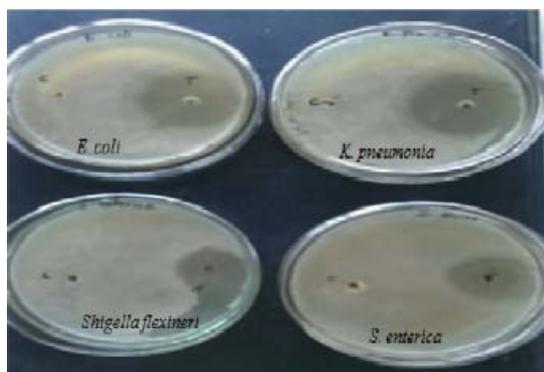


Fig. 2. Capacidad bactericida de las AgNPs en medios con diferentes especies bacterianas [7]

La eficiencia bactericida de las AgNPs aumenta cuanto menor volumen (<10 nm de radio) y mayor área o superficie de contacto (forma triangular) poseen, ya que uno de los problemas más comunes de las AgNPs es su agregación.

Las cualidades que poseen las nanopartículas de plata, y que las hacen tan especiales, se deben a la liberación de cationes Ag^+ (Figura 1), los cuales interactúan con grupos fosfato y tioles de las proteínas de la membrana plasmática y a los ácidos nucleicos, dañando de esta forma el ADN y ARN bacteriano. Además de dañar los ácidos nucleicos, los Ag^+ , al interactuar con las cargas negativas de la membrana plasmática, crean poros y disipan el gradiente de protones provocando la muerte celular,

sobre todo de la bacterias gram -. Los Ag^+ también inhiben los citocromos de la cadena de transporte de electrones de los microorganismos, y son capaces de formar especies reactivas de oxígeno (ROS) e inhibir la síntesis de pared celular de las bacterias gram + [1].

2.1.2 Nanopartículas liberadoras de Oxido Nítrico

Al igual que la AgNPs, las nanopartículas liberadoras de óxido nítrico (NO) tienen un importante papel bactericida. Eso se debe a la capacidad del NO de reaccionar con el oxígeno y el super óxido de forma espontánea, dando lugar a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RNOS) que son tóxicas para las células. Estas especies RNOS son capaces de unirse irreversiblemente al grupo hemo de las proteínas, causando la delección del hierro y la inactivación de dichas enzimas (Figura 1). Además, los RNOS producen la peroxidación de lípidos en liposomas y la desaminación del ADN. Estudios *in vivo* con ratones [8] han demostrado que su aplicación tópica en heridas disminuye significativamente el número de bacterias resistentes (abscesos dérmicos e intramusculares).

2.1.3 Nanopartículas de óxidos metálicos

Entre este tipo de nanopartículas se incluyen TiO_2 , CuO y ZnO , las cuales exhiben una buena capacidad antibacteriana. Se caracterizan porque comparten entre sí una potente actividad fotocatalítica debida a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales van a interaccionar con la membrana plasmática y el ADN, produciendo daños irreparables en ambos. A su vez las nanopartículas de CuO y ZnO son capaces de liberar cationes Cu^+ y Zn^+ , respectivamente, que se unen a las cargas negativas de las membranas bacterianas y forman poros, produciendo la muerte celular (Figura 1) [3].

2.1.4 Nanotubos de carbono (CNTs)

Los nanotubos de carbono son nanoestructuras cilíndricas constituidas por átomos de carbono dispuestos en una conformación hexagonal, los cuales presentan unas propiedades eléctricas, mecánicas y térmicas únicas. A pesar de que existe una gran controversia respecto a su biotoxicidad, numerosos estudios aprueban la utilización de CNTs como potentes bactericidas (Figura 1). Su mecanismo de acción se debe a tres factores, en primer lugar, los CNTs, al entrar en contacto con las bacterias, producen la perturbación y oxidación de la membrana plasmática. En segundo lugar previenen de la formación de biopelícula y, en tercer lugar, poseen una alta estabilidad y son fácilmente biofuncionalizables, lo que disminuye su biotoxicidad y permite dirigirlos específicamente a las células bacterianas mediante la interacción con glucolípidos de membrana. Los CNTs pueden ser utilizados también en la terapia fototérmica antimicrobiana. Por último, aunque su estabilidad en medio acuoso es baja, lo que puede disminuir su capacidad bactericida, los últimos estudios han demostrado que se puede mejorar su estabilidad si se modifica su superficie con ligandos estabilizadores o tensioactivos como el dodecil benceno sulfato de sodio o el Triton-X. [4]

2.2 Nanopartículas liberadoras de antibióticos

La posibilidad de combinar diferentes nanopartículas con antibióticos de distintas clases permite aumentar la eficacia bactericida de estos fármacos mejorando su solubilidad, el tiempo de vida media y la circulación de estos. Además, permite dirigirlos específicamente, disminuyendo las dosis y los efectos secundarios en los pacientes [3]. A continuación se resumen las nanoestructuras más utilizadas en el tráfico y liberación de fármacos bactericidas, entre los que destacan los liposomas y los dendrímeros, aunque también se ha descrito que otras nanopartículas, como las de oro, son capaces de transportar diferentes antibióticos, pudiéndose usar para combatir la resistencia microbiana aunque no posean capacidad bactericida por sí mismas.

2.2.1 Liposomas

Los liposomas son los vehículos liberadores de fármacos (polimixina B, estreptomycin, vancomicina, ampicilina, etc.) más utilizados debido a sus características. Son nanovesículas que mimetizan los fosfolípidos de membrana, por lo que tienen la capacidad de fundirse en ella y liberar su contenido al interior celular incrementando el flujo intracelular. Durante su síntesis y utilización deben tenerse en cuenta diferentes aspectos como sus propiedades físico-químicas, el tamaño y polidispersión, la carga superficial, la estabilidad, y la reproducibilidad de la síntesis a gran escala.

Para aumentar la estabilidad de los liposomas estos se pueden conjugar al polímero polietilenglicol (PEG) en su superficie. La unión a PEG también permite que se puedan direccionar lo que a su vez permiten activar la direccionalidad de la vesícula al unirse a diversos ligandos de direccionamiento (anticuerpos) [9,4].

2.2.2 Dendrímeros

Los dendrímeros son polímeros globulares hiperramificados con una estructura precisa. Poseen una elevada área superficial, que genera una gran reactividad antimicrobiana debido a la elevada densidad de grupos funcionales con una alta afinidad a receptores bacterianos o virales que se les pueden añadir. Las diferentes fármacos, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, pueden unirse o conjugarse en las cavidades internas de la nanoestructura o en la superficie multivalente del dendrímero. El dendrímero más estudiado es la poliamidoamina (PAMAM), el único problema es que posee una cierta citotoxicidad, que reduce su aplicabilidad en clínica. Los últimos estudios se basan en sintetizar un dendrímero PAMAM bioconjugado con grupos carboxilo e hidroxilo terminales y, de esta forma, hacerlo más biocompatibles. [9, 4].

3. ÚLTIMOS AVANCES

Las últimas investigaciones que se están llevando a cabo para combatir la resistencia microbiana se centran en la producción de nanocompuestos formados por diferentes nanopartículas. Un ejemplo de ello se muestra en el artículo publicado por Matai et al., en 2014, en el cual utilizan un nanocompuesto de ZnO/Ag, de tal forma que

reducen los problemas de agregación de la plata, obteniendo mejores resultados bactericidas [10]. Estos nanocompuestos presentan una gran aplicabilidad en el empaquetamiento de alimentos y en la producción de material quirúrgico.

Otros estudios que se están llevando a cabo en el contexto del tratamiento de infecciones es la aplicación de las propiedades nanotérmicas de algunos nanomateriales en terapia médica y, más concretamente, para combatir las enfermedades o heridas infecciosas de bacterias resistentes. Algunas nanopartículas, como las de oro (AuNPs) tienen la capacidad de absorber energía del infrarrojo y desprenderla en forma de calor. Se ha demostrado que las AuNPs funcionalizadas con anticuerpos específicos oseen una gran capacidad antimicrobiana, usados como agentes fototérmicos [11], [3].

4. CONCLUSIONES

Para concluir, solo cabe mencionar la posible citotoxicidad de estos nanomateriales, la cual sigue siendo controvertida hoy en día. La biofuncionalidad y formación de conjugados abre las puertas de su aplicación terapéutica, disminuyendo su capacidad citotóxica y, de esta forma, poder combatir las enfermedades infecciosas resistentes a los fármacos actuales. Aún queda mucho por investigar en este nuevo y fascinante campo de la bionanotecnología, pero los avances y resultados obtenidos hasta la fecha son bastante concluyentes, ya existen multitud de nanomateriales entre los mencionados con cualidades muy potentes y prometedoras.

REFERENCIAS

- [1] R. Y. Pelgrift, and A. J. Friedman, "Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance," *Advanced drug delivery reviews*, vol. 65, no. 13, pp. 1803-1815, 2013, doi:10.1016/j.addr.2013.07.011
- [2] F. C. Tenover, "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria", *The American journal of medicine*, vol. 119, no. 6, pp. S3-S10, 2006, doi:10.1016/j.amjmed.2006.03.011
- [3] R. Singh, M. S. Smitha, and S. P. Singh, "The Role of Nanotechnology in Combating Multi-Drug Resistant Bacteria," *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 14, no. 7, pp. 4745-4756, 2014, doi: http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2014.9527
- [4] A. J. Huh, and Y. J. Kwon, "Nanoantibiotics: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era", *Journal of Controlled Release*, vol. 156, no. 2, pp. 128-145, 2011, doi:10.1016/j.jconrel.2011.07.002.
- [5] Q. Li, S. Mahendra, D.Y. Lyon, L. Brunet, M.V. Liga, D. Li and P.J. Alvarez, "Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications", *Water Res*, vol. 42, no. 18, pp. 4591-4602, 2008.
- [6] R. Singh, U. U. Shedbalkar, S. A. Wadhvani, and B. A. Chopade, "Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99, no 11, pp. 4579-4593, 2015.
- [7] B. Gowramma, U. Keerthi, M. Rafi, and R. Muralidhara Rao, "Biogenic silver nanoparticles production and characterization from native stain of *Corynebacterium* species and its antimicrobial activity," *Journal of Nanoparticles*, vol. 2014, pp. 1-10, 2014.

- icrobial activity". 3 *Biotech*, vol. 5, no. 2 pp. 195-201, 2015, doi:10.1007/s13205-014-0210-4.
- [8] D.O. Schairer, J.S. Chouake, J.D. Nosanchuk, and A.J. Friedman. "The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents", *Virulence* vol. 3, no. 3, pp. 271-279, 2012.
- [9] L. Zhang, D. Pornpattananankul, C. M. Hu, and C. M. Huang, "Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery". *Current medicinal chemistry*, vol 17 no. 6, pp. 585-594, 2010.
- [10] L. Matai, A. Sachdev, P. Dubey, S. U. Kumar, B. Bhushan, and P. Gopinath, "Antibacterial activity and mechanism of Ag-ZnO nanocomposite on *S. aureus* and GFP-expressing antibiotic resistant *E. coli*". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol 115, pp. 359-367, 2014.
- [11] W. C. Huang, P. J Tsai, and Y. C. Chen, " Functional gold nanoparticles as photothermal agents for selective-killing of pathogenic bacteria," *Nanomedicine*, vol. 2, no. 6, pp 777-787 , 2008, doi: 10.2217/17435889.2.6.777.



Elena Romero Ben recibió el título de Grado en Biología en 2014 por la Universidad de Sevilla y está realizando el Máster de Biotecnología Sanitaria de la Universidad Pablo de la Olavide. Desde 2012 hasta 2014 fue Alumna Interna del Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla, cuya actividad de desarrollaba en el CABIMER.

Aplicaciones biomédicas del Grafeno

José Miguel Vélez Ortiz

Resumen—El grafeno es un nanomaterial con múltiples aplicaciones en numerosas ciencias, entre ellas la biomedicina debido a sus propiedades únicas. Así, se han desarrollado numerosas variantes de este material en esta disciplina. Por ejemplo, se han desarrollado modificaciones para usarlo como biosensor de biomoléculas de importancia vital, como la glucosa, se ha utilizado en terapia fototérmica y génica, en el estudio de bioimágenes, en ingeniería tisular y como sistema liberador de fármacos.

Palabras Claves — Aplicaciones biomédicas, Biosensor, Grafeno, Liberación de fármacos, Terapia antitumoral.

1. INTRODUCCIÓN.

El grafeno es un nanomaterial reciente, bidimensional, compuesto únicamente por carbono y dispuesto en planos hexagonales de extrema delgadez (un átomo de espesor), similar a un panal de abejas. Su estructura está compuesta por la superposición de orbitales sp^2 de los carbonos enlazados. Entre sus características hay que destacar su alta conductividad térmica ($5000 \text{ m}^{-1} \text{ K}^{-1}$), su gran elasticidad y dureza, su elevada área superficial ($2630 \text{ m}^2/\text{g}$), su ligereza y su transparencia. Su síntesis es relativamente fácil y tiene numerosas variantes, como el óxido de grafeno (GO). Este tipo de grafeno está enriquecido con oxígeno, es biocompatible, estable fisiológicamente y capaz de transportar fármacos, biomoléculas y material genético. Estas características le otorgan al grafeno llevar a cabo gran variedad de aplicaciones biomédicas [1].

En artículos de números anteriores de la revista *MoleQla* se han tratado los métodos de producción del grafeno (Nº8, Dic. 2012) [2], y algunas de sus aplicaciones, como la creación de transistores de grafeno, motores más eficientes e incluso el desarrollo de aplicaciones relacionadas con las energías renovables (Nº 0, Dic. 2010) [3]. Son tales las propiedades de este nanomaterial, que le han permitido alcanzar también el ámbito de la biomedicina. En este artículo se revisarán las aplicaciones del grafeno y sus derivados en el campo biomédico. Por ejemplo, su uso en biosensores de biomoléculas, en terapia fototérmica y génica, en el estudio de bioimágenes, en ingeniería tisular y como sistemas de liberación de fármacos.

2. APLICACIONES BIOMÉDICAS DEL GRAFENO

2.1. Grafeno como biosensor

Las biomoléculas son los constituyentes básicos de los seres vivos, llevando a cabo funciones vitales en todos los procesos biológicos. Por esto, las alteraciones en su composición o concentración se relacionan con el desarrollo de enfermedades. Así, la detección rápida y eficaz de estas biomoléculas es realmente crucial en el diagnóstico y desarrollo de terapias adecuadas. En este sentido, el grafeno puede utilizarse como biosensor para la detección de estas biomoléculas.

Su alta sensibilidad y rápida respuesta, junto con su elevada superficie, su buena conductividad, su posibilidad de interactuar con varias biomoléculas y sus excelentes propiedades electroquímicas, hacen de éste un biosensor electroquímico verdaderamente eficaz.

Gracias al grafeno se pueden detectar moléculas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Aunque el H_2O_2 no forma parte de la familia de radicales libres, está relacionado con su síntesis a través de varias reacciones químicas (Ej. Reacción de Fenton) involucradas en procesos neurodegenerativos [4]. Además, está implicado en numerosas vías de señalización que actúan, por ejemplo, en el control del ciclo celular [5]. La detección de H_2O_2 por metodologías convencionales no es realmente exacta, debido a la presencia de numerosas especies que interfieren en la medición. Se ha reportado que el N-grafeno, un grafeno con grupos funcionales de nitrógeno permite una detección precisa del H_2O_2 [6].

Otra biomolécula relevante en el metabolismo es la glucosa, cuya detección se realiza de forma rutinaria para el tratamiento y diagnóstico de la diabetes. Se han realizado modificaciones de este nanomaterial, obteniendo una detección más sensible (hasta $0,02 \text{ mM}$) que la realizada utilizando otros nanomateriales y métodos convencionales [7].

Otro ejemplo es la dopamina, neurotransmisor cuya concentración regula varios procesos, y su disminución en el cerebro está relacionada con patologías como la enfermedad de Parkinson, que conduce a la destrucción progresiva de neuronas. Debido a sus propiedades electroquímicas, la dopamina puede detectarse usando grafeno. Sin embargo, parece ser que existen otras biomoléculas capaces de interferir en la medición, como es el caso de ácido ascórbico, con un potencial de oxidación muy similar. Para evitar esto se han desarrollado derivados del grafeno capaces de realizar una detección sensible de la dopamina en un rango de $5 \text{ }\mu\text{M}$ hasta $200 \text{ }\mu\text{M}$ [8].

Por otra parte, el grafeno ha demostrado ser capaz de realizar una cuantificación rápida, reproducible y versátil del ADN y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), en compara-

ción con las técnicas convencionales, más laboriosas y complejas [9]. En este campo destaca el GO. La capacidad del GO para emitir fluorescencia en un amplio intervalo de longitud de onda (desde el infrarrojo cercano al ultravioleta) le permite actuar como *quencher* de otros marcadores fluorescentes. Esto permite la utilización del GO para la cuantificación y detección de ADN. Por ejemplo, el ADN de cadena simple (ssADN) se une fácilmente a la superficie del nanomaterial a través de interacciones hidrofóbicas entre las bases nucleotídicas y las regiones aromáticas del grafeno, proporcionándole además protección contra las nucleasas. Esta interacción del GO con ssDNA marcado con un fluorocromo conduce a la pérdida de la fluorescencia. Tras la adición de la secuencia de ADN complementaria (o proteína de unión), se forma la secuencia de doble cadena de ADN (o el dímero ADN-proteína) y el ADN se libera de la superficie debido al aumento de la rigidez. Al separarse de la plataforma se produce la recuperación de la fluorescencia perdida que es ya cuantificable. Esto tendría importantes aplicaciones en el estudio de la existencia de mutaciones en genes responsables de enfermedades, o la presencia de material genético de patógenos [10,11] (Figura 1).

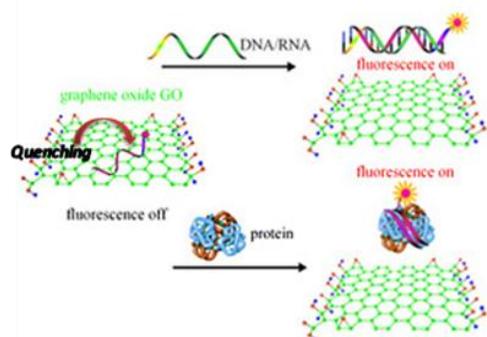


Figura 1. Cuantificación de ADN usando GO mediante el análisis de fluorescencia. Modificado de [10].

Esta estrategia también permite la detección de proteínas como la trombina, un marcador de varias enfermedades cardiovasculares [12].

2.2. Grafeno en aplicaciones de bioimagen.

Varios investigadores han introducido moléculas fluorescentes, como Cy7, en el GO a través de puentes con polietilenglicol (PEG) para elaborar hojas de nano-grafeno con el objetivo de realizar estudios de imagen de enfermedades como el cáncer (Figura 2a). Así, se ha descubierto que varias líneas celulares murinas de cáncer de mama y células de glioblastoma humanas poseen una alta eficiencia de captación de este nanomaterial lo que permite su análisis por fluorescencia [13].

Otro ejemplo es el uso de conjugados de GO (marcado con con ^{64}Cu) con anticuerpos monoclonales, como TRC105, para reconocer específicamente al marcador de angiogénesis CD105, relacionado con procesos tumorales. El análisis mediante tomografía por emisión de positrones (PET) permite localizar un posible tumor. Además, esta construcción parece permitir la unión de fármacos anticancerígenos o realizar terapia fototérmica sin la necesidad de utilizar técnicas inva-

sivas (Figura 2b) [14].

Otra conjugación a destacar del grafeno se realiza con *quantum dots* (QDs). Los QDs son fluoróforos con fluorescencia intrínseca, que también pueden ser usados para estudios de imagen [15].

2.3. Grafeno en la liberación de fármacos.

La mayoría de los fármacos que se integran en la superficie del nanomaterial tienen estructuras formadas por dominios aromáticos. La elevada área superficial, el hecho de estar formado por la superposición de orbitales sp^2 de carbonos enlazados enriquecidos con grupos que incorporan oxígeno, y su biocompatibilidad y estabilidad en condiciones fisiológicas, le hacen ser un eficiente transportador de fármacos. Además, el GO puede incorporar PEG y quitosano mediante enlaces covalentes para alterar el perfil de su circulación en sangre, mejorando aún más su biocompatibilidad [16]. También es posible añadir al GO moléculas de ácido fólico junto con fármacos antitumorales, aumentando la selectividad del tratamiento debido a la sobreexpresión de receptores de ácido fólico en algunos tipos de tumores [17].

En otros experimentos se ha sintetizado un conjugado de GO-PEG con Rituximab (anticuerpo que se une específicamente al antígeno CD20, altamente expresado en algunos tipos de cáncer, como los linfomas) para la liberación de fármacos antitumorales, como la Doxorubicina (DOX) (Figura 3a), provocando una disminución significativa de la viabilidad de las células tumorales (Figura 3b). Además, la liberación de fármacos de la superficie del GO es pH-dependiente, lo que permite la liberación controlada del fármaco [17].

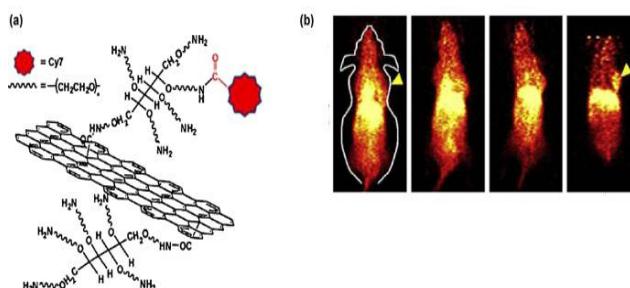


Figura 2. Aplicaciones del grafeno en análisis de imágenes. a) Construcción GO-PEG-Cy7 [1]. b) Localización del tumor utilizando la construcción GO-PEG-Cy7 mediante la detección por fluorescencia [14].

Este nanomaterial permite la liberación de otros tipos de fármacos, como los antiinflamatorios. Así, se han elaborado conjugados de GO, quitosano e ibuprofeno [1].

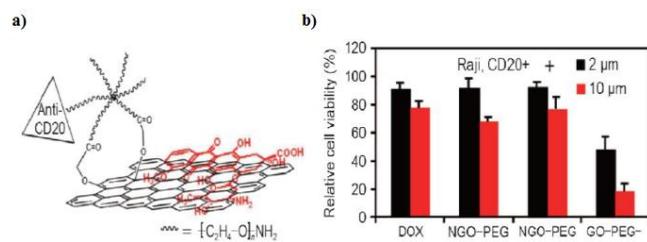


Figura 3. a) Contrucción GO-PEG-Anticuerpo anti-CD20; b) Medida de la viabilidad de células cancerígenas *in vitro* tras la suministración de diferentes concentraciones de DOX y usando plataformas de grafeno conjugados [17].

2.4. Grafeno y terapia génica.

Las cargas negativas que se encuentran en el GO pueden ser utilizadas para establecer interacciones electrostáticas con polímeros cargados positivamente como la polietilenimina (PEI). Este polímero puede ser utilizado para proporcionar carga positiva a la plataforma de grafeno, permitiéndole conjugar moléculas de ADN y ARN, cargadas negativamente [18].

Por otra parte, se puede combinar la liberación de fármacos con ARN interferente (ARNi). La unión covalente de PEI a GO facilita la unión y liberación del ARNi, encargado de inhibir la expresión de una proteína concreta. Esto se ha probado en células HeLa con el objetivo de evitar la sobreexpresión de Bcl-2, a la vez que se favorece la liberación del fármaco anti-tumoral DOX. Esta técnica disminuyó, significativamente, la viabilidad de las células tumorales [19].

2.5. Grafeno y terapia fototérmica.

El GO puede absorber energía en el espectro cercano al infrarrojo (700-1100 nm) y posteriormente emitir energía en forma de calor, produciendo así la ablación térmica de tejidos específicos. El mecanismo de ablación fototérmica se debe a la producción de especies reactivas de oxígeno, la activación de caspasas, la despolimerización de la membrana mitocondrial y la fragmentación del ADN. La combinación de estos factores es suficientemente potente como para lograr que las células que están a una distancia específica de la plataforma de grafeno entren en apoptosis. En este sentido, el grafeno tiene una eficacia similar a los nanotubos de carbono, aunque requiere menores concentraciones y absorbe radiaciones menos energéticas, lo que evita alteraciones en los tejidos sanos [16].

2.7. Grafeno y su actividad antimicrobiana.

El grafeno también posee una gran actividad bactericida. El GO provoca la ruptura de la membrana y, aunque no se detecta producción de anión superóxido en el proceso, estos materiales pueden oxidar el glutatión, alterando el estado redox de la bacteria (Figura 4). Esta característica permitirá al grafeno recubrir vendajes y apósitos, facilitando la cura de heridas al disminuir la posibilidad de que se produzcan infecciones [20].

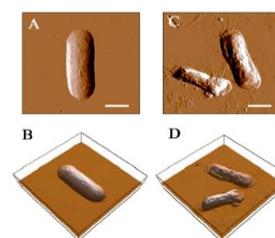


Figura 4. Imagen 3D de *Escherichia coli* después de incubación con GO. Control sin tratar (A y B); incubación de *E.coli* con 40 μg/mL de una suspensión de GO durante 2 horas (C y D) [20].

2.8. Grafeno, ingeniería tisular y cultivos.

Los materiales basados en carbono, como el grafeno, se están empezando a utilizar para la creación de andamios para el cultivo celular y para fomentar la diferenciación celular. Se ha demostrado que el grafeno se puede utilizar como soporte para el cultivo de una línea celular de fibroblastos (NIH-3T3), ya que posibilita una proliferación y adhesión correcta. Además, este nanomaterial parece aumentar la eficiencia de transfección en un 250% [21]. También hay que destacar la utilidad del grafeno en la capacidad de diferenciación de células madre mesenquimales, similar a los obtenidos usando protocolos de diferenciación convencionales [22].

Además, las propiedades de la superficie del grafeno permiten el mantenimiento, en un estado indiferenciado, de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) y posibilita una rápida adhesión. Por el contrario, derivados del grafeno como el GO parecen favorecer la diferenciación en las tres líneas germinales [23].

3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.

Gracias a sus propiedades únicas, el grafeno y sus derivados han ido ganando un enorme peso en la investigación, innovación y desarrollo en el campo de biomedicina. Así, a partir del grafeno se están desarrollando biosensores, se está investigando su capacidad de transportar fármacos, su uso en terapia génica, fototérmica, ingeniería tisular, etc. Su rápido y prometedor desarrollo en aplicaciones biomédicas posibilitará, en el futuro, la sustitución de las metodologías convencionales. Así, este continuo desarrollo implicará la elaboración de análisis toxicológicos exhaustivos tanto *in vivo* e *in vitro* de este nanomaterial, así como la optimización de protocolos de síntesis, evitando falsas expectativas y problemas sanitarios derivados. Así, no cabe duda de que en un futuro, no tan lejano, el grafeno y sus derivados se considerarán herramientas potentes, principalmente en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

REFERENCIAS

- [1] He Shen, Liming Zhang, Liming Zhang, Min Liu, and Zhijun Zhang. "Biomedical Applications of Graphene". *Theranostics* 2012; 2(3):283-294. doi: 10.7150/thno.3642
- [2] Vigara Astillero, G. "Grafeno, el material del futuro. ¿posibilidad real o pura fantasía?". *Revista MoleQla*, nº8. Sevilla: Universidad Pablo de Olavide, Diciembre

2012. Págs. 62-65.
- [3] Gamero Estévez, E. “Grafeno: la panacea tecnológica”, Revista MoleQla, nº0. Sevilla: Universidad Pablo de Olavide, Diciembre Diciembre de 2010. Págs. 60-61.
- [4] Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. “Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options”. *Curr Neuropharmacol*. 2009 Mar; **7**(1):65-74. doi: 10.2174/157015909787602823.
- [5] Li M, Zhao L, Liu J, Liu AL, Zeng WS, Luo SQ, Bai XC. “Hydrogen peroxide induces G2 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in osteoblasts”. *Anat Rec (Hoboken)*. 2009 Aug; **292**(8):1107-13. doi: 10.1002/ar.20925.
- [6] Wang Y, Shao Y, Matson DW, Li J, Lin Y. “Nitrogen-doped graphene and its application in electrochemical biosensing”. *ACS Nano*. 2010 Apr **27**;4(4):1790-8. doi: 10.1021/nn100315s.
- [7] Kang X, Wang J, Wu H, Aksay IA, Liu J, Lin Y. “Glucose oxidase-graphene-chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing”. *Biosens Bioelectron*. 2009 Dec **15**;25(4):901-5. doi: 10.1016/j.bios.2009.09.004.
- [8] Kim YR, Bong S, Kang YJ, Yang Y, Mahajan RK, Kim JS, Kim H. “Electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using graphene modified electrodes”. *Biosens Bioelectron*. 2010 Jun **15**;25(10):2366-9. doi: 10.1016/j.bios.2010.02.031.
- [9] Xu H, Yang Q, Li F, Tang L, Gao S, Jiang B, Zhao X, Wang L, Fan C. “A graphene-based platform for fluorescent detection of SNPs”. *Analyst*. 2013 May **7**;138(9):2678-82. doi: 10.1039/c3an36740a.
- [10] Lu CH, Yang HH, Zhu CL, Chen X, Chen GN. “A graphene platform for sensing biomolecules”. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009; **48**(26):4785-7. doi: 10.1002/anie.200901479.
- [11] Ying Fen Duan, Yi Ning, Yang Song, Le Deng. “Fluorescent aptasensor for the determination of *Salmonella typhimurium* based on a graphene oxide platform”. *Microchimica Acta* April 2014, Volume 181, Issue 5-6, pp 647-653. doi: 10.1007/s00604-014-1170-4
- [12] Xie L, You L, Cao X. “Signal amplification aptamer biosensor for thrombin based on a glassy carbon electrode modified with graphene, quantum dots and gold nanoparticles”. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 2013 May **15**;109:110-5. doi: 10.1016/j.saa.2013.02.017.
- [13] Yang K, Zhang S, Zhang G, Sun X, Lee ST, Liu Z. “Graphene in mice: ultrahigh in vivo tumor uptake and efficient photothermal therapy”. *Nano Lett*. 2010 Sep **8**;10(9):3318-23. doi: 10.1021/nl100996u.
- [14] Hong H, Yang K, Zhang Y, Engle JW, Feng L, Yang Y, Nayak TR, Goel S, Bean J, Theuer CP, Barnhart TE, Liu Z, Cai W. “In vivo targeting and imaging of tumor vasculature with radiolabeled, antibody-conjugated nanographene”. *ACS Nano*. 2012 Mar **27**;6(3):2361-70. doi: 10.1021/nn204625e.
- [15] Wang X, Sun X, Lao J, He H, Cheng T, Wang M, Wang S, Huang F. “Multifunctional graphene quantum dots for simultaneous targeted cellular imaging and drug delivery”. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014 Oct **1**;122:638-44. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.07.043.
- [16] Bitounis D, Ali-Boucetta H, Hong BH, Min DH, Kostarelos K. “Prospects and challenges of graphene in biomedical applications”. *Adv Mater*. 2013 Apr **24**;25(16):2258-68. doi: 10.1002/adma.201203700.
- [17] Huang P, Xu C, Lin J, Wang C, Wang X, Zhang C, Zhou X, Guo S, Cui D. “Folic Acid-conjugated Graphene Oxide loaded with Photosensitizers for Targeting Photodynamic Therapy”. *Theranostics*. 2011 Apr **13**;1:240-50.
- [18] Bitounis D, Ali-Boucetta H, Hong BH, Min DH, Kostarelos K. “Prospects and challenges of graphene in biomedical applications”. *Adv Mater*. 2013 Apr **24**;25(16):2258-68. doi: 10.1002/adma.201203700.
- [19] Zhang L, Lu Z, Zhao Q, Huang J, Shen H, Zhang Z. “Enhanced chemotherapy efficacy by sequential delivery of siRNA and anticancer drugs using PEI-grafted graphene oxide”. *Small*. 2011 Feb **18**;7(4):460-4. doi: 10.1002/smll.201001522.
- [20] Liu S, Hu M, Zeng TH, Wu R, Jiang R, Wei J, Wang L, Kong J, Chen Y. “Lateral dimension-dependent antibacterial activity of graphene oxide sheets”. *Langmuir*. 2012 Aug **21**;28(33):12364-72. doi: 10.1021/la3023908.
- [21] Ryoo SR, Kim YK, Kim MH, Min DH. “Behaviors of NIH-3T3 fibroblasts on graphene/carbon nanotubes: proliferation, focal adhesion, and gene transfection studies”. *ACS Nano*. 2010 Nov **23**;4(11):6587-98. doi: 10.1021/nn1018279.
- [22] Nayak TR, Andersen H, Makam VS, Khaw C, Bae S, Xu X, Ee PL, Ahn JH, Hong BH, Pastorin G, Özyilmaz B. “Graphene for controlled and accelerated osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells”. *ACS Nano*. 2011 Jun **28**;5(6):4670-8. doi: 10.1021/nn200500h.
- [23] Chen GY, Pang DW, Hwang SM, Tuan HY, Hu YC. “A graphene-based platform for induced pluripotent stem cells culture and differentiation”. *Biomaterials*. 2012 Jan; **33**(2):418-28.



José Miguel Vélez Ortiz. Graduado en Bioquímica por la Universidad de Córdoba. Actualmente cursa el primer curso del Máster de Biotecnología Sanitaria de la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

LUCHA DE ANTIDEPRESIVOS

Álvaro Escobar Doncel

Resumen— En el mundo ha aumentado en gran medida el uso de fármacos antidepresivos, tanto mediante receta médica por enfermedad u otras formas menos ortodoxas. Hace unos años, Prozac realizó una gran campaña que les hizo llegar a ser el antidepresivo más recetado, aunque ha surgido un "nuevo" antidepresivo, el Bupropión, el cual le está empezando a disputar al Prozac su puesto en el mercado. Ahora, llega el momento de decidir, dejando a parte cualquier truco publicitario, cual de los dos es más efectivo y causa menos efectos secundarios.

Palabras Claves— Prozac, Bupropion, Antidepresivos, Segunda Generación, Competición

1. ANTIDEPRESIVOS

Los antidepresivos son un tipo de medicamentos utilizados principalmente para el tratamiento de la depresión, pero también desórdenes de estrés post-traumático (PTSD), obsesivo-compulsivo (OCD) y de ansiedad generalizada (GAD). Estos fármacos aumentan los niveles de ciertos neurotransmisores como la serotonina, la norepinefrina y la dopamina [Figura 1], los cuales tienen diferentes funciones como la percepción del dolor y el hambre, y la regulación humoral.

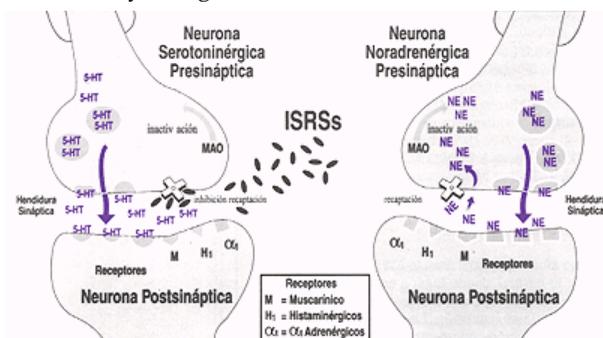


Figura 1. Modo de acción de los antidepresivos SSRI, bloqueando la proteína de recaptación de la serotonina en los receptores serotoninérgicos post-sinápticos.

Existen cuatro tipos diferentes de antidepresivos, los cuales tienen un mecanismo de acción distinto para ejercer la misma acción general y la combinación de cualquiera de ellos puede producir graves efectos secundarios o la toma de alguno de ellos sin padecer problema alguno puede producir alteraciones en la regulación química cerebral.

- **Inhibidores de la monoamina oxidasa (MAOIs):** Fueron los primeros antidepresivos que se sintetizaron. La monoamina oxidasa es una enzima que degrada la dopamina, la serotonina y la norepinefrina, así al inhibir dicha enzima se incrementan los niveles de dichos neurotransmisores. Pero también es capaz de romper la tiramina, la cual se encuentra en algunos alimentos y tiene una acción vasodilatadora, causando hipertensión. La Isocarboxazida (Enerzer) o la Moclobemida (Aurorix) son ejemplos de este tipo de antidepresivos.

- **Antidepresivos tricíclicos (TCAs):** Estos antidepresivos se comenzaron a comercializar sobre 1950 y actúan aumentando los niveles de serotonina y, en mayor medida, los de norepinefrina. Esto lo realizan debido a que no permiten la recaptación de estos dos neurotransmisores. Un ejemplo de TCA es la Amitriptilina (Elavil).
- **Inhibidores de la recaptación de serotonina-noradrenalina (SNRIs):** Estos antidepresivos han sido los últimos en salir al mercado y su función radica en el incremento de las cantidades de norepinefrina y serotonina a nivel cerebral. Esto se produce gracias a que estos SNRIs bloquean las moléculas encargadas de reabsorber estos neurotransmisores, permitiendo así que se encuentren durante más tiempo en el espacio intersináptico. Se intenta que estos sean más efectivos que todos los anteriores, aunque aún existen ciertas dudas de que lo haya conseguido. El Bupropión es uno de los "últimos" fármacos antidepresivos que han salido al mercado y del cual hablaremos más tarde. |

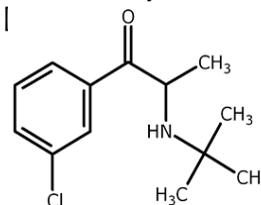


Figura 2. Estructura química del Bupropión.

- **Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs):** Estos antidepresivos son los más utilizados actualmente y se encargan del aumento de los niveles de serotonina y, en menor medida, de norepinefrina en el cerebro. Estos SSRIs bloquean la reabsorción de estos neurotransmisores, por lo cual se incrementan sus niveles y, por tanto, su interacción con sus receptores químicos, es decir, tienen una acción similar a los SNRIs. En este grupo se en-

cuentra el antidepresivo más recetado en estos momentos, la Fluoxetina (Prozac), del cual hablaremos más adelante. [Figura 3]

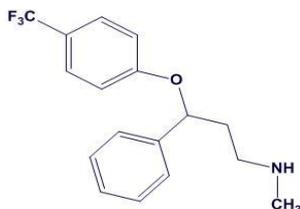


Figura 3. Estructura química de la Fluoxetina.

2. PROZAC VS BUPROPIÓN

2.1. Prozac

El famoso Prozac empezó a comercializarse a finales de los años 80, pero se descubrió mucho antes, a principios de los 70. Esto nos da una idea de lo complicado y costoso que puede ser sacar un nuevo fármaco al mercado debido a que debe de pasar un gran número de tests, además estas pruebas se han ido complicando a medida que pasan los años.

El Prozac es su nombre comercial, pero el fármaco se llama fluoxetina, cuya nomenclatura según la IUPAC es N-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoxi]propan-1-amina. Este es un fármaco que se denomina de segunda generación, ya que es un SSRI y posee una estructura y una forma de actuar diferentes a los primeros que se sintetizaron, los cuales fueron los TCAs.

Es tomado vía oral [Figura 4] y es absorbido en el tracto gastrointestinal, de forma que tras unas 8 horas tras la ingestión aparece concentraciones de esta molécula en sangre. Este fármaco tiene una vida media en el organismo de entre uno y cuatro días, aunque su metabolito activo, la norfluoxetina, permanece unos nueve días. Así, su excreción se produce por conjugación de estas moléculas mediante el metabolismo hepático y, posteriormente,



eliminada por la orina.

Figura 4. Cápsulas de Prozac 20 mg.

Como se ha mencionado anteriormente, este medicamento actúa inhibiendo la reabsorción de serotonina, lo cual permite que se den un mayor número de activaciones de los receptores de serotonina en el cerebro. Uno de los metabolitos que se generan en el organismo y también lleva a cabo este proceso, es la Norfluoxetina, que se consigue mediante la desmetilación de la molécula.

Muchos estudios han demostrado que el Prozac es uno de los antidepresivos más seguros en caso de sobredosis, en cuyo caso produce problemas gastrointestinales y neu-

rológicos principalmente. Estos problemas pueden ser mareos, dolores de cabeza, visión borrosa, bradicardia, vómitos, dolor abdominal, entre otros, aunque el que más preocupa es la pérdida de peso. Además, se han hecho estudios carcinogénicos en los cuales se ha visto que no producen ningún síntoma asociado; y sobre teratogenicidad, que han demostrado que no provoca malformaciones fetales, aunque los neonatos tienen una serie de problemas durante los primeros días, pero acaban cesando.

2.2. Bupropión

El Bupropión es un antidepresivo que está empezando a conocerse a escala mundial, por lo pronto, en Estados Unidos está siendo uno de los más recetados. A pesar de esta entrada en el mercado tan espectacular, el Bupropión es un fármaco que se sintetizó a finales de los años 60 y se metió en el mercado a mediados de los 80, pero tuvo que ser retirado debido a que presentó problemas relacionados con la aparición de convulsiones en personas medicadas con él.

Más tarde, fue introducido en una serie de medicamentos contra el tabaquismo con un papel secundario y, hasta ahora, no se ha comercializado de forma individual. De esta forma, no se puede considerar este antidepresivo como nuevo, tal y como se ha mencionado antes. Además, está realizando una campaña tal que le podría permitir competir con el todopoderoso Prozac.

El Bupropión es una forma de acortar su nombre químico, el cual según la IUPAC es 2-(terc-butilamina)-1-(3-clorofenil)propan-1-ona (un derivado de las anfetaminas), siendo un antidepresivo de tipo SNRI, por tanto, considerado de segunda generación, aquí podemos ver la primera diferencia con el Prozac: el modo de acción en diferentes neurotransmisores. Aunque no se conoce todavía exactamente sus mecanismos de acción en la inhibición de la reabsorción de dopamina, pero sí se ha visto que tiene una menor actividad que otros antidepresivos.

A parte de antidepresivos, se está utilizando para reducir las ganas de fumar, ya que se ha visto que el incremento de norepinefrina (dopamina) disminuye el síndrome de abstinencia, aunque viéndolo así muchos otros antidepresivos podrían usarse para ello.

Es un fármaco vía oral que se absorbe en el intestino, y se metaboliza eficaz y rápidamente en el cuerpo, lo cual se produce por oxidación de la cadena lateral, hidroxilándolo y formando una glicina conjugada con un ácido metaclorobenzoico. Este metabolito es el que se encuentra en mayor proporción en la orina. También puede producirse la reducción del grupo carbonilo, ambas reacciones pueden darse conjuntamente. El Bupropión tiene una vida media de un día, siendo bastante menor que la del Prozac.

En el caso de este fármaco a diferencia de la Fluoxetina es que una sobredosis puede causar graves problemas como pérdida de conciencia, alucinaciones, paro cardíaco o taquicardia. A parte, existe una gran lista de posibles efectos secundarios que puede producir tales como irritabilidad, dolores fuertes de cabeza, confusión, convulsiones... Dependiendo de la persona y de la frecuencia con la

que se esté medicando con este fármaco, habrá una probabilidad diferente, además no todos ocurren con la misma frecuencia.

3. CONCLUSIONES

No creo que se pueda llegar a una conclusión a partir de los datos que hemos recopilado sobre que un tipo de antidepresivo sea mejor o peor que otro, ya que en general poseen un mecanismo de acción relativamente parecido, al menos en su objetivo final. También es verdad que dependiendo del modo de acción pueden acarrear más o menos problemas adicionales a la hora de su uso.

Básicamente, los efectos secundarios pueden producirse a nivel total del organismo, ya que puede afectar tanto al sistema genitourinario como al gastrointestinal sin olvidarse del sistema nervioso. Esto es debido a que una mínima alteración de moléculas como los neurotransmisores que son tan importantes y controlan gran número de procesos, puede acarrear problemas a todo el organismo. Aunque esto no solo en el Bupropion o en el Prozac sino en cualquier fármaco que produzca cambios a este nivel.

En cuanto a la hora de darse a conocer o promocionarse, pueden tener diferentes formas de hacerlo, pero deben de ser realistas e indicar tanto los efectos positivos como sus posibles efectos negativos. No vendiéndolo como un medicamento maravilloso que te da la felicidad y con efectos secundarios que no tienen importancia, preocupándose de cercionarse cuidadosamente de que estos no sean realmente perjudiciales.

REFERENCIAS

- [1] Web del PubChem, perteneciente al NCBI (National Center for Biotechnology Information). <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- [2] Web del NHS (National Health Service). <http://www.nhs.uk/Pages/HomePage.aspx>
- [3] <http://www.medicinenet.com/antidepressants/page2.htm#maoi>
- [4] http://www.pharmamedix.com/img/formule/formula_amitriptilina.gif
- [5] <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/depression/in-depth/ssris/art-20044825>
- [6] <http://www.info-farmacia.com/medico-farmaceuticos/revisiones-farmaceuticas/estudios-no-publicados-sobre-prozac>
- [7] <http://www.theguardian.com/science/2011/apr/04/morality-drugs-improve-ethical-behaviour>
- [8] https://www.erowid.org/pharms/bupropion/bupropion_chemistry.shtml
- [9] <http://neurociencia.eutimia.com/2010/06/mecanismo-de-accion-de-los.html>

Álvaro Escobar Doncel estudia 3º de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide y en estos momentos está inmerso en un grupo de investigación para participar en el concurso iGEM.

Estatinas, ¿medicamento o droga?

Laura Barroso Burgos

Resumen—Las estatinas son un tipo de fármaco que está reduciendo los niveles de colesterol a numerosos pacientes con hipercolesterolemia. En estos últimos años se han comercializado numerosos medicamentos con estatinas, y se han logrado numerosos éxitos al cumplir con los objetivos que prometían. Sin embargo, otros han tenido que ser retirados del mercado por sus efectos secundarios, además de inhibir la síntesis de otros compuestos importantes para la salud, como la coenzima Q10. ¿Son por tanto las estatinas medicamentos seguros o una droga que perjudica nuestra salud?

Palabras Claves—Estatinas, colesterol, mevalonato, lovastatina,.

1. INTRODUCCIÓN

Las estatinas pertenecen al grupo conocido como inhibidores de la HMG-CoA reductasa, por tanto, se conoce a las estatinas por ser fármacos usados en la disminución del colesterol en pacientes que poseen hipercolesterolemia.

A pesar de que las estatinas se conocen desde hace relativamente poco tiempo, son numerosos los estudios que se han realizado sobre ellas y numerosos los pacientes que ya las han tomado. Varios ensayos clínicos a gran escala han demostrado que los inhibidores de la HMG-CoA reductasa son eficaces, que son bien tolerados y que se asocian con una tasa baja de retirada del tratamiento por efectos secundarios. Sin embargo, en los últimos tiempos se han descubierto efectos relacionados con la pérdida de otros componentes muy importantes sintetizados en la ruta del Mevalonato, por lo que realmente no está exenta de efectos secundarios.

A lo largo de este artículo trataremos estos medicamentos que, desde hace poco, están en el punto de mira del sector médico.

2. DESCUBRIMIENTO Y SÍNTESIS

2.1. Descubrimiento

El descubrimiento de las estatinas se remonta a 1971, cuando el doctor Masao Kuroda, junto con todo su equipo, esperaba encontrar inhibidores de la HMG-CoA reductasa de origen microbiano en microorganismos, como respuesta a otros organismos que requieren de esteroides y otros isoprenoides para su crecimiento.

Como resultado a una gran cantidad de experimentos realizados, se encontró una cepa de *Penicillium citrinum* que producía un compuesto activo, que se logró aislar con disolventes orgánicos y, posteriormente, purificar mediante cromatografía y recristalización. De esta forma se consiguieron cristales de Mevastatina el primer tipo de estatina descubierta. En 1973, se logró establecer su estructura, mostrada en la Figura 1, gracias a numerosas técnicas de caracterización.

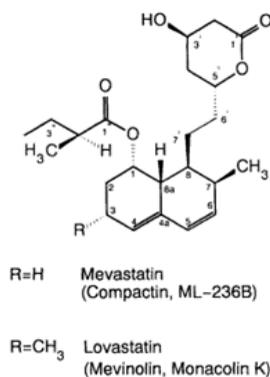


Fig. 1. Estructura de la Mevastatina [2]

Los resultados del estudio permitieron concluir que la Mevastatina era un potente reductor de la HMG-CoA reductasa, se había encontrado la primera estatina de la historia.

Posteriormente, de ese mismo hongo se consiguió extraer un segundo tipo de estatina, la Lovastatina (1978). Después aparecieron la pravastatina, aislada de cultivos de *Nocardia autotrophica*, y la fluvastatina (primera estatina totalmente sintética). Más tarde se sintetizaron la simvastatina, a partir de un producto de la fermentación del *Aspergillus terreus* y todas las demás, manteniéndose la investigación en esta línea en el momento actual.

2.2. Biosíntesis

Los estudios sobre la biogénesis de las estatinas se centraron en las monacolininas L y J, ya que se intuía que estos compuestos eran precursores de la lovastatina. Tras los estudios, se supo que la monacolina L es la primera estatina sintetizada, a partir de nueve unidades de acetato, y que posteriormente ésta se transforma en J por hidroxilación. Por último, la monacolininas K y X son derivados de la J y son las que se convierten a lovastatina.

Las investigaciones se realizaron sobre una cepa de *Aspergillus terreus* y se supo que el proceso comenzaba con 9 unidades de acetato que se unían formando cadenas

policétidas. Los átomos de oxígeno son insertados posteriormente con una oxidación aeróbica. En la Figura 2 se muestra la ruta de la lovastatina.

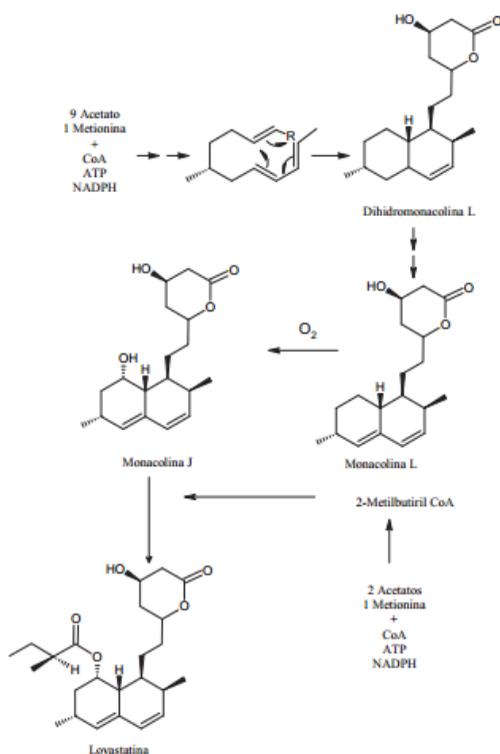


Fig. 2. Biosíntesis de la Lovastatina [8].

3. CLASIFICACIÓN Y ESTRUCTURA

La clasificación de las estatinas se puede hacer en función a su estructura. De esta forma se clasifican en dos grupos, las estatinas de tipo I (con mayor porción policética) y las de tipo II.

Ambos tipos poseen en común un anillo hexahidronaftaleno funcionalizado con un éster α -metilbutírico y una β -hidroxi- δ -lactona enlazada por un puente etilénico. Lo que diferencia una de otra es la posición de los metilos sobre el anillo y la cadena lateral. En las de tipo I podemos encontrar a la lovastatina, con una cadena lateral metilbutírica y un grupo 6- α -metilo, a la pravastatina, que se encuentra como la sal sódica del β -hidroxiácido, y la simvastatina, con un grupo metilo en la posición 2' de la cadena lateral, entre otras.

Con respecto a las estatinas de tipo II, surgieron como producto a las investigaciones que buscaban encontrar un medicamento contra la hipercolesterolemia, es decir, son estatinas artificiales que poseen una acción más potente que las naturales debido a su magnitud molecular más grande, una cadena lateral fluorofenil, un grupo metiletil y un ácido heptenoico.

Las características estructurales están relacionadas con las propiedades fisicoquímicas de las estatinas, ya que existen diferencias entre su lipofilia, hecho que se refleja en su facilidad de paso a través de las membranas celulares por difusión pasiva, y explica por qué la pravastatina no atraviesa fácilmente las membranas celulares mientras que la simvastatina sí lo hace.

4. ESTATINAS COMO FÁRMACO

Las estatinas se usan como fármacos para combatir la hipercolesterolemia, pero, además, son beneficiosas para otros problemas de salud debido a que poseen actividad anti-inflamatoria. Por otra parte, ayudan a estabilizar el revestimiento de los vasos sanguíneos, por tanto, podrían reducir el riesgo de ataques de corazón debido a que las arterias coronarias serían más fuertes y estarían mejor revestidas. Las estatinas también ayudan a relajar los vasos sanguíneos, reduciendo la presión arterial. Además, podrían reducir el riesgo de la formación de coágulos de sangre. Por estas razones, los médicos están empezando a prescribir estatinas antes y después de la cirugía de bypass de la arteria coronaria o angioplastia, y después de ciertos tipos de accidentes cerebrovasculares.

Las estatinas también podrían tener beneficios que ayudan a prevenir las enfermedades que no están relacionadas con la salud del corazón, aunque se necesita más investigación. Otros beneficios de éstas podrían incluir una reducción del riesgo de las fracturas de la artritis y de los huesos, del cáncer, de la demencia y el Alzheimer o de enfermedades renales.

Las estatinas, como cualquier otro medicamento, sufren un proceso de absorción, distribución en el organismo, modificación y expulsión:

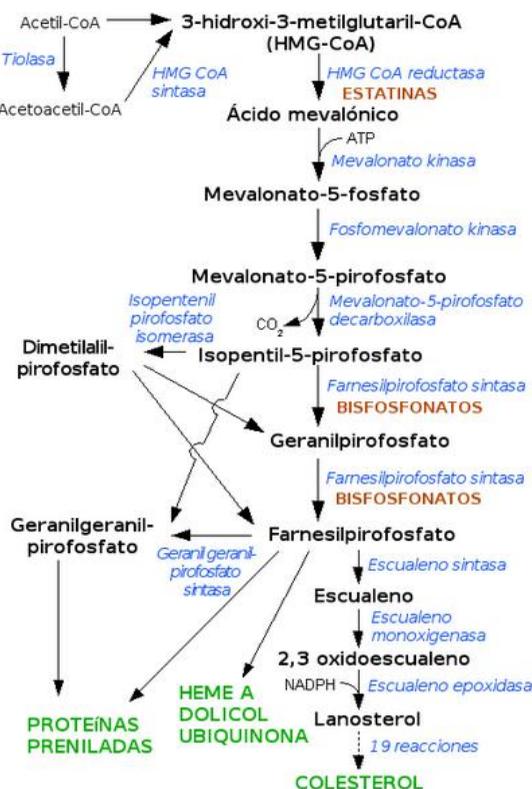
- **Absorción:** son absorbidas rápidamente tras su ingesta, lográndose la máxima concentración en sangre a las 4 horas. Posteriormente, se mantienen en el plasma de 2 a 3 horas más.
- **Distribución:** las estatinas se enlazan fuertemente a las proteínas de la sangre, además, debido a que son captadas por el hígado, las limitaciones por desplazamiento son limitadas.
- **Metabolismo:** son metabolizadas por el citocromo P450 y otras enzimas que se encuentran en el hígado y en el intestino.
- **Excreción:** son excretadas a través de las heces tras ser metabolizadas en el hígado. Es por ello que la disfunción hepática es un factor de riesgo y a los pacientes que poseen enfermedades del hígado no se les puede prescribir. La cantidad de estatinas en la orina es mínima.

En la siguiente tabla se muestran las características farmacológicas de las distintas clases de estatinas:

Características farmacológicas de las estatinas							
Sustancia	Simvastatina	Pravastatina	Lovastatina	Fluvastatina	Atorvastatina	Rosuvastatina	Pitavastatina
Profármacos	SI	NO	SI	NO	NO	NO	NO
Alimentos y absorción	No influyen	Disminuyen	Aumentan	Disminuyen	Disminuyen	No influyen	-
Biodisponibilidad	≤ 5	18%	≤ 5%	24%	14%	20%	>30%
Unión a proteínas plasmáticas	94%	50%	>95%	98%	98%	88%	-
Atraviesa barrera hematoencefálica	SI	NO	SI	NO	NO	NO	SI
Metabolismo	CYP3A4	Sulfatación	CYP3A4	CYP2C9	CYP3A4	CYP2C9	CYP2C9 ; CYP2C8
Excreción biliar	60%	70%	83%	95%	-	90%	-
Excreción urinaria	13%	20%	10%	5%	<2%	30%	3%
Semivida	2-3 h.	0.8 h.	1-4 h.	2,5 h.	20 h.	20 h.	-

5. CICLO DEL MEVALONATO Y ESTATINAS

Como se ha mencionado anteriormente, las estatinas son inhibidoras de la HMG-CoA reductasa. Esta enzima cataliza la conversión de la HMG-CoA a mevalonato, que es un metabolito clave en la síntesis de colesterol. Esta ruta de biosíntesis parte de dos unidades de acetil CoA, las cuales se van condensando y reduciendo hasta llegar a ácido mevalónico, que se fosforila por acción del ATP para dar lugar a los precursores del terpeno. Los resultados finales de este ciclo son el colesterol, el dolicol y proteínas preniladas. El ciclo se puede muestra en la Figura



3.

Fig. 3. Ruta del Mevalonato (Extraída de Wikipedia)

El bloqueo de la HMG-CoA se produce debido al gran parecido estructural que tienen las estatinas con ella.

6. ESTATINAS, MEDICAMENTO O ERROR.

Una vez visto el ciclo del Mevalonato podemos decir que al actuar, el ciclo se rompe casi al principio, impidiendo no solo la formación de colesterol sino también la del dolicol y la de otras sustancias necesarias en el organismo. Una de estas sustancias importantes es la coenzima Q10 (CoQ10), necesaria para el funcionamiento de las mitocondrias, nuestra principal fuente de ATP y, por tanto, de energía. El uso de las estatinas disminuye la producción de CoQ10 hasta en un 40% de manera directa (no por efecto secundario), provocando que esta falta afecte directamente a los músculos produciendo dolores, roturas y daños. Esto resulta muy paradójico, ya que se está recetando un medicamento que evita un colesterol alto que afecte a nuestro corazón, a la vez que este mismo medicamento está dañando el músculo de este órgano tan importante.

Por otra parte, ingerir estatinas aumenta la concentración de ALT en el hígado, transaminasa que evalúa el daño que sufre este órgano, lo que indica que se está produciendo una disfunción hepática. Este efecto secundario, que causa este daño tan grave, hizo que en 2001 la cerivastatina fuera retirada del Mercado por causar numerosas miopatías y daños en las personas que la tomaban.

Sin embargo, tras muchos estudios se afirma que no hay evidencia de toxicidad, por lo que no pueden ser calificadas como sustancias tóxicas por la EUA.

Pese a que no se considera sustancia tóxica, lo más recomendado para evitar el colesterol es llevar una vida sana con una dieta equilibrada y mucho ejercicio, de manera que no lleguemos a padecer de hipercolesterolemia y no tengamos que poner nuestra salud en juego ingiriendo sustancias ajenas a nuestro organismo.

REFERENCIAS

- [1] Davidson MH, "Safety profiles for the HMG-CoA reductase inhibitors: treatment and trust". *Drugs* **2001**; 61 (2): 197-206
- [2] Endo A, "The Discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors", *Journal of lipid research* **1992**; 33(11):1569-82.
- [3] Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A., "Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids", *Trends Plant Sci* **2001**;6(2):78-84.
- [4] Mayo Clinic Staff, "Statins: Are these cholesterol-lowering drugs right for you?" (<http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/high-blood-cholesterol/in-depth/statins/art-20045772>)

- [5] Amando Martín-Zurro, J. F. Cano Pérez, "Atención primaria", Elsevier España, 2003, pág 811.
- [6] Nissen S, Tuzcu M, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, et al., "Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis", JAMA 2004;291(9):1071-80.
- [7] Enlace web: "Las estatinas inhiben la síntesis de coenzima Q10 - Reducir su nivel de colesterol con CoQ10 y alfa lipoico", http://artilugio.com/las-estatinas-inhiben-la-s%C3%ADntesis-de-coenzima-q10---reducir-su-nivel-de-cholesterol-con-coq10-y-alfa-lipoico_7b4a1.html.
- [8] Nieto-Ramírez, Ivonne J.; Chegwin-Angarita, Carolina; Atehortúa, Lucía; Sepúlveda A., Liuda J., "Las estatinas: química, técnicas analíticas, biosíntesis y farmacocinética", Vitae, vol. 20, núm. 1, 2013, pp. 49-63.



Laura Barroso Burgos es actualmente estudiante de primer curso del Grado en Biotecnología, en la Universidad Pablo de Olavide, en Sevilla.

Búsqueda de diversidad: ¿Qué opciones tenemos?

Jara Cárcel Márquez

Resumen— Cada vez más se necesita una mayor diversidad de compuestos químicos para suplir las necesidades de la industria, así como luchar contra la adquisición de resistencia a antibióticos mediante la creación de nuevos. Esta búsqueda de diversidad la podemos conseguir mediante la creación de quimiotecas, genotecas y metagenotecas.

Palabras Claves— Antibióticos, Diversidad, Genotecas, Metagenotecas, Quimiotecas.

1. INTRODUCCIÓN

No cabe duda de que cada vez más se necesitan una mayor variedad de compuestos químicos para satisfacer la gran necesidad que tiene la industria química, alimentaria, farmacéutica, etc. Uno de los puntos clave en el que vemos más aguda la importancia de la búsqueda de compuestos químicos es la lucha contra las resistencias a antibióticos. En la figura 1, vemos como en el caso *Enterococcus faecium* esta ha conseguido adquirir de manera muy rápida gran resistencia al antibiótico vancomicina. Esto es muy importante ya que esta bacteria es causante de una enfermedad tan grave como la meningitis neonatal. Por todo eso, ¿qué opciones tenemos?

2. QUIMIOTECAS

Las quimiotecas son colecciones de compuestos químicos, que van desde decenas a millones. Estas colecciones de compuestos catalogados pueden haberse obtenido directamente de la naturaleza, un ejemplo claro de esto es la empresa española Pharmamar, empresa líder en biotecnología marina [1], dedicada a realizar quimiotecas del entorno marino. Otra forma de obtener quimiotecas es gracias a una herramienta con gran potencial, la síntesis combinatoria.

La síntesis combinatoria consiste en un conjunto de técnicas que permiten la síntesis/biosíntesis simultánea de un gran número de compuestos mediante la combinación sistemática de una serie de precursores [2]. La síntesis combinatorial nos permite sintetizar una gran cantidad de compuestos de manera rápida. Lo cual permite que nos saltamos el cuello de botella que es la síntesis de cada compuesto químico por separado.

Una vez que tenemos nuestra quimioteca se pueden buscar actividades de las moléculas ahí presentes mediante un método de cribado masivo o *high throughput screening* que permite los análisis de actividad de varios compuestos, lo que una vez más abarata costes y agiliza el proceso.

3. GENOTECAS

Las genotecas son colecciones de clones de ADN de los organismos cultivables. Con esta herramienta hemos conseguido una infinidad de compuestos químicos. Véase el ejemplo de *Streptomyces spp*, bacterias de las que obtenemos el 80% de los antibióticos actualmente conocidos. El genoma de esta interesante bacteria se secuenció en 2002 y desde entonces se han estado haciendo análisis de manera que se han identificado 167 genes como potencialmente interesante para la síntesis de nuevos antibióticos [3]. Por tanto, vemos como de potente es esta herramienta, en cuanto a la búsqueda de diversidad.

Una de las limitaciones que presentan las genotecas es

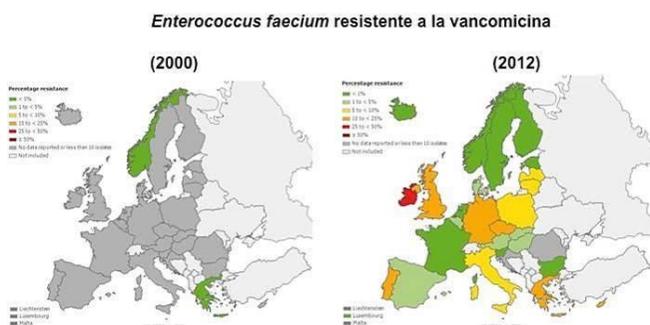


Fig. 1. Caldero de MoleQla.

Algunas de las alternativas que se han desarrollado para conseguir la diversidad tan necesaria para la investigación y mejora en tantos aspectos la podemos conseguir mediante la creación de quimiotecas, genotecas e incluso metagenotecas. Términos que iré desarrollando uno a uno a lo largo de este artículo.

que los organismos de los que obtenemos los compuestos tienen que ser necesariamente cultivables en el laboratorio, limitación que nos saltamos con la siguiente estrategia.

4. METAGENOTECAS

Las metagenotecas son genotecas, es decir, colecciones de genes, que se realizan de un nicho determinado y no de un organismo. La ventaja que esto supone es que tiene un mayor alcance en cuanto al número de compuestos que podemos llegar a encontrar, ya que dejamos atrás la necesidad de tener que cultivar en el laboratorio el microorganismo de interés. Las metagenotecas se realizan como vemos en la figura 2, extracción de ADN genómico del nicho, clonación en vectores e introducción en organismos hospedadores que serán estudiados. Una vez que tenemos nuestro vector podríamos hacer análisis de función para ver si tenemos la actividad deseada o podríamos realizar análisis de secuencia que nos permiten hacer una especie de “foto” para saber qué organismos y qué características tienen los que están creciendo en el nicho estudiador. [4]

5. CONCLUSIONES

Por todo lo anteriormente mencionado, vemos a las quimiotecas, genotecas y metagenotecas como unas herramientas muy potentes en la búsqueda de compuestos químicos. Con las que podemos obtener una gran cantidad de sustancias que nos podrían ser útiles para la lucha contra enfermedades y mejoras necesarias para la industria.

Estas técnicas tienen un futuro muy prometedor, y quién sabe el número de compuestos químicos nuevos que obtendremos con estas herramientas en pocos años y qué nuevas herramientas surgirán a raíz de estas.

REFERENCIAS

- [1] Web de Pharmamar, grupo Zeltia.
<http://www.pharmamar.com/>
- [2] Tema: Sistemas de Diseño Combinatorial de Productos Químicos y Escrutinio. Asignatura Ingeniería farmacéutica y diseño de medicamentos, 3º grado en Biotecnología, Universidad Pablo de Olavide. Profesora: Ana Paula Zaderenko Partida.
- [3] Rudi Emerson de Lima Procópio, Ingrid Reis da Silva, Mayra Kassawara Martins, João Lúcio de Azevedo and Janete Magali de Araújo, “Antibiotics produced by *Streptomyces*”, vol 16, Issue 5, Sep/Oct 2012, pages 466–471, doi:10.1016/j.bjid.2012.08.014
- [4] Jo Handelsman, “Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms”, vol. 68, No. 4, Dec. 2004, pages 669–685, doi: 10.1128/MBR.68.4.669–685.2004

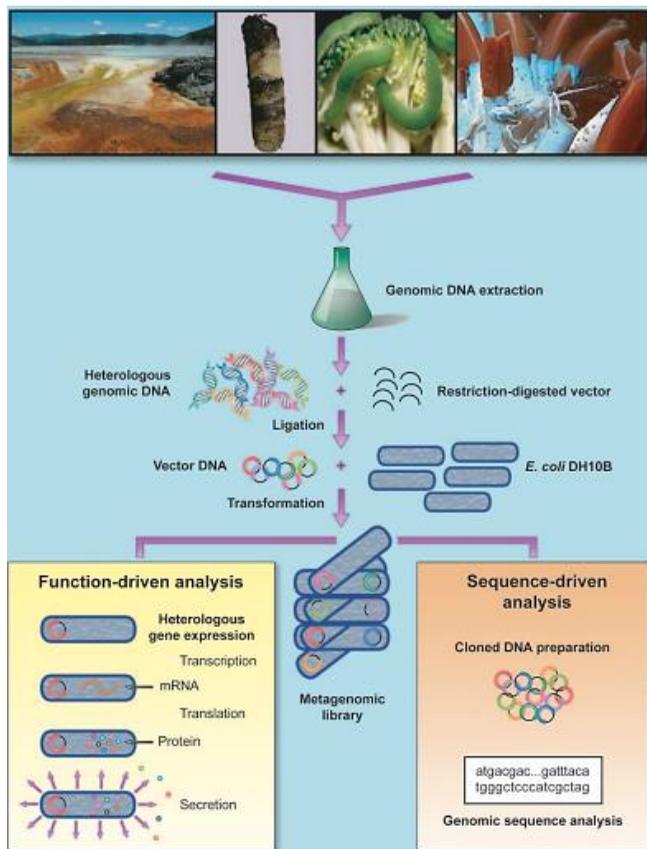


Fig 2. Creación y análisis de una metagenoteca.



Jara Cárcel Márquez estudiante de 3º de Biotecnología, facultad de ciencias experimentales en la Universidad Pablo de Olavide.

Energía potencial osmótica: Un buen sustituto de los combustibles fósiles

Ignacio Tomé Fdez. - Ladreda

Resumen— La energía osmótica presenta un enorme potencial para obtener energía limpia mediante el contacto de aguas con diferentes concentraciones de sal para generar electricidad en centrales instaladas junto a la costa, y de la cual, han surgido dos tipos de tecnologías complementarias: la osmosis por presión retardada y la electrodiálisis inversa

Palabras Claves— Energía osmótica, Presión osmótica retardada, Electrólisis inversa, Renovable.

1. INTRODUCCIÓN

La utilización continua de una energía verde y renovable es el reto más importante al que se enfrenta la humanidad en este siglo, siendo un punto clave para las generaciones futuras [1]. Actualmente, la mayoría de la generación de electricidad depende de fuentes no renovables de combustibles fósiles que emiten carbono, y que ha desembocado en un aumento sustancial de las emisiones de dióxido de carbono y otros importantes impactos ambientales [2, 3]. Las emisiones procedente de estas combustiones se prevé que aumenten de forma continua, llegando a 37,2 GT/año en 2035 [4]. Por lo tanto, la implementación de tecnologías para recolección eficiente de la energía a partir de fuentes renovables es imprescindible para el crecimiento económico y la protección medioambiental [5].

La fuerza con la que el agua llega a la desembocadura de un río, viene acompañada de una silenciosa pero inmensa disipación de energía libre. Este fenómeno, no guarda relación alguna con reacciones químicas ni con la pérdida de calor, solo con la pérdida de orden: los iones de sal, inicialmente con movimientos limitados al agua salada, pueden fluir al agua que inicialmente era dulce, volviendo uniforme la concentración de iones en el agua. La consecuencia de la pérdida de orden se traduce, en términos termodinámicos, como un aumento de la entropía o liberación de la energía libre. [6]

La energía libre que se disipa cuando un litro de agua se dispersa en el mar, produce aproximadamente 2,4 kJ, una energía mucho menor que la energía que posee un litro de gasolina.

Pero cuando la cantidad de agua aumenta, la energía libre en juego puede llegar a ser inmensa. Por ejemplo, el río Po, ingresa unos 1540 m³ por segundo en el mar mediterráneo, disipando una potencia cercana a los 3,7 GW. [7] La energía potencial osmótica, se basa en la transformación de la energía libre asociada a la diferencia de salinidad en trabajo mecánico, utilizando para ello membranas semipermeables. Este trabajo mecánico, asociado al flujo de agua bajo condiciones específicas de presión, puede ser convertido en corriente eléctrica a través de una turbi-

na [8].

2. TÉCNICAS DE EXPLOTACIÓN

2.1. Osmosis por presión retardada (PRO):

Antes de entrar en los módulos de membrana, el agua de mar se presuriza mediante el intercambiador de presión aproximadamente a la mitad de la presión osmótica, 12-14 bares. Después de haber sido filtrada, se hace pasar el agua dulce hacia el módulo de membrana. En este proceso se consigue entonces un exceso de agua de mar presurizada, que se divide en dos corrientes: un tercio de este agua de mar a presión se utiliza para la generación de electricidad en una turbina de energía hidroeléctrica, y la parte restante, pasa a través de un intercambiador de presión con el fin de presurizar el agua de mar entrante. El agua producida como desecho (agua salobre) será redirigida de vuelta a la desembocadura del río o al mar. [9]

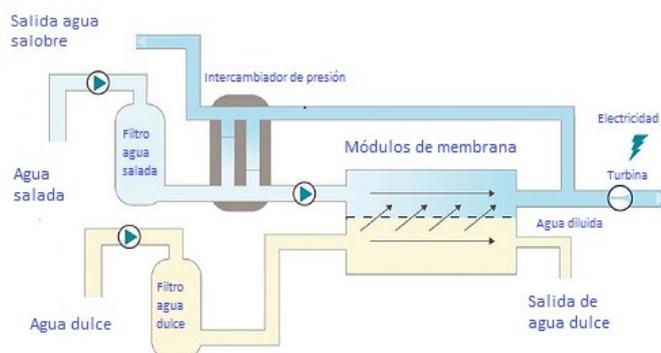


Fig. 1: Esquema del funcionamiento de la osmosis por presión retardada.

En los módulos de membrana, el agua con bajo contenido en sal se mueve a través de la membrana hacia el agua de concentración más alta, que crea una mayor presión debido a las fuerzas osmóticas. Gracias al control de esta presión, aproximadamente la mitad de energía teórica puede ser transformada en energía eléctrica, obteniendo 1 MW por m³/s de agua dulce.

En consecuencia, cuanto mayor es el gradiente de salinidad entre agua dulce y salada, mayor es la presión que se acumula en el sistema. Del mismo modo, más agua puede

ser introducida en el sistema y mayor es la energía que puede ser producida.

Es muy importante que tanto el agua dulce como el agua de mar estén lo más limpias posibles. Las sustancias en el agua pueden quedar capturadas dentro de la estructura de soporte de membrana o en la misma superficie de la membrana, reduciendo el flujo a través de la membrana, la potencia de salida y la eficiencia general del sistema. Este fenómeno está vinculado a las características de la membrana, al módulo de membrana y al pretratamiento del agua dulce y el agua de mar. [11]

2.2. Electrodialisis inversa (EDI):

La técnica de la electrodialisis inversa utiliza una pareja de membranas, de tipo diferente de las semipermeables descritas anteriormente: se trata de membranas permeables, ya sea al agua o a los iones de un patrón marcado; se dividen en catiónicas y aniónicas, según que permitan el paso de cationes o aniones (figura 2). Estas membranas están compuestas de polímeros similares a las llamadas resinas de cambio iónico. Una unidad de la técnica consiste en una serie de compartimentos delimitados por membranas catiónicas y aniónicas alternativamente; se hace fluir agua dulce y agua salada, de manera que en cada uno de los compartimentos se encuentre agua con concentración distinta de la del compartimento contiguo. Por difusión, los iones se esparcen de un compartimento con agua salada a los dos compartimentos adyacentes, pero, gracias a las membranas, en los dos compartimentos entran iones de signo opuesto. A lo largo de la secuencia de los compartimentos se produce por lo tanto una diferencia de potencial, que puede ser recogida con dos electrodos situados a los extremos.

Cuando se acoplan muchas unidades en serie, formando una pila alimentada por agua salada, la tensión total entre los electrodos alcanza decenas de voltios. En los compartimentos colocados a los extremos, donde se recoge la corriente de los electrodos, la tensión debe ser suficiente para que suceda una óxido-reducción, ya que si no ocurriera, no habría ningún paso de corriente

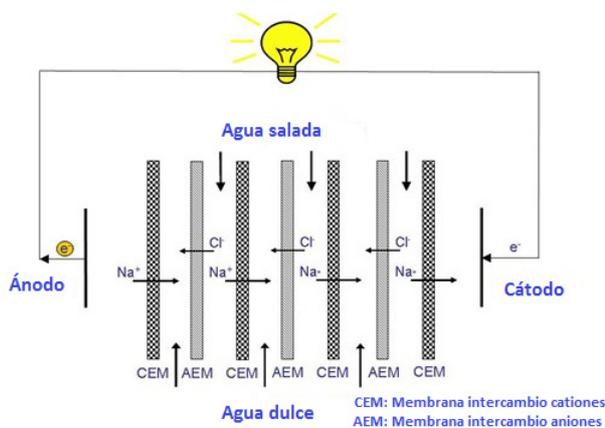


Fig.2: Esquema del funcionamiento de la electrodialisis inversa.

En la técnica EDI, la permeabilidad de la membrana define la resistencia al paso de los iones, esto es, de la corriente.

La potencia típicamente producida es del orden de 1 – 3 W por m² de membrana, análoga por lo tanto a la producida por la técnica PRO. Dado que la fuente de energía es la misma, sea PRO o sea EDI, pueden producir idealmente la misma energía a partir de la misma cantidad de agua, y también el rendimiento efectivo es similar, esto es, mayor del 50%. [6]

3. LA COMPETITIVIDAD DE LA ENERGÍA OSMÓTICA

El coste energético estimado de la energía osmótica es comparable y competitivo con otras fuentes de energías renovables, como las olas, las mareas y la energía eólica marina. Aunque las membranas todavía requieren un desarrollo más extenso, un análisis de costos entre mercado existente sitúa la energía osmótica como una de las energías con más potencial futuro, entrando en un rango de costos de 50-100 €/MWh (figura 3). [8]

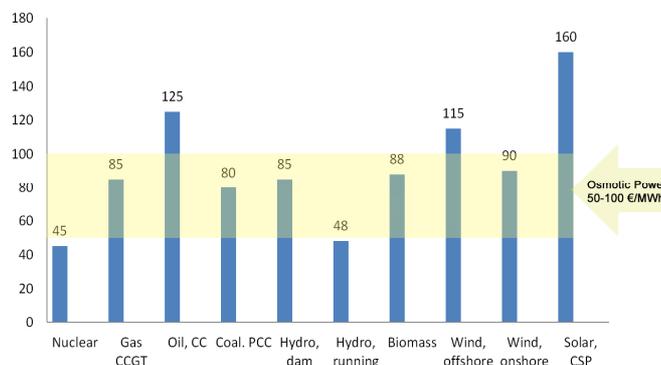


Fig.3: Posición potencial en el mercado energético de la energía potencial osmótica.

Por otro lado, el impacto ambiental que produce la energía potencial osmótica viene asociado a la infraestructura necesaria para su extracción, además del impacto derivado de la salida y entrada de agua salada sobre el entorno. Aún así, se podría reducir el impacto mediante la gestión del agua asociada al funcionamiento de la planta, pudiendo ser esta diseñada de forma que los biotipos del río, estuario y océano sean mantenidos en buen estado.

4. CONCLUSIONES

La energía osmótica se perfila en el futuro como una de las energías renovables más potentes. Se siguen desarrollando mejoras en ambos sistemas de extracción, sobre todo en cuanto a la calidad de las membranas. Estudios de mercado las sitúan en un costo en torno a 50-100 €/MWh, convirtiéndola en más económica que la energía solar o eólica en mar abierto y con la posibilidad de causar un menor impacto que estas mediante un óptimo diseño de las infraestructuras.

5. REFERENCIAS

- [1] Post, J. W.; Veerman, J.; Hamelers, H. V. M.; Euverink, G. J. W.; Metz, S. J.; Nymeyer, K.; Buisman, C. J. N. Salinity-gradient power: Evaluation of pressure-retarded osmosis and reverse electrodialysis. *J. Membrane. Sci.* 2007, 288, 218–230.
- [2] Solomon, S.; Plattner, G. K.; Knutti, R.; Friedlingstein, P. Irreversible climate change due to carbon dioxide emissions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009, 106, 1704–1709.
- [3] Cox, P. M.; Betts, R. A.; Jones, C. D.; Spall, S. A.; Totterdell, I. J. Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. *Nature* 2000, 408 (6813), 184–187.
- [4] Roca, J.; Alcántara, V. Economic growth, Energy Use, and CO₂ emissions. *Energy Research at the Cutting Edge*. Nova Science Publishers, Nueva Cork. 2002 pp. 123-134.
- [5] Chu, S.; Majumdar, A. Opportunities and challenges for a sustainable energy future. *Nature* 2012, 488 (7411), 294–303.
- [6] Broglioli, D. Energia dalla differenza di salinitá. *Il nuovo viaggiatore* 2012, 28, 28-38.
- [7] Loeb, S. Method and apparatus for generating power utilizing pressure-retarded osmosis. Patent US 4,193,267 Assigned Ben-Gurion University of the negev, Research and development Authority, Beersheba, Israel
- [8] Loeb, S., Van Hessen, F., Shahaf, D. Production of energy from concentrated brines by pressure-retarded osmosis. Preliminary technical and economic correlations, *J. Membrane Sci.*, 1976, 1, 49.
- [9] Gerstandt, K.; Peinemann, K. V.; Skilhagen, S. E.; Thorsen, T.; Holt, T., Membrane processes in energy supply for an osmotic power plant. *Desalination* 2008, 224, 64-70.
- [10] Thorsen, T.; Holt, T. The potential for power production from salinity gradients by pressure retarded osmosis *J. Membrane Sci.* 2009, 335, 103–110
- [11] Brogioli, D. Extracting renewable energy from salinity difference using a capacitor. *Phys. Rev. Lett.*, 2009 103, 058501.

RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE LA CAFEÍNA

Isabel Pérez Martínez

Resumen: La síntesis de receptores artificiales para derivados de xantinas, en especial para la cafeína, ha hecho que se desarrolle una intensa investigación sobre el mecanismo molecular que lleva a la interacción entre este sustrato y el respectivo receptor, un estudio que hace hincapié en la estructura molecular de la cafeína y cómo influye tal estructura en la dificultad de desarrollar los receptores.

Palabras clave: Sitios de unión, co-cristales, receptor artificial, cafeína, reconocimiento molecular.

1. INTRODUCCIÓN

La cafeína es un alcaloide derivado de la xantina, considerada por algunos una droga psicoactiva, barata y fácilmente disponible; consumida en el café, té negro, té verde, algunos refrescos, como coadyuvante en algunos fármacos e incluso se emplea en cosmética. Actúa sobre el sistema nervioso central, SNC, estimula el músculo cardíaco, relaja el músculo liso, es diurética, aumenta las secreciones gástricas, es antibroncoespástica y antitusígena [1, 2].

En investigaciones recientes se ha estudiado su acción para inducir la pérdida de peso, su efecto en la resistencia física de los atletas, el tratamiento de enfermedades tales como Parkinson, Alzheimer, enfermedad isquémica, enfermedad de Huntington y envenenamiento fetal por metilmercurio.

Su consumo, en pequeñas dosis y en adultos, se considera inofensivo, aunque algunos estudios establecen que posee efectos desfavorables ya que, aunque el consumo habitual de una taza de café al día no produce adicción, cuando no se consigue la dosis habitual aparecen síntomas de abstinencia: dolor de cabeza, fatiga, dificultad en la concentración, somnolencia e incluso dolor muscular. La sobredosis de cafeína provoca sobreestimulación del SNC generando nerviosismo, insomnio, ansiedad, trastornos en la micción y gastrointestinales, pulso irregular y, en casos extremos, la muerte [3].

Los trabajos realizados, enfocados a la comprensión del papel que desempeña la cafeína en los sistemas biológicos, están basados en el reconocimiento molecular de esta, tanto en disolución como en estado sólido.

La razón de que la cafeína sea responsable del estado de vigilia en la persona radica en la gran similitud estructural entre las moléculas de cafeína, adenosina y fosfato de adenosina cíclico, (Fig 1). La adenosina regula la actividad cerebral, y cuando la concentración de adenosina es elevada inicia la unión a receptores activando los mecanismos responsables del sueño; la unión de cafeína a los receptores de adenosina retrasa la somnolencia.

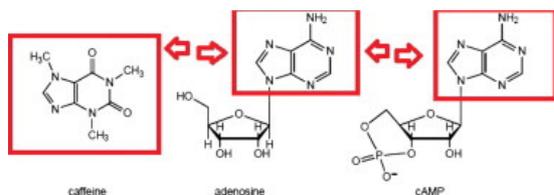


Fig 1. Similitud estructural entre cafeína y adenosina [1].

La cafeína es moduladora de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Las evidencias obtenidas, resultado de los trabajos realizados *in vitro* e *in vivo* sugieren que su acción inmunomoduladora está mediada a través de la inhibición del monofosfato de adenosina-fosfodiesterasa cíclico, (cAMP-PDE), con el consiguiente aumento de la concentración de cAMP producida por la hormona epinefrina.

La cafeína aumenta la frecuencia cardíaca, aumentando la capacidad de respuesta del corazón, porque produce un aumento de los niveles de ATP como consecuencia del aumento de cAMP al inhibir la acción de cAMP-PDE.

2. RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE LA CAFEÍNA

De entre todos los alcaloides de la xantina, la cafeína es la base más fuerte, es una clase de oxopurina alquilada, capaz de unirse a compuestos naturales como catequina, teoflavina o ciclodextrina; también puede unirse a diferentes ácidos dicarboxílicos e hidroxiácidos, tiene características "de péptido", de modo que compite eficazmente con las proteínas frente a sustratos fenólicos, lo que permite regenerarlas a partir de complejos polifenol-proteína por tratamiento con cafeína. La molécula de cafeína es pequeña, esto optimiza su eficacia en la formación de complejos con sustratos polifenólicos en los cuales el grupo fenólico es buen donante de protones y la cafeína un buen aceptor de los mismos para la formación de enlaces de hidrógeno. Los nitrógenos de la cafeína están totalmente metilados, lo que los convierte en un mal sitio de reconocimiento para los receptores; no obstante, la contribución hidrófoba es el factor que más influye en la interacción cafeína-polifenol en medio acuoso, (Figura 2a y 2b) [4,5].

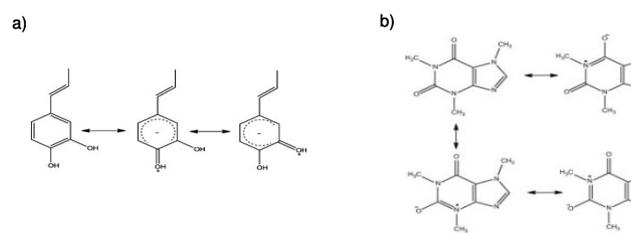


Fig. 2. Características polares complementarias de un compuesto fenólico (a) y la cafeína (b) [1].

En lo que respecta a la unión de la cafeína con los receptores ácidos se sabe que es más fuerte que la de otros alcaloides de xantina, hecho que queda debidamente justificado, dado que es la base más fuerte de entre todos los alcaloides de xantina.

Actualmente se han sintetizado receptores artificiales para derivados de la xantina, su diseño se ha basado en la elección de fluoróforos que permiten la unión de grupos hidroxilo, fenólico o carboxilo. La principal dificultad a la hora de diseñar un receptor es colocar los grupos de enlace de forma apropiada para que se pueda establecer el máximo número de enlaces de hidrógeno, y dar lugar a la formación de un complejo más fuerte. Se han desarrollado diferentes sensores y reacciones con capacidad de señalización para el reconocimiento molecular de la cafeína. Waldvogel propuso el primer receptor artificial sobre la estructura del hexahidroxitriifenileno y el reconocimiento de la cafeína en solución acuosa se logró por primera vez mediante receptores de porfirina, cuyo mecanismo de unión se estudió mediante aplicaciones de espectrometría, resonancia magnética nuclear y microcalorimetría. Los métodos fluorimétricos ofrecen la ventaja de ser sensibles y fáciles de diseñar, ya que se conocen sensores químicos fluorescentes basados exclusivamente en el enlace de hidrógeno. Se sabe que el carbazol es un buen fluorosensor, altamente selectivo y sensible, con gran afinidad hacia el oxígeno del anillo y el imidazol básico de la cafeína, es estable químicamente y presenta un alto rendimiento cuántico de fluorescencia [6, 7].

Por otra parte, la importancia de la co-cristalización en estado sólido radica en que permite obtener materiales con propiedades "a medida". En la industria farmacéutica se obtienen co-cristales: complejos 1:1 cafeína-fármaco sulfamantibiótico; complejo 1:1 cafeína-ácido dicarboxílico.

En estado sólido la cafeína forma fácilmente un hidrato cuya estructura cristalina ha sido determinada por rayos X. Este hidrato puede transformarse, en condiciones ambientales, en una fase- β -anhidro que, a su vez, al aumentar la temperatura puede transformarse en otra fase- α -anhidro, se conoce también un hidrato cristalino no estequiométrico que contiene 0,8 moles de agua por mol de cafeína; cuando la cafeína cristaliza en presencia de agua, esta se retiene como un sustituto para el enlace de hidrógeno y para las interacciones laterales débiles y poco selectivas [8].

Debido a su basicidad (pK del grupo imidazol=3,6), la cafeína es especialmente adecuada para la co-cristalización, en su forma neutra, con ácidos carboxílicos aromáticos y polifenoles. La cafeína posee tres sitios que pueden actuar como aceptores de enlaces de hidrógeno, un grupo se basa en un átomo de nitrógeno de un imidazol, mientras que los dos grupos restantes se basan en átomos de oxígeno de los grupos carbonilo de una urea y un resto amida.

Entre los cristales cafeína-ácido se distinguen, significativamente, complejos iónicos en forma de sales y complejos neutros en forma de co-cristales. Se han aislado cristales de cafeína-ácido adípico en los que ambos componentes forman un aducto cafeína-ácido-cafeína de tres componentes unidos mediante un fuerte enlace de hidrógeno OH...N y otros débiles. Este aducto trimérico se une a otra molécula de ácido adípico a través de enlaces de hidrógeno OH...O. También se han aislado cristales de cafeína-ácido succínico y de cafeína-ácido pícrico.

Las investigaciones llevadas a cabo con grupos carboxilo e hidroxilo pretendían demostrar la fuerte interacción ácido-base en los co-cristales sin que se produjera

ninguna transferencia de protones, el análisis de las estructuras por rayos X fue consistente con el hecho de que todos los complejos son neutros, y la distancia C-O corresponde a la de un co-cristal sin transferencia de protón.

3. CONCLUSIONES

Independientemente del hecho de que la cafeína sea considerada para unos como droga adictiva y para otros como un estimulante útil que, entre otros beneficios, aumenta la concentración, lo importante a recordar es que los efectos que produce dependen del metabolismo y de la ingesta en cantidad y frecuencia.

La química bioorgánica moderna trabaja en el diseño de moléculas sintéticas que desempeñan el mismo papel en los sistemas biológicos que las enzimas. En relación a ello se han diseñado gran variedad de receptores moleculares artificiales para el reconocimiento molecular de la cafeína, tanto en fase sólida como en solución, capaces de unirse a ella de manera eficiente y selectiva.

De todos los sistemas aplicados en la detección de la cafeína mediante receptores artificiales, ya sea en solución o en estado sólido, la detección fluorimétrica es la más rentable por su selectividad y sensibilidad.

La comprensión de la naturaleza de las fuerzas intermoleculares como responsables del reconocimiento molecular y de la selectividad y afinidad en la interacción ha abierto las puertas a la química biológica. Los enlaces de hidrógeno se utilizan como herramienta para diseñar estructuras de cristales moleculares, debido a su fuerza y a su naturaleza direccional con respecto a cualquier otro tipo de interacción intermolecular. Una de las principales aplicaciones del desarrollo de los co-cristales está en la industria farmacéutica, en la que se trabaja actualmente en la creación de co-cristales de cafeína-compuestos con funciones hidroxilo, ácido carboxílico y ácido hidroxicarboxílico, con propiedades y funciones específicas.

REFERENCIAS

- [1] P. Sahoo, *Biorganic Chemistry* **2015**, 58 26-47.
- [2] H. Milon, R. Guidoux, JA Antonioli, Efectos fisiológicos del café y sus componentes Ed. RJ Clarke, R. Macrae, *Café: Fisiología*, Springer, Berlín (1988), pp. 81-122.
- [3] RL Alstott, AJ Miller, RB Forney. *J. Forensic Sci.* **1973**, 18(2):135-7.
- [4] P. Ballester, MA Barcelo, A. Costa, J. Morey, M. Orell, CA Hunter *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 3849-3853.
- [5] R.S. Mulliken, *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 811-824.
- [6] B. Valeur, I. Leray, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 3-40.
- [7] SO Jeon, JY Lee, *Tetrahedron*, **2010**, 66, 7295- 7301.
- [8] HGM Edward, E. Lawson, M. Matas, L. Shields, P. York *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1997**, 2, 1985-90.



Isabel Pérez Martínez es estudiante del primer año del grado en Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide.