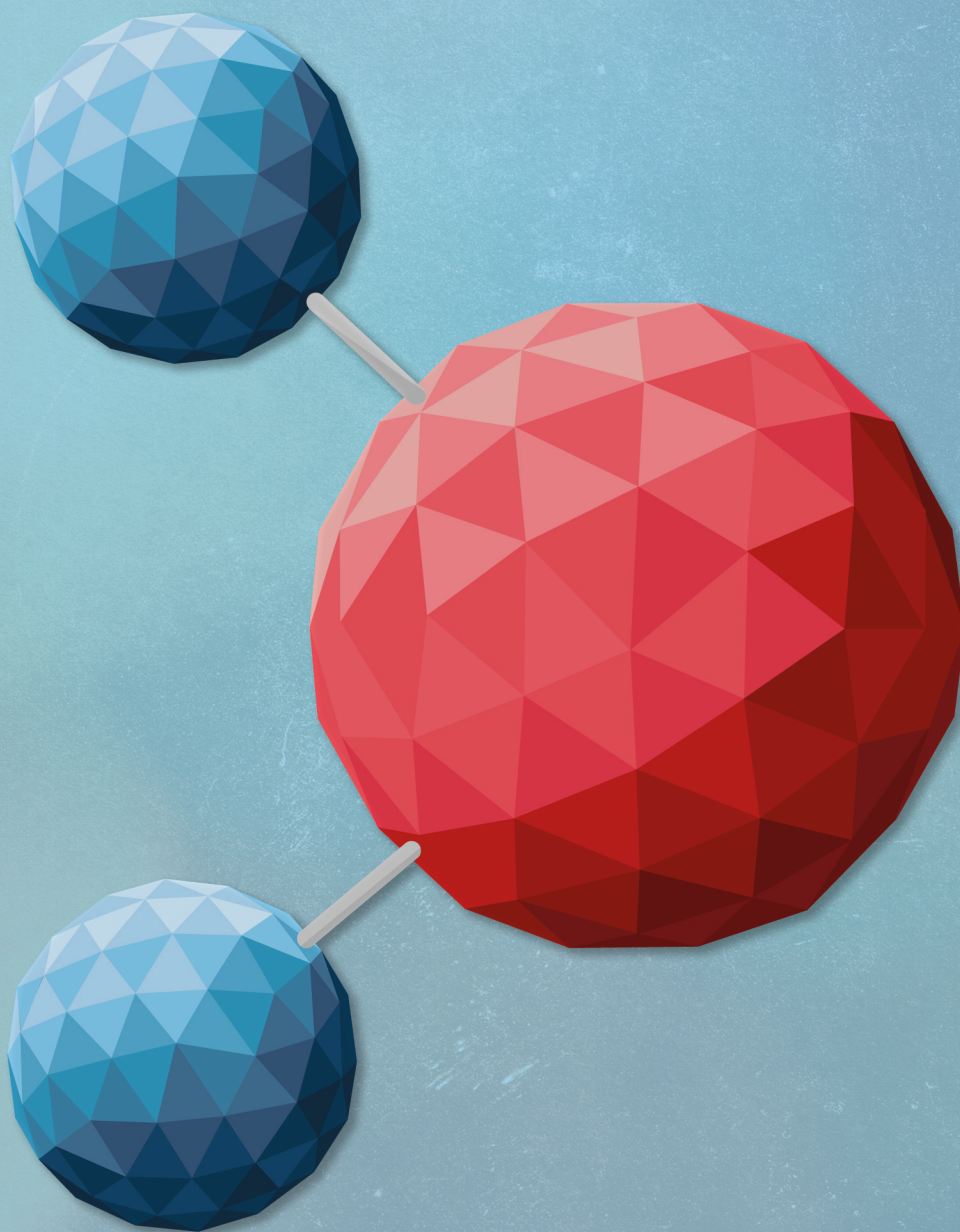


# MOLEQLA

Revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide

·Número 22·



**Portada**

Carmen Santisteban Trigo y María Manuela Valverde

**Logotipo y Título de la revista**

Juan Manuel García Arcos, Rafael Hoyos Manchado y Rafael Iigo  
Rocío 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 Química*: Patrick J. Merkling

*MoleQla Forense*: Paula Gómez Álvarez

*MoleQla Ambiental*: Ana Martín Calvo

*MoleQla Nutrición*: Alejandro Cuetos Menéndez

*MoleQla Energía*: Juan José Gutiérrez Sevillano

*MoleQla Ambiental*: Ana Martín Calvo

*MoleQla Celular*: Guillermo López Lluch

*MoleQla Instituto*: María Reyes de la Vega Sánchez

*MoleQla Patrimonio*: María Pilar Ortiz Calderón

*MoleQla Informática*: Norberto Díaz Díaz

*MoleQla Nanotecnología*: Ana Paula Zaderenko Partida

*MoleQla Farmacéutica*: Matilde Revuelta González

**Responsables de maquetación de las secciones que aparecen en este número**

Cristina Guillén Mendoza

Juan Antonio del Castillo

Almudena García Sánchez

Alba Jiménez Díaz

**Maquetador Global:** Rafael Rastroero Prieto

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

**Editores**

Sofía Calero Díaz

Ana Paula Zaderenko Partida

Juan Antonio Anta Montalvo

Patrick J. Merkling



ISSN 2173-0903

Editado el 21 de Junio de 2016

Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España

MoleQla se va a veranear algo más tarde este año, ¡pero se va con los deberes hechos! A partir de septiembre arranca una nueva fase, en la que se va a poner en marcha progresivamente una plataforma para que los autores envíen sus trabajos. La plataforma guarda el registro de las entradas con su fecha y permite gestionarlas, como en tantas otras revistas profesionales en las que acostumbramos publicar. Esto ha sido obra de un trabajo de fin de grado muy bien aprovechado de Rafael Rastrero Prieto, alumno del grado de Informática de Gestión tutorizado por el prof. Norberto Díaz. Rafael ha seguido dedicado al proyecto hasta poner en pie la plataforma actual. De momento, estamos todavía en la fase de transición, pero en breve cambiará la página web por completo y los nuevos trabajos se tendrán que entregar a través de la nueva plataforma. Después del número de septiembre, ya todo envío a la revista tendrá forzosamente que realizarse a través de dicha plataforma.

Buen verano y buena (o al menos entretenida) ciencia.

Patrick Merkling



# ÍNDICE

---

## **1. MoleQla Farmacéutica**

- 1.1 *Conotoxinas, un “veneno marino” con aplicaciones farmacéuticas*
- 1.2 *Epigenética para el estudio de nuevas dianas terapéuticas para la enfermedad de Alzheimer*
- 1.3 *Nuevas estrategias en el tratamiento del cáncer: Inhibidores de la DDR*

## **2. MoleQla Ambiental**

- 2.1 *Análisis físico-químico del agua de la Dársena del río Guadalquivir*

## **3. MoleQla Nutrición**

- 3.1 *La conservación por sal*
- 3.2 *¿Qué se esconde tras los TCA?*

## **4. MoleQla Informática**

- 4.1 *Open Source Hardware: el futuro de la innovación tecnológica*
- 4.2 *Descomposición modular del cliente-servidor*

## **5. MoleQla Patrimonio**

- 5.1 *La técnica LIBS y su uso combinado con XRF para el análisis de bronce*
- 5.2 *Implementación de la tecnología láser en la restauración de metales arqueológicos*
- 5.3 *Guía rápida para estudiar el color de un vidrio*
- 5.4 *Nanotecnología: La ciencia al servicio del Patrimonio Histórico*

## **6. MoleQla Química**

6.1 *Lo que la milbillonésima parte de un segundo puede hacer por ti*

6.2 *¿Cuidado con lo que bebes! ¿Etanol o metanol?*

6.3 *Active and intelligent packaging based on climacteric fruits ripening process*

6.4 *Baterías de ión-litio, ¿adiós a combustibles fósiles?*

## **7. MoleQla Nanotecnología**

7.1 *Nanotubos de carbono como biomateriales prometedores para la regeneración del tejido óseo*

## **8. MoleQla Instituto**

8.1 *Influence of oil variety and harvest time on the hydroxytyrosol, tyrosol, secoiridoids and o-diphenols content of Extra Virgin Olive oil*

## **9. MoleQla Celular**

9.1 *Tomas de contacto con microorganismos como sensibilización del sistema inmune. ¿Beneficioso o perjudicial?*

9.1 *Influencia de la microbiota en la regulación del sistema inmune*

9.3 *Ingeniería de anticuerpos*

9.4 *Cuando nuestro sistema inmune nos ataca: Tiroiditis de Hashimoto*

## **10. MoleQla Energía**

10.1 *Thermal materials in aerospace*

10.2 *Electrical signals within the nerve cells*

## **11. MoleQla Forense**

11.1 *Ansiolíticos: la nueva forma de “acabar” con la “ansiedad”*

11.2 *Bioterrorismo, la amenaza masiva*

11.3 *El diésel y los óxidos de nitrógeno: divorcio inevitable*

# Conotoxinas, un “veneno marino” con aplicaciones farmacéuticas

María Jesús Sancho Velasco

**Resumen**— las conotoxinas son unos pequeños péptidos con residuos conservados de cisteínas que actúan sobre canales iónicos y receptores neuronales, permitiendo el uso de estas como fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades que afectan al sistema nervioso, así como mejorar su actividad mediante un amplio abanico de modificaciones estructurales.

**Palabras Claves**— Acetilcolina, ciclación, cisteínas, conotoxinas, fármacos.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los conos marinos (*Conus*) son unos moluscos gasterópodos cuyo interés en ellos comenzó cuando se descubrió que el veneno de éstos, además de emplearlo para capturar a sus presas inmovilizándolas y como mecanismo defensivo, podía provocar la muerte en humanos.

Mediante varios estudios, se descubrió que la capacidad tóxica del veneno era consecuencia de unos péptidos de entre 10 y 40 aminoácidos, ricos en puentes disulfuros (entre los residuos de cisteínas de su estructura primaria) y que afectaban a canales iónicos y receptores neuronales, denominados “conotoxinas”. Estas tienen una potente actividad biológica y debido a sus buenas propiedades, como su alta selectividad y especificidad, se están empleando para aplicaciones terapéuticas como moduladores de sus correspondientes receptores, con el objetivo de modificar determinadas funciones fisiológicas en el sistema nervioso.

El veneno de cada especie de cono es único, y en cada uno hay una gran variedad de conotoxinas, debido a una alta tasa de mutaciones en la región de la toxina madura, por lo que el número de estas es muy elevado. Hasta la fecha, existen 12 familias de conotoxinas, procedentes de varias superfamilias de genes cada una con determinadas regiones conservadas, que parecen ser patrones de puentes disulfuro específicos; la síntesis de cada péptido tiene lugar a partir de un ARNm, generándose un propéptido que tiene que procesarse con proteasas específicas, dando lugar a la conotoxina que ha de pasar por ciertas modificaciones postraduccionales a través de la vía secretora. Es en este paso de secreción donde entran en juego las regiones conservadas, ya que determinan qué vía secretora seguirá el péptido.

La clasificación en familias se establece por las diferentes dianas farmacológicas sobre las que actúan, y las más importantes son las  $\omega$ -conotoxinas, que afectan a los canales de calcio dependientes de voltaje cerrados y por tanto inhiben la transmisión sináptica, las  $\mu$ -conotoxinas, blo-

queadoras de canales de sodio, las  $\chi$ -conotoxinas, que afectan a los transportadores neuronales de adrenalina, y las  $\alpha$ -conotoxinas, de las cuales vamos a hablar a continuación.

## 2. $\alpha$ -CONOTOXINAS

Como ya hemos mencionado, son un tipo de conotoxinas que se encuentran en el veneno de los conos marinos, y el tamaño de los péptidos de esta familia se encuentra entre 12 y 19 aminoácidos; las subfamilias  $\alpha$  se diferencian en el número y la disposición de los residuos de cisteína, y casi todas presentan cuatro residuos en las regiones conservadas, formándose por cada par un bucle de enlace disulfuro, cuya separación es fundamental para determinar el esqueleto de la conotoxina [Fig.1].

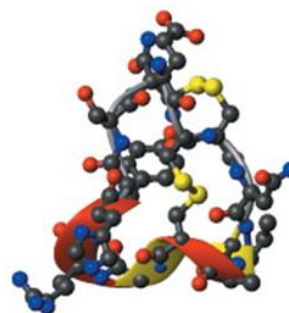


Fig.1: Estructura de una alfa-conotoxina. En amarillo se pueden ver los puentes disulfuro entre los átomos de azufre [4].

La actividad de estos péptidos se centra en su actuación como antagonistas competitivos de receptores nicotínicos de acetilcolina. Además, son capaces de distinguir entre los receptores musculares y los de tipo neuronal, siendo muy selectivos, lo que nos permite usarlos como sondas para conocer la estructura y la función de estos receptores, cuyas subunidades  $\alpha 1$  son las responsables de la unión de los agonistas y los antagonistas, que establecen interacción de alta afinidad con estos, permitiendo la apertura del canal o inhibiéndola, respectivamente.

## 2.1. Importancia de las $\alpha$ -conotoxinas: aplicaciones médicas

Determinadas enfermedades como el Parkinson, el Alzheimer o la esquizofrenia, surgen por cambios funcionales en los receptores nicotínicos de acetilcolina, los blancos de estas conotoxinas, que se sabe que son muy importantes en la cognición, memoria y aprendizaje. Además, la adicción a nicotina también es causa de cambios en estos receptores, por lo que es bastante importante desarrollar un tratamiento farmacológico para mejorar los efectos de estas enfermedades.

De esta forma, las  $\alpha$ -conotoxinas se están estudiando profundamente para elaborar fármacos que permitan actuar ante estos padecimientos y sus síntomas, es más, ya hay ensayos preclínicos de algunas de ellas para ser usadas por ejemplo como analgésicos; como es lógico, una mayor potencia en la actividad de estos pequeños péptidos mejoraría su función, y se ha descubierto que una carga positiva en el extremo C-terminal mejora esa potencia respecto al que presenta una carga neutra. Y es que, se han realizado variaciones sutiles dentro de esta familia de conotoxinas que han permitido mejorar su actividad, ser más específicas... Todo ello contribuye al desarrollo de fármacos adecuados que contienen estos péptidos y también para la creación de análogos no naturales (derivados de la lactama), que incluso pueden llegar a ser más potentes con los cambios adecuados.

Este amplio conocimiento acerca de las conotoxinas nos permite poder usarlo para el diseño racional de fármacos.

Por último, como dijimos en el apartado anterior, las  $\alpha$ -conotoxinas se pueden emplear para conocer de forma más clara y específica los receptores nicotínicos de acetilcolina mediante la creación de sondas con estas. Además, también se han desarrollado  $\alpha$ -conotoxinas cíclicas mejorando sus propiedades para ser usadas como medicamentos, así como más miembros de las demás familias, consiguiendo unos resultados excepcionales.

## 3. CICLACIÓN DE CONOTOXINAS

En la naturaleza también encontramos otros compuestos de interés terapéutico como es el caso de los "cyclotides", unos péptidos vegetales que, al igual que las conotoxinas, tienen una elevada cantidad de residuos de cisteína y por tanto enlaces de puentes disulfuro entre ellos. Tienen actividad insecticida y se emplean por tanto como mecanismos de defensa de las plantas. Por otra parte, se han descubierto propiedades de estos contra el cáncer o actividades hemolíticas.

Sin embargo, lo que los diferencia de las conotoxinas es que los residuos de cisteína se encuentran ciclados, confiriéndoles una elevada estabilidad estructural debido a la formación de puentes disulfuros; las conotoxinas tienen algunas barreras, como que pueden ser fácilmente degradadas por proteasas, algo que no interesa en el de-

sarrollo de fármacos, por lo que lo más interesante aquí es que este concepto de ciclación puede aplicarse a las conotoxinas, fusionando propiedades y otorgándole mayor resistencia frente a dichas proteasas. Esta aplicación está teniendo un auge notable en la bioingeniería, debido a que los extremos N y C terminal de la mayoría de las conotoxinas se encuentran próximos y haría fácil la ciclación, mejorando así las propiedades biofarmacéuticas de estas.

### 3.1. Método de ciclación

El método más utilizado es el ligamiento químico nativo (NCL). La base de este radica en que dos fragmentos de péptidos sintéticos, uno con un tioéster C-terminal y otro con una cisteína N-terminal, se unan para formar un fragmento proteico de mayor tamaño. Aquí lo que ocurriría sería que el grupo tiol de la cisteína, desplazaría al grupo tioéster, reordenándose la estructura intramolecularmente de forma rápida por medio de un componente cíclico intermediario (de 5 aminoácidos) que formaría un enlace amida entre los dos fragmentos, regenerando la cisteína [6].

Esta introducción de nuevos componentes no causa ninguna distorsión o cambio en la estructura terciaria de la conotoxina, a no ser que estos sean fragmentos muy cortos o muy largos, por lo que hay que tener en cuenta la longitud del enlazador.

Esta estrategia está dando muy buenos resultados y, como ejemplo, podemos hablar de la ciclación de la conotoxina Vc1.1, perteneciente a la familia de  $\alpha$ -conotoxinas. Este péptido tiene actividad analgésica, tanto por poder unirse los receptores de GABA y bloquear canales de calcio, como por poder unirse a un subtipo de receptores nicotínicos de acetilcolina, inhibiéndolo.

Anteriormente se introducía en el organismo por inyección subcutánea, pero actualmente se ha creado un análogo ciclado que ha permitido su administración vía oral. Este consiste en un enlazador de glicinas y alaninas que le proporciona una alta estabilidad y una mejor selectividad frente a canales de calcio. Probado en rata en los ensayos clínicos, mostró una reducción del dolor neuropático así como una mayor potencia y efectividad que las que producen otros tratamientos que no implican conotoxinas.

## 4. USOS ACTUALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Como ya hemos podido comprobar, la importancia de las conotoxinas se encuentra en sus usos médicos, como fármacos principalmente. Esto está permitido gracias a la fácil síntesis y manipulación química que presentan, entre otras propiedades. Además, la creación de conotoxinas sintéticas mejora sus cualidades y potencian su actividad, así como pequeños cambios en su estructura como el hecho de alterar algunas de las muchas modificaciones postraduccionales que sufren les permitirían cambiar la selectividad del receptor y ser útiles en otros aspectos. Por

todo ello, las conotoxinas se emplean para estudiar los canales iónicos (por su especificidad) mediante sondas, para elaborar medicamentos...

Por otra parte, también mediante modificaciones se podría conseguir que determinadas conotoxinas fuesen activas ante receptores de mamíferos que nos interesasen, o conseguir elaborar peptidomiméticos, algo que se está trabando muchísimo en la actualidad, como es el caso de una  $\mu$ -conotoxina para crear bloqueadores selectivos de canales de sodio, o incluso mezclar las estrategias de ciclación y peptidomiméticos, como se ha conseguido con una determinada  $\alpha$ -conotoxina aumentando su potencia y efectividad.

También se han apreciado mejoras en las conotoxinas que permiten una administración de estas mucho más fácil y eficiente, como por vía oral, como vimos en el caso de la ciclación, y es que hay una amplia variedad de modificaciones que pueden realizarse a estas estructuras peptídicas para mejorar muchas de sus propiedades o aplicarlas al campo médico que más nos interese.

La bioingeniería de conotoxinas está cogiendo un gran impulso y cada vez son más los avances que se consiguen gracias a esta y a todas las investigaciones que se están llevando a cabo, y que esperamos que se sigan realizando, aunque, para ampliar más la variedad de modificaciones que se les pueden hacer, habría que cambiar algunos aspectos de la normativa actual del desarrollo de conotoxinas.

## 5. CONCLUSIONES

Gracias a la especificidad y selectividad de la mayoría de las conotoxinas, estas pueden emplearse para conocer mejor la estructura de sus receptores, al poder usarse como sondas, así como para el diseño racional de fármacos al conocerse sus estructuras y funciones, puesto que se sabe que afectan a receptores neuronales y canales iónicos, alterados en muchas enfermedades relacionadas con el sistema nervioso y para las cuales un tratamiento con conotoxinas sería muy eficiente.

Lo más interesante de estos pequeños péptidos es que podemos modificarlos de muchas maneras consiguiendo mejorar sus características, consiguiendo que afecten a un receptor que nos interese, que aumente su potencia a la hora de ejercer su acción, que nos permita una mejor forma de administración de su fármaco o haciéndolas más resistentes a la degradación, como conseguimos ciclándolas o generando conotoxinas sintéticas.

En definitiva, las conotoxinas tienen unas características muy buenas para que la investigación de estas siga en marcha, debido al alto potencial médico que tienen, así como cada vez irán cogiendo mucha más fuerza en este sector y en la ingeniería química, gracias al juego estructural y funcional que pueden dar.

## REFERENCIAS

- [1] Baldomero M. Olivera, Lourdes J. Cruz; "Conotoxins, in retrospect"; *Toxicon* 39 (2001), págs. 7-14
- [2] Parashar Thapa, Michael J. Espiritu, Chino C. Cabalteam Jon-Paul Bingham; "Conotoxins and their regulatory considerations"; *Regulatory toxicology and Pharmacology* 70 (2014), págs. 197-202
- [3] Hugo R. Arias, Michael P. Blanton; "alpha-conotoxins"; *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32 (2000), págs. 1017-1028
- [4] Robert W. Janes; "alpha-conotoxins as selective probes for nicotinic acetylcholine receptor subclasses"; *Current Opinion in Pharmacology*, 2005, 5: 280-292
- [5] Eline K.M. Lebbe, Steve Peigneur, Mohitosh Maiti, Bea G. Mille, Prabha Devi, Samuthirapandian Ravichandran, Eveline Lescrinier, Etienne Waelkens, Lisette D'Souza, Piet Herdewijn, Jan Tytgat; "Discovery of a new subclass of alpha-conotoxins in the venom of *Conus australis*"; *Toxicon* 91, (20014), págs. 145-154
- [6] Richard J. Clark, Muharrem Akcan, Quentin Kaas, Norelle L. Daly, David J. Craik; "Cyclization of conotoxins to improve their biopharmaceutical properties"; *Toxicon* 59, 2012, págs. 446-455
- [7] Joakim E. Swedberg, Christina I. Schroeder, Justin M. Mitchell, Thomas Durek, David P. Fairlie, David J. Edmonds, David A. Griffith, Roger B. Ruggeri, David R. Derksen, Paula M. Loria, Spiros Liras, David A. Price, David J. Craik; "Cyclic alpha-conotoxin peptidomimetic chimeras as potent GLP-1R agonists"; *European Journal of Medicinal Chemistry* 103, (2015), págs. 175-184
- [8] Marijke Stevens, Steve Peigneur, Natalia Dyubankova, Eveline Lescrinier, Piet Herdewijn, Jan Tytgat; "Miniaturization of mu-Conotoxins as peptidomimetic strategy to develop selective sodium channel blockers"; *Toxicon* 60, 2012
- [9] Bruce G. Livett, David W. Sandall, David Keays, John Down, Ken R. Gayler, Narmatha Satkunanathan, Zeinab Khall; "Therapeutic applications of conotoxins that target the neuronal nicotinic acetylcholine receptor"; *Toxicon* 48, 2006, págs. 810-829



**María Jesús Sancho Velasco** finalizó los estudios de bachillerato en 2013 en el I.E.S. Alba Plata (Fuente de Cantos, Badajoz). Actualmente es estudiante de 3º de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.



# Epigenética para el estudio de nuevas dianas terapéuticas para la enfermedad de Alzheimer

Ester Molina López y Manuel Velasco Gomariz

**Resumen**— Existen muchas evidencias acerca de la importancia que juegan los mecanismos epigenéticos en la fisiología y función del sistema nervioso y en muchos procesos cognitivos, como el aprendizaje y la memoria, por ello no es de extrañar que muchas enfermedades que implican alteraciones en estos procesos, como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, enfermedad de Huntington o el síndrome de Angelman, estén asociados con alteraciones en las modificaciones epigenéticas. El Alzheimer es el tipo de demencia más común y por ello es una de las más estudiadas y en las que más interés hay por desarrollar un tratamiento efectivo, aunque todavía eso no ha ocurrido. En este artículo se hablará de la implicación de las alteraciones epigenéticas en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer y el uso de estos conocimientos para desarrollar nuevos fármacos para tratar esta enfermedad, además se comentarán algunos de los fármacos epigenéticos ya surgidos.

**Palabras Claves**— Alzheimer, epigenética, fármacos, histonas, metilación.

## 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a miles de personas en todo el mundo y que se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y otras capacidades cognitivas y que acaba produciendo la muerte. Aunque hay algunos casos de aparición temprana en los que la enfermedad está causada por mutaciones mendelianas, la mayoría de los casos son de aparición tardía. En este último caso juegan un papel muy importante factores genéticos, algunos factores de riesgo ambientales (como la edad, el género, hipertensión, diabetes, estrés crónico o depresión) y alteraciones en las modificaciones epigenéticas [1].

A lo largo de los últimos 30 años se han descubierto más de 690 genes asociados con el Alzheimer y muchos de ellos están relacionados con modificaciones epigenéticas [2]. De hecho, se ha demostrado que la desregulación epigenética está directamente relacionada con los defectos cognitivos y conductuales asociados al Alzheimer así como con los principales procesos fisiopatológicos que subyacen a dicha enfermedad (como la hipermetilación de la proteína tau, exceso de producción de péptido amiloide). Por otra parte, la metilación del ADN, algunas modificaciones de las histonas y los niveles de algunos microRNAs están regulados por el péptido amiloide, el estrés oxidativo y la neuroinflamación. Todo esto indica que las alteraciones en la regulación epigenética son tanto una causa como una consecuencia de la enfermedad y a su vez hace que los fármacos epigenéticos estén cobrando cada vez más interés como potenciales candidatos para el tratamiento del Alzheimer, ya que pueden revertir cambios en la expresión génica en genes relacionados con el Alzheimer [1].

## 2. MECANISMOS EPIGENÉTICOS Y FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La epigenética hace referencia a la modificación de la expresión génica sin que se altere la secuencia de ADN. Entre los mecanismos epigenéticos afectados en la enfermedad de Alzheimer están la metilación de ADN, la alteración de las modificaciones postraduccionales de las histonas y la regulación de ARNs no codificantes [3].

### 2.1. Metilación del ADN:

La metilación de ADN se da sobre todo en las islas citosina-guanina (CpG) de los promotores y ejerce un efecto represor sobre la transcripción de los genes. Esta metilación depende del ciclo folato-metionina-homocisteína, y dado que tanto la enfermedad de Alzheimer como el envejecimiento están relacionados con un déficit de folato, no es de extrañar que el número de alteraciones de la metilación encontradas en el hipocampo y el córtex cerebral de personas con Alzheimer sea mayor que en personas sanas de la misma edad [1].

La hipometilación del ADN se correlaciona con un aumento del tamaño de las placas amiloides así como con un aumento de la expresión de los genes que codifican para el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), que es un gen proinflamatorio, y ciclooxigenasa-2, que cataliza la generación de prostaglandinas, lo que sugiere que las alteraciones en la metilación en el ADN son responsables de la neuroinflamación que va asociada a la enfermedad. Mientras que la hipermetilación de los promotores de algunos genes como BDNF (Brain-derived neurotrophic factor o factor neurotrófico derivado del cerebro) o CREB (cAMP-responsive element) puede interferir con la plasticidad

sináptica.

En definitiva, las alteraciones en la metilación del ADN tienen un papel en el desarrollo y avance de la enfermedad de Alzheimer [4].

## 2.2. Metilación/Acetilación/Fosforilación de histonas

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas, entre las que destacan la acetilación y la metilación, son factores muy importantes a la hora de regular la expresión génica, ya que determinan el que la cromatina se encuentre en una configuración “abierta”, más accesible a factores de transcripción y otros reguladores del ADN, o en una configuración “cerrada” en la que la transcripción no está favorecida. La acetilación y la fosforilación de las histonas generalmente favorecen la transcripción, mientras que la metilación puede tener diferentes efectos dependiendo de la zona metilada [1].

Algunas de las alteraciones de estos procesos presentes en esta enfermedad son: acetilación reducida de las histonas; altos niveles de la histona desacetilasa 6 (HDAC6) que es responsable de la fosforilación y acumulación de la proteína tau; niveles reducidos de SIRT1, que se relacionan con la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide y tau; disminución de la acetilación de H4; sobreexpresión neuronal de HDAC2, que disminuye la plasticidad neuronal y la formación de memoria; etc.

En la enfermedad de Alzheimer se observa un descenso en la metilación de la histona H3 en el córtex temporal, lo que puede ser debido a una sobre actividad de HDAC2. Además, la desregulación de la acetilación de la histona H4 se asocia con déficits cognitivos en ratones modelo de la enfermedad de Alzheimer [1][2].

La hiperacetilación de H3 participa en la inducción del péptido amiloide, y de manera recíproca, el péptido amiloide puede producir patrones anómalos de acetilación de histonas, por ejemplo puede suprimir la acetilación de la histona H3, lo que da lugar a una expresión reducida de los reguladores de la plasticidad sináptica [5].

## 2.3. ARNs no codificantes

Otra dimensión del control epigenético se debe a un amplio repertorio de ARNs que no son codificantes para proteínas (ncRNA) y muchos de ellos están desregulados en las enfermedades neurodegenerativas, como son Sox2OT, BACE1-AS y NAD-Rad18, entre otros asociados a la enfermedad de Alzheimer [6]. Los más importantes son los microRNA, que pertenecen a una clase de ARN regulatorios no codificantes que son capaces de regular el 60% de todos los genes conocidos a través del mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional; afectando a la expresión de los ARN mensajeros de diversos genes [2]. Por tanto, alteraciones en estos miRNA provocan alteraciones epigenéticas que contribuyen a la expresión aberrante de genes relacionados con la patología.

## 3. FÁRMACOS EPIGENÉTICOS PARA EL TRATAMIENTO DEL ALZHEIMER

Estudios preclínicos en modelos de Alzheimer han

demostrado que algunas drogas epigenéticas pueden resultar beneficiosas en términos de protección frente a la neurodegeneración y mejora de la capacidad cognitiva, ya que reducen la hiperfosforilación de la proteína tau y la formación de placas seniles.

Estos fármacos son capaces de provocar modificaciones epigenéticas mediante distintos mecanismos, como la interacción con las enzimas encargadas de esas modificaciones, la metilación del ADN o cambios conformacionales de las histonas. Entre estas drogas epigenéticas destacan: inhibidores de DNA metil transferasa, inhibidores de histona desacetilasa, moduladores de histona acetiltransferasa, inhibidores de histona acetiltransferasa, inhibidores de histona demetilasa y ARN no codificante (miRNA) [2][3]. A continuación se mostrará más en detalle su mecanismo de acción.

### 3.1. Inhibidores de la ADN metiltransferasa (DNMT)

Reducir la metilación en algunos genes patogénicos puede ser una buena terapia contra el Alzheimer. Algunos ejemplos de inhibidores de DNMT son análogos de nucleósidos (Azacitidina); pequeñas moléculas (Hidralazina, Procainamida); productos naturales (derivados de curcumina); inhibidores de oligonucleótidos antisensido y micro-RNAs [2]. Uno de los compuestos más interesantes es el galato de epigallocatequina del té verde, capaz de atenuar la neurotoxicidad del péptido  $\beta$ -amiloide, reducir el número de células apoptóticas y disminuir la producción de radicales superóxido [7].

### 3.2. Inhibidores de la Histona desacetilasa (HDAC)

Hay diferentes tipos de compuestos que actúan como inhibidores de HDAC, algunos de ellos son:

-Ácidos grasos de cadena corta, como el butirato sódico (capaz de incrementar los niveles de acetilación de histonas, lo que produce un aumento de la sinapsis y la formación de memoria a largo plazo) [8] y ácido valproico (inhibe la producción del péptido  $\beta$ -amiloide, afectando a la histona H4) [9].

-Ácidos hidroxicinámicos: tricostatina A (incrementa la acetilación de la H4 y restaura la memoria en animales modelos de la enfermedad) y ácido hidroxicinámico suberoilánilido (incrementa la acetilación de H4K12, restaurando la expresión de genes que inducen el aprendizaje) [10].

-Moduladores de las sirtuinas, inhibidores y activadores de sirtuinas: uno de los activadores de sirtuinas más conocidos es el resveratrol, que es capaz de inhibir la agregación del péptido  $\beta$ -amiloide gracias a que es capaz de regular positivamente la SIR1 [11]. Un compuesto inhibidor de la HDAC sería la nicotinamida, que es capaz de reducir la fosforilación de la proteína tau [12].

### 3.3. Inhibidores de la Histona acetiltransferasa (HAT)

Otro tipo de compuestos son los inhibidores de la histona acetiltransferasa. Los HAT modulan la expresión génica acetilando el grupo amino de residuos de lisinas en las histonas. Dentro de este grupo se encuentra la curcumina, muy interesante para el tratamiento del Alzhei-

mer [13].

### 3.4. Inhibidores de la Histona metiltransferasa (HMT)

Las histonas metiltransferasas inducen la acetilación de histonas para regular los patrones de expresión génica. La metilación de la lisina está involucrada tanto en la activación transcripcional como en el silenciamiento génico, según la lisina que se metile. La S-adenosilmetionina y la caetocina son inhibidores de HMT, con potencial para tratar el Alzheimer [14].

### 3.5. micro-ARNs y silenciamiento génico

Los micro-ARNs ejercen control regulatorio sobre la estabilidad del ARNm y son esenciales para el normal desarrollo y función del cerebro, por lo que el conocimiento de la función de los miRNA puede ser una potencial diana inhibiendo o sobreexpresando estas pequeñas moléculas [2]. Un ejemplo es la sobreexpresión de miR-124 y miR-195, capaces de reducir los niveles de péptido  $\beta$ -amiloido con BACE1 como diana [15][16].

Otra terapia interesante se basa en el uso de ARN de interferencia para disminuir la expresión génica de genes relacionados con la patogénesis del Alzheimer activando el proceso de degradación del ARNm. Así, se han probado RNAi contra genes como BACE1, APP, PS con resultados aún difusos [17].

## 4. CONCLUSIONES

En definitiva, la información descrita a lo largo de este artículo muestra el papel tan importante que juega la epigenética en la aparición de enfermedades que afectan a procesos cognitivos como el Alzheimer y que hasta ahora había pasado desapercibido y a su vez, abre una nueva puerta hacia el desarrollo de nuevos fármacos destinados al tratamiento de esta enfermedad.

Los avances en cuanto al conocimiento de los mecanismos epigenéticos implicados en la aparición y el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer han permitido que cada vez se vayan descubriendo más moléculas capaces de modificar las marcas epigenéticas y de modular la expresión de distintos genes mediante distintos mecanismos de acción. Sin embargo, aunque estos fármacos son muy prometedores, todavía no se han hecho ensayos clínicos formales con estos fármacos epigenéticos en pacientes de Alzheimer, por lo que todavía queda mucho camino por recorrer hasta que este tipo de fármacos sean una realidad.

## REFERENCIAS

[1] Millan, M. J. (2014). The epigenetic dimension of Alzheimer's disease: causal, consequence, or curiosity? *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 16(3), 373–393.

[2] Cacabelos, R., & Torrellas, C. (2014). Epigenetic drug discovery for Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 0441(October), 1–28.

[3] Ding, X., Boney-montoya, J., Owen, B. M., Bookout, A. L., Coate, C., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. a. (2013). Epigenetics-Based

Therapeutics for Neurodegenerative Disorders. *NIH Public Access*, 16(3), 387–393.

[4] Rao JS, Keleshian VL, Klein S, Rapoport SI. (2012). Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry*. 2:e132.

[5] Lithner CU, Lacor PN, Zhao WQ, et al. (2013). Disruption of neocortical histone H3 homeostasis by soluble A $\beta$ : implications for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*.34:2081-2090.

[6] Wu P, Zuo X, Deng H, et al. (2013). Roles of long noncoding RNAs in brain development, functional diversification and neurodegenerative diseases. *Brain Research Bulletin*. 97 (69-80).

[7] Dragicevic N, Smith A, Lin X, et al. (2011). Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and other flavonoids reduce Alzheimer's amyloid-induced mitochondrial dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease*; 26(3):507-521.

[8] Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, et al. (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *Journal of Biological Chemistry*; 279(39):40545-59.

[9] Qing H, He G, Ly PT, et al. (2008). Valproic acid inhibits Abeta production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *The Journal of Experimental Medicine*; 205(12):2781-9.

[10] Kilgore M, Miller CA, Fass DM, et al. (2010). Inhibitors of class 1 histone deacetylases reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*; 35(4):870-80.

[11] Feng X, Liang N, Zhu D, et al. (2013). Resveratrol inhibits beta-amyloid-induced neuronal apoptosis through regulation of SIRT1-ROCK1 signaling pathway. *PLoS One*; 8(3):e59888.

[12] Green KN, Steffan JS, Martinez-Coria H, et al (2008). Nicotinamide restores cognition in Alzheimer's disease transgenic mice via a mechanism involving sirtuin inhibition and selective reduction of Thr231-phosphotau. *The Journal of Neuroscience*; 28(45):11500-10.

[13] Hoppe JB, Coradini K, Frozza RL, et al. (2013). Free and nanoencapsulated curcumin suppress beta-amyloid-induced cognitive impairments in rats: Involvement of BDNF and Akt/GSK-3beta signaling pathway. *Neurobiology of Learning and Memory*; 106:134-44.

[14] Peedicayil J. (2014). Epigenetic drugs in cognitive disorders. *Current Pharmaceutical Design*; 20(11):1840-6.

[15] Fang M, Wang J, Zhang X. (2012). The miR-124 regulates the expression of BACE1/ $\beta$ -secretase correlated with cell death in Alzheimer's disease. *Toxicology Letters*; 209(1):94-10.

[16] Zhu HC, Wang LM, Wang M, et al. (2012). MicroRNA-195 downregulates Alzheimer's disease amyloid-production by targeting BACE1. *Brain Research Bulletin*; 88(6):596-601.

[17] Wang J, Yu JT, Tan MS, et al. (2013). Epigenetic mechanisms in Alzheimer's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Ageing Research Reviews*; 12(4):1024-41.



**Ester Molina López:** Graduada en Biotecnología por la Universidad de Murcia. Actualmente cursa el Máster en Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.



**Manuel Velasco Gomariz** Graduado en Biotecnología por la Universidad de Murcia. Actualmente cursa el Máster de Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.

# Nuevas estrategias en el tratamiento del cáncer: Inhibidores de la DDR

Pedro Jesús García Murillo y Carmen González Galán

**Resumen**— Existen un gran número de enfermedades en las cuales se encuentran implicados las distintas vías del mecanismo de reparación de daños en el ADN (DDR), entre las que podemos destacar los distintos tipos de cáncer. El tratamiento de esta enfermedad ha evolucionado mucho con los años pero hoy en día sigue teniendo un gran inconveniente, el gran número de reacciones adversas que presentan debido a la inespecificidad de los mismos. En la actualidad, existen muchos estudios sobre fármacos que actúen en la DDR para aumentar dicha especificidad y reducir los efectos secundarios.

**Palabras Claves**— ATM, ATR, Cáncer, DDR, PARP-1, WEE-1.

## 1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, se conocen una gran cantidad de agentes que pueden producir daños en el ADN de diversos tipos: inserción de bases erróneas, delección de bases, desaminaciones, oxidación de bases, formación de enlace covalente entre bases nitrogenadas de la misma cadena, metilación de bases, roturas... entre otras.

Como consecuencia de esto, es necesario que las células detecten dichos daños e inicien un mecanismo transductor para, mientras paran el ciclo celular con el fin de ganar tiempo, repararlos y conseguir que las células continúen su ciclo y se dividan sin replicar los errores que han sufrido.

En respuesta a esta necesidad, surge una red de rutas conocida como respuesta de daño en ADN (DNA damage response, DDR). Consiste en un conjunto de proteínas sensoras, transductoras y efectoras cuyo objetivo es mantener la integridad genómica de la célula, actuando como guardián del genoma.

Uno de los daños más graves por sus potenciales consecuencias y paradigmáticos en los procesos de DDR son las roturas de doble cadena, principalmente por su condición de radicales libres que pueden provocar reordenamientos cromosómicos aberrantes.

En este caso los principales sensores del daño *in situ* son; (i) la familia PIKK (fosfatidilinositol-3 quinasa), la cual incluye proteínas como ATM, ATR o DNA-PK, localizadas en el sitio donde se ha producido el daño y que señalizan mediante una cascada de fosforilación que activa la DDR, y (ii) la familia PARP (poli-ADP-ribosa polimerasa, que se encarga de llevar a cabo la poliadenilación de las cadenas de ADN con el objetivo de señalar el daño y servir de andamio para regular otros factores DDR.

Tras la activación de estos sensores la señal se transduce a diferentes efectores; (i) para modular el ciclo celular son activadas las proteínas CHK2 y CHK1 que, junto a Mdm2 también activadas por DDR, actúan regulando p53, molécula central en procesos de arresto del ciclo celular y

apoptosis. P53 actúa como un oscilador, siendo responsable de decidir si el daño se ha reparado y continúa el ciclo o el daño no se puede reparar y se entra en senescencia replicativa o apoptosis, (ii) para activar la reparación, ATM/ATR activan BRCA1 y NBS1, factores que reducirán la maquinaria necesaria para la reparación del daño en el ADN mediante recombinación homóloga.

La DDR regula, por tanto, procesos que implican diferentes capas de decisión: ejecuta la evaluación del daño, pone en marcha su reparación y procede a retomar el ciclo o pararlo en función del éxito obtenido.

Esta ruta es central para el estudio del desarrollo del cáncer ya que, por lo general, son necesarios fallos en ella para permitir una acumulación de mutaciones y aberraciones cromosómicas que son las que lideran el proceso de malignización de las células [1].

## 2. PATOLOGÍAS RELACIONADAS

### 2.1. Cáncer

Al hablar de cáncer se hace referencia a un conjunto de enfermedades relacionadas. En cualquier tipo de cáncer, algunas de las células del cuerpo empiezan a dividirse sin control pudiendo diseminarse a los tejidos del alrededor.

Las células cancerosas difieren de las normales de diversas maneras que les permiten crecer sin control y volverse invasivas [2].

El cáncer está causado, fundamentalmente, por cambios genéticos en tres grupos principales: proto-oncogenes, genes supresores de tumores y/o genes reparadores de ADN.

No solo las alteraciones descritas en el ADN son importantes para el desarrollo de la enfermedad, sino que también adquiere un papel fundamental en el desarrollo de tumores el transcriptoma [3].

### 2.2 Otras enfermedades

Además del gran impacto que tiene en el desarrollo de cáncer, la DDR está implicada en otras muchas enfermedades, algunas de ellas con una prevalencia bastante baja, las cuales son denominadas enfermedades raras, que

podrían ser tratados con inhibidores de la DDR [4].

### 3. TRATAMIENTO ACTUAL DEL CÁNCER

Hoy en día existen un gran número de fármacos destinados al tratamiento del cáncer. Generalmente, suelen administrarse de manera combinada fármacos que actúen sobre distintas dianas para lograr aumentar la eficacia del tratamiento, disminuir las posibilidades de que aparezcan resistencias y, sobretodo, disminuir la toxicidad, ya que algo que tienen en común todos los antitumorales es el gran número de efectos secundarios que presentan.

Estos fármacos producen su efecto antitumoral a través de diversos mecanismos de acción, entre los que destacan los antineoplásicos que actúan dañando el ADN. A continuación se mencionan algunos de los más empleados actualmente [5]:

#### 3.1 Alquilantes

Los agentes alquilantes actúan dañando el ADN e interfiriendo en la replicación celular, mediante la unión covalente al ADN. Esto provoca un bloqueo en la replicación del ADN y de la transcripción del ARN y, por lo tanto, de la mitosis y de la síntesis de proteínas. Estos fármacos también tienen en común que presentan mielosupresión e inmunosupresión aguda, entre otros efectos adversos.

La ciclofosfamida es el agente alquilante más usado en la actualidad. Se trata de un profármaco, una molécula inactiva que requiere una activación hepática, formando el metabolito activo fosforamida, que está indicado en el tratamiento de diversos tipos de neoplasias como son cáncer de mama, de ovario y sarcomas. Puede presentar cistitis hemorrágica como reacción adversa por la formación de acroleína, lo cual es posible evitar con una ingesta elevada de líquidos durante 24-48 horas [5].

#### 3.2 Antimetabolitos

Los antimetabolitos son un grupo de fármacos que presentan una estructura similar a la de determinados componentes del metabolismo celular, interfiriendo en el proceso de la síntesis de ácidos nucleicos por inhibición competitiva.

El 5-fluorouracilo (5-FU), por ejemplo, es una pirimidina fluorada que inhibe a la timidilato sintetasa por desplazamiento del sustrato natural, bloqueando la síntesis de timidilato, además de incorporarse al ADN y ARN alterando su función. Está indicado como tratamiento coadyuvante en cáncer de mama, colorrectal y gástrico principalmente. Produce como efecto secundario mielosupresión y síndrome palmo-plantar, además de cardiotoxicidad dosis-independiente [5].

#### 3.3 Antibióticos citotóxicos

Este tipo de fármacos son compuestos naturales producidos principalmente por hongos capaces de alterar el crecimiento de otras células mediante diversos mecanismos de acción.

El antibiótico citotóxico más empleado es la doxorubicina,

el cual está indicado en diversos tipos de tumores como por ejemplo leucemias agudas y carcinoma de mama y ovario. El mecanismo de acción de este fármaco de la familia de las antraciclinas se basa en inhibir la síntesis de ADN y de ARN por unión al ADN. Además de las reacciones adversas comunes entre la mayoría de los antineoplásicos, este fármaco presenta cardiotoxicidad a dosis elevadas [5].

#### 3.4 Derivados del platino

Un grupo muy importante de fármacos en el tratamiento del cáncer son los derivados del platino, los cuales actúan formando enlaces cruzados muy estables con el ADN, provocando una alteración de la configuración tridimensional del ADN, la producción de errores de transcripción e impidiendo que las dos hebras puedan separarse para ser reparadas. Dentro de este grupo de anticancerosos, cabe destacar a dos de ellos, el cisplatino y el carboplatino, dos fármacos con mecanismos de acción y actividad antitumoral similares pero con distinto perfil toxicológico. El cisplatino tiene una toxicidad variada e importante, siendo el fármaco antitumoral más nefrotóxico, además de producir ototoxicidad, nefropatía periférica, neuropatía, trombopenia y anemia moderada. A pesar de ello, es muy usado por su amplio espectro de actividad y se ha convertido en un fármaco fundamental en el tratamiento de tumores germinales.

El carboplatino es diez veces más soluble que el cisplatino, lo que facilita su eliminación renal, disminuyendo así sus efectos adversos, entre los que destaca la mielosupresión. Su principal indicación es como tratamiento de primera o segunda línea del carcinoma de origen epitelial del ovario [5].

### 4. NUEVAS ESTRATEGIAS

Se ha visto en algunos estudios que las células madre cancerosas muestran un DDR aumentado y que suelen ser resistentes al tratamiento con radioterapia y quimioterapia, y podrían presentar propiedades únicas de su maquinaria DDR. Es por ello que se ha empezado a pensar en la inhibición de los mecanismos DDR como nueva diana terapéutica que podría aumentar la eficacia del tratamiento con radio y quimioterapia y actualmente ya existen fármacos inhibidores del DDR que se encuentran en fase preclínica y clínica [6].

Las diferentes vías de reparación del ADN pueden solaparse, lo que conlleva a que el déficit de una de ellas pueda ser suplementada por otra vía distinta. La gran mayoría de las células cancerosas carecen de uno u otro mecanismo del DDR, debido principalmente a las presiones selectivas que ocurren durante la evolución del tumor. Es por ello por lo que se ha considerado el uso de inhibidores de vías específicas del DDR, ya que estos fármacos deberían presentar un mayor efecto sobre células cancerosas que en células sanas (Fig. 1) [4].

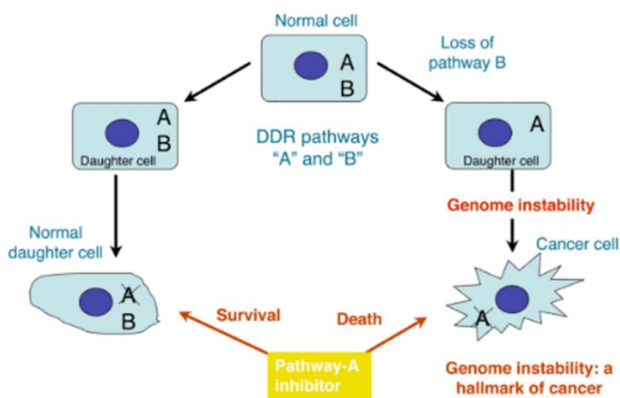


Fig. 1. Mecanismo de acción de los fármacos inhibidores de la DDR.

#### 4.1. Inhibidores de PARP-1

Un ejemplo claro de este tipo de fármacos son aquellos dirigidos a la enzima PARP-1. Esta enzima participa en la vía de reparación por escisión de base (BER), catalizando la poli ADP-ribosilación de proteínas involucradas en el metabolismo del ADN.

Los inhibidores de PARP-1 son relativamente no tóxicos para las células humanas pero son citotóxicos para las células que presentan una deficiencia en la vía DDR de recombinación homóloga (RH), más concretamente, en aquellas células dañadas en BRCA1 o BRCA2, que son las células cancerosas que encontramos en el cáncer de mama y de ovario [4].

Uno de estos fármacos, el olaparib, se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase 2 para probar su uso en pacientes BRCA-defectivos con cáncer de mama y de ovario. Cabe destacar que se han visto casos de otros tipos de cáncer como de próstata y de páncreas, RH-deficientes debido a una mutación o inactivación epigenética de los componentes que participan en esta vía de reparación del ADN, por lo que podría ser útil el uso de inhibidores de PARP en otros tipos de cáncer [7].

#### 4.2. Inhibidores de WEE-1

Los inhibidores de la tirosin quinasa WEE-1 presentan también actividad de sensibilización antineoplásica. AZD1775, un fármaco que se encuentra bajo estudio por la empresa AstraZeneca, inhibe de manera selectiva a WEE-1, una tirosin quinasa encargada de fosforilar a la quinasa dependiente de ciclina 1 (CDK1 o CDC2) para inactivar al complejo ciclina B/CDK1. La inhibición de WEE-1 evita la fosforilación de CDK1 y deteriora el "checkpoint" G2 de daño en el ADN, que junto con la administración de agentes quimioterapéuticos, pueden conducir a la apoptosis celular [8], [9], [10].

A diferencia de las células normales, la mayoría de los cánceres humanos con p53 deficiente o mutado carecen del "checkpoint" G1 debido a que p53 es clave para su correcto funcionamiento. Esto supone que estas células necesitan del "checkpoint" G2 para realizar el mecanismo de DDR. Por lo tanto, la inhibición del "checkpoint" G2

mediante los inhibidores de WEE-1 convertirían a las células tumorales p53 deficientes en células más sensibles a los agentes antineoplásicos, aumentando su efecto citotóxico y reduciendo los efectos secundarios que se producen debido a la inespecificidad de los tratamientos actuales [8].

#### 4.3. Inhibidores de ATM

ATM (ataxia telangiectasia mutado) es un gen localizado en el cromosoma 11 y que codifica para la proteína ATM serina/treonina quinasa implicada en la regulación de los procesos de control de la división celular y en la reparación de daños sufridos en el ADN. Este gen es capaz de fosforilar dianas diferentes, como p53 y proteínas de reparación del ADN lo que produce una pausa en el ciclo celular y una estimulación de vías de reparación de ADN, respectivamente. Por otro lado, es capaz de activar a CHECK2, punto de control del ciclo celular quinasa 2, como respuesta a roturas en la doble cadena de ADN [11], [12].

Las mutaciones en este gen provocan una enfermedad conocida como ataxia-telangiectasia, además de una predisposición a la aparición de ciertos tipos de cáncer (estómago, vejiga, páncreas, pulmón y ovario) [11], [12].

Existen inhibidores de ATM específicos con gran potencial que se encuentran en estudios preclínicos. Cabe destacar:

- **KU-55933**. Bloquea la fosforilación de H2AX, NBS1 y Chk1. Es bastante específico y presenta un mecanismo de acción competitivo [13].
- **CGK733**. Inhibe a ATM y ATR, bloqueando paradas en el ciclo celular.
- **CP466722**. Inhibe ATM y las dianas donde actúa.

Algunos estudios llevados a cabo en ratón han puesto de manifiesto que existe una respuesta diferente a la inhibición de ATM dependiendo del tejido en cuestión. Se piensa que una de las posibles soluciones se encuentra en la Nanomedicina: controlar la liberación de los fármacos mediante transportadores (como por ejemplo, Telomelysin) con capacidad de diana tumoral [11], [12].

#### 4.4. Inhibidores de ATR

Al igual que ATM, ATR se activa por daños provocados en el ADN. Participa, junto con el anterior, en la regulación de procesos de control de la división celular y en procesos de reparación. ATM y ATR son quinasas que se encuentran muy relacionadas entre sí, perteneciendo a la misma familia de enzimas [14].

Las mutaciones en ATR provocan enfermedades como Síndrome de Seckel y/o una mayor predisposición a sufrir ciertos tipos de cáncer (orofaríngeo, fundamentalmente).

Algunos de los inhibidores de ATM, debido a su actividad conjunta, también pueden usarse para inhibir ATR (CGK733). Estos inhibidores son más tóxicos para tumores p53-deficientes que para tejidos sanos. Estudios re-

cientes han demostrado que existen inhibidores de ATR que aumentan su eficacia cuando los tumores tienen niveles elevados de la proteína CDC25A. Para poder superar la resistencia a estos inhibidores en las células CDC25A-deficientes, se promueve la entrada prematura en mitosis con algún otro compuesto, como por ejemplo inhibidores WEE-1 [15].

## 5. CONCLUSIONES

Actualmente existen una gran cantidad de fármacos destinados al tratamiento de los distintos tipos de cáncer. Estos fármacos actúan con diferentes mecanismos para lograrlo pero todos los antineoplásicos que se usan hoy en día presentan el mismo problema para el paciente; un gran número de reacciones adversas debido principalmente a la inespecificidad de estos tratamientos a la hora de diferenciar entre células tumorales y normales.

Por ello, parece ser una imperiosa necesidad el estudio de nuevas líneas de tratamiento del cáncer que presenten una mayor especificidad, afectando a un menor número de células normales, como es el caso de los inhibidores de la DDR.

Con el descubrimiento de este nuevo tipo de fármacos anticancerosos, podría ser de utilidad desarrollo de nuevos procedimientos de diagnóstico y de estudio para identificar diferencias en los mecanismos DDR entre las células normales y las células tumorales de los distintos tipos de cáncer para poder obtener un tratamiento más específico para cada tipo de tumor.

Además, estos inhibidores de la DDR podrían ser la solución para el tratamiento de un gran número de enfermedades raras que aún no disponen de uno eficaz.

## REFERENCIAS

- [1] F. Fagagna, T. Soo-Hwang and S. P. Jackson. "Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response". *Genes & Development*, vol. 18, no. 15, pp. 1781-1799, Aug 2015. doi:10.1101/gad.1214504.
- [2] Web del National Cancer Institute (NCI). <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>
- [3] E. Sebestyén, B. Singh, B. Miñana, A. Pagès, F. Mateo, M.A. Pujana, J. Valcárcel and E. Eyra, "Large-scale analysis of genome and transcriptome alterations in multiple tumors unveils novel cancer-relevant splicing networks". *Genome Research*, Apr 2016, doi:10.1101/gr.199935.115.
- [4] S. P. Jackson and J. Bartek. "The DNA-damage response in human biology and disease". *Nature*, vol. 461, no. 7267, pp. 1071-1078, Oct 2009, doi:10.1038/nature08467.
- [5] J. Benedí and M.A. Gómez, "Fármacos antineoplásicos (I)", *Farmacia Profesional*, vol. 20, no. 2, pp. 60-65, Feb 2006.
- [6] I. Ahel, D. Ahel, T. Matsusaka, A. J. Clark, J. Pines, S. J. Boulton and S. C. West, "Poly(ADP-ribose)-binding zinc finger motifs in DNA repair/checkpoint proteins," *Nature*, vol. 451, no. 7174, pp. 81-85, Jan 2008, doi:10.1038/nature06420.
- [7] J. Murai, S.Y. Huang, B.B. Das, A. Renaud, Y. Zhang, J.H. Doroshow, J. Ji, S. Takeda and Y. Pommier. "Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors". *Cancer Res.*, vol. 72, no. 21, pp. 5588-5599, Nov 2012, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2753.
- [8] Web del National Cancer Institute (NCI). <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug?cdrid=594147>
- [9] S. Mueller and D.A. Haas-Kogan. "WEE1 Kinase As a Target for Cancer Therapy". *Journal Of Clinical Oncology*, vol. 33, no. 30, pp. 3485-3487, Oct 2015, doi:10.1200/JCO.2015.62.2290.
- [10] L.E.M. Vriend, P.C. De Witt, C.J.F. Van Noorden and T. Würdinger. "WEE1 inhibition and genomic instability in cancer," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1836, no. 2, pp. 227-235, Dec 2013, doi:10.1016/j.bbcan.2013.05.002.
- [11] I. Hickson, Y. Zhao, C.J. Richardson, S.J. Green, M.B. Martin, I. Orr, M. Reaper, P. Jackson, J. Curtin and C.M. Smith, "Identification and Characterization of a Novel and Specific Inhibitor of the Ataxia - Telangiectasia Mutated Kinase ATM," *Cancer Research*, vol. 64, no. 24, pp. 9152-9159, Dec 2004, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2727.
- [12] S. Kuroda, Y. Urata and T. Fujiwara, "Ataxia-Telangiectasia Mutated and the Mre11-Rad50-NBS1 Complex: Promising Targets for Radiosensitization," *Acta Med. Okayama*, vol. 66, no. 2, pp. 83-92, Apr. 2012.
- [13] M.E. Hammond and J. Muschel, "Radiation and ATM inhibition: the heart of the matter," *Clin Invest.*, vol. 124, no. 8, pp. 3289-3291, Aug 2014, doi:10.1172/JCI77195.
- [14] K. Abbas and N. Fausto, *Patología Humana*. Elsevier. pp. 201-202, 2008.
- [15] S. Ruiz, C. Mayor-Ruiz, V. Lafarga, M. Murga, M. Vega-Sendino, S. Ortega and O. Fernandez-Capetillo, "A Genome-wide CRISPR Screen Identifies CDC25A as a Determinant of Sensitivity to ATR Inhibitors," *Molecular Cell.*, vol. 62, pp. 1-7, Apr 2016, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.006>.



**Pedro Jesús García Murillo** recibió el Grado en Farmacia por la Universidad de Sevilla en 2015 y un curso certificado por el MIT sobre "Ensayos para el estudio de los mecanismos de replicación y reparación del ADN". Actualmente está realizando el primer curso del Máster de Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide.



**Carmen María González Galán** recibió el Grado en química por la Universidad de Huelva en 2015. Actualmente está realizando el primer curso del Máster de Biotecnología Sanitaria en la Universidad Pablo de Olavide.

# Análisis físico-químico del agua de la Dársena del río Guadalquivir

Adrián Rivero Martínez

**Resumen**—Se ha llevado a cabo el análisis físico-químico de las aguas de la Dársena del Guadalquivir para determinar la calidad de la misma así como el conocimiento de resultados que puedan indicarnos posibles afecciones a estas aguas y determinar aquellas actividades que la perjudican, poniendo de manifiesto la mejora y control de la Dársena para solucionar los problemas derivados.

**Palabras Claves**—Análisis físico-químico, Dársena, fitoplancton, zooplancton, composición iónica, nutrientes, grado trófico

## 1. INTRODUCCIÓN

El Río Guadalquivir, con una longitud de unos 657 km, se encuentra principalmente distribuido por el territorio andaluz, nace en Cañada de las Fuentes (Jaén) y desemboca en Sanlúcar de Barrameda (Cádiz), transcurriendo por las provincias de Córdoba, Almería, Granada, Málaga, Sevilla y Huelva. La zona objeto de estudio se encuentra en Sevilla, la llamada Dársena del Guadalquivir, mostrada en la figura 1, correspondiendo al antiguo cauce del río Guadalquivir, que fue cegado en el norte de Sevilla, quedando en sus márgenes el puerto de Sevilla y el tapón de San Jerónimo, evitando así el riesgo de avenidas del río que ocasionarían inundaciones en la población cercana al mismo. La Dársena es, por tanto, un brazo ciego del río, con una longitud de 13.5 km y que conecta con el puerto de Sevilla mediante una esclusa que permite la entrada y salida de barcos turísticos y mercantiles así como el uso de diferentes actividades deportivas. El comportamiento de esta masa de agua se asemeja más a la de un lago que a la de un río.

En 1973, se comenzó a estudiar el riesgo de contaminación en la Dársena, principalmente, cuando se abrió la esclusa, debido a que muy cerca desembocaba el río Guadaíra. Se estudió la posibilidad de desviar el río Guadaíra (1980) para así reducir la contaminación recibida evitando el exceso de nutrientes y provocando un aumento del oxígeno. Además, la desviación del Guadaíra permitió conocer otras perturbaciones que quedaban enmascaradas por el río, como son los efectos del dragado, la presencia de barcos que generan pequeños vertidos y los residuos periódicos (molienda del aceite y azúcares [1]). También han surgido problemas en cuanto a la disminución general de la diversidad de peces a lo largo del río Guadalquivir como muestra el estudio [2]. También debemos tener en cuenta otros efectos sobre la Dársena como la influencia del proyecto de ampliación del dragado, y efectos sobre la flora y fauna.

El muestreo en la Dársena del Guadalquivir así como la identificación, de problemas se ha detallado en diferentes estudios como [1] y [2], así como el propio muestreo rea-

lizado en la pasarela que muestra la figura 2 y su posterior estudio realizado.

Este artículo muestra la calidad en la que se encuentran las aguas de la Dársena del río Guadalquivir, que podría verse afectada por la población. Por ello, se ha realizado un análisis de las aguas para conocer el comportamiento de la Dársena, las características físico-químicas que presenta, para conocer si hay o no contaminación, y ver como afectarían, en cuanto a eutrofia, posibles vertidos, como la contaminación difusa por el uso de fertilizantes en la cuenca del Guadalquivir.

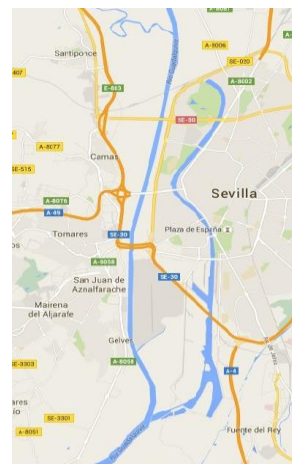


Fig. 1. Dársena del Guadalquivir.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Muestreo *In situ*

Se ha llevado a cabo un muestreo en una de las pasarelas situadas junto al Club Náutico de Sevilla, el día 16 de Noviembre (Otoño), comenzando a las 09:30 y finalizado a las 11:30 horas solares, con unas condiciones meteorológicas estables, viento poco considerable y con actividad solar poco intensa.



Fig. 2. Lugar de muestreo



Los parámetros tomados *in situ* son los siguientes:

### 1. Parámetros Abióticos.

- **Temperatura:** Mediante el uso de una sonda multiparamétrica portátil (Hatch, modelo 5424).
- **pH:** Mediante la sonda multiparamétrica portátil (Hatch, modelo 5424).
- **Transparencia:** Para medir la profundidad a la que penetra la luz en el agua se utiliza el disco de Secchi blanco/negro de 20 cm.
- **Oxígeno disuelto:** Se utilizó una sonda multiparamétrica portátil (Hatch, modelo 5424).
- **Conductividad:** Se toma por medio de una sonda multiparamétrica portátil (Hatch, modelo 5424).

### 2. Parámetros Bióticos.

- **Microorganismos:** se recogieron mediante una red de nival de 50  $\mu$  y unas botellas de polipropileno con capacidad para 1 l. Se llevaron a cabo dos tipos de muestreo de los microorganismos:
  - \* Cualitativo: Se utilizó una red de nival de 50  $\mu$  y se introdujo en el agua a la profundidad que permitió la cuerda a la que estaba unida, con esta luz de malla los microorganismos más pequeños podrían escapar. Posteriormente se cogió una pequeña muestra y se fijó con un poco de formol al 4% para matar a los microorganismos y se agita para comprobar que todos sedimentan al fondo.
  - \* Cuantitativo: Parte de la muestra anterior, se separó en un frasco de color para evitar la degradación de las muestras y se añadió lugol para preservar los microorganismos.

## 2.2. Medidas Ex situ

Las siguientes medidas se realizaron en los laboratorios de la Universidad Pablo de Olavide minutos después del muestreo en la Dársena, extendiéndose a lo largo de una semana debido al requerimiento temporal de algunas medidas.

### 1. Parámetros Abióticos.

Se realizó el siguiente análisis químico:

- **Reserva alcalina:** Mediante titulación con ácido sulfúrico (APHA, 1985).
- **Cloruros:** Método argentométrico (APHA, 1985).
- **Sulfatos:** Los iones sulfato reaccionan con cloruro de bario en soluciones acuosas y forman sulfato de bario, que es difícilmente soluble. La turbidez resultante se mide mediante fotometría (Merck 14564).
- **Dureza total (calcio y magnesio):** Método titulométrico de EDTA, APHA, 1985). Usó de EDTA 0.01M para conocer el contenido en calcio.
- **Sodio y potasio:** Por medio de cromatografía iónica (APHA, 1992). Si no se dispone de la técnica, podría utilizarse la siguiente fórmula:  

$$Na^+ + K^+ = (Reserva\ alcalina + SO_4 + Cl) - (Ca^{+2} + Mg^{+2})$$
- **Fósforo:** Los iones fosfatos reaccionan en solución ácida con iones molibdato antimonio formando un complejo antimonilfosfomolibdato que, mediante ácido ascórbico, se reduce a azul de fosfomolibdeno. Adaptación del método del fosfomolibdato (Murphy & Riley) para medida colorimétrica (Merck 14842).
- **Nitratos:** En soluciones que contienen ácidos sulfúrico y fosfórico los iones nitrato reaccionan con 2.6-dimetilfenol formando 4-nitro-2.6-dimetilfenol. (Merck 14773).

- **Nitritos:** En solución ácida los nitritos reaccionan con aminas aromáticas primarias formando sales de diazonio. Éstas forman junto con compuestos aromáticos que contienen un grupo amino o un grupo hidroxilo, colorantes azoicos intensamente coloreados. (Merck 14776).
- **Amonio:** Los iones amonio reaccionan, a un pH de 12.6 con iones hipoclorito e iones salicilato, en presencia de nitroprusiato como catalizador, formando azul de indofenol. (Merck 14752)
- **Silicato reactivo:** En una solución ácida, el ácido silícico reacciona con el molibdato amónico formando ácido silico-molibdico de color amarillo. La adición de un agente reductor provoca coloración azul. (Merck 14794)
- **Demanda Química de Oxígeno (DQO):** Oxidabilidad al permanganato (APHA, 1985).
- **Sólidos:** Sólidos por diferencia de pesada (APHA, 1992).

### 2. Parámetros Bióticos.

- **Fitoplancton:** Mediante este análisis obtuvimos la concentración de pigmentos fotosintéticos. Se tomó una muestra de un litro de agua de la Dársena (el volumen a filtrar puede variar según la cantidad de fitoplancton presente en el agua) y filtramos mediante un filtro WHATMAN GF/C que colocamos en la bomba de vacío. Una vez filtrado, quitamos el filtro de la bomba de vacío y lo introducimos en un tubo de ensayo y añadimos metanol (o acetona 90%) hasta cubrir el filtro para matar microorganismos y romper las estructuras fotosintéticas para obtener la clorofila. Seguidamente cubrimos el tubo de ensayo con papel de plata para evitar la degradación de la clorofila y se introdujo en una nevera durante 24 horas. Tras pasar el tiempo necesario se colocó un tubo milimetrado en la bomba de vacío para controlar el volumen extractante y se volvió a filtrar con otro filtro para eliminar los restos de las estructuras fotosintéticas, así como todo el disolvente utilizado, usando una jeringuilla para exprimir el filtro y hacemos con todo el disolvente (anotamos el volumen extraído). Posteriormente, utilizamos el espectrofotómetro, donde con la ayuda de una cubeta realizamos un blanco, es decir, metimos agua destilada en la cubeta y lo introducimos en el espectrofotómetro para calibrarlo y luego se hizo un barrido a 430 nm, 665 nm y 750 nm, para determinar el máximo de absorción de pigmentos amarillos, clorofila a y la turbidez de la muestra respectivamente. Se calculó mediante la siguiente fórmula:  

$$mg\ Clorofila\ a/m^3 = 13.9 \times (DO_{665} - DO_{750}) \times V_{extractante}(ml) / V_{total\ de\ la\ muestra}(l)$$
 Calculamos el índice de Margalef que nos permite relacionar las clorofilas con pigmentos amarillos:  

$$Índice = DO_{430} - DO_{750} / DO_{665} - DO_{750}$$

## 3. RESULTADO Y DISCUSIÓN

### 3.1. In situ

Mediante los datos representados en la tabla 1.a, se identificó una temperatura homogénea en relación con la profundidad, puesto que el muestreo se llevó a cabo en Otoño, por lo que generalmente, el viento actúa sobre la masa de agua provocando una mezcla entre el epilimnion e

hipolimnion, evitando así la formación de una termoclina. Esta determinación se vió reforzada por la concentración homogénea de oxígeno a lo largo de la columna de agua, ya que al ser homogénea nos informa que no existe termoclina y el oxígeno se difunde por toda la masa de agua, llegando a zonas más profundas. Además, en la mezcla de la columna de agua, influye la navegación por la Dársena.

TABLA 1.a

Valores *in situ* tomados con la sonda multiparamétrica en una de las pasarelas de la Dársena hasta 2'5 metros de profundidad.

	0m	0.5m	1m	1.5m	2m	2.5m
T° (°C)	18.8	19.3	19.3	19.3	19.3	19.2
O2 (mg/l)	5.82	5.80	5.79	5.81	5.81	5.81
O2 (%)	66.5	66.1	65.9	66.1	66.1	66.1

En cuanto al pH del agua de la Dársena recogido en la tabla 1.b, nos indica que es propio de aguas básicas, es decir, un pH propio de aguas con muchas sales y, en principio con una mayor proporción en bicarbonatos que en carbonatos, puesto que presenta un pH superior a 7 pero inferior a 8.3.

TABLA 1.b

Valores *in situ* tomados con la sonda multiparamétrica en una de las pasarelas de la Dársena hasta 2'5 metros de profundidad.

	0m	0.5m	1m	1.5m	2m	2.5m
pH	8.14	8.19	8.19	8.18	8.18	8.17

TABLA 2. Valores *in situ* (2).

Transparencia tomada mediante el disco de Secchi blanco/negro de 20 cm y medida de la conductividad con sonda multiparamétrica.

Transparencia	0.6m	
Conductividad (µS/cm)	2069	1300 mg/l Sales

La información relevante a la tabla 2 permite conocer la profundidad a la que es viable la fotosíntesis, considerando que la luz visible penetra en la columna de agua hasta una profundidad de 0.6 m tomada por el disco de Secchi, por lo que calculamos el límite de compensación de la luz (LCL) mediante la siguiente fórmula:  $Z_{LCL} = (\ln 100 - \ln 1) / (1.7/Dm)$ ; donde Dm es la profundidad a la que deja de verse el disco.  $Z_{LCL} = (\ln 100 - \ln 1) / (1.7/0.6) = 1.63$  metros, indicando la profundidad a la que la fotosíntesis en la masa de agua se iguala a la respiración. Por encima de dicha profundidad predomina la fotosíntesis y por debajo la respiración, delimitada por la penetración de la luz solar.

Sobre el valor obtenido para la conductividad, observamos que son aguas con una considerable carga iónica, por lo que nos lleva a pensar que Sevilla, al encontrarse a nivel del mar y que debido a los dragados que se llevan a cabo, es muy probable la intrusión del domo salino. Esto

provoca un aumento considerable de sales en las aguas de la Dársena. Para tener una idea aproximada, la concentración en sales de un agua dulce es muy heterogénea de 1-2 g/l y en agua de mar de unos 35 g/l aproximadamente, mientras que en la Dársena encontramos 1.3 g/l, cantidad que podría aumentar con el dragado.

### 3.2. Ex situ

Si comparamos los valores obtenidos en la tabla 3, se observa una alcalinidad baja, lo que se traduce en aguas sensibles frente a cambios en el pH de la misma, puesto que actúa como amortiguador del pH, es decir, permite al agua responder de manera reguladora frente a casuales vertidos que modifiquen el pH del agua.

TABLA 3.

Análisis Físico-químico en el laboratorio

Análisis de Laboratorio	Medias	Unidad
Reserva alcalina	3.11	meq/l
Dureza Total	479.5	mg/l
Oxidabilidad	8.24	mg/l
Sólidos Totales	1631	mg/l
Sólidos Totales Minerales	1304	mg/l
Sólidos Totales Volátiles	327	mg/l
Sólidos Totales en Suspensión	16.01	mg/l
Sólidos en Suspensión Minerales	12.04	mg/l
Sólidos en Suspensión Volátiles	6.23	mg/l
Clorofila a	6.36	mg/m <sup>3</sup>
Índice de Margalef	2.70	

En cuanto a la oxidabilidad, presenta valores aptos para la vida piscícola (>4 mg/l), que además está relacionada con la clorofila, ya que los valores de oxígeno disuelto en agua obtenidos nos indican que existe actividad fotosintética por el fitoplancton, liberando oxígeno al medio, siendo vital para establecer las comunidades de la masa de agua. Además el oxígeno disuelto ha ido aumentando en la Dársena desde aquellos problemas en 1980, alcanzando los valores establecidos por el Reglamento de la Calidad de Aguas para el río Guadalquivir. Cuestionando los sólidos analizados, la mayoría corresponden a la fracción mineral, lo que nos indica que no existe un gran aporte de materia orgánica.

TABLA 4.

Tabla de la composición salina de la masa de agua en función de sus iones representados en porcentajes.

Cationes	meq/l	%	Aniones	meq/l	%
Ca <sup>+2</sup>	4.81	23.54	Cl <sup>-</sup>	9.98	58.16
Mg <sup>+2</sup>	4.77	23.35	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	4.07	23.72
Na <sup>+</sup>	10.24	50.12	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3.11	18.12
K <sup>+</sup>	0.61	2.99			
Total	20.43	100	Total	17.16	100

En cuanto a la tabla 4, es importante observar el alto porcentaje de Na<sup>+</sup> y de Cl<sup>-</sup>.

A continuación se representa la tabla 4 mediante el gráfico circular (figura 3) para una mejor interpretación de los resultados obtenidos:

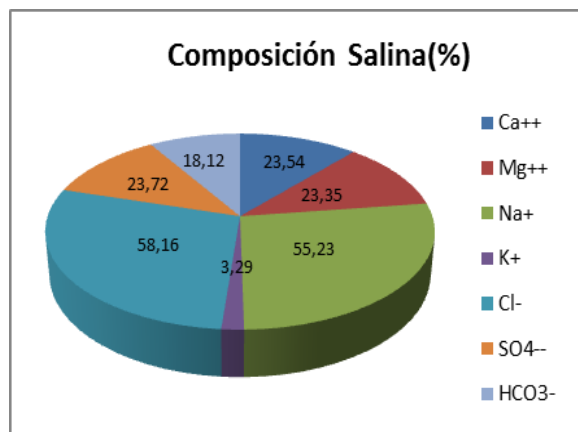


Fig. 3. Composición salina por gráfico circular

En vista de los resultados obtenidos, se determinó que las aguas de la Dársena del Guadalquivir se componen principalmente de cloruro sódico, propio de aguas salinas, determinando que se trata de aguas muy duras, con valor de 479.5 mg/l CaCO<sub>3</sub> (>300 mg/L CaCO<sub>3</sub>, según OECD, 1982).

Identificando los nutrientes en el agua de la Dársena, mediante la tabla 5.a, percibimos un aporte de nitratos que superan los parámetros establecidos por el Reglamento de Calidad de Aguas para el Río Guadalquivir (14 mg/L), lo que repercute en el desarrollo de productores primarios principalmente, haciendo que aumenten en densidad, siendo estos parámetros vitales para el desarrollo de la vida en estas aguas.

TABLA 5.a  
Análisis de nutrientes de la masa de agua

Nutrientes	Medidas	Unidad
NO <sub>3</sub>	13.28	mg/l

TABLA 5.b  
Análisis de nutrientes de la masa de agua

Nutrientes	Medidas	Unidad
NO <sub>2</sub>	0.51	mg/l
NH <sub>4</sub>	0.37	mg/l
PO <sub>4</sub> -3	0.17	mg/l
Si	2.24	mg/l

El contenido de nitritos, amonio, fosfatos y sílice de la tabla 5.b, se encuentran dentro de los parámetros establecidos por el Reglamento de la Calidad de Aguas para el Río Guadalquivir.

- Fitoplancton:

En cuanto a los organismos fitoplanctónicos identificados por medio de [3-18] y la distribución de estos en la tabla 6,

se observa una predominancia de diatomeas y algas verdes que se ve correspondida con el valor obtenido en el índice de Margalef. Entre 2-3 se observarían un predominio de algas verdes, clorofitas principalmente, y entre 3-3.5 un predominio de Diatomeas, pero al encontrarse el valor cercano a 3 es probable encontrar predominancia de clorofitas en estado maduro o Diatomeas en expansión logarítmica.

Algunas de las especies fitoplanctónicas de la tabla son bioindicadoras del estado de eutrofia de los ecosistemas acuáticos de agua dulce. Además, definen algunas características que presenta la masa de agua en cuestión, como por ejemplo: *Pediastrum boryanum*, *Coelastrum microporum*, *Euglena spirogyra* y *Phacus triquetter*, se encuentran en aguas estancadas o de poca corriente, e incluso en embalses, lagos y ríos en su curso bajo, bien de agua dulce, agua subsalina o incluso algunas de ellas en aguas hipersalinas, soportan niveles medios y altos de contaminación y algunas se desarrollan mejor en sistemas con aportes considerables de materia orgánica. En definitiva, todas aparecen en sistemas acuáticos meso o eutróficos.

TABLA 6.  
Inventario del fitoplancton obtenido en la Dársena, identificado por grupos

<b>Algas Azules</b>	<i>Lyngby alimnética</i> , <i>Oscillatoria rubescens</i> , <i>Oscillatoria agardhii</i>
<b>Algas Verdes</b>	<i>Ankistrodesmus falcatus</i> , <i>Coelastrum microporum</i> , <i>Oedogonium capillare</i> , <i>Pediastrum boryanum</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i>
<b>Euglenofitos</b>	<i>Euglena sanguinea</i> , <i>Euglena spirogyra</i> , <i>Phacus triquetter</i> , <i>Trachelomonas volvocina</i>
<b>Diatomeas</b>	<i>Bacillaria paxillifer</i> , <i>Cyclotella meneghiniana</i> , <i>Fragilaria construens</i> , <i>Gyrosigma</i> , <i>Gomphonema sp</i> , <i>Navicula sp</i> , <i>Nitzschia sp</i> , <i>Stephanodiscus astraes</i> , <i>Tabellaria fenestrata</i>

TABLA 7.  
Inventario del zooplancton obtenido en la Dársena, identificado por grupos

<b>Ciliados</b>	<i>Codonella cratera</i> , <i>Tintinopsis lacustris</i>
<b>Rotíferos</b>	<i>Hexarthra fennica</i> , <i>Lecane sp</i> , <i>Polyarthra remata</i> , <i>Testudinella</i>
<b>Cladóceros</b>	<i>Ceriodaphnia quadrangula</i> , <i>Ceriodaphnia reticulata</i> , <i>Diaphanosoma mongolianum</i>
<b>Copépodos</b>	<i>Acanthocyclops robustus</i> , <i>Cletocamptus retrogressus</i> (además sus fases nauplios y copepoditos)

- Zooplancton:

Algunas de las especies zooplanctónicas de la tabla 7 son bioindicadoras del estado de eutrofia de los ecosistemas acuáticos de agua dulce, y definen algunas características que presenta la masa de agua, como *Hexarthra fennica*, *Testudinella*, *Ceriodaphnia quadrangula*, *Ceriodaphnia reticulata*, *Diaphanosoma mongolianum*, *Acanthocyclops robustus* o *Cletocamptus retrogressus*, se encuentran preferentemente en aguas permanentes claras o turbias, cálidas y con grado considerable de salinidad aunque también se pueden

encontrar en aguas meso o eutróficas. Es importante considerar la especie *Acanthocyclops robustus*, puesto que ataca a larvas de peces y podría considerarse un factor de riesgo para las piscifactorías.

En cuanto a la información obtenida en [2, 19-20] y el estudio propio realizado en el laboratorio se pudo clasificar el agua de la Dársena como Zona  $\beta$ -mesosaprobia, por lo que se consideran aguas contaminadas moderadamente con predominio de algas dorofíceas según el dato obtenido por el índice de Margalef, al encontrarse proporción de pigmentos verdes y amarillos cerca del equilibrio.

Además, la presencia de rotíferos, cladóceros y ciliados nos indican que el agua podría presentar un estado de eutrofia generalmente.

#### 4. CONCLUSIONES

A partir del estudio realizado sobre la Dársena, podemos deducir que presenta un comportamiento propio de un lago monomítico cálido u holomítico debido a que presenta un periodo de mezcla anual de sus aguas (otoño-invierno-primavera). En vista de los análisis realizados concluimos que con el paso de los años, la Dársena se ha ido recuperando, puesto que en nuestro análisis físico-químico se observa una reducción considerable de los nutrientes. Además, la oxidabilidad es alta, y por tanto propicia para el desarrollo de la vida en el agua, y ello proviene de una gran actividad del fitoplancton presente en sus aguas. El mayor problema detectado actualmente es la alta salinidad, que proviene de las aguas más salinas que entran a la Dársena cuando se abre la esclusa para el paso de los barcos. La alta concentración de cloruros que presenta la masa de agua, nos indica una menor tendencia a la eutrofización, puesto que además la dureza del agua, nos indica que se trata de aguas duras, corrigiéndose así el problema de eutrofización que arrastraba hace años. Su situación actual puede empeorar si se llevan a cabo actividades con un mal control que perjudiquen a la Dársena, como podría ser el dragado, que conlleva a una retirada del sedimento del fondo del río y por tanto a una posible intrusión de aguas salinas, aumentando aún más la salinidad y perjudicando el desarrollo de la vida en la Dársena.

Otro problema que aún persiste en la Dársena es la contaminación difusa propiciada por un aporte excesivo de nitratos que provienen de la intensa actividad agrícola y que podría aumentar el nivel trófico del sistema acuático si no se realiza un control de dichos aportes.

#### REFERENCIAS

- [1] González-Rull J. A., Toja J. & Ramos D. 1984. Recuperación de la dársena del Guadalquivir tras la eliminación de su mayor fuente de contaminación. *Limnética* 1: 256-262
- [2] Distribución del estado de conservación de los peces dulceacuícolas del río Guadalquivir (Fernández-Delgado et al., 2008)
- [3] <http://www.glerl.noaa.gov/seagrant/GLWL/Algae/Cyanophyta/Cyanophyta.html>
- [4] <http://www.plingfactory.de/Science/Atlas/Kennkarten%20Algen/Chlorophyta/source/Binuclearia%20sp.2.html>
- [5] [http://www.oilgae.com/ref/glos/ankistrodesmus\\_falcatus.html](http://www.oilgae.com/ref/glos/ankistrodesmus_falcatus.html)
- [6] [http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Cyanobacteria/cyano\\_filaments/cyano\\_unbranched\\_fil/untapered\\_filaments/no\\_heterocysts/no\\_vis\\_sheath/OSCILLATORIA/Oscillatoria\\_Image\\_page.html](http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Cyanobacteria/cyano_filaments/cyano_unbranched_fil/untapered_filaments/no_heterocysts/no_vis_sheath/OSCILLATORIA/Oscillatoria_Image_page.html)
- [7] <http://www.respyn.uanl.mx/xii/2/articulos/Actividadnuevaintiespasmodica.htm>
- [8] [http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/mastigophora/euglena/sanguinea/sanguinea\\_4.html](http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/mastigophora/euglena/sanguinea/sanguinea_4.html)
- [9] [http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/chlorophyta/pediastrum/boryanum/sp\\_04.html](http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/chlorophyta/pediastrum/boryanum/sp_04.html)
- [10] [http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/mastigophora/euglena/spirogyra/var\\_02/spirogyra3d.html](http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/mastigophora/euglena/spirogyra/var_02/spirogyra3d.html)
- [11] [http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/chlorophyta/pediastrum/boryanum/sp\\_04.html](http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/chlorophyta/pediastrum/boryanum/sp_04.html)
- [12] [http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Euglenophyceae/PHACUS/Phacus\\_Image\\_page.html](http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Euglenophyceae/PHACUS/Phacus_Image_page.html)
- [13] <http://www.diatomloir.eu/Site%20Diatom/Saumatre.html>
- [14] [http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Euglenophyceae/TRACHELOMONAS/Trachelomonas\\_Image\\_page.html](http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Euglenophyceae/TRACHELOMONAS/Trachelomonas_Image_page.html)
- [15] <http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/Heterokontophyta/Centrales/Cyclotella/index.html>
- [16] <http://www.geppe.net/microscopia/album/Diatomee/Gomphonema%20sp/slides/gomphonema%20sp.%207.html>
- [17] [http://ucjeps.berkeley.edu/constancea/83/morales\\_et\\_al/all\\_figures.htm](http://ucjeps.berkeley.edu/constancea/83/morales_et_al/all_figures.htm)
- [18] [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gyrosigma\\_sp.jpeg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gyrosigma_sp.jpeg)
- [19] Atlas de organismos planctónicos en los humedales de Andalucía.
- [20] Streble H. & Krauter D. 1987. Atlas de los microorganismos de agua dulce. La vida en una gota de agua, 1: 28-41



**Adrián Rivero Martínez** es actualmente estudiante del 4º Curso del Grado en Ciencias Ambientales en la Universidad Pablo de Olavide.

# La conservación por sal

María Pérez Sánchez

**Resumen**—Como consecuencia del sistema industrial actual hemos tenido que desarrollar métodos de conservación de los alimentos, siendo el de la conservación por sal uno de los más antiguos, a continuación expongo sus principales características.

**Palabras Claves**— Actividad del agua, Microorganismos, Ósmosis, Salazón, Salmuera.

## 1. INTRODUCCIÓN

La conservación de los alimentos es algo que llevamos haciendo desde hace muchísimos años, ya que actualmente vivimos en un mundo industrializado y de consumo, en el que podemos conseguir todos alimentos que queramos aunque no sea la época de consumo de estos, y los podemos trasladar de unos países a otros. Pero antiguamente las personas se alimentaban de lo que daba la tierra en la zona en la que vivían y dependía mucho del clima. Había períodos en los que no se obtenía comida. Surge entonces la preocupación por la conservación de los alimentos para las épocas de carencia.

Por tanto, podríamos definir la conservación como el proceso de transformación de un alimento para ralentizar o evitar su deterioro, así como para que este no pierda sus características, o las pierda lo menos posible, siendo apto para el consumo a lo largo de un período de tiempo. El objetivo de estos procesos es preservar los alimentos de la acción de los microorganismos y elementos que alteren las características requeridas para la ingesta de un alimento.

## 2. ¿QUÉ ES LA CONSERVACIÓN POR SAL?

De los diversos métodos de conservación que existen, me voy a centrar en el de la conservación por sal. Dicho método está basado en la reducción del contenido de agua de los alimentos, es decir, en una deshidratación parcial.

Todos los alimentos contienen agua, siendo en la mayoría de ellos el componente predominante; además es uno de los factores que influye en las características de estos.

Esta presencia de agua en los alimentos hace de este un sitio ideal para el desarrollo de microorganismos que pueden afectar a las propiedades de los alimentos en lo que se desarrolla, llegando incluso a deteriorarlos hasta tal punto que estos nos sean aptos para el consumo humano, ya que podrían conducir al desarrollo de enfermedades.

Es por ello que este método está basado en la deshidratación, ya que lo que se va a hacer es eliminar esa

agua añadiendo otros componentes para evitar o ralentizar el desarrollo de microorganismos que puedan afectar a las propiedades de esos alimentos.

Generalmente una disminución del agua de estos va a tener como consecuencia una disminución del tamaño del alimento.

Este proceso solo es llevado a cabo en determinados alimentos, ya que en otros pueden verse afectadas sus características organolépticas y alterar su durabilidad.

## 3. BASES FÍSICO-QUÍMICAS

Este método de conservación ha sido utilizado desde tiempos inmemorables, y de forma tradicional se ha asociado el contenido de humedad presente en los alimentos con el desarrollo de microorganismos en ellos. A día de hoy se ha comprobado que el desarrollo de los microorganismos no está relacionando con la cantidad de agua presente en el alimento, sino más bien con la disponibilidad que este muestre para que se lleven a cabo las reacciones de deterioro. Esta disponibilidad recibe el nombre de actividad del agua. Esta puede verse afectada por las propiedades coligativas, la capilaridad, y por la interacción superficial que el agua ejerce con otras moléculas.

La actividad del agua puede ser calculada mediante el uso de una fórmula, que es la siguiente:

$$a_w = \frac{p}{p_0}$$

Fig.1. Fórmula del agua.

Donde  $a_w$  es la actividad del agua,  $p$  la presión de vapor del agua en la disolución y por la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura. Dicha fórmula indica la disponibilidad de agua de un medio determinado, para las reacciones químicas, bioquímicas y para las transferencias a través de las membranas semipermeables. Su valor oscila entre 0 y 1.

En función de los resultados de la fórmula se lleva a cabo un proceso de clasificación para saber cuales son los requerimientos de almacenamiento de los alimentos desde un punto de vista microbiológico. Hay que tener en cuenta, que un cambio de valor en la actividad del agua influye en las reacciones de deterioro de los alimentos.

Los resultados de la actividad del agua de dicha fórmula son importantes, ya que también nos proporcionan información sobre la cantidad de agua que podemos extraer de un alimento. Si la cantidad extraída no ha sido la adecuada, se puede llegar a producir una pérdida del valor biológico de los alimentos.

De forma general, cuando la actividad del agua es inferior a 0,86 se evita el crecimiento de bacterias y si es inferior a 0,60 se evita el desarrollo de mohos, ya que cuando esta es inferior a 0,60 los microorganismos no pueden crecer ni provocar alteraciones en los alimentos.

En épocas primitivas lo que se hacía era una combinación de deshidratación solar y osmótica. Actualmente se trata más bien de una deshidratación osmótica.

En función de lo citado anteriormente podemos decir que el objetivo de este método de conservación es la adición de sal, para que mediante fenómenos osmóticos se consiga eliminar el agua de los alimentos y por tanto no se pueda llevar a cabo el desarrollo de microorganismos.

Si los alimentos se salan bien, la sal extraerá el agua de sus células, mediante procesos osmóticos, y eso impedirá el desarrollo de microorganismos. Esto ocurre de la siguiente manera: los fenómenos osmóticos equilibran las concentraciones a un lado y a otro de las membranas. El agua va desde el lado donde la concentración es menor hacia donde es mayor para diluir la más concentrada y así disminuir en ella la concentración de sal. Por tanto, cuando cubrimos los alimentos con sal (salazón), o cuando los introducimos en una disolución salada (salmuera), el agua que se encuentra en el interior del alimento va a salir produciéndose así la deshidratación parcial de dicho alimento. Este proceso se mantiene hasta que la concentración salina en el interior y en el exterior del alimento se equilibren.

El tipo de alimentos sobre los que se lleva cabo este proceso son aquellos que presentan lo que se denomina humedad intermedia, es decir, que presentan entre un 20 y un 25 % de humedad. Los procesos que se llevan a cabo para quitar esa humedad no desnaturalizan las proteínas, por lo que estos pueden seguir llevando a cabo algunas actividades enzimáticas.

Los alimentos que sufren el proceso de deshidratación osmótica presentan las siguientes ventajas:

- 1- Están listos para comer, sin necesitar una rehidratación.
- 2- La composición química del alimento se puede regular en función de las necesidades.
- 3- Se reduce su tamaño, lo que facilita su almacenamiento y transporte.

## 4. TIPOS DE CONSERVACIÓN POR SAL

Distingamos dos tipos de conservación por sal, el salazón y la salmuera.

### 4.1. El salazón

Los primeros en emplear la salazón fueron los egipcios, fenicios, griegos y, posteriormente, los romanos, siendo estos últimos los verdaderos difusores de la conservación con la sal. Los romanos incluso pagaban a sus trabajadores con sal para que estos pudieran conservar sus alimentos.

Cuando en salazón se menciona el empleo de sal, se hace referencia a una mezcla de sal con nitrato sódico y nitrito.

El método de salazón implica una protección por incorporación y recubrimiento con inhibidores, que ocasionan un efecto barrera sobre los microorganismos. Además de conservar los alimentos también potencia los sabores de estos. Es de uso frecuente en carnes y sobre todo pescados, pero también se aplica en frutas y vegetales.

Un ejemplo muy común de salazón en carnes en nuestra tierra es el jamón. Primero se pone en salmuera para ayudar en el proceso de deshidratación y posteriormente es colocado en cámaras con temperaturas entre 0 y 5 grados recubierto completamente por sal. Pasado la mitad del tiempo que este debe permanecer en las cámaras, se le da la vuelta para que la distribución de sal sea homogénea.

Los pescados en los cuales actualmente más se utiliza son el atún, el bonito, la melva y la sardina entre otros.

Si lo comparamos con la salmuera, este método de conservación es más lento y la carne queda más salada, pero es un método de mayor seguridad y confianza.

### 4.2. La salmuera

En este caso tiene lugar el mismo proceso osmótico que en el anterior, pero el proceso es diferente ya que en este caso se sumerge el alimento en una disolución saturada de sal y agua junto con otras especies. Este no sólo se produce por inmersión del alimento en la disolución anteriormente nombrada, sino que también la salmuera puede ser inyectada en el alimento.

La salmuera presenta dos ventajas con respecto al salazón y es que esta es capaz de llegar a todos los huesos presentes en el alimento, ya que la sal se encuentra disuelta en agua. Y otro es que actúa mucho más rápido.

## 5. CONCLUSIONES

Ya hemos tratado las características de este método de conservación, ¿pero cuáles son los efectos nutricionales de este método?

Bien, pues en lo que a ventajas respecta nos encontramos con las siguientes:

1. Hay una mayor concentración de nutrientes por el mismo peso.
2. Los alimentos proteicos presentan una textura más tierna.
3. Se potencia el sabor de las comidas.

Este método también presenta una serie de inconvenientes que son los que se nombran a continuación:

1. Una ingesta elevada de estos puede llegar a producir hipertensión y enfermedades coronarias.
2. Se produce retención de líquidos.
3. Se pueden llegar a presentar enfermedades renales y daños en la densidad mineral ósea.

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a Alejandro Cuetos Menéndez la atención prestada, ya que sin él este artículo no habría salido a la luz.

## REFERENCIA

- [1] Web del IEEE Computer Society. <http://www.computer.org> (Enlace web)
- [2] Web lo mejor de la gastronomía. <http://www.lomejordelagastronomia.com/firmas/la-salazon-y-otras-conservas>.
- [3] Web la página de Bedri. [http://www.bedri.es/Comer\\_y\\_beber/Conservas\\_caseras/Salazon.htm](http://www.bedri.es/Comer_y_beber/Conservas_caseras/Salazon.htm).
- [4] Web Wikipedia. <https://es.wikipedia.org/wiki/Salmuera>.
- [5] Díaz Torres, Raúl Prats López, Deborah, *Conservación de los alimentos*. Félix Varela, pp. 4-15, 184-271, 2009.
- [6] Casp Vanaclocha, Ana Abril Requena, José, *Procesos de conservación de los alimentos (2ª ed.)*. Mundi- Prensa, pp. 38-40, 76-82, 86, 2008.



**María Pérez Sánchez** finalizó el bachiller en año 2016, en el instituto I.E.S Galileo Galilei, en Montequinto. Actualmente cursa el primer año de la titulación de Nutrición Humana y Dietética, en la universidad Pablo de Olavide.

# ¿Qué se esconde tras los TCA?

Irene Belacortu Pérez.

**Resumen**— El siguiente artículo, se trata de una redacción de diversas vivencias de mujeres, que han convivido durante años o siguen conviviendo con este tipo de enfermedad, considerando a partir de todas ellas la especial importancia de que los más jóvenes tengan una información amplia sobre sus causas, síntomas y sobre la tan crítica "repercusión social". En el caso de estas mujeres padecen o han padecido anorexia o bulimia de tipo nerviosa, de modo que será entorno a los trastornos que giraran estas escalofriantes narraciones. Conociendo no solo las vivencias, sino la repercusión que trae consigo los TCA.

**Palabras Claves**— TCA, anorexia, bulimia, atracón, sintomatología, tratamiento nutricional.



## 1. EN QUÉ CONSISTEN LOS TCA.

Se define TCA como: "conjuntos de trastornos mentales caracterizados por una conducta alterada ante la ingesta alimentaria o a la aparición de comportamientos de control de peso"

Actualmente los tipos de trastornos más conocidos resultan ser la anorexia nerviosa y la bulimia nerviosa, sin embargo el abanico de enfermedades que se recogen bajo dicha definición resulta ser muy amplio pese a que los mismos psicólogos clínicos y nutricionistas reconozcan que ellos mismos en ocasiones apartan aquellos que se escapan de dicho segmento pues aparecen tan inusualmente que cuestan ser reconocidos.

No pudiendo olvidar, lo común que es en este tipo de enfermedades la aparición de pacientes que presentan comorbilidad, es decir, la presencia de diversas enfermedades psiquiátricas paralelas, produciendo un incremento en la dificultad para el/la terapeuta de diagnosticar el problema.

## 2. ¿CUÁLES SON LOS FACTORES QUE LLEVAN A SUMIRSE EN ESTE TIPO DE ENFERMEDAD?

Lo más común en este tipo de charlas divulgativas, es desarrollar un listado de factores extraídos fácilmente de un libro/web que abarque el tema, sin embargo, se ha querido dar un giro al modo de información al lector y en este caso al grado mismo de investigación llevado a cabo para desarrollar el proyecto. A partir de aquí, todo el artículo hablara acerca de vivencias.

Mujeres con las que he convivido o conversado en algún momento de mi vida y han querido realizar un aporte personal a este tema. Quiero resaltar el hecho de que la presencia en testimonios exclusivamente de mujeres no quiere decir que este tipo de trastorno sea exclusivo de dicho género, sino que los porcentajes de hombres res-

pecto a mujeres resultan ser muy bajos, y pese a lecturas e interés en la materia, no es fácil extraer ninguna vivencia destacada masculina de este tipo.

Una vez planteada esta introducción, retomamos la pregunta inicial de este apartado, ¿Qué lleva a la persona a sumirse en una enfermedad de este tipo? Es curioso, como tras formular dicha pregunta con tal variedad de respuesta, la respuesta giraran en su mayoría entorno a un panorama muy similar: la autoexigencia y la influencia social.

Está recogido en recientes estudios como los TCA pueden llegar a tener una base genética, que nos haga presentar vulnerabilidad, sin embargo se considera que este actualmente es un factor que podría considerarse como poco destacado, pues sigue considerándose como factor principal el de tipo psicosocial.

En el caso de las entrevistadas, en todas ellas destaca un exceso de autoexigencia física, querían adquirir ese canon de belleza destacado de la sociedad y coinciden en que posiblemente ese fuese el inicio de su tortura. Describen como cruento el análisis de sus propios cuerpos y todo el odio que sentían hacia ellos, "solo deseábamos la talla indicada" y este es una de las peores equivocaciones que podría cometer un joven con exceso de exigencia y comunmente baja autovalía.

No solo recalcan la base social de sus enfermedades en este canon expuesto en modelos e incrementado en las supuestas modelos de tallas grandes, sino además apoyado en la industria textil, donde se han recogido diversas polémicas acerca de la variación en el tallaje. Tampoco olvidaban la salida al mercado, donde en muchos puestos seguía y sigue la prevalencia del contrato a la mujer canonizada, unido a la publicidad que tan impone la constitución de la mujer admirada.



Tras realizar esta primera cuestión, pude vislumbrar el constante sabotaje moral, donde de manera indirecta se está constantemente bombardeando con un prototipo único y deseado.

### 3. ¿CUÁLES SON LOS SÍNTOMAS DE UN TCA?

Ante esta cuestión los síntomas difieren según la enfermedad de la persona entrevistada, sin embargo, debido a que cada entrevistada prefiere mantenerse en el anonimato, simplemente señalaré aquellos aspectos los cuales pertenezcan a un tipo específico de enfermedad, pese a que la mayoría de características sean de tipo general.

**-Testimonio A:** Desde pequeña sabía que algo iba mal, escondía constantemente mi cuerpo y no podía evitar sentir odio por él, había recibido burlas en clase debido a mi supuesto sobrepeso, toda aquella situación producía una constante sensación de irritabilidad que se unía a un carácter apático, alejado de lo que anteriormente había sido, solo conseguía frenar aquella sensación por medio de grandes ingestas de comida (*trastorno por atracón*) que más tarde vomitaba de manera provocada debido a la culpabilidad (*conducta purgativa*), todo fue sucediendo paulatinamente, hasta que se convirtió en algo de mi día a día, el peso fue disminuyendo hasta alcanzar valores que hacían peligrar mi salud.

**-Testimonio B:** Nadie podía esperar aquello, era la niña perfecta, la de buenas notas, la chica responsable, sin embargo mi físico no se acercaba al deseado, empecé realizando un régimen, lo inicié por mi misma y poco a poco fui eliminando mayor número de alimentos de mi ingesta diaria (*anorexia de tipo restrictiva*), comencé a realizar deporte incluso a altas horas de la madrugada y llegue a consumir en 24h exclusivamente una pieza de fruta, mi peso fue disminuyendo y en poco tiempo mi cuerpo ya no aceptaba el mínimo alimento (*fase de inanición*).

### 4. ¿CÓMO SE REALIZA UN TRATAMIENTO A PACIENTES QUE SUFREN UN TCA?

Cómo hemos podido ver a lo largo del artículo, los TCA se tratan de trastornos los cuales se encuentran sobre una base psicológica que se extiende hacia consecuencias de tipo nutricional, en mi caso, debido a que soy estudiante de esta área, me voy a basar en el tratamiento exclusivamente desde el ámbito nutricional. En caso de querer saber más acerca de su tratamiento a nivel psicológico o psiquiátrico, les recomiendo las publicaciones de las lecturas recomendadas expuestas en la bibliografía.

El tratamiento nutricional llevado a cabo en este tipo de patologías variara según la situación en la que se encuentre el paciente, en este caso nos hemos basado en el tipo de dieta impuesto en personas que sufren dicha en-

fermedad y son internadas en centros propios de dichas patologías (tanto de tipo diurnos como internos), en este caso nos hemos basado en una distribución alimentaria propia del centro ABB (<http://www.centroabb.com/es/>) en el que se impone una distribución de la ingesta diaria de comidas en 5 tomas (en caso de estar en una fase aguda de dicha enfermedad, comenzaremos sobre una base de 3 tomas que ira en incremento) pues debemos de recordar que en fases agudas el cuerpo se sume en una fase de inanición (testimonio b) que le impide fisiológicamente la ingesta del alimento. Siendo la distribución la siguiente.

-Desayuno: Se debe realizar la ingesta de un alimento sólido y otro líquido

-Tente (media mañana): sólido y líquido

-Almuerzo: compuesto de primer y segundo plato, unido a postre, pan y bebida

-Merienda: sólido y líquido, del mismo modo que el tente de media mañana

-Cena: igual que el almuerzo

Dicha distribución de los alimentos según si son sólidos o líquidos poseen un razonamiento claro y es el hecho de que dicha patología suele ir acompañada de una fuerte deshidratación, intentando por tanto por medio de esta dieta abarcar ambas necesidades orgánicas.

Las características nutricionales de estas dietas impuestas resultan ser:

- Alto aporte calórico de proteínas (superior al 20% del VCT), moderado de lípidos y muy bajo de HC.
- Consumo de fibra inferior a las recomendaciones.
- Deficiencias de minerales, especialmente de calcio, hierro, magnesio y cinc
- En general, las deficiencias de vitaminas más frecuentes son las de vitaminas D, E y piridoxina. Aunque también se pueden encontrar deficiencias de tiamina, riboflavina y niacina que se suelen atribuir al alto porcentaje de pacientes vegetarianas

En caso del paciente presentar rechazo hacia la comida, se puede realizar una adaptación del paciente mediante el uso de suplementos, produciendo una adaptación dirigida hacia la dieta que deseamos, teniendo siempre en cuenta un estudio dietético tanto pasado como futuro de la situación individual del paciente a tratar.

## 5. CONCLUSIONES

Lo que se pretende por medio de este artículo, es acercarse de una manera íntima a las vivencias y situaciones que llevan consigo el padecimiento de estas enfermedades, ya que es muy sencillo encontrar datos objetivos que nos indiquen de un modo estricto cuáles son sus causas y síntomas en un listado sin fin con una total falta de vivencia y emoción. Además, por medio de este tipo de redacción se pretende desarrollar una campaña de tipo concienciadora, pues tal como se trataba en el primer punto y en los diversos testimonios, el factor social resulta jugar un importante papel, reconocido por muchos como el principal.

Realicemos un llamamiento a la cordura, un llamamiento al fin del sabotaje de nuestra propia autoestima, un llamamiento a la necesidad de abandonar las conductas que han y producirán un gran número de muertes a lo largo de la historia, un anuncio al fin de la gordofobia y de un canon universal.

Pon fin a los estigmas, tu cuerpo también es válido.

## REFERENCIAS

- [1.] 197. Saldaña C. Tratamientos psicológicos eficaces para trastornos del comportamiento alimentario. *Psicohema*. 2001;13(3):381-92
- [2.] 198. Borrego Hernando O. Tratamiento de los trastornos de la conducta alimentaria: anorexia y bulimia.

*Inf Ter Sist Nac Salud*. 2000;24(2).

[3.] 199. Nicholls D, Viner R. Eating disorders and weight problems. *BMJ*. 2005;330:950-3.

[4.] Chinchilla Moreno, A.; Barjau Romeo, J. (2003). *Trastornos de la conducta alimentaria: Anorexia y bulimia nerviosa, obesidad y atracones*. Elsevier.

### Agradecimientos:

Me gustaría mostrar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas chicas que de alguna manera aparecieron en mi vida y cuyas vivencias y ansias de superación han inspirado la redacción y el deseo de elaborar dicho artículo. Por otro lado, expresar mis agradecimientos a Alejandro Cuetos por confiar en la valía de mi artículo y su deseo desde el primer momento por su publicación.

**Irene Belacortu Pérez** estudia actualmente Nutrición



Humana y Dietética por la Universidad Pablo Olavide y Psicología por la Universidad a distancia desde septiembre de 2015. Interesada por los TCA desde hace años desde un punto de vista tanto nutricional como psicológico y con deseos de centrar su futuro hacia dichas áreas.

# Open Source Hardware: el futuro de la innovación tecnológica

Marco Corzetto Conflan

**Resumen**— El objetivo del presente artículo es definir al *Open Source Hardware*, delinear sus características principales y presentar algunos ejemplos de sus usos. Estas líneas nos permitirán reflexionar sobre las potencialidades de un modelo de desarrollo innovador, con el que tenemos que comprometernos desde nuestra formación de grado.

**Palabras Claves**— *Open Source Hardware*, *Software Open Source*, paradigma, negocio.

## 1. INTRODUCCIÓN

El *Open Source Hardware* (OSHW) es un fenómeno que en los últimos años ha adquirido un importante desarrollo y una rápida difusión, que han derivado en notables beneficios no solo para la comunidad científica sino también para los consumidores de tecnología. El desarrollo de este tipo de diseño, que dio sus primeros pasos impulsado por grupos de aficionados y que logró consolidarse por la acción de importantes centros científicos, produjo un cambio de paradigma de negocio empresarial que, cada vez con más fuerza, atrae a las diversas empresas.

## 2. ANTECEDENTES

El desarrollo del OSHW se vincula con el del *Software Open Source* (OSS). El OSS es un software cuyo código fuente es difundido bajo una licencia compatible con la *Open Source Definition* (OSD) [1], que permite a los usuarios utilizar, modificar y redistribuir libremente el software, con fines particulares o comerciales.

Los proyectos de OSS avanzan gracias a comunidades de desarrolladores que trabajan adaptando el software a sus necesidades u obteniendo reconocimiento por los aportes realizados. Mientras que algunos proyectos de OSS dependen del interés particular no lucrativo de los miembros de esa comunidad, otros, en cambio, dependen de empresas, cuyo principal negocio consiste en vender accesorios, plugins o servicios relacionados con el OSS.

En la actualidad, la OSS se ha convertido en sinónimo de innovación tecnológica. El código abierto ha adquirido tal popularidad que miles de programadores interactúan código a código en el desarrollo de cientos de proyectos, y cada vez más compañías publican los códigos que antes guardaban celosamente.

## 3. PRIMEROS PASOS DEL OPEN SOURCE HARDWARE

Inspiradas en el fenómeno del OSS, hacia el final de la década de 1990, comenzaron a desarrollarse varias iniciativas que tenían como objetivo la definición del OSHW y la creación de licencias compatibles con sus principios.

La definición de OSHW creada por la *Open Source Hardware Association* (OSHWA), basada en los principios de la OSD, goza en la actualidad de un amplio reconocimiento. Para la OSHWA, la OSHW es aquel hardware cuyo diseño se hace disponible públicamente para que cualquier otro individuo pueda estudiarlo, plasmarlo, modificarlo, distribuirlo, usarlo o venderlo –tanto al diseño original como a los objetos basados en él– [2].

En base a esa definición se han creado la *CERN Open Hardware Licence* [3] y la *TAPR Open Hardware Licence* [4], entre otras. Esas licencias específicas para el OSHW derivaron de la adaptación de las licencias del OSS –como, por ejemplo, la *GNU General Public Licence*– a los diseños del hardware.

## 4. EL CERN Y EL OPEN SOURCE HARDWARE

En 2011, la Organización Europea para la Investigación Nuclear (CERN) lanzó la iniciativa *Open Hardware Repository* (OHWR), generando un fuerte impacto en la comunidad científica internacional [5].

En los últimos años, el CERN ha desarrollado sus proyectos más importantes e innovadores a través de la utilización del OSS. Así, por ejemplo, el famoso acelerador de partículas, instalado en la frontera entre Suiza y Francia, utiliza un sistema operativo *Linux Red Hat* de código abierto –que ha sido bautizado con el nombre de *White Rabbit*– para sincronizar sus complejos procesos.

En base a esa experiencia, los investigadores del CERN entendieron que para desarrollar el hardware para sus experimentos resultaba mucho más beneficioso recurrir a la comunidad libre, que limitarse al trabajo aislado y solitario de sus ingenieros.

Una de las primeras ventajas de la adopción de este modelo de desarrollo de hardware abierto ha sido la eliminación de la duplicación del esfuerzo y del trabajo de los varios sujetos que, desde diferentes lugares del mundo, se dedican simultáneamente a proyectos con objetivos idénticos o similares.

La cooperación y el trabajo en conjunto permiten obtener mejores resultados en menor tiempo y con una menor inversión. Asimismo, los proyectos son permanentemente revisados y reciben aportes de grupos multidisciplinarios, lo que no solo favorece el control de calidad sino que también puede llegar a producir cambios radicales e inesperados en los objetivos iniciales de un determinado proyecto.

Otra de las ventajas del OSHW es su potencialidad para evitar uno de los mayores peligros que acechan a la innovación tecnológica: el bloqueo comercial de productos y desarrollos realizado por empresas que se adueñan de patentes con el propósito de frenar el desarrollo de la competencia o evitar que una nueva tecnología pueda frustrar las inversiones realizadas [6].

Para evitar este tipo de prácticas, el CERN ha creado la licencia *CERN OHL* con el propósito de proteger la libertad de difusión de proyectos OSHW, permitiendo que estos y sus derivados puedan tener fines comerciales. De esa manera, esa licencia se vuelve atractiva no sólo para quienes poseen motivaciones puramente científicas, sino también para aquellos que persiguen intereses económicos.

## 5. DIFUSIÓN Y VENTAJAS DEL OSHW

No solo los científicos y las empresas se han beneficiado con el auge de OSHW. Gracias a su desarrollo, los consumidores tienen a su disposición no solo dispositivos tecnológicos más baratos sino que, además, pueden modificarlos y adaptarlos a sus exigencias.

Mientras que el abaratamiento de componentes electrónicos actuó como un factor de impulso para el OSHW, la mayor difusión de los dispositivos desarrollados con OSHW ha llevado, a su vez, a ampliar la popularidad de su uso. Un buen ejemplo lo constituye la placa *Arduino* – que nació en Italia en 2006 con fines educativos y que un lustro después empezó a ganar difusión comercial –, que a través de un microcontrolador y un sencillo entorno de desarrollo permite la creación de proyectos de electrónica y de robótica con mucha facilidad y bajo costo. Asimismo, con la mayor difusión de las impresoras 3D, cualquier individuo puede construir sus propios artefactos tecnológicos desde la comodidad de su casa, seleccionando en internet alguno de los diversos modelos disponibles de OSHW para su fabricación con materiales económicos y de fácil acceso.

La gran popularidad que ha desarrollado este tipo de modelo tecnológico se pone de manifiesto en los miles de

proyectos OSHW disponibles en internet, realizados por aficionados que desean hacerse conocer o que, encontrándose en dificultad para poner en práctica sus ideas, prefieren optar por recibir la ayuda de la comunidad en lugar de abandonar su proyecto. Esta lógica ha llevado a que numerosas *startups* decidan basar su modelo de negocio en el OSHW para recibir colaboración en el diseño o prototipación de sus productos.

## 6. PRO VS. CONTRA EN EL OSHW

Si bien algunos consideran que el uso del modelo OSHW implica el riesgo de que sus productos sean clonados, hay quienes, por el contrario, en lugar de considerarlo como una amenaza lo ven como una ventaja. Registrar una patente es una gestión cara que no garantiza que otras empresas se inspiren en ella para obtener los mismos resultados. Es por ello que algunas *startups* eligen al camino opuesto a las patentes y deciden publicar los diseños de su hardware, incluyendo las guías para la construcción de prototipos [8].

Con esa difusión obtienen ayuda por parte de la comunidad de desarrolladores para el testeo y el prototipado de sus productos. De esa manera, gracias al feedback de los aficionados y de los expertos, logran mejorar sus diseños. Otro beneficio que se puede alcanzar es la creación de una comunidad de desarrolladores interesados en la innovación de los diseños publicados. *Arduino*, *Adafruit*, *SparkFun* son hoy marcas sólidas, definidas a través de valores éticos concretos. Sus productos han sido y son clonados en todo el mundo, pero la comunidad que innova en torno a ellos no deja de apoyarlos comprando sus elaboraciones originales. Si bien, como podemos observar, se trata de un modelo de negocio que supone grandes riesgos, aún más grandes pueden ser los beneficios tanto para una empresa emergente como para una multinacional.

Los gigantes de Internet como *Google*, *Facebook*, *Amazon* y *Microsoft* tienen la necesidad de procesar y almacenar una cantidad inmensa de datos de una manera económica, segura y energéticamente eficiente. Para empresas que centran su modelo de negocio en la disponibilidad de los datos, todo esto presupone un ingente reto tecnológico y una apuesta de vital importancia.

En 2009, *Facebook* se dio cuenta de que ya no le bastaba el hardware ofrecido por sus proveedores de servidores – principalmente *Dell* – y emprendió la fabricación de nuevos servidores usando tecnología propia. Así, se encargó la construcción de un inmenso *data center* en Prineville, Oregon, que comenzó a funcionar en el año 2010. En abril 2011, la compañía sorprendió al mundo al publicar los diseños del hardware que componen su *data warehouse* de Prineville. De esa manera, nació el *Open Compute Project* (OPC) [8], una enorme comunidad colaborativa en la que decidieron participar otros colosos de la informática como *Intel*, *Microsoft*, *Dell*, *Broadcom* y, a partir de marzo 2016, *Google* [9].

Las compañías mencionadas tienen la necesidad común de almacenar una descomunal cantidad de datos con el menor costo posible. La creación de OPC llevó a que el avance en la tecnología de los servidores fuera mucho más rápido y la inversión realizada por cada empresa implicada fuera mucho menor. En un entorno de I+D secreto, los beneficios que una empresa obtiene en desarrollo es proporcional con la inversión realizada. En un entorno open, en cambio, los beneficios que cada empresa obtiene en desarrollo son inmensamente superiores a los gastos realizados. Además, ese tipo de entorno produce otro efecto económicamente favorable: los componentes hardware requeridos en los diseños open tienen una demanda mayor, favoreciendo así a su abaratamiento, gracias a un aumento de la escala de producción.

## 5. CONCLUSIÓN

El modelo de OSHW se ha convertido en uno de los modelos de negocios más estimulantes e innovadores de los últimos años. Aunque su desarrollo ha despertado visiones encontradas entre sus defensores –que lo consideran como el paradigma de negocios más beneficioso a nivel mundial– y sus detractores –que lo ven como un riesgo innecesario–, no cabe duda de que el OSHW ha producido una revolución cultural alrededor del desarrollo

tecnológico. Más allá de los beneficios obtenidos por las empresas, un sinnúmero de ámbitos –médico, educativo, artístico, etc.– se han visto beneficiados por la difusión global del OSHW y los intercambios posibilitados por ese modelo.

## REFERENCIAS

- [1] <https://opensource.org/osd>
- [2] Web del OHWA: <http://www.oshwa.org/definition/>
- [3] <http://www.ohwr.org/projects/cernohl/wiki>
- [4] <http://www.tapr.org/ohl.html>
- [5] <http://www.ohwr.org/>
- [6] [http://www.eldiario.es/turing/Patentes\\_de\\_softwa\\_re\\_0\\_116188568.html](http://www.eldiario.es/turing/Patentes_de_softwa_re_0_116188568.html)
- [7] <https://www.kickstarter.com/?ref=nav>
- [8] [http://www.eetimes.com/author.asp?doc\\_id=1321530&page\\_number=1](http://www.eetimes.com/author.asp?doc_id=1321530&page_number=1)
- [9] [http://www.theregister.co.uk/2011/04/07/facebook\\_data\\_center\\_unveiled/?page=1](http://www.theregister.co.uk/2011/04/07/facebook_data_center_unveiled/?page=1)
- [10] <http://www.wired.com/2016/03/google-facebook-designing-open-source-data-center-gear-together/>

**Marco Corzetto Conflan** es alumno del tercer año del Grado en Ingeniería Informática en Sistema de Información de la Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.

# Descomposición modular del cliente-servidor

Antonio Flores Romero

**Resumen:** En este artículo nos centraremos en la 'Descomposición modular del cliente-servidor', trataremos las principales funcionalidades de la misma, sus características y en que situaciones la podemos encontrar.

**Palabras Claves:** Cliente, Servidor, Modulo, Subproblemas, Descomposición, Sistema, Ventajas, Desventajas.

## 1. INTRODUCCIÓN

Antes que nada, hablaremos un poco sobre que es la descomposición modular. La descomposición modular de un determinado sistema, consiste en descomponerlo en distintos subsistemas, en este caso módulos, para reducir su complejidad y poder tratar con cada uno de ellos de forma independiente y no con un bloque entero completo para agilizar el trabajo y conseguir un resultado mucho más eficiente. Al aplicar una descomposición modular podremos encontrar una serie de ventajas como podría ser la reducción del coste o la claridad.

Cuando tengamos nuestro sistema descompuesto en diferentes módulos, nos será más fácil tratar un módulo como a un único ente y poder ocuparnos de ese modulo sin preocuparnos de los demás módulos que encontremos en el sistema. Si más adelante encontramos un fallo en un módulo podremos actuar en ese modulo sin que se afecte a los demás.

Para llevar a cabo la descomposición modular, debemos seguir una serie de pasos, los cuales se describen a continuación: identificar los módulos, describir cada módulo, describir las relaciones entre módulos.

Para asegurar una buena descomposición modular en un sistema siempre se deberá de asegurar una serie de cualidades, como lo pueden ser el acoplamiento o la adaptabilidad.

### 1.2. Características de la descomposición modular

- La independencia funcional, donde cada uno de los módulos de nuestro sistema debe tener un objetivo o más bien realizar una función en específico.
- El acoplamiento, cuando hablamos de acoplamiento hablamos del nivel de conexión que tienen entre sí dos módulos. El acoplamiento puede variar según la interconexión entre dos módulos. El acoplamiento puede ser desde débil a moderado y finalmente a fuerte.

- La cohesión, cuando hablamos de cohesión hablamos desde que un modelo requiera de otros módulos para ejecutar alguna tarea hasta que no llegue a ser necesario. La cohesión puede variar desde una cohesión baja a una cohesión media y finalmente a una cohesión alta.
- La comprensibilidad, en la que se busca que cada uno de los módulos de un sistema sea comprensibles mediante la documentación o la identificación.
- La adaptabilidad, aquí hablamos de la adaptación de un sistema. Algunos factores para facilitar la adaptabilidad de un sistema son la previsión, la accesibilidad o la consistencia.

## 2. CLIENTE-SERVIDOR

Ahora nos centraremos en el modelo del cliente-servidor. El cliente-servidor es un sistema distribuido, el cual se centra en que el cliente solicita una serie de servicios al servidor y éste es el que determina la entrega de los mismos o no.

Uno de los sistemas distribuidos más famosos en el que se utiliza la metodología cliente-servidor es Internet.

El modelo cliente-servidor lo encontramos en la actualidad en muchos sistemas, y como decíamos anteriormente el más conocido en el que se emplea dicho modelo es el Internet.

En resumen en la descomposición modular del Cliente-Servidor nos encontramos con el Cliente que será el que realice las peticiones, el Servidor que será el que acepte o deniegue dichas peticiones, las Comunicaciones que será la manera de comunicarse entre el Cliente y el Servidor, la Infraestructura de redes que son los componentes del sistema que garantizan la conexión entre los equipos y ofrecen la transferencia de datos entre ellos y la Infraestructura de comunicaciones que permiten las comunicaciones entre ambos.

## 2.1. Características principales del cliente-servidor

Las características principales del cliente-servidor son las siguientes:

- El cliente realiza una petición a el servidor para poder acceder a un servicio. El cliente una vez realizado dicha petición quedara a la espera de una respuesta por parte del servidor.
- El servidor será al que le llega la petición del remitente, éste es el cliente, y determinara si le acepta la solicitud o la acaba denegando.
- Tanto el Cliente como el Servidor se pueden encontrar en distintas o en las mismas plataformas.

## 2.2. Ventajas

El modelo Cliente-Servidor ofrece una serie de ventajas bastantes interesantes, como lo podría ser la escalabilidad, ya que éste modelo ofrece una adaptación al cambio bastante interesante, como lo puedo ser el aumento significativo en un momento concreto de clientes. También podríamos comentar que una de las ventajas que tiene este modelo es que el cliente no se verá afectado por un problema de gran magnitud, ya que el Servidor es el que tiene el control de la aceptación o no de peticiones del cliente y lo único que podría pasar es que el cliente no pudiese acceder a un servicio, mientras que el problema que tenga dicho Servidor se podría tratar independientemente sin afectar a otros componentes de este modelo.

## 2.3. Desventajas

También encontramos desventajas como en todo sistema. Una de ls desventajas más comunes que se pueden dar es una sobrecarga de peticiones del Cliente al Servidor que cause un colapso significativo que impida el correcto funcionamiento del mismo. Otra de las desventajas que podría limitar el uso de este modelo es que tanto el cliente como el servidor deben utilizar el mismo mecanismo, como lo podría ser por ejemplo mediante Sockets, por lo tanto, tanto el Cliente como el Servidor deberían proporcionar estos servicios para tener un correcto funcionamiento en la mayoría de las ocasiones.



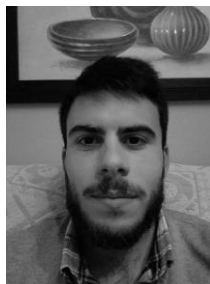
Figura 1. Modelo Cliente-Servidor.

## 3. CONCLUSIONES

Hemos visto en que consiste principalmente el modelo Cliente-Servidor y comprenderlo de forma general, sin llegar a adentrarnos muchos en expresiones o detalles minuciosos de este sistema. Además, hemos podido tener constancias de las características principales sobre el tema de este artículo y acoger una visión general del funcionamiento del modelo del Cliente-Servidor.

## REFERENCIAS

- [1]<https://richardisai.wordpress.com/descomposicion-modular/>
- [2]<http://ithuejutlalvf.blogspot.com.es/2013/05/unidad-3-arquitecturas-de-software.html>
- [3]<https://aniramchapparro.wordpress.com/unidad-vi-karime/>
- [4]<http://www.clubinvestigacioncr.com/docs/informe23.pdf>
- [5]<http://robiniclienteservidor.weebly.com/ventajas---desventajas.html>
- [6][http://www.ecured.cu/Arquitectura\\_Cliente\\_Servidor](http://www.ecured.cu/Arquitectura_Cliente_Servidor)
- [7]<https://docs.google.com/document/d/1klulki-R49ZZEpZPSqDFcViXLGRIN51fc0Sma80wvQU/edit>



**Antonio Flores Romero**, estudiante de Ingeniería Informática en Sistemas de Información de la Universidad Pablo de Olvide. Actualmente en tercer curso.

# La técnica LIBS y su uso combinado con XRF para el análisis de bronce

Joan Escudé González

**Resumen**—Las técnicas de espectroscopía láser han tenido un gran desarrollo en sus aplicaciones en el campo del patrimonio histórico durante los últimos años. Son técnicas de análisis composicional, mínimamente invasivas y que no requieren preparación de la muestra, no obstante, como en todos los casos, no existe una técnica global y su uso combinado con otras técnicas abre posibilidades de análisis muy interesantes.

**Palabras Claves**— Bronce, LIBS, XRF, Espectroscopía.

## 1. INTRODUCCIÓN

En el pasado la confección de útiles era un proceso complejo que mezclaba materiales de distinta naturaleza hasta conseguir el producto que se estaba buscando. Además, una vez estos objetos llegan a nosotros, han sufrido procesos de alteración que han modificado de nuevo su estructura y/o composición. Es por esto que las técnicas de espectroscopía son necesarias en los ámbitos de los estudios históricos y que la cantidad de información que los investigadores quieren extraer de ellas es cada vez mayor.

Las técnicas de espectroscopía láser pueden ofrecer información cualitativa y cuantitativa de la composición química de los materiales. En concreto, la técnica de espectroscopía de ablación inducida por láser (LIBS), de igual modo que la fluorescencia de rayos X (XRF), es una técnica que nos proporciona datos composicionales de carácter elemental, es decir, podemos conocer los elementos que componen la pieza de estudio pero no la forma en que estos están combinados, esto es, los compuestos que conforman el material.

Los análisis de carácter elemental son herramientas fundamentales en el estudio y caracterización de los materiales para la arqueología y la conservación y se han utilizado para casi todos los soportes y materiales. Muchas de las técnicas analíticas tradicionales requieren de la toma y preparación de muestras para que éstas puedan ser sometida a análisis, y es en ese aspecto en el que las técnicas láser presentan una gran ventaja.

## 2. LA TÉCNICA LIBS

El fundamento físico de este tipo de analíticas se basa en la irradiación de la superficie a analizar con un pulso láser de una energía suficiente para que se produzca una ablación que a su vez generará una pluma de plasma. Al analizar los espectros de emisión de esta pluma de plasma mediante un espectrómetro podemos obtener la composición elemental muestreada en ese punto de la superficie [1].

La técnica permite la determinación de la composición del material gracias al análisis del espectro de emisión característico de cada elemento y nos puede proporcionar información multielemental de carácter cualitativo, semicuantitativo y cuantitativo. Es una técnica directa, mínimamente invasiva, versátil y simple, que puede ser realizada sobre muestras sólidas, líquidas o gaseosas por personal con una mínima especialización y que puede proporcionar datos en tiempo real, lo que puede resultar de utilidad en situaciones en las que sea necesario tomar decisiones con inmediatez como excavaciones o intervenciones de conservación. Además puede ser aplicada *in situ* con equipos portátiles, no requiere preparación de muestra y las marcas del impacto del láser son prácticamente invisibles a simple vista [1], [2], [3].

### 2.1. Principios técnicos

Por lo común se usan láseres Q-switch de Nd:YAG a una frecuencia de 1064 nm o en sus armónicos 532, 355, 266 nm, con un tiempo de pulso del orden de nanosegundos y que generan unos cráteres de un diámetro de entre 20 y 200  $\mu\text{m}$  [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7], [8], [9].

La obtención de datos de carácter cualitativo es relativamente directa y tan solo requiere asignar los distintos picos del espectro atómico a sus correspondientes elementos. Para ello se cuenta con la ayuda de bases de datos informatizadas de bibliotecas de espectros. A su vez, los análisis cuantitativos se basan en relacionar la intensidad de una línea espectral con la densidad de cada especie que ha emitido en la pluma, lo que se conecta con las concentraciones de cada elemento en el sólido. Esto se realiza generalmente mediante curvas de calibración y muestras de calibración estándar de composición conocida, no obstante, dada la gran variedad de superficies que podemos encontrar y la diversidad de composiciones y heterogeneidad de materiales, no es siempre posible encontrar estándares de comparación adecuados [1].

Una de las principales características que hacen de ésta una técnica particularmente interesante es la progresiva penetración que podemos conseguir mediante los sucesivos pulsos láser [4]. Cada pulso nos ofrece información de una capa relativamente delgada de material, de modo que



si nos encontramos ante una muestra con una estratigrafía de varias capas o ante materiales recubiertos por una capa de impurezas, el impacto de pulsos consecutivos en un mismo punto nos puede proporcionar un análisis estratigráfico en profundidad de los niveles que deseemos hasta llegar al núcleo [1], [2], [3], [6], [7]. Así, una información que tan solo podría obtenerse mediante toma de muestra y preparación de sección en lámina delgada, puede llevarse a cabo con una técnica mínimamente invasiva. [3], [9]. Por regla general se toman unos valores de penetración de entre 0,08 y 0,11  $\mu\text{m}$  por pulso, aunque en algunos casos puede llegar a ser menor o mayor [4], [9], de hecho Torrisi *et al.* [5] establecieron una relación directamente proporcional para muestras de cobre entre la longitud de onda utilizada en el haz láser y la magnitud del cráter de ablación, tanto en masa arrancada como en profundidad. Estos parámetros también influyen en las propiedades del plasma en cuanto a homogeneidad espacial y estequiometría de la pluma [8].

## 2.2. Aplicación en bronce

La buena reacción entre los pulsos láser de muy variada longitud de onda (desde ultravioleta hasta infrarrojo) y el sustrato metálico hacen de técnica LIBS un método muy eficiente para la caracterización analítica de este material. Lo directo y simple de sus medidas cualitativas la hacen una herramienta rápida y útil a la hora de distinguir metales y aleaciones e incluso permite cierto grado de cuantificación relativa entre muestras [7]. Además, las posibilidades del análisis cuantitativo son especialmente útiles a la hora de caracterizar positivamente las aleaciones en sus elementos constituyentes y elementos traza, que pueden proporcionar información acerca de la época y procedencia de los materiales y de las técnicas metalúrgicas usadas en su fabricación [1], [2], [5], [9]. Así mismo, puede ser útil a la hora de identificar fragmentos metálicos deslocalizados o para la autenticación de piezas [7].

Esta técnica también permite el análisis de las capas de contaminación superficial o de productos de corrosión, lo que nos aporta información acerca de las condiciones de enterramiento de objetos arqueológicos y nos puede ayudar en el momento de diagnosticar un tratamiento contra los procesos de degradación del metal y a detectar procesos de migración iónica desde el núcleo metálico hasta la superficie alterada [1], [9]. De igual modo, también está entre las capacidades de esta técnica el poder monitorizar el avance en procesos de limpieza por láser, ya que será capaz de decirnos cuantos pulsos son necesarios para alcanzar el núcleo metálico o el nivel en el que se desee detener la limpieza [4].

En Agresti *et al.* [2] podemos ver un ejemplo muy completo del trabajo que se puede realizar en bronce con el LIBS. El dispositivo fue calibrado para la detección de los diferentes elementos presentes en las aleaciones de cobre con unos límites de detección de entre el 0,5 y el 0,1% en peso respecto al cobre. Se recopilaron diversos perfiles de composición elemental en profundidad utilizando un mínimo de 2000 pulsos en cada punto de análisis, lo que correspondía a una profundidad del microcráter de entre 700 a 1500  $\mu\text{m}$  de acuerdo a la composición de

las muestras y la mineralización de la superficie. Los perfiles en profundidad presentaron típicamente una zona inicial de modulación correspondiente a la superficie cubierta por los productos de alteración y una parte interna donde las mediciones alcanzaban progresivamente unos valores estables que representaban la composición del núcleo metálico. La detección de elementos exógenos como calcio y silicio se relacionó con el medio y las condiciones de enterramiento y ayudó a distinguir entre las capas de corrosión y el núcleo del objeto, la composición del cual se estimó mediante unas 500 mediciones en la parte más interna, donde los valores se estabilizaban y desaparecía la presencia de elementos exógenos. Finalmente, los resultados fueron corroborados con otras técnicas como difracción neutrónica, XRF y Raman.

En el caso de bronce al aire libre (esculturas, tejados, etc.), la técnica LIBS también nos permitirá valorar la influencia de la polución en el material al detectar la presencia y penetración de elementos derivados de los productos de contaminación atmosférica como el plomo, el sodio o el aluminio [6].

## 3. EL USO COMBINADO CON XRF

La XRF ha sido una de las técnicas más usadas para la determinación de la composición elemental en objetos artísticos y arqueológicos y como tal sigue en evolución y mejorando su desarrollo en portabilidad, análisis *in situ* y microanálisis ( $\mu$ -XRF) [1], [7].

Es una técnica no destructiva, multielemental, rápida y que permite analizar muestras en estado sólido, líquido o gaseoso de forma cualitativa, semicuantitativa y, en casos favorables cuantitativa [4], [5]. Permite además realizar mapas elementales que pueden mostrar separadamente la presencia de cada elemento en la superficie analizada [5]. No obstante, presenta dificultades a la hora de analizar elementos ligeros por encima del silicio y tiene poca penetración (del orden de 0,5 mm como mucho), por lo que ha sido utilizada en bronce para determinar la composición de los productos de corrosión o de tratamientos superficiales (patinados, dorados, etc.) [2], [6]. La zona analizada es mucho mayor que con la técnica LIBS y, aunque pueden usarse lentes en el colimador para modificarlo, el diámetro de análisis está sobre los 5-6 mm [7].

Nos encontramos ante dos técnicas caracterizadas por ser nula o mínimamente invasivas, que no requieren toma de muestra, que son capaces de aportar información cuantitativa con relativa inmediatez y que presentan un alto grado de portabilidad, lo que las hace muy recomendables para análisis *in situ* en yacimiento o exposición [7].

El uso combinado de estas dos técnicas se ha desarrollado en algunos estudios [1], [3], [4], [7], [8], no solo como técnicas complementarias realizadas independientemente sino de forma dinámica mediante la superposición del haz láser de un equipo portátil de LIBS con el haz de rayos X de un espectrómetro  $\mu$ -XRF alineados en un mismo punto del objeto, en este caso, piezas de bronce arqueológico. En Kantarelou *et al.* [4], el LIBS se usó primero para la ablación del metal corroído mediante pulsos sucesivos analizando a su vez los correspondientes espectros de emisión y la variación elemental con la progresión en pro-

fundidad. Mientras tanto, entre los pulsos del haz láser se realizaba un mapeo mediante  $\mu$ -XRF de la zona de ablación que aportaba información del gradiente de intensidades elementales desde la superficie hasta el fondo del cráter. El mapeo elemental de la zona sometida a ablación láser permitió la evaluación y apreciación de las características morfológicas del fondo y los laterales del cráter, ayudando a la interpretación de la estratigrafía elemental de la capa de corrosión mediante la correlación de las sucesivas espectrometrías obtenidas por ambas técnicas.

El principal problema a la hora de analizar este tipo de materiales resulta de la heterogeneidad de las capas de corrosión tanto en la superficie como en profundidad, con complejas microestructuras químicas. El hecho de encontrar un procedimiento que permita obtener información analítica de carácter espacial (por lo menos de varias decenas de micras), que posea un rango amplio de análisis que incluya elementos ligeros y que sea capaz de analizar la variación en profundidad de la composición elemental abre un interesante abanico de posibilidades analíticas. Es por esto que las técnicas LIBS y XRF presentan en este aspecto un alto grado de complementariedad, especialmente en cuanto a sensibilidades y rango de análisis [4].

En el caso de Pérez-Serradilla *et al.* [3] se hace un uso combinado de ambas técnicas pero con fines diferenciados. En la investigación se usa la XRF para el análisis de la composición superficial y la técnica LIBS para la obtención de información tomográfica y de profundidad, ya que en algunos objetos la capa de corrosión es demasiado gruesa para que la XRF pueda penetrar hasta el núcleo y determinar su composición. Además establecen como los análisis previos con XRF hacen más fácil la adjudicación elemental de los picos de los espectros obtenidos con LIBS. Del mismo modo, se comprueba la complementariedad de ambas técnicas pues hay algunos elementos que solamente pueden detectarse con una de las dos, ya sea por encontrarse a profundidades a las que la XRF no llega o, al contrario, por ser impurezas de muy baja y superficial concentración que el LIBS no alcanza a distinguir.

#### 4. CONCLUSIONES

Son escasos los casos en los que una sola técnica analítica nos puede proporcionar por sí misma toda la información necesaria para caracterizar un objeto de interés artístico o arqueológico. Cada vez se desarrollan más casos en los que los datos obtenidos con diferentes técnicas se complementan entre ellos y proporcionan información significativa para la interpretación de los hallazgos.

La combinación de una técnica como la LIBS con otros métodos como la XRF puede aportar conocimientos materiales para la caracterización de objetos de bronce a niveles muy diversos, no solo en lo referente a la composición elemental y estructural, sino a las técnicas de fabricación, origen de los materiales, productos de corrosión, decoraciones desaparecidas y un largo etcétera, además de poder ser una herramienta auxiliar en los procesos de intervención por limpieza láser.

La aproximación multitécnica en el análisis de objetos patrimoniales es una metodología que puede ser aplicada

a todos los campos y materiales y es algo que disciplinas como la conservación, la arqueología o la historia del arte deben tener muy presente.

#### REFERENCIAS

- [1] A. Nevin, G. Spoto, and D. Anglos, "Laser spectroscopies for elemental and molecular analysis in art and archaeology," *Applied Physics A: Material Science & Processing*, vol. 106, no. 2, pp. 339–361, 2012.
- [2] J. Agresti, I. Osticioli, M. C. Guidotti, N. Kardjilov, and S. Siano, "Non-invasive archaeometallurgical approach to the investigations of bronze figurines using neutron, laser, and X-ray techniques," *Microchemical Journal*, vol. 124, pp. 765–774, 2016.
- [3] J. A. Pérez-Serradilla, A. Jurado-López, and M. D. Luque de Castro, "Complementarity of XRFs and LIBS for corrosion studies," *Talanta*, vol. 71, no. 1, pp. 97–102, Jan. 2007.
- [4] V. Kantarelou, C. Zarkadas, A. Giakoumaki, and M. Giannou, "A novel approach on the combined in-situ application of LIBS and  $\mu$ -XRF spectrometers for the characterization of copper alloy corrosion products," in *Metal 2007, 2007*, vol. Vol. 2. In, pp. 35–41.
- [5] L. Torrisi, F. Caridi, L. Giuffrida, A. Torrisi, G. Mondio, T. Serafino, M. Caltabiano, E. D. Castrizio, E. Paniz, and A. Salici, "LAMQS analysis applied to ancient Egyptian bronze coins," *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interaction with Materials and Atoms*, vol. 268, no. 10, pp. 1657–1664, May 2010.
- [6] Ł. Ciupiński, E. Fortuna-Zaleśna, H. Garbacz, A. Koss, K. J. Kurzydłowski, J. Marczak, J. Mróz, T. Onyszczyk, A. Rycyk, A. Sarzyński, W. Skrzeczanowski, M. Strzelec, A. Zatorska, and G. Z. Zukowska, "Comparative laser spectroscopy diagnostics for ancient metallic artefacts exposed to environmental pollution," *Sensors*, vol. 10, no. 5, pp. 4926–4949, 2010.
- [7] M. Ferretti, G. Cristoforetti, S. Legnaioli, V. Palleschi, A. Salvetti, E. Tognoni, E. Console, and P. Palaia, "In situ study of the Porticello Bronzes by portable X-ray fluorescence and laser-induced breakdown spectroscopy," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 62, no. 12, pp. 1512–1518, Dec. 2007.
- [8] M. F. Alberghina, R. Barraco, M. Brai, T. Schillaci, and L. Tranchina, "Comparison of LIBS and  $\mu$ -XRF measurements on bronze alloys for monitoring plasma effects," *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 275, no. 1, pp. 1–12, 2011.
- [9] M. F. Alberghina, R. Barraco, M. Brai, T. Schillaci, and L. Tranchina, "Integrated analytical methodologies for the study of corrosion processes in archaeological bronzes," *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, vol. 66, no. 2, pp. 129–137, Feb. 2011.



**Joan Escudé González** es diplomado y graduado en Conservación y Restauración de Bienes Arqueológicos por la Escuela Superior de Conservación y Restauración de Bienes Culturales de Cataluña. Actualmente está cursando el Máster en Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico de la Universidad Pablo de Olavide.

# Implementación de la tecnología láser en la restauración de metales arqueológicos.

Marina Estornell Zubeldia

**Resumen**— Debido a la constante y rápida evolución en las técnicas de limpieza de objetos con valor simbólico y de representación social-cultural-histórica-artística, ha llevado a la generación de una enorme variedad de posibles metodologías y prácticas de limpieza. Aún así una gran parte de estas suelen ser, por desgracia, un tanto invasivas, pudiendo dejar huellas en los objetos. Por ello cabe señalar que, cada día, la aplicación del láser en la conservación y restauración de bienes culturales, con especial mención en el área de los metales, es cada vez mayor y con grandes enfoques a futuras técnicas de análisis y de conservación. No obstante, a pesar de que se trata de un tema estudiado y cuya investigación ya lleva algunos años, la intervención sobre los materiales metálicos sigue siendo un tema todavía polémico y que suscita debate en el área de la restauración.

**Palabra Clave**— Láser, Restauración, Metal, Arqueología, Corrosión.

## 1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas el rápido desarrollo experimentado por los dispositivos y técnicas láser ha proporcionado nuevas metodologías y soluciones en la ciencia de la conservación. El amplio rango de materiales utilizados en obras de arte u objetos del Patrimonio Cultural, junto con la complejidad de procedimientos de uso, requiere el concurso de varias disciplinas dentro de la ciencia de materiales, la química y la biología. Los láseres se utilizan como fuentes de excitación para análisis espectroscópico y diagnóstico óptico, como herramientas para conservación, como por ejemplo para limpieza basada en ablación láser, y como elemento principal de los escáners 3D, dispositivos que analizan la forma y el color de los objetos [1]

El uso de en las diversas aplicaciones del láser se comenzaron a desarrollar sobre los años 60, las cuales no han dejado de evolucionar y avanzar en la creación de nuevas técnicas y métodos de análisis; y gracias a esta evolución, ha sido posible su uso en el estudio del Patrimonio Histórico.

## 2. LA RADIACIÓN LÁSER.

La palabra "laser" procede del acrónimo en inglés *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, que en español se traduce como, *amplificación de luz por emisión estimulada de radiación* (ALEER). En su concepto, el láser se refiere a cualquier dispositivo que utilice la emisión para generar un determinado haz de luz coherente de un medio adecuado y con el tamaño, la forma y la pureza controlados, y que, como toda radiación electromagnética, esta se encuentra definida por una frecuencia, una longitud de onda y una velocidad de propagación.

La radiación láser es una forma extremadamente intensa de luz monocromática, emitida en forma de haz de luz colimado. Su naturaleza monocromática significa que el haz de luz láser se relacionará de manera muy intensa con algunos materiales, pero prácticamente nada en absoluto con otros, mientras que su carácter altamente direccional hace que dirigir un rayo de luz con toda exactitud hacia un objetivo sea relativamente fácil. La direccionalidad del rayo láser significa también que su energía puede ser recogida con gran facilidad por una lente y, o bien difundirla sobre una extensa área o dirigirla hacia un punto y controlar así su efecto sobre una superficie. [2]

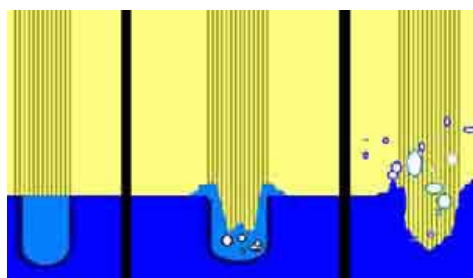


Figura 1. Mecanismo del fenómeno de spallation en la ablación.

El láser es un instrumento que se nos presenta como una herramienta de gran precisión, y que, con la debida selección nos permitirá trabajar con gran exactitud y control, aspecto de gran importancia y con un gran potencial, ante las tareas de restauración y conservación.

## 3. METALES ARQUEOLÓGICOS.

Los metales rara vez se encuentran en un estado de material puro, más bien se presentan en combinaciones químicas con uno o más elementos no-metálicos, estas combinaciones químicas son comunmente conocidas como mineral; por ello, la corrosión, que podría ser simplemente definida como óxido, se trata de la tendencia de los metales de volver a su estado natural, cuyo estado menor es el mineral original.

### 3.1. Corrosión. Procesos y causas.

La corrosión se define como el ataque destructivo e involuntario de un metal, se trata de un ataque electroquímico que generalmente se inicia en la superficie.

Es el proceso mediante el cual se produce un deterioro de un metal y de sus aleaciones, como consecuencia de una acción química o electroquímica del entorno en el que se encuentra. La velocidad a la que la corrosión tenga lugar, o avance, depende en algunos aspectos como la temperatura, la salinidad del medio donde se encuentra, y las propiedades del material o los materiales en cuestión.

La corrosión ordinaria, es un proceso redox por el cual los metales se oxidan por medio del oxígeno  $O_2$ , en presencia de humedad (Fig. 1). El oxígeno en estado gaseoso es un agente oxidante, y la mayoría de los metales tienen potenciales de reducción menores que éste, por lo tanto son fácilmente oxidables. [3]

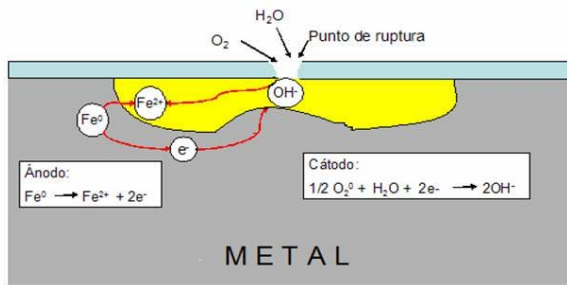


Figura 2. Proceso corrosión

Algunos de los procesos más familiares de corrosión son la herrumbre del hierro y el acero y la formación de pátina verde en el cobre y sus aleaciones bronce y latón.

No siempre que se presenta la oxidación de un metal existe corrosión, en algunos casos el óxido formado es resistente y forma una capa gruesa de óxido que impide que el resto del material continúe oxidándose. Este fenómeno es común en materiales de aluminio, zinc y magnesio. [3]

La corrosión puede ser definida como la degradación de un material debido a una reacción con su entorno. Esta degradación implica un deterioro de las propiedades físicas del material, provocado por un debilitamiento del material debido a una pérdida, ruptura o fragmentación.

Sin embargo, la corrosión es un fenómeno mucho más amplio que también afecta materiales no metálicos (cerámicas, polímeros, etc.), que sufren corrosión mediante otros mecanismos dependiendo del medio ambiente.

### 3.2. Consideraciones Previas.

Previo a cualquier tipo de intervención o contacto con la pieza, lo primero deberá ser realizar unos análisis y estudios sobre el estado de la pieza. Se recomienda realizar un análisis radiológico; este nos aportará una imagen visible, en el uso de rayos X, del diagnóstico interno de las estructuras del material metálico y de su núcleo. Este tipo de análisis servirá para observar con mayor detalle las áreas que

presentan un mayor grado de corrosión, así como los detalles internos de la pieza en sí.

Es por ello que todos estos análisis y estudios previos, presentan una parte importante en el proceso de restauración y conservación, ya que, los datos y resultados obtenidos servirán tanto antes, durante y después de la restauración; de esta forma podremos observar qué cambios ha sufrido la estructura interna de la pieza, y de esta manera, poder llevar a cabo una mejor conservación preventiva, e incluso, alguna nueva intervención en el futuro.

## 4. LIMPIEZA LÁSER.

La limpieza implica con frecuencia la eliminación de capas de suciedad muy adheridas a una superficie que es muy valiosa pero frágil y tendente al desmenuzamiento. [2]

La limpieza láser se basa en la eliminación de material superficial mediante la irradiación con pulsos láser de suficiente intensidad. Este procedimiento elimina el contacto directo con el sustrato y permite el control del espesor de la capa eliminada en el rango de decenas de nanómetros ( $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ). Este fenómeno se denomina ablación láser y tiene lugar a través de mecanismos generalmente complejos en los que intervienen procesos de tipo térmico, fotoquímico y fotomecánico. La contribución relativa de cada uno de ellos depende de la naturaleza del sustrato y de los parámetros del láser, fundamentalmente longitud de onda, energía, duración y número de pulsos. [4]

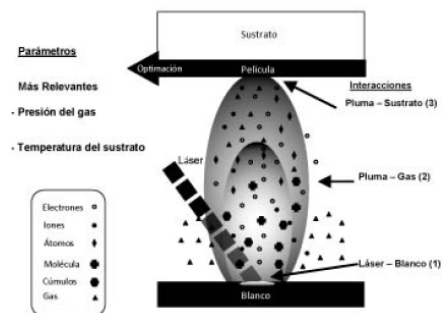


Figura 3. Interacciones fundamentales para la optimización del proceso de ablación y deposición de la película sobre el sustrato (Okada, 1999)

La ablación es el principal fenómeno por el cual limpia el láser. La ablación láser es un término que designa una serie de procesos físico-químicos que alteran el material y engloban fenómenos de vaporización, desorción, *sputtering* (recubrimientos de una superficie), eyección, *etching* (ataque químico), *spallation* (conversión explosiva de energía térmica en energía cinética), generación de plasma, emisión inducida y *blow-off* (explosiones), dependiendo de la energía de la luz láser. Estos fenómenos no se suelen dar de forma aislada sino que en muchos casos se producen cooperativamente y no es raro que se produzcan varios de ellos simultáneamente, aunque la ablación no implica necesariamente que se den todos en conjunto. [5]

### 4.1. Limpieza Láser sobre Metales Arqueológicos.

La restauración con láser en metales arqueológicos puede llegar a considerarse una técnica innovadora, debido a que

se encuentra en una fase de experimentación, la cual da indicios de ventajas en la solución de determinados problemas de deterioro, todo ello, frente a las tradicionales técnicas de limpieza.

Quizás, debido a eso, es más considerada una técnica de complementación antes que de suplantación de las técnicas ya existentes y de los métodos mecánicos o químicos.

El láser es capaz de eliminar las concreciones y productos de corrosión, depositados en una pieza de metal tras años de deterioro, y hacerlo de forma selectiva recuperando en cierta manera la forma original que aún quede del objeto, sin intervención manual sobre la pieza.



Figura 4. Limpieza láser sobre moneda de cobre revelando relieve. [7]

Se observa que en la emisión láser con una duración de pulso corto es generalmente más preferible para evitar el daño por calor a la superficie de los metales. Esto es particularmente visible en la limpieza de metales, que presentan una temperatura de fusión baja, como el plomo y el estaño. Esta preocupación también se aplica siempre en todos aquellos procedimientos donde la limpieza tiene como fin la eliminación completa de los óxidos, produciendo una exposición directa de la radiación láser sobre el metal.

## 5. CONCLUSIONES

En conclusión, la limpieza con láser puede ser una opción para los problemas de conservación que aún están sin resolver, o que presentan soluciones difíciles con las técnicas tradicionales de limpieza. Como se ha podido observar, esta técnica se puede aplicar de forma fiable para el tratamiento de objetos muy frágiles y alterados, ya que se puede lograr un grado de limpieza sin ejercer presión mecánica, impidiendo así, una mayor fragmentación y la exfoliación de la superficie. En cuanto el tiempo de funcionamiento, que es un parámetro primario importante, pero no en los procedimientos de conservación, la limpieza láser requiere una cantidad de tiempo más corto con respecto a la limpieza mecánica.

La diferencia fundamental entre el láser y otras formas de limpieza es que, en muchos casos, es capaz de discriminar con éxito entre una superficie lisa y otra sucia, lo cual es resultado de la naturaleza monocromática de la radiación láser. El uso cuidadoso de un sistema láser adecuado permite al conservador llevar a cabo la limpieza de forma mucho más controlada para que la superficie subyacente quede intacta. En lugar de bombardearla con partículas abrasivas o moléculas de agua, se utiliza un pulso de luz de forma que cualquier impacto resulta insignificante, ya que el proceso no requiere contacto.

Aun así el láser no es en absoluto una panacea, pero entre las características más interesantes de esta técnica, están el alto control y la selectividad. El control es una consecuencia del proceso de eliminación, este sigue la microestratigrafía de las capas de alteración, lo que permite al restaurador poder detener la limpieza en el estrato que considere apropiado. La selectividad, permite la discriminación de las capas de alteración que van ser eliminadas con respecto a la superficie original, que dependen de varios factores, como la reflectancia de la superficie y la cohesión material. Teniendo en cuenta estas características, la limpieza con láser nos ofrece unos avances y mejoras reales en la conservación de los metales.

## REFERENCIAS

- [1] Castillejo M., Moreno P., Oujja M., Radvan R., Ruiz J. (eds.) (2008), Volume of Proceedings of 7th International Conference of Lasers in the Conservation of Artworks, CRC Press, Taylor and Francis Group, London, ISBN 978-0-415-47596-9
- [2] Cooper M., Zafirooulos V., Fotakis C., Pueyo A., *Introducción a la limpieza con láser*. Madrid: Istmo, 2005.
- [3] R. Enríquez García, "Corrosión de metales, un proceso espontáneo", UAM Escuela Nacional Preparatoria. Proyecto INFOCAB SB202507, <http://prepa8.unam.mx/academia/colegios/quimica/infocab/unidad124.html>.
- [4] M. Castillejo, C. Domingo, S. Martínez, & M. Oujja, "Láseres y Nanotecnologías para el Patrimonio Cultural" *TechnoHeritage (Primera Reunión de la Red de Ciencia y Tecnología para la Conservación del Patrimonio)*, pp. 27-30, Jun. 2011.
- [5] J. Barrio, J. Chamón, A.I. Pardo, M. Arroyo, E. Catalán, " Primeros resultados de la restauración mediante tecnología láser de metales arqueológicos," *Notas corrosivas*, Publicaciones Digitales ENCRyM-INAH,
- [6] C. Fotakis, D. Anglos, V. Zafirooulos, S. Georgiou, V. Tornari. *Lasers in the preservation of cultural heritage: Principles and applications*. New York: Taylor & Francis, 2007.
- [7] R. Pini, S. Siano, R. Salimbeni, M. Pasquinucci, and M. Miccio, "Tests of laser cleaning on archeological metal artefacts," *Journal of Cultural Heritage*, vol. 1, pp. 129-137, 2000, doi:10.1016/S1296-2074(00)00139-4.
- [8] S. Siano, J. Agresti, I. Cacciari, D. Ciofini, M. Mascalchi, I. Osticioli, and A. Mencaglia, "Laser cleaning in conservation of stone, metal, and painted artifacts: state of the art and new insights on the use of the Nd:YAG lasers," *Applied Physics A*, vol 106, n° 2, pp. 419-446, Nov. 2011, doi:10.1007/s00339-011-6690-8



**Marina Estornell Zubeldia** alumna del máster universitario en Diagnóstico del estado de conservación del Patrimonio Histórico de la Universidad Pablo de Olavide y graduada en Conservación y restauración de Bienes Culturales por la Universidad Politécnica de Valencia en 2014. Con dos títulos de Especialización, *Arqueología Clásica y Conservación* por la Universidad de Jaime I, y en

*Gestión del Patrimonio Cultural* por la Universidad a distancia de Madrid (UDIMA).

# Guía rápida para estudiar el color de un vidrio

Teresa Palomar Sanz

**Resumen**— El color de un vidrio está determinado por la presencia de determinados elementos químicos, su estado de oxidación y su concentración, por ello es necesario aplicar técnicas ópticas como la espectrofotometría visible o técnicas nucleares como la espectroscopía de rayos X cercana al borde de absorción (XANES) que permitan cuantificar el estado de oxidación de los metales. La microscopía electrónica de transmisión es muy útil cuando se quieren caracterizar los cromóforos en forma de nanocoloides o microcristales, y la espectroscopía Raman para caracterizar opacificantes.

**Palabras Claves**— Vidrio, color, UV/VIS, XANES, espectroscopía Raman, TEM.

## 1. INTRODUCCIÓN

El color del vidrio es el resultado de su interacción con la radiación luminosa que incide sobre él. Si un haz de luz blanca atraviesa el vidrio sin pérdidas, el vidrio será incoloro, pero si absorbe determinadas longitudes de onda, el vidrio mostrará la coloración resultante de las zonas no absorbidas [1].

La estructura básica de un vidrio, formada por óxidos formadores, fundentes y estabilizantes, es incolora por lo que es preciso incorporar determinados compuestos químicos para producir la coloración. Los compuestos incorporados al vidrio que aportan color pero mantienen la transparencia del vidrio se denominan cromóforos, mientras que los compuestos que aportan color y vuelven al vidrio opaco se denominan opacificantes.

La gran problemática del estudio de la coloración es la presencia de varios cromóforos y/u opacificantes en un mismo vidrio para conseguir tonalidades intermedias, incluso un mismo elemento puede presentar dos valencias diferentes en la masa vítrea modificando el color final del vidrio. Por ello, este trabajo trata de recoger las técnicas más comunes para el estudio del color de los vidrios.

## 2. CROMÓFOROS

Existen tres tipos de cromóforos en función de su tamaño y su interacción con la luz (Tabla 1).

Los cromóforos más habituales son los colorantes iónicos formados principalmente por cationes de elementos de transición disueltos en la estructura del vidrio. Estos elementos tienen su penúltima capa de valencia *d* incompleta, por lo que los saltos de los electrones entre los diferentes niveles de excitación se producen fácilmente y la

energía absorbida y liberada en estos saltos cae en el intervalo visible del espectro electromagnético [1]. La coloración resultante de los vidrios será la resultante de las zonas no absorbidas por los cromóforos.

El segundo grupo de cromóforos más habituales son los que se encuentran en estado coloidal o microcristalino formados por agrupamientos de átomos metálicos o moléculas (Tabla 1). En este grupo hay que destacar los vidrios rubí de oro y de cobre, formados por partículas coloidales de dichos metales cuyo diámetro varía entre 20 y 50 nm. En este tipo de cromóforos, la coloración se produce por la absorción de determinadas longitudes de onda por parte de los coloides y, predominantemente, por la dispersión de la luz inducida por las partículas coloidales. Por tanto, el color va a depender del tamaño de los agregados coloidales, cuanto mayor sea el tamaño de éstos, mayor será el desplazamiento de la banda de absorción hacia longitudes de onda mayores induciendo un color castaño en el vidrio. El proceso de producción de un vidrio rubí comprende tres etapas: la disolución iónica del agente colorante en el vidrio, su reducción a un estado de valencia inferior o al estado elemental y su precipitación y agregación coloidal. Un vidrio histórico muy conocido y estudiado que presenta este tipo de cromóforos es el Vaso de Licurgo (British Museum, Londres, Reino Unido), el cual cambia de color si la fuente de iluminación es interna o externa. En este caso, el observador percibe la transmisión o absorción-reflexión de la luz inducida por los nanocoloides de oro y plata [2].

El último grupo de cromóforos lo constituyen los vidrios que deben su coloración a la presencia de cristales de tamaño apreciable en el interior de la estructura del vidrio. Estos cristales van a dispersar la luz induciendo el color al vidrio. En este caso, los cristales se forman por el enfriamiento lento de la masa vítrea.

A lo largo de la historia, se han ido descubriendo e incorporando nuevos cromóforos lo que ha ido ampliando la gama cromática del vidrio [3].

## 3. OPACIFICANTES

Hay que tener en cuenta que no todos los vidrios son transparentes, existen vidrios opacos utilizados principalmente en servicios de mesa, objetos de decoración y

TABLA 1  
CLASIFICACIÓN DE CROMÓFOROS DE ACUERDO CON SU TAMAÑO [1]

Grado de división	Estado	Magnitud	Ejemplos
Iónica o molecular	Disolución	1 nm	Fe <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , Cr <sup>3+</sup> , Cr <sup>6+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , V <sup>5+</sup> ...
Coloidal o microcristalina	Dispersión coloidal o microcristalina	1 nm - 100 nm	Cu <sub>2</sub> O, Ag <sup>0</sup> , Au <sup>0</sup> ...
Grosera	Dispersión cristalina	> 100 nm	Cu <sup>0</sup> , Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>

teselas de mosaicos. En estos vidrios, determinados compuestos químicos forman cristales de gran tamaño que reflejan la luz. Estos compuestos se denominan opacificantes.

Los opacificantes más habituales en los vidrios más antiguos son los antimoniatos de calcio o plomo [4]. Posteriormente, junto con los antimoniatos, se comenzaron a utilizar las sales de estaño o titanio [5].

#### 4. TÉCNICAS ANALÍTICAS

El color de un vidrio es consecuencia de la absorción y/o dispersión de la radiación visible por parte de los iones y partículas metálicas, y va a depender del estado de oxidación y de la concentración de dichos elementos. Las técnicas más idóneas para el análisis de una propiedad óptica como es el color son las técnicas ópticas como la espectrofotometría visible, o las técnicas espectroscópicas que permitan cuantificar el estado de oxidación de los elementos químicos como la espectroscopía de rayos X cercana al borde de absorción. La microscopía electrónica de transmisión es muy útil cuando se quieren caracterizar los cromóforos en forma de nanocoloides o microcristales, y la espectroscopía Raman para caracterizar los opacificantes.

Tratar de analizar la coloración de un vidrio únicamente mediante el análisis de su composición química puede inducir errores ya que la presencia de diferentes cromóforos varía la coloración de la pieza pudiendo, incluso, contrarrestar su color [6]. Además, la existencia de elementos químicos como el hierro o el manganeso, que pueden presentar diferentes estados de oxidación, puede variar la coloración del vidrio sin alterar su composición química.

##### 4.1. Espectrofotometría visible

La espectrofotometría visible permite obtener espectros de transmitancia o reflectancia característicos de cada cromóforo. Además, con esta técnica no sólo se va a detectar el cromóforo principal, también se pueden detectar las contribuciones de especies menos intensas cromáticamente pero que afectan a la coloración final del vidrio (Fig. 1).

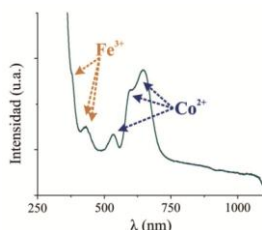


Fig. 1. Espectro de espectrofotometría visible de un vidrio verdoso que muestra las bandas de absorción de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Co}^{2+}$ .

La técnica más adecuada para determinar los cromóforos de un vidrio es la espectrofotometría de transmisión. En ella, un haz de luz visible se hace atravesar una lámina de vidrio, mientras que un haz gemelo que no lo atraviesa

actúa como haz de referencia. La intensidad luminosa para cada longitud de onda se compara con la intensidad del haz de referencia, permitiendo conocer la luz absorbida por el cromóforo del vidrio.

La técnica es destructiva, ya que para la obtención de un espectro óptico es necesario preparar una lámina de aproximadamente 1 mm de espesor y pulido óptico a espejo por ambas caras. Según la ley de Lambert-Beer, la absorbancia de la muestra es proporcional al espesor atravesado por el haz de luz. Por ello, para minimizar errores, es necesario que todas las láminas tengan las caras paralelas y el mismo espesor.

Cuando los vidrios, ya sea por su relevancia histórica, fragilidad, espesor o curvatura, no permiten la preparación de la muestra se puede aplicar la espectrofotometría de reflexión. En ella, el haz de luz incide sobre la muestra y se recoge la luz reflejada gracias a una esfera integradora. Con esta técnica la señal es más débil y de menor resolución que la que se obtiene por absorción.

##### 4.2. Espectroscopía de rayos X cercana al borde de absorción (XANES)

Las técnicas nucleares de absorción de rayos X (XAS) son técnicas no destructivas, selectivas a cada elemento y sensibles a bajas concentraciones. En particular, la espectroscopía de rayos X cercana al borde de absorción (XANES) ofrece información estructural específica sobre cada elemento como el estado de oxidación, la simetría, el número de coordinación, las distancias interatómicas o los parámetros de desorden en la primera esfera de coordinación.

La desventaja de esta técnica es que requiere una instalación nuclear avanzada y los espectros son complicados de analizar (Fig. 2), además es necesario analizar la contribución individual de cada elemento no teniendo certeza de la posible presencia de cromóforos secundarios.

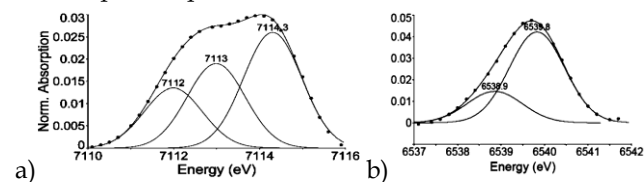


Fig. 2. Espectros de las bandas de XANES del a) hierro y b) manganeso. Imágenes extraídas de la referencia [7].

##### 4.3. Microscopía electrónica de transmisión

La concentración de cromóforos en un vidrio es tan baja y éstos se encuentran disueltos en la matriz vítrea que no se pueden observar mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Pero si los cromóforos se encuentran en estado coloidal o cristalino se pueden observar mediante la microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Fig. 3).

La técnica no requiere mucha muestra, pero la preparación es destructiva ya que es necesario preparar una réplica de carbón de la superficie de fractura fresca atacada previamente con ácido fluorhídrico.

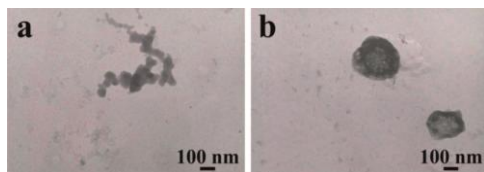


Fig. 3. Imágenes de TEM de coloides de  $\text{Ag}^0$ . Imágenes extraídas de la referencia [8].

#### 4.4. Espectroscopía Raman

La espectroscopía Raman es una técnica no destructiva que permite identificar la naturaleza mineralógica de las fases cristalinas que conforman los opacificantes del vidrio, siempre que éstos contengan enlaces covalentes [9].

A pesar de ser una técnica no destructiva, para la óptima caracterización de los opacificantes es preciso embutir una pequeña muestra del vidrio y pulirlo hasta obtener una superficie especular. La caracterización de los opacificantes es sencilla con una base de datos adecuada, ya que cada compuesto tiene una "huella" característica que permite su identificación (Fig. 4).

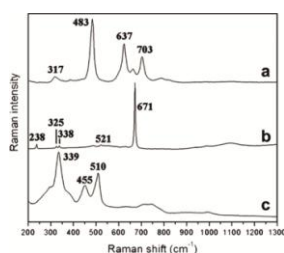


Fig. 4. Espectros Raman de los opacificantes a)  $\text{Ca}_2\text{Sb}_2\text{O}_7$ , b)  $\text{CaSb}_2\text{O}_6$ , y c)  $\text{Pb}_2\text{Sb}_2\text{O}_7$ . Imagen extraída de la referencia [4].

La aplicación de difracción de rayos X para la caracterización de los opacificantes es complicada debido a que éstos son demasiado pequeños y están embudidos en una matriz amorfa que induce una gran banda en el espectro que oculta las fases cristalinas minoritarias.

#### 4. CONCLUSIONES

El estudio del color en los vidrios es más complicado de lo que puede parecer en un principio. El hecho de que existan tres tipos de cromóforos diferentes, que un mismo vidrio pueda presentar varios cromóforos, o que éstos puedan encontrarse en dos estados de oxidación diferentes en una misma matriz puede afectar al color final del objeto. Además, hay que tener en cuenta que también existen opacificantes que pueden alterar la transparencia y algunos, incluso, aportar cierta coloración amarillenta al vidrio. Por ello, no existe una metodología única para la caracterización general del color.

La técnica más idónea para cuantificar los cromóforos es la espectroscopía visible, pero es una técnica destructiva que conlleva preparación de muestra. Las técnicas nucleares como XANES permiten conocer el estado de oxidación de los elementos metálicos, aunque no es una técnica de fácil acceso e interpretación. Los agregados atómicos, moleculares y cristalinos se pueden observar y cuantificar mediante microscopía electrónica de transmisión pero requiere una compleja preparación de muestra.

En cuanto a los opacificantes, la técnica más habitual que se aplica para determinar las especies es la espectroscopía Raman que permite conocer los óxidos y sales que inducen la opacificación del vidrio.

#### REFERENCIAS

- [1] J.M. Fernández Navarro, *El vidrio*. 3ª ed. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 2003.
- [2] D.J. Barber, I.C. Freestone, "An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus Cup by analytical transmission electron microscopy", *Archaeometry*, vol. 32, nº 1, pp. 33-45, 1990, doi: 10.1111/j.1475-4754.1990.tb01079.x.
- [3] F. Agua, J. Peña-Poza, J.F. Conde *et al.*, "Análisis óptico de los cromóforos de las vidrieras y su evolución cronológica", *Estudio y Conservación del Patrimonio Cultural. Actas*, España: pp. 98-101, 2015.
- [4] P. Ricciardi, P. Colomban, A. Tournié *et al.*, "A non-invasive study of Roman Age mosaic glass tesserae by means of Raman spectroscopy", *Journal of Archaeological Science*, vol. 36, nº 11, pp. 2551-2559, 2009, doi: 10.1016/j.jas.2009.07.008.
- [5] V.S. Muralha, S. Canaveira, J. Mirão *et al.*, "Baroque glass mosaics from the Capela de São João Baptista (Chapel of Saint John the Baptist, Lisbon): unveiling the glassmaking records", *Journal of Raman Spectroscopy*, vol. 46, nº 5, pp. 483-492, 2015, doi: 10.1002/jrs.4669.
- [6] T. Palomar Sanz, J. Peña-Poza, J.F. Conde Moreno, "Cuentas de vidrio prerromanas y arqueometría: una valoración de los trabajos realizados en la Península Ibérica", *Zephyrus*, vol. 64, pp. 53-62, 2010.
- [7] R. Arletti, S. Quartieri, I.C. Freestone, "A XANES study of chromophores in archaeological glass", *Applied Physics A*, vol. 111, pp. 99-108, 2013, doi: 10.1007/s00339-012-7341-4.
- [8] T. Palomar, F. Agua, M. García Heras, M.A. Villegas, "Chemical degradation and chromophores of 18th century window glasses", *Glass Technology - European Journal of Glass Science and Technology Part A*, vol. 52, nº 5, pp. 145-153, 2011.
- [9] P. Colomban, "Raman spectrometry, a unique tool to analyze and classify ancient ceramics and glasses", *Applied Physics A*, vol. 79, nº 2, pp. 167-170, 2004, doi: 10.1007/s00339-004-2512-6.



**Teresa Palomar Sanz**, doctora en Química por la Universidad Autónoma de Madrid (2013). Ha trabajado en diversos institutos y centros del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Actualmente se encuentra cursando el Máster de Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla.



# Nanotecnología: La ciencia al servicio del Patrimonio Histórico

Julia Benítez Jiménez

**Resumen**— La nanociencia y la nanotecnología han demostrado ser herramientas útiles y versátiles en el estudio y la conservación del Patrimonio Histórico. La capacidad de modificar las propiedades de los materiales mediante esta tecnología, abre un gran abanico de posibilidades en cuanto a las aplicaciones de los mismos, de forma que pueden encontrarse en forma de pigmentos, revestimientos o tratamientos de diversa índole, lo cual supone un gran avance en el ámbito del Patrimonio Histórico.

**Palabras Claves**— Conservación, Nanomateriales, Nanopartículas, Patrimonio, Tratamiento.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los avances tecnológicos han supuesto una gran cantidad de mejoras en campos muy diversos como la medicina o la industria, así como también en el estudio del Patrimonio Histórico. En este sentido, la nanociencia y la nanotecnología han abierto una nueva puerta a la aplicación de materiales que anteriormente eran inviables y aportado, a la conservación del patrimonio, nuevos productos con propiedades mejoradas que aventajan a los tratamientos protectores tradicionales.

Al reducir un material macroscópico a escala nanométrica se obtiene un material ligeramente diferente, ya que aunque su composición química no varía, si lo hacen sus propiedades [1].

Son muchos los materiales que pueden llevarse a la escala nanométrica, y, aunque la reducción de tamaño implica efectos comunes en ellos, las nuevas propiedades que presenten también van a depender de la composición química del material original.

La Nanotecnología modifica las propiedades de los materiales en base al tamaño de los mismos, y por tanto su comportamiento, generando materiales con propiedades únicas y características, con múltiples aplicaciones como las expuestas a continuación.

## 2. NANOPARTÍCULAS EN PIGMENTOS

La obtención de decoraciones basadas en oro coloidal, conocidas como Púrpura de Cassius, es un proceso muy complicado, ya que se caracterizan por tener como base física la presencia de nanopartículas de oro (AuNPs), capaces de absorber de forma intensa determinadas frecuencias del espectro electromagnético y proporcionar coloraciones rojizas muy intensas.

Mediante este estudio se busca un proceso de síntesis por vía húmeda que permita obtener pigmentos entre rojos y púrpuras de forma fácil, que pueda ser transferido a escala industrial [2].

La síntesis de los pigmentos (Tabla 1) se llevó a cabo

partiendo de agua destilada, ácido tetracloroaurico y bromuro amónico para las AuNPs, y, añadiendo aditivos en algunos casos, así como coloides industriales de diverso tipo para evaluar el método de encapsulado. Por último, se utilizó un vidrioado transparente de monococción para evaluar el poder colorante de los pigmentos.

TABLA 1  
MATERIAS PRIMAS USADAS EN LA SÍNTESIS DE PIGMENTOS

Ref.	H <sub>2</sub> AuCl <sub>4</sub> (mmol)	NH <sub>4</sub> Br (mmol)	SiO <sub>2</sub> (mL)	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (mL)	SnO <sub>2</sub> (mL)	NH <sub>3</sub> (mL)	6MH (μL)	DTA (μL)	CMC (mL)
A1	0,76	1,43	5	-	-	3	-	-	-
A2	1,52	2,86	20	-	-	12	-	-	-
B1	0,76	1,43	5	-	-	3	100	-	-
B2	0,76	1,43	5	-	-	3	100	-	-
B3	0,76	1,43	5	-	-	3	100	-	-
C1	0,76	1,43	5	-	-	3	-	100	-
C2	0,76	1,43	5	-	-	3	-	100	30
D1	0,76	1,43	-	10	-	3	-	100	32
D2	0,76	1,43	-	-	13	3	-	100	32

Como resultado, se obtuvieron pigmentos de elevado poder colorante encapsulando AuNPs, de tamaño inferior a 100nm, en una matriz de óxido refractario, con distintos tonos de rojo en función del óxido que constituyese la cápsula protectora.

## 3. NANOMATERIALES FOTOACTIVOS AUTO-LIMPIANTES

Los materiales fotocatalíticos, activados por luz solar, son capaces de degradar la materia orgánica depositada en monumentos y fachadas de edificios históricos, siendo el dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>) el fotocatalizador más eficiente conocido.

El grupo de investigación Nanomateriales TEP-243 ha sintetizado nanomateriales TiO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> a partir de una mezcla de oligómeros de etoxisilano con nanopartículas de titanio en presencia de un surfactante no iónico (n-octilamina) [3].

En la figura 1 se presentan probetas de roca carbonata tratadas con el fotocatalizador y sin tratar. En la probeta

sin tratar se observa un cambio de color tras mancharse con azul y metileno y ser expuesta a radiación UV, mientras que la probeta tratada recupera su color blanco tras la exposición a radiación UV.

Se observan también en la figura 1 los resultados de un ensayo de cristalización de sales en el que la roca tratada permanece inalterada, mientras que la muestra sin tratar se pulveriza completamente.

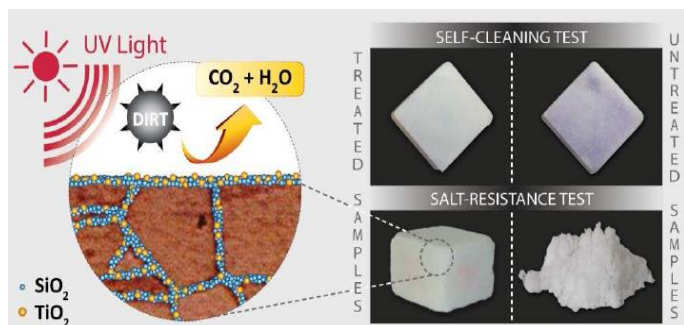


Fig. 1. Esquema proceso fotocatalítico (izq); imágenes de rocas carbonatas tratadas y sin tratar tras ensayos de auto-limpieza y cristalización de sales.

Estos nanomateriales se caracterizan por no fracturarse y dotar al sustrato en el que se aplica de propiedades auto-limpiantes. Proporciona además, un incremento de la resistencia mecánica así como la durabilidad frente a procesos de formación de sales.

Son una herramienta en la conservación de edificios y monumentos ya que pueden aplicarse directamente en éstos en un proceso simple y de bajo coste.

#### 4. NANOTECNOLOGÍA Y CONSERVACIÓN DE DOCUMENTOS

Dentro del proyecto NANOFORART Papel-México que se realiza en el Laboratorio de Conservación del Museo Nacional de Antropología (MNA), se evalúa el modo de aplicación y eficacia del uso de nanopartículas de calcio y magnesio suspendidas en alcohol isopropílico (2-propanol), para la desacidificación y ajuste del pH en documentos así como la utilización de microemulsiones para la eliminación de adhesivos utilizados en las reparaciones de los mismos [4].

La investigación se realiza en 4 documentos del acervo del Archivo Histórico del MNA, y 24 documentos de descarte, todos pertenecientes al siglo XX, elaborados con pulpa mecánica y que presentan pH ácido, además de gran cantidad y diversidad de tintas solubles en los disolventes más comunes utilizados en la restauración de este tipo de material, así como adhesivos y papeles comerciales de reparaciones anteriores.

Los métodos de aplicación de las nanopartículas evaluados han sido 5, siendo la nebulización en ambiente saturado el que presenta mejores resultados, ya que no hubo ni dispersión ni arrastre de la tinta.

En cuanto a las microemulsiones, se evaluaron 3 métodos de aplicación (papeta de celulosa, caolín y atapulguita). Los dos primeros fueron descartados debido a la falta de control en la dispersión de la emulsión y de

agua de lavado, mientras que el tercer método presentó más ventajas y mejores resultados pero sin llegar a ser el método óptimo.

En todo caso, aunque los métodos de aplicación no han sido efectivos al cien por cien, se ha comprobado la eficacia de las microemulsiones (Figura 2).



Fig. 2. Eliminación de adhesivos con microemulsiones. NanoforArt Papel-México, 2013.

#### 5. NANOÓXIDOS EN REVESTIMIENTOS CERÁMICOS

Mediante el uso de nanoóxidos se pretenden mejorar las propiedades superficiales de la cerámica, de forma que se amplíe su rango de aplicación. En concreto se han seleccionado nanoóxidos de circonita y albúmina debido a que proporcionan propiedades mecánicas excelentes así como buena resistencia al ataque químico. En la Tabla 2 puede observarse la composición mineralógica de las muestras [5].

TABLA 2

COMPOSICIÓN MINERALÓGICA SUPERFICIAL DE LAS MUESTRAS

Sample	Mineralogical phases
P	Quartz, Mullite, Plagioclase
AP	Quartz, Mullite, Plagioclase, $\alpha$ -alumina
ZP	Quartz, Mullite, Plagioclase, t-zirconia

Los valores de absorción de agua no se han visto modificados con la adición de los nanoóxidos mientras que si hay un aumento en los valores de microdureza.

Las muestras P presentan el comportamiento quebradizo propio de las cerámicas frente al rayado, mientras que las muestras AP Y ZP si presentan cambios, con un aumento en la resistencia al rayado y la morfología del mismo.

Mediante SEM se comprueba la resistencia al ataque químico, observando cristales de Mullita al disolverse la fase cristalina en la muestra P. En las muestras tratadas, la presencia de los nanoóxidos previene la corrosión de la fase cristalina.

#### 5. TRATAMIENTO DE CONSOLIDACIÓN EN DOLOMIAS

La dolomía constituye uno de los materiales pétreos más utilizados en el ámbito del patrimonio histórico, y como tal, está sometida a diversos procesos de deterioro, ya sea por agentes internos o externos, lo que puede desencadenar una pérdida de cohesión interna en el

material, y que obliga a utilizar productos consolidantes para restablecer la cohesión perdida.

Para evaluar el tratamiento de consolidación en dolomías se van a analizar las características de un consolidante comercial que contiene nanopartículas de hidróxido de calcio, valorándose la eficacia de su aplicación en función del tiempo y de la humedad relativa, siendo esta última determinante en el proceso de carbonatación del hidróxido de calcio [6].

El proceso de consolidación (Figura 4) ha sido monitoreado y tras 28 días de la aplicación del producto y expuesta al 75% de humedad relativa, se aprecia que el consolidante ha penetrado en la probeta y ha suavizado la superficie de la misma al penetrar en los poros de la piedra

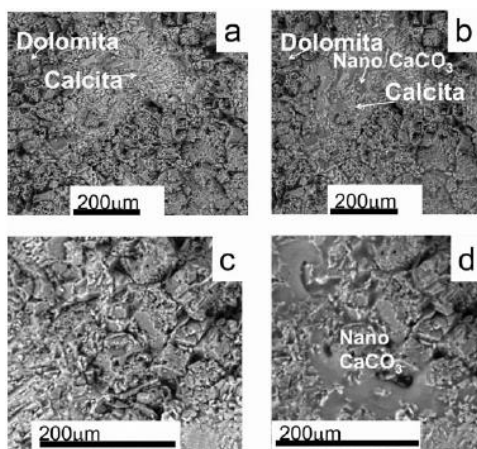


Fig. 3. Micrografías en ESEM de la piedra antes del tratamiento (Fig. 3a y 3c) y después de 28 días de aplicación del consolidante (Fig. 3b y 3d). Cara superior de la probeta.

Se ha realizado un estudio morfológico y estructural del consolidante, que junto con los resultados de las distintas técnicas analíticas confirman el proceso de carbonatación.

El producto, además, no genera daños en el material una vez aplicado por lo que resulta un método adecuado para mejorar la durabilidad de este tipo de materiales.

#### 4. CONCLUSIONES

El estudio del Patrimonio Histórico tiene en los avances tecnológicos y de investigación una de las herramientas más útiles para conseguir aplicaciones cada vez más completas y precisas.

La nanociencia y la nanotecnología abren la puerta al desarrollo de nuevos materiales para tratamientos específicos, los cuales aseguren la conservación del bien intervenido sin ocasionar daños o perjuicios en el mismo, lo cual es fundamental en cualquier intervención sobre elementos del Patrimonio Histórico.

#### REFERENCIAS

[1] ZADERENKO PARTIDA, A.P. (2014-2015): "Nanotecnología y Patrimonio. Sección 1. Introducción a la Nanotecnología" en Master de Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico, Universidad Pablo de Olavide, 1-19.

- [2] MESTRE, S., PALACIOS, M.D., AGUT, P. Instituto de Tecnología Cerámica (ITC). Asociación de Investigación de las Industrias Cerámicas (AICE). Universitat Jaume I. Castellón. España. "Síntesis de un pigmento rojo a partir de nanopartículas de oro" en Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio (en línea), ISSN 0366-3175, Vol 51, nº 2, Marzo-Abril 2012, págs. 75-82. Disponible en: <http://boletines.secv.es/upload/2012050281407.20125175.pdf> [Consulta 17-01-2015].
- [3] MOSQUERA, M.J. "Nuevos productos para restauración y conservación del Patrimonio Cultural" en RIIPAC (en línea), ISSN 2255-1565, nº 2, 2013, págs. 153 – 172. Disponible en: <http://www.eumed.net/rev/riipac> [Consulta 20-01-2015].
- [4] PÉREZ FLORES, M., RODRIGUEZ LARRAGAIN, K., VALENCIA ESCÁRCEGA, L.E. "La nanotecnología al servicio de la conservación de documentos. ¿Es posible?" en Panorama de la conservación del Patrimonio documental (en línea), ISBN 978-607-484-437-5, 2013. Disponible en: <http://www.publicaciones-encrym.org/gestion/index.php/ediciones/article/view/216> [Consulta 19-01-2015].
- [5] RAMBALDI, E., TUCCI, A., ESPOSITO, L., NALDI, D., TIMELLINI, G. Centro Cerámico Bologna Italiano, Italia. "Nano-oxides to improve the surface properties of ceramic tiles" en Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio (en línea), ISSN 0366-3175, Vol 49, nº 4, págs. 253-258, 2010. Disponible en: <http://boletines.secv.es/upload/20100901170620.201049253.pdf> [Consulta 19-01-2015].
- [6] GÓMEZ-VILLALBA, L.S., LÓPEZ-ARCE, P., ZORNOZA, A., ÁLVAREZ DE BUERGO, M., FORT, R. Instituto de Geociencias (CSIC-UCM), Madrid. "Evaluación del tratamiento de consolidación de dolomías mediante nanopartículas de hidróxido de calcio en condiciones de alta humedad relativa" en Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio (en línea), ISSN 0366-3175, Vol 50, nº 2, Marzo-Abril 2011, págs. 85-92. Disponible en: <http://boletines.secv.es/upload/2011042982016.20115085.pdf> [Consulta 17-01-2015].



**Julia Benítez Jiménez** recibió el título de Licenciada en Ciencias Ambientales por la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla en Septiembre de 2012. Actualmente cursa el Máster en Diagnóstico del Estado de Conservación del Patrimonio Histórico en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla

# Lo que la milbillonésima parte de un segundo puede hacer por ti

Juan Morillas Viñuales

**Resumen**—La femtoquímica es el estudio de la química a escalas de tiempo muy pequeñas. Es una disciplina reciente que ofrece una visión muy detallada de la estructura de las moléculas y nuevas perspectivas en campos como el diseño de fármacos y el estudio del metabolismo.

**Palabras Claves**— Femtoquímica, Química Física, Espectroscopía, Femtosegundo, Bomba-Sonda, Femtobiología, Fármacos, Malaria.

## 1. INTRODUCCIÓN: ¿QUÉ ES LA FEMTOQUÍMICA?

Si hoy quisiéramos comprar una nueva cámara fotográfica, una de las características en las que nos deberíamos fijar a la hora de buscar nuestra cámara ideal es la **resolución**. Queremos que nuestras fotografías tengan cada vez más megapíxeles, que capten el momento con la mayor exactitud posible. Y para ello disponemos de herramientas que nos lo permiten: nuestras cámaras permiten una definición en las imágenes cada vez mayor.

Algo muy similar sucede en el ámbito de la ciencia: nos desvivimos por retratar la naturaleza a escalas cada vez más pequeñas, queremos conocer el mundo con el **máximo detalle posible**. Esto sucede en todas las disciplinas científicas: los físicos estudian las minúsculas partículas elementales de la materia y los biólogos emplean microscopios que les permiten distinguir objetos cada vez más pequeños para conocer las partes de la célula. Cuando se estudian **sistemas dinámicos** (que cambian con el tiempo), como las reacciones químicas o el crecimiento de un ser vivo, no solo es importante la resolución de una imagen: también lo es la **resolución temporal**, es decir, cuál es la cantidad de tiempo más pequeña que somos capaces de distinguir y estudiar.

A este respecto, la química cuenta con una herramienta enormemente eficaz. La **femtoquímica** es el campo de la física química que estudia los fenómenos químicos a escalas de tiempo minúsculas, o lo que es lo mismo, con una gran resolución temporal [1]. Emplea técnicas que permiten distinguir entre dos momentos separados apenas por la milbillonésima parte de un segundo, o, como se dice en la jerga científica, un **femtosegundo**.

Cuando se da una reacción química, cada molécula de reactivo ve modificada su estructura hasta alcanzar la estructura del producto. Pero para que se dé esto, antes ha de pasar por una serie de **estados intermedios**. La formación de estos intermedios se da en tiempos del orden del femtosegundo. He aquí la importancia de la femtoquímica: nos permite conocer mejor los procesos más elementales de la química.[2]

## 2. ¿CÓMO SE HACE FEMTOQUÍMICA?



Ahmed Zewail  
Fuente:  
nobelprize.org

Los trabajos que sentaron las bases de esta disciplina son obra de **Ahmed H. Zewail**, químico egipcio cuya labor pionera encaminada a desvelar los entresijos de la química le valió el premio Nobel de Química en 1999.

La técnica desarrollada por Zewail es también la más ampliamente usada y conocida de la femtoquímica: la *pump-probe spectroscopy*, o **espectroscopía de bomba-sonda** [2][5]. Consiste en “bombardear” la muestra de interés con dos haces muy cortos de láser, separados apenas por unos femtosegundos. El primer haz de láser “**excita**” la muestra, le aporta energía. Esto induce un cambio en la estructura química de la muestra, que es detectado gracias al segundo haz de láser. Este actúa como una sonda; al llegar a la muestra, el haz interactúa con la muestra excitada de manera diferente a como lo haría con una muestra no excitada. El haz-sonda es recogido de nuevo por unos detectores, y se analizan los cambios en el comportamiento del haz de láser [2][5]. Esto da información sobre los rápidos cambios que sufre la muestra al ser excitada, y proporciona **información muy valiosa** sobre la estructura y la dinámica de las moléculas. Existen otras técnicas más complejas y de usos más específicos, pero todas se caracterizan por ser capaces de discernir hechos que se dan con **muy poca separación temporal**.

## 3. ¿PARA QUÉ SIRVE LA FEMTOQUÍMICA?

Por supuesto, las aplicaciones más directas de estas técnicas se dan en la investigación en química. Las herramientas que proporciona la femtoquímica se han empleado para estudiar la naturaleza de los **enlaces de hidrógeno**, de tremenda importancia para entender los procesos biológicos más básicos [3]; para conocer mejor la estructura de ciertos metales, en investigación de semiconducto-

res, y demás cuestiones elementales.

Pero el alcance de la femtoquímica va mucho más allá de la investigación básica en química. Las técnicas de la femtoquímica se usan con frecuencia en la bioquímica estructural: es lo que se conoce como **femtobiología** [4]. Una vez más, hablamos del estudio de la química a escalas de tiempo ínfimas; pero en este caso, hablamos exclusivamente de la química de las **biomoléculas**, que constituyen la materia viva. Gracias a la femtobiología conocemos más sobre la estructura y el funcionamiento de las enzimas y sus sustratos, y esto ha permitido avances en campos muy diversos.

El estudio de la **fotosíntesis**, por ejemplo, hace buenas migas con la femtobiología. Estas técnicas han permitido que hoy conozcamos mejor de qué manera se rompen las moléculas de agua durante este proceso de vital importancia para la vida; se han estudiado también en profundidad los mecanismos de las enzimas que intervienen en este proceso [4]. Quizá esto nos permita en el futuro **usar la fotosíntesis de maneras novedosas** y provechosas.

También la femtoquímica se sitúa al frente de la lucha contra enfermedades como la **malaria**. El estudio de la estructura de una proteína vital para la supervivencia del protozoo causante de la malaria (*Plasmodium falciparum*) ha permitido diseñar un fármaco que bloquea la acción de esta proteína, paralizando el metabolismo del patógeno y acabando con él. Este mismo proceso podría proporcionar nuevos fármacos contra enfermedades como el **SIDA** [4].

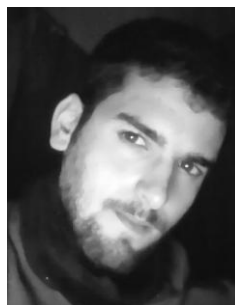
#### 4. CONCLUSIONES

La corta historia de la femtoquímica es un ejemplo del **carácter multidisciplinar** de la ciencia actual. Estas técnicas basadas en la física nos llevan a importantes avances en biología, física y química, con aplicaciones en ciencia de materiales e ingeniería.

Pero sobre todo, es una muestra de los beneficios que trae a nuestro día a día la **investigación básica**. Hoy en día, las investigaciones científicas están orientadas a la practicidad, a lo estrictamente útil. Pero probablemente este tipo de investigación nunca habría planteado las preguntas propias de la ciencia básica, que a su vez nos ha abierto las puertas a preguntarnos qué es lo que la milbillonésima parte de un segundo podría hacer por nosotros.

#### REFERENCIAS

- [1] M. Mahet, P. Plaza, M. M. Martin, G. Checcucci, and F. Lenci, "Femtochemistry and Femtobiology," *Femtochemistry and Femtobiology*, no. 8, pp. 441-444, 2004.
- [2] A. H. Zewail, "Femtochemistry: atomic-scale dynamics of the chemical bond using ultrafast lasers", *Nobel Prize*, [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1999/zewail-lecture.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1999/zewail-lecture.pdf) .1999
- [3] A. Douhal, M. Sanz, L. Tormo, and J. A. Organero, "Femtochemistry of Inter- and Intramolecular Hydrogen Bonds," *ChemPhysChem*, vol. 6, no. 3, pp. 419-423, 2005.
- [4] P. Hunter, "Caught in the act," *EMBO Rep.*, vol. 14, no. 1, pp. 36-38, 2013.
- [5] S. U. P. Riola, "Summary of a session presented at the Ninth Annual Frontiers of Science Symposium, held November 7-9, 1997, at the Arnold and Mabel Beckman Center of the National Academies of Sciences and Engineering in Irvine, CA.," *Engineering*, vol. 95, no. September, pp. 11030-11031, 1998.



**Juan Morillas Viñuales** estudia primero de Biotecnología en la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Pablo de Olavide. Le interesa la divulgación científica, y es un apasionado de la ciencia y la tecnología.

# ¡Cuidado con lo que bebes!

## ¿Etanol o metanol?

Rafael Serrano Durán

**Resumen**—El etanol y el metanol son compuestos parecidos. Sin embargo, producen diferentes efectos en el organismo, principalmente debido a sus metabolitos.

**Palabras Claves**—Etanol, metanol, alcohol, metabolismo.

### 1. INTRODUCCIÓN

Viernes por la tarde, volvemos a casa tras una larga semana de estudio o trabajo, deseando descansar junto a nuestros seres más cercanos y nada mejor que acompañado con una cerveza o una copa. En España, de media un adulto consume 9,8 litros de alcohol al año, cifra bastante significativa en comparación con los 9,0 litros de media de los países de la OCDE [1].

El compuesto principal de estas bebidas es el etanol. Sin embargo, el etanol posee un hermano malvado que aunque a primera vista pueda hacerse pasar por él, sus efectos son mucho más nefastos: el metanol.

El metanol, también llamado alcohol metílico o alcohol de madera, ha sido causante de varias intoxicaciones masivas, llegando a causar un gran número de muertes, como el centener que hubo en Bombay en junio de 2015 [2] o el *caso del metílico*, que acaeció en la España de los años 60 produciendo más de las sólo 51 muertes reconocidas y que el régimen franquista trató de ocultar [3].

En el siguiente documento trataremos de realizar un estudio comparativo entre estas dos moléculas de la familia de los alcoholes, indicando sus características, metabolismo y efectos en el organismo.

### 2. PROPIEDADES GENERALES

#### 2.1. Propiedades del etanol

El etanol es un líquido claro, volátil y transparente que posee un suave olor vinoso. La molécula de etanol (fórmula molecular  $C_2H_6O$ ), de masa molecular 46,068g/mol, posee un esqueleto carbonado de 2 átomos de carbono con un grupo hidroxilo en uno de ellos, como podemos ver en la figura 1a. Es soluble en agua gracias a su capacidad de formar enlaces de hidrógeno con su grupo hidroxilo pudiendo actuar tanto como donador como de aceptor. Además, también es soluble en disolventes orgánicos como etiléter, acetona, cloroformo y bence-

no. Su punto de ebullición es 78,29 °C y su punto de fusión -114,14 °C. Posee una densidad de 0,7893g/cm<sup>3</sup> a 20°C, siendo sus vapores más densos que el aire. Su presión de vapor es 44 mmHg. Difícilmente actúa como ácido, teniendo un pKa de 15,9 a 25 °C. [4].

Además de su ya conocida aplicación en la industria alcoholera, el etanol es empleado como solvente, en los tintes, pinturas, aromatizadores, productos de higiene personal, combustibles, etc. También se emplea como un

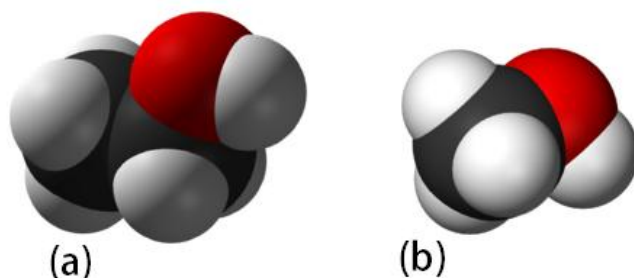


Fig. 1. Representaciones moleculares según el modelo compacto de (a) etanol y (b) metanol

potente desinfectante y bactericida gracias a su papel como desnaturalizante de proteínas [4] al disminuir la hidratación de los restos aminoácidos polares superficiales.

En medicina se puede emplear como sedante [5] o para combatir malformaciones arteriovenosas [6], pero destaca su papel en el tratamiento ante la intoxicación con metanol debido a que ambas compiten por ser metabolizadas principalmente por las mismas enzimas, como veremos más adelante. El tratamiento de la intoxicación lo completan hidrogenocarbonato de sodio ( $NaHCO_3$ ), para anular la acidosis, y hemodiálisis. [7]

#### 2.2. Propiedades del metanol

Al igual que el etanol, el metanol es un líquido transparente e inflamable con el mismo olor a alcohol. La molé-

cula de metanol (fórmula molecular  $\text{CH}_4\text{O}$ ), de masa molecular 32,042g/mol, posee solo un carbono en su cadena, contando como único sustituyente un grupo hidroxilo, tal y como podemos ver en la figura 1b. Estructuralmente, solo se diferencia por tener un grupo metileno menos en su cadena. Respecto a la solubilidad es capaz de disolverse en la mayoría de disolventes orgánicos. Al poseer también el grupo hidroxilo, también es miscible en agua y en etanol. Sus puntos de ebullición y fusión son más moderados en comparación los del etanol, siendo  $65^\circ\text{C}$  y  $-98^\circ\text{C}$  respectivamente. Su densidad es prácticamente igual a la del etanol y sus vapores también son levemente más densos que el aire. Su presión de vapor (127mmHg a  $25^\circ\text{C}$ ) lo convierte en un líquido altamente volátil, más que el etanol. Su pKa también es elevado (15,3), siendo difícil que ejerza de ácido.[8] Resumiendo, las propiedades físicas y más aún las químicas son muy parecidas, por lo que sorprende que sus efectos sobre el organismo sean tan diferentes.

Es liberado al medio ambiente debido a su uso industrial, pero también es expulsado por los volcanes, la vegetación y algunos microbios. Es empleado en adhesivos, tintas y combustibles, como disolvente, como anticongelante y en la síntesis química. [8]

### 3. METABOLISMO

#### 3.1. Metabolismo del etanol

Una vez ingerido, el alcohol es rápidamente absorbido al torrente sanguíneo en el estómago y en los intestinos [7]. De toda la cantidad tomada, menos del 10% será expulsado por la orina, el sudor y la respiración. Entonces, ¿Cómo elimina nuestro cuerpo el más del 90% restante? La respuesta a esta pregunta se encuentra principalmente en el hígado. En nuestro laboratorio personal, gran parte del alcohol es metabolizado, oxidándolo primero a acetaldehído y luego a ácido acético. Un adulto medio bebedor ocasional metabolizaría entre 100 y 125 mg por kg del sujeto a la hora, en cambio, un bebedor habitual metabolizaría alrededor de 175 mg/kg/h. [9]

En general, existen tres vías para el metabolismo del etanol:

La primera y principal se desarrolla en el citosol de los hepatocitos del hígado. La alcohol deshidrogenasa oxida al etanol a acetaldehído empleando zinc y  $\text{NAD}^+$  (que pasa a  $\text{NADH}$ ). A continuación, la aldehído deshidrogenasa completa la oxidación hasta acetato. De esta forma, el acetato entra en el ciclo de Krebs en la mitocondria en forma de acetyl-CoA (proceso dependiente de tiamina). Así, termina siendo degradado a  $\text{CO}_2$  y agua. Esta vía se satura a niveles relativamente bajos de alcohol en sangre,

cuando ello ocurre, pasa de una cinética de orden uno a ser de orden cero. [9]

También puede metabolizarse gracias a unos sistemas oxidativos del etanol microsomaes (MEOS y CYP2E1) del retículo endoplasmático. Este sistema es responsable del metabolismo de pequeñas cantidades de etanol en bebedores no familiarizados. Pero también actúa notoriamente cuando las concentraciones de etanol aumentan o cuando su ingesta se hace crónica. El CYP2E1 emplea  $\text{NADP}^+$  como aceptor de hidrógeno en la oxidación.[9]

Por último, el etanol también puede oxidarse por el sistema de catalasa-peroxidasa asociado a los peroxisomas hepáticos. [9]

#### 3.2. Metabolismo del metanol

El metanol es rápidamente absorbido en el tracto intestinal, ocurriendo la máxima absorción entre los 30 y 60 minutos tras su ingesta dependiendo de la presencia de comida en el estómago. [10] El metabolismo del metanol consta de tres fases: Comienza oxidándose a formaldehído catalizado por la alcohol deshidrogenasa hepática, proceso saturable y limitante. A su vez, el formaldehído es oxidado por la aldehído deshidrogenasa a ácido fórmico. Finalmente el ácido fórmico es neutralizado a dióxido de carbono por una vía dependiente de ácido fólico. [11] Como podemos observar, el metanol es metabolizado principalmente por las mismas enzimas que el etanol. Sin embargo, además, el metanol puede ser neutralizado por oxidación microsomal con el sistema del citocromo P450 [12].

En comparación con la tasa de eliminación del etanol, la de metanol es mucho menor [12]. A bajas concentraciones, su degradación sigue una cinética de orden cero, en cambio, a concentraciones mucho mayores, pasa a orden uno, probablemente gracias al aumento del papel de los pulmones en la eliminación [9]. Al depender la neutralización del ácido fórmico de tetrahidrofolato (derivado del ácido fólico), los primates, que poseemos bajos niveles de este compuesto (a diferencia de los roedores), sufrimos durante más tiempo los efectos tóxicos de los metabolitos. [13]

### 4. EFECTOS

#### 4.1. Efectos del etanol

Son bastante conocidos los efectos del etanol sobre el cuerpo humano. Su efecto principal es la depresión del sistema nervioso central (SNC). El etanol interactúa con una extensa variedad de neurotransmisores, principalmente ampliando los efectos del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor inhibitor del SNC y bloqueando los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) de

glutamato (principal neurotransmisor excitador de la corteza cerebral). Los receptores NMDA median la neurotoxicidad e inhiben la liberación de dopamina en el núcleo accumbens y en las estructuras mesolímbicas, que a su vez modula la acción de agentes adictivos. De esta forma, al inhibir la actividad de este receptor, el etanol incrementa la liberación de dopamina pudiendo producir dependencia. [9]

El etanol también actúa como diurético al inhibir la hormona antidiurética (vasopresina). Al aumentar la diuresis puede provocar deshidratación. [4]

Otro efecto derivado de la ingesta de pequeñas cantidades de etanol es la acumulación de grasa en el hígado. Esto se debe a la acumulación de NADH producido en el metabolismo del alcohol, lo cual provoca una inhibición del ciclo de Krebs y de la oxidación de los lípidos. [7]

Si la ingesta de etanol se realiza bajo una combinación de circunstancias en las que se incluye la desnutrición puede provocar el desarrollo de cetoacidosis alcohólica. La carencia de nutrientes y la disminución de las reservas de glucógeno produce la conversión de aminoácidos a piruvato, que debido al exceso de NADH producido por el metabolismo del alcohol se reduce a ácido láctico no pudiendo participar así en la gluconeogénesis. Para compensar la falta de sustratos catabólicos, mediante la secreción de glucagón, catecolaminas, hormona de crecimiento y cortisol, el cuerpo moviliza las grasas utilizando el metabolismo de ácidos grasos como fuente alternativa de energía. El acetil-CoA producido se combina con el exceso de acetato producido del metabolismo del etanol para producir ácido acetoacético, que es en parte reducido a ácido beta-hidroxibutírico. La acumulación de estos ácidos en la sangre disminuye su pH y produce esta patología potencialmente letal. [9]

#### 4.2. Efectos del metanol

Una dosis de entre 0,3 y 1 gramo por kg del individuo es letal [8] ¿Pero a qué se debe su toxicidad? La mayoría de sus efectos tóxicos son responsabilidad de uno de los metabolitos de su eliminación, el ácido fórmico.

El ácido fórmico daña la retina y el nervio óptico al interrumpir la producción de energía en las mitocondrias. Este inhibe la actividad de la citocromo oxidasa, un componente esencial en la cadena de transporte de electrones involucrada en la producción de ATP. Esta inhibición se produce como consecuencia de la unión del formiato (base conjugada del ácido fórmico) al hierro del grupo hemo del complejo. [10][12]

La intoxicación por metanol puede producir diversos síntomas como: irritación en ojos, piel y sistema respiratorio superior, dolor de cabeza, somnolencia, mareos, náu-

seas, vómito, dificultad visual y daño del nervio óptico (ceguera). [14]

## 5. CONCLUSIONES

Como hemos podido observar, ambos compuestos poseen propiedades bastante parecidas. Ambos son compuestos líquidos a temperatura ambiente, transparentes, volátiles, con olores similares y con otras propiedades análogas. Sin embargo, la diferencia en la toxicidad es notable. El metanol es un tóxico que puede causar la muerte con apenas una pequeña cantidad. Por tanto, es indispensable dar a conocer los efectos que provoca para evitar que por desconocimiento o por ahorrar se adulteren bebidas espirituosas con alcohol metílico y se provoquen más homicidios involuntarios con esta sustancia

Aunque no por ello hay que despreocuparse por el alcohol etílico. Si bien a priori sus efectos no son tan devastadores, también puede suponer un problema de salud pública, teniendo en cuenta además otros efectos secundarios que puede producir como los accidentes o la violencia.

Por ello hay que tratar de disfrutar del alcohol libre de metanol con moderación.

## REFERENCIAS

- [1] <http://www.rtve.es/noticias/20150512/consumo-alcohol-espana-98-litros-per-capita-supera-media-ocde/1143073.shtml>
- [2] <http://www.elmundo.es/internacional/2015/06/22/5587f4ed22601db8398b4589.html>
- [3] <http://www.publico.es/politica/franco-oculto-mayor-envenenamiento-masivo.html>
- [4] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ethanol>
- [5] Troy, D.B. (Ed); Remington The Science and Practice of Pharmacy. 21 st Edition. Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, PA 2005, p. 1081
- [6] Ethanol embolization of arteriovenous malformations: interim results. Do, Young Soo; Yakes, Wayne F; Shin, Sung Wook; Lee, Byung-Boong; Kim, Dong-Ik et al. (2005)
- [7] Hardman, J.G., L.E. Limbird, P.B., A.G. Gilman. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th ed. New York, NY: McGraw-Hill, 2001., pp. 430, 434, 437.
- [8] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/methanol>
- [9] Goldfrank, L.R. (ed). Goldfrank's Toxicologic Emergencies. 7th Edition McGraw-Hill New York, New York 2002., pp. 954, 955, 959, 982



- [10] WHO; Environ Health Criteria 196: Methanol pp. 56, 94 (1997).  
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc196.htm>
- [11] WHO/Health and Safety Guide No. 105 for Methanol (1997).  
<http://www.inchem.org/pages/hsg.html>
- [12] Bingham, E.; Cochrane, B.; Powell, C.H.; Patty's Toxicology Vol  
6. 5 ed. John Wiley & Sons. New York, N.Y. (2001). pp.374, 375
- [13] Medinsky MA, Dorman DC; Toxicology Letters 82-83: 707-11  
(1995)
- [14] <http://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0397.html>



**Rafael Serrano Durán** es estudiante de primer curso del Grado de Biotecnología en la universidad Pablo de Olavide, curso 15/16.

# Active and intelligent packaging based on climacteric fruits ripening process

Marina Domínguez Quintero

**Abstract**— Active and intelligent packagings have achieved widespread use in the food industry. For so-called climacteric fruits their mechanism of action is based on regulating the reactions taking place during post-harvest ripening, especially reactions with ethylene release. This article describes these systems and the chemical reactions involved.

**Keywords**— Active Packaging, Intelligent Packaging, Climacteric fruits, Ethylene scavenging, Ripening.

## 1. INTRODUCTION

Since ancient times, food has been packaged in a variety of materials in order to protect it against external influences. Nowadays, with the help of technological advances, globalization and a deeper knowledge about the nature of food and its degradation processes, new forms of packaging have been developed to, besides a better protection, increase shelf-life, enhance safety and organoleptic properties or give information about food quality and traceability data [1]. These packaging systems, known as active and intelligent, respond also to consumer demands, who ask for prolonged shelf-life, less additives and more information.

Fruit suffers a series of post-harvest chemical reactions during ripening, consisting mostly in respiration and ethylene production. These processes are more significant in climacteric fruits, those ones in which respiratory rate is very high and also ethylene liberation, which translates into huge changes in texture and composition. Based on these processes, new packagings are being developed which detect, absorb or capture chemicals released in reactions in order to increase fruit shelf-life or give information about their freshness [2], [3].

## 2. POST-HARVEST RIPENING PROCESS

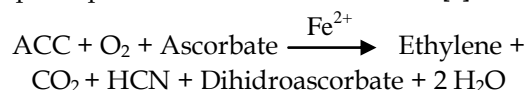
The utilization of this kind of packaging in climacteric fruits is conditioned by the chemical reactions that occur in fruit ripening processes after harvest. Two types of fruits can be defined based on physiological differences in their ripening patterns:

**Climacteric fruits:** accumulate starch during growth and during ripening, they are hydrolyzed to monosaccharide, glucose and fructose mainly, with high energy requirements and thereby, an increased rate of respiration. These are fruits that continue ripening after harvest due to ethylene production. Examples of climacteric fruits are bananas, pears, peaches, melons and kiwi.

**Non-climacteric fruits:** accumulate monosaccharide directly through growth, so respiratory rate is not increased

significantly during ripening. Included in this group are citrus fruits, olives and cherries [2].

The increased respiratory rate in climacteric fruits is responsible for significant changes on fruits: massive accumulation of sugars (30-50%), colour alteration and tissue softening [2]. Ethylene has an important role on ripening as it can initiate or accelerate the process. This is why ethylene has been known as the ripening hormone [2], [3]. Ethylene's biosynthesis is produced from the amino acid methionine that is converted to S-adenosyl methionine (SAM) by the action of the enzyme SAM synthase and, in the next step, to 1-amino-cyclopropane carboxylic acid (ACC) by the ACC synthase. Finally, ACC is oxidised by the ACC oxidase to form ethylene, in presence of oxygen and the participation of Fe ions and ascorbate [4].



## 3. ACTIVE AND INTELLIGENT PACKAGINGS

Regulation (EC) N° 450/2009 [5] defines both concepts:

“Active materials and articles are those intended to extend the shelf-life or to maintain or improve the condition of packaged food; they are designed to deliberately incorporate components that would release or absorb substances into or from the packaged food or the environment surrounding the food.”

“Intelligent materials and articles are those that monitor the condition of packaged food or the environment surrounding the food.”

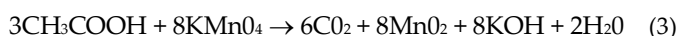
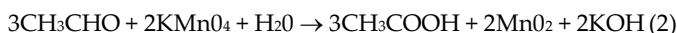
To sum up, active and intelligent packaging has another function further than being a passive barrier to external medium, that is to interact with the food directly or with the surrounding environment in order to improve its quality or safety. Intelligent packaging can indeed be considered as intelligent messengers or information links [1].

### 3.1. Active Packaging

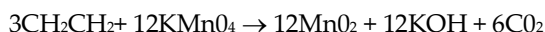
Although there are numerous active and intelligent packaging techniques used on food (resumed in table1) [1], the most common in climacteric fruit are those systems that intend to remove undesirable substances from packaging's interior by absorption, adsorption or scavenging. Absorption and adsorption are physical phenomena, while scavenging implies chemical reactions [3].

In most cases, for packaged climacteric fruits it would be desirable to prevent exposure to ethylene and thereby avoid such a rapid ripening. Oxidisers in combination with adsorbents can be used to remove the adsorbed ethylene, being potassium permanganate (KMnO<sub>4</sub>) the most used [1], [3]. To be effective, KMnO<sub>4</sub> must be adsorbed on a suitable inert carrier with a large surface area such as celite [6].

The oxidation reaction of ethylene with potassium permanganate begins with the oxidation of ethylene (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) to acetaldehyde (CH<sub>3</sub>CHO), which in turn oxidises into acetic acid (CH<sub>3</sub>COOH). Then, acetic acid is oxidised to carbon dioxide and water [3]:



Combining equations 1-3, we get:



Potassium permanganate changes from purple to brown while it is being reduced to MnO<sub>2</sub>, indicating the remaining ethylene removal capacity [3].

TABLE 1  
ACTIVE PACKAGING

TECHNIQUES	ACTIVE PRINCIPLE	APPLICATION
Oxygen Scavenging	Organic-based, UV light-activated. Natural and biological components.	Bakery products, beverages
Carbon Dioxide Generation	Ferrous carbonate and a metal halide catalyst, ascorbate and sodium hydrogen carbonate.	Fresh meat, poultry, fish, cheese
Moisture Regulating	Silica gel, molecular sieves, CaO and natural clays	Cheese, meat, chips, nuts, candies
Antioxidant Packaging	Butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole, tert-butylhydroquinone and propyl gallate.	Cereals
CO <sub>2</sub> Scavenging	Calcium oxide and activated carbon.	Coffee, Fermented products, sauces

Ethylene Scavenging and Blocking	KMnO <sub>4</sub> . Potassium dichromate. Carbon blocker (1-methylcyclopropene)	Fruits and vegetables
Antimicrobial Packaging	Potassium sorbate ions of Ag and Cu, Quaternary ammonium. Antimicrobials and nanotechnologies combined.	Natural food products
Modified Atmosphere Packaging	Siloxanes or acrylic polymers	Fruits and vegetables

### 3.2. Intelligent Packaging

Intelligent packaging is a very active research and development area, currently offering a wide variety of freshness indicators and systems that provide some kind of information about the product [1] (see Table 2).

Ripeness indicators for instance are useful in climacteric fruits, especially in those that do not exhibit obvious visual indications of ripening, such as kiwi fruit and most varieties of pears [1], [7].

Several ripeness indicator systems can be found in commercial products [1]:

- Ethylene oxidation by ammonium molybdate on palladium sulfate-catalyst indicator.
- Ester hydrolysis, using phenol red on alkalinized solid phase indicator film.

RipeSense® sensor [7] is the trade name of a ripeness indicator using the second system. The sensor changes colour by responding to the aromatic volatile compounds emitted by fruit as it ripens (see figure 2).

TABLE 2  
INTELLIGENT PACKAGING

TECHNIQUES	ACTIVE PRINCIPLE	APPLICATION
Integrity Indicators	Semiconductor photosensitizer (titanium dioxide) coupled with a redox dye and a sacrificial electron donor (glycerol) activated by UV.	Vacuum-packed foods
Spoilage Indicator	pH dye-based indicator, platinum group metal fluorophore chromophore seen under UV light.	Chilled food products
Ripeness Indicator	Phenol red on alkalinized solid phase indicator film. Ammonium molybdate on palladium	Fruits

	sulfate-catalyst indicator.	
Rancidity Indicator	Methyl red dissolved in an alkaline methanol solution applied onto cellulose-based.	Raw products
Time-Temperature Indicator	Enzymatic hydrolysis of a lipid substrate. Lactic acid bacteria. Solid state polymerization Photochromic solid state reaction upon UV light irradiation. Polydiacetylene/SiO <sub>2</sub> nanocomposites.	Refrigerated products
Radio Frequency Identification	Microprocessor chip and antenna giving traceability and temperature data.	Fresh fish

#### 4. CONCLUSIONS

Active and intelligent packaging can be seen as the next generation of food packaging, being an interesting research area.

New trends include novel engineered nanofillers with multiple functionalities (O<sub>2</sub> scavenger, antimicrobial and antioxidant), natural and biological components, dual-action system (CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> scavenger), combinations of antimicrobials and nanotechnologies or the development of bioactive and biointelligent packaging. "In the future the package will be a communication channel from processor to consumer" [1].

However, we must not forget about the potential danger that new substances and packaging techniques mean for food safety. Therefore, the EU has established specific rules for active and intelligent materials and articles in-

tended to be used in contact with foodstuffs, included in Regulation 450/2009 / EC [1], [5].

#### REFERENCES

- [1] P. Suppakul, «Active and Intelligent Packaging,» de *Polymers for Packaging Applications*, Apple Academic Press Inc., 2015, pp. 393-420.
- [2] M. Agustí, «Crecimiento y maduración del fruto,» de *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, McGraw Hill Education, 2013, pp. 519-535.
- [3] L. Vermeiren, L. Heirlings, F. Devlieghere, J. Debevere, «Oxygen, ethylene and other scavengers,» of *Novel Food Packaging Techniques*, Woodhead Publishing Limited, 2003, pp.22-49.
- [4] L. Zacarías, M.T. Lafuente «Etileno, ácido abscísico y otros reguladores del desarrollo,» de *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, McGraw Hill Education, 2013, pp. 445-455.
- [5] EU Guidance to the Commission Regulation (EC) n° 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food.
- [6] L. Vélez, H. Soto-Valdez, R. Gavara and R. Catalá, "Efectividad de absorbentes de etileno en la conservación de plátanos envasados," *V Congreso Iberoamericano de Tecnología Postcosecha y Agroexportaciones 2007*, pp.333-341, 2007, ISBN 978-84-95781-85-7.
- [7] Web of RipeSense®, [www.ripesense.co.nz/index.html](http://www.ripesense.co.nz/index.html)

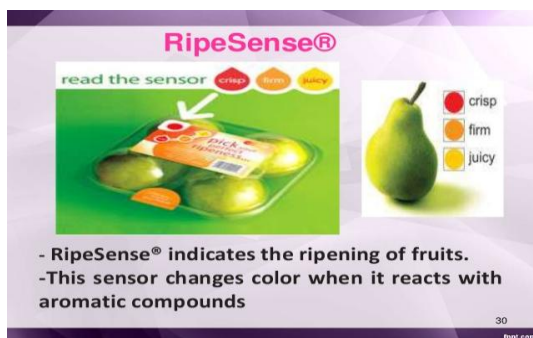


Fig.2.- Ripesense®



**Marina Domínguez Quintero** First-year biotechnology student at Universidad Pablo de Olavide.

# Baterías de ión-litio, ¿adiós a combustibles fósiles?

Pablo Jiménez Barrios

**Resumen**—Analizaremos las distintas investigaciones que están surgiendo en torno a las baterías de ión-litio y que pretenden realzar a las energías renovables como alternativas de los combustibles fósiles. Además, comentaremos las distintas baterías químicas que competirán con las de ión-litio.

**Palabras Claves**— Baterías de azufre, BESS, Electrolito sólido, Ión-litio, Powerwall,

## 1. INTRODUCCIÓN

En un mundo donde los combustibles fósiles se están agotando y el ser humano no deja de consumir, se hace necesaria la búsqueda de nuevas fuentes energéticas.

Mientras nos centramos en mejorar alternativas renovables (eólica, solar, nuclear...) para que den más energía, no buscamos formas de almacenar toda esta energía. Sin embargo, cada vez son más las compañías que comienzan a adentrarse en el sector químico.

Desde que Sony lanzó las primeras baterías de ión-litio [2], las hemos utilizado en infinidad de artículos eléctricos: ordenadores, móviles, relojes... Hasta ahora sólo se habían mejorado en tamaño y autonomía, mas ahora distintas compañías se han propuesto dar un paso más allá, desplazar a las combustibles fósiles como fuente de energía principal.

## 2. FUNCIONAMIENTO

Las pilas o celdas electroquímicas son capaces de producir energía eléctrica a partir de reacciones químicas, más concretamente reacciones redox; en la que una de las especies se oxida o pierde electrones y la otra se reduce o los gana. Para ello necesitamos dos electrodos (ánodo, en el que ocurre la oxidación, y cátodo, en el que se produce la reducción) sumergidos en un electrolito.

Las baterías de ión-litio, como cualquier otra, están compuestas por varias celdas electroquímicas agrupadas; los electrodos son grafito (ánodo) y óxido de cobalto, trifilina u óxido de manganeso (cátodo); y el electrolito presen-

ta iones de lítico. [6]

Algunas de las ventajas de las baterías de ión-litio son su pequeño peso y tamaño, su alto voltaje (3.7 V), su baja tasa de autodescarga y que carecen de efecto memoria. Y además son recargables.

Pero también presentan inconvenientes: poseen un número limitado de cargas, son costosas, tienen una baja capacidad de trabajo en frío y pueden sobrecalentarse. [7]

## 3. POWERWALL

La compañía Tesla ha solucionado el problema del sobrecalentamiento creando una batería compuesta por miles de mini baterías de ión-litio recubiertas de un líquido refrigerante. El riesgo se reduce debido a que ninguna de ellas está generando una gran cantidad de energía. [3], [4]

Tesla ha sacado a la venta dichas baterías para el hogar, bajo el nombre de "Powerwall". ¿Cómo funciona? La batería es cargada con electricidad procedente de paneles solares



Fig. 2. Powerwall

y, cuando no hay suficiente energía solar, captándola de la red eléctrica, pero en horas en las que ésta es más barata. [4], [5]

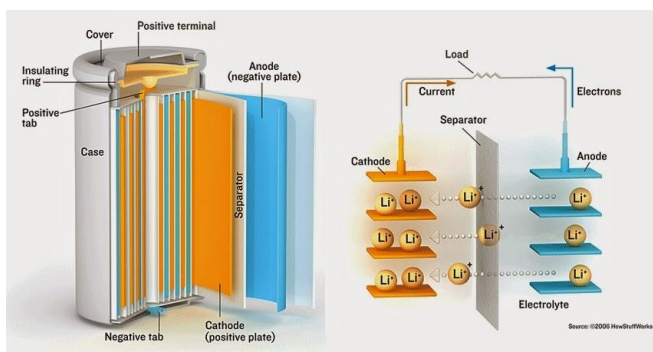


Fig. 1. Batería de ión-litio

Su capacidad es de 7 kWh y, teniendo en cuenta los datos de la tabla 1 del consumo eléctrico de un hogar común,

TABLA 1  
CONSUMO ELÉCTRICO DE UN HOGAR

Televisor	Bombilla/hab	Ordenador
0,01 kWh*	0,01 kWh*	0,05 kWh*
Frigorífico	Lavadora	Secadora
1,6 kWh**	2,3 kWh***	3,3 kWh***

\* Consumo por hora

la convierten en una buena alternativa para ahorrar dinero, a la vez que colaboramos con el medio ambiente. [5]

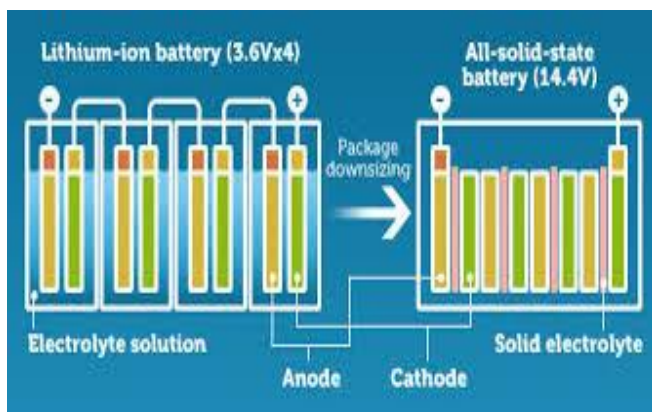


Fig. 3. Prototipo de batería con electrolito sólido

#### 4. ELECTROLITO SÓLIDO

Por su parte, Toyota no se quiere quedar atrás y se ha propuesto encontrar un electrolito sólido para las baterías de ión-litio. [1]

Dichas baterías ocuparían un menor volumen, ya que permitirían el apilamiento en serie de estructuras bipolares; al no ser líquidas, no habría peligro de derramamiento, lo que reduciría el riesgo de que prendan, es decir, serían más seguras; y sus vidas útiles aumentarían. También se ha comprobado que podrían trabajar a temperaturas extremas, tanto por arriba como por abajo. [8], [9]

Sin embargo, el prototipo muestra resistencia en la transferencia de electrones entre el electrolito sólido y el cátodo; es por ello que aún les queda un largo camino por delante. Mas creen haber encontrado un sólido con mayor conductividad de iones lítico, llegando a superar incluso la de cualquier electrolito líquido; se trata del  $\text{Li}_{10}\text{GeP}_2\text{S}_{12}$  (LGPS). [8]

En Toyota también están investigando baterías de ión-sodio y otras de litio-aire. [1] Las primeras se deben a que los distintos compuestos de sodio poseen mayores potenciales que los del litio, por lo que ha de existir alguno capaz de

formar una batería ión-sodio. Las últimas consistirían en utilizar carbono en lugar de óxidos metálicos, las moléculas de oxígeno del aire atravesarían la capa de carbono y dichas moléculas reaccionarían con los iones líticos disueltos en los electrolitos, produciéndose energía. [10]

#### 5. BATTERY ENERGY STORAGE SYSTEM (BESS)

Hace unos años, Toshiba sacó al mercado unas baterías de ión-litio cuyo componente del ánodo era el titanato de litio ( $\text{Li}_2\text{TiO}_3$ ), a las que llamó SCiB™. Las ventajas de estas baterías son una mayor seguridad debido a su baja resistencia eléctrica, que evita que se produzcan cortocircuitos; una gran vida útil, permitiendo un gran número de ciclos de carga; y la capacidad de soportar temperaturas bajo cero (de hasta  $-30^\circ\text{C}$ ).

A principios de 2015, Toshiba logró crear un sistema de almacenamiento de energía a base de baterías SCiB™ (BESS) a gran escala para suministrar electricidad a una empresa japonesa. Este sistema contaba con 40 MW de potencia y una capacidad de almacenamiento de 20 MW/h. Pero, no conformándose con ello, ahora intentan crear otro BESS de 40 MW/h. [1]

#### 6. BATERÍAS DE AZUFRE

Y como no, Sony, pionero en las baterías de ión-litio, no iba a ser menos: pretenden fabricar una batería de azufre.

Prometen que con ello aumentarían la duración de las baterías y reducirían su tamaño.

Aunque el uso de azufre anteriormente ha demostrado reducir los ciclos de carga de la batería, en Sony aseguran tenerlo controlado. Para evitar este problema han reformulado la solución de los electrolitos.

Actualmente se encuentran en fase de prueba; a la vez que miran otros proyectos, tales como las baterías de electrolito sólido o las de ión-aire; mencionadas anteriormente. [2]



Fig. 4. BESS de la compañía eléctrica Tohoku

## 7. CONCLUSIÓN

El fin de los combustibles fósiles no debería preocuparnos, sino alegrarnos. El hecho de que se agoten supone el fin de la polución, el adiós a los gases contaminantes será la bienvenida a nuevas fuentes de energía renovables, en las que tendrá una gran cabida la energía química.

Comenzará una nueva época, una época llena de energías renovables, sin contaminación, de armonía con la Tierra; se dejará atrás la era de la contaminación, iniciada tras la Revolución Industrial.

Si bien es cierto que todavía quedan algunos años de investigación, cada vez son menos, las alternativas a los combustibles fósiles están a la vuelta de la esquina. Tesla ya ha dado el primer paso con su batería "Powerwall", lo que significa que las demás no tardarán en subirse al carro y entonces comenzará la carrera por ver quién consigue la mejor batería, la que más rápido carga, la más duradera, en definitiva, la más eficiente.

## REFERENCIAS

- [1] "Spotlight in Japanese battery technologies". *Nature*, vol. 528, no. 7580, pp. 160-163, Dec 2015, doi: 10.1038/nj0473.
- [2] "Sony battery to offer 40% longer phone life", *Nikkei*, <http://asia.nikkei.com/Tech-Science/Tech/Sony-battery-to-offer-40-longer-phone-life>. 2015.
- [3] Teknautas, "Tres motivos por los que la batería de Tesla es un avance real", *El Confidencial*, [http://www.elconfidencial.com/tecnologia/2015-05-05/tres-motivos-por-los-que-la-bateria-de-tesla-es-un-avance-real\\_787855/](http://www.elconfidencial.com/tecnologia/2015-05-05/tres-motivos-por-los-que-la-bateria-de-tesla-es-un-avance-real_787855/). 2015.
- [4] Antonio Ruiz de Elvira, "¿Por qué la batería Tesla almacena la energía solar?", *El Mundo*, <http://www.elmundo.es/blog/elmundo/elporquedelascosas/2015/05/10/por-que-la-bateria-tesla-almacena-la.html>. 2015.
- [5] Web de Tesla Motors. <http://www.teslamotors.com/powerwall>
- [6] Isaac P. E., "Baterías de ión-litio: conceptos, funcionamiento, mantenimiento y trucos - Parte I", *Arquitectología*, <http://arquitectologia.blogspot.com.es/2014/04/bateria-s-de-ion-litio-conceptos.html>. 2014.
- [7] "Baterías de Li.-Ión: ventajas, desventajas y mantenimiento", *SecuraMe*, <http://www.securame.com/baterias-de-liion-ventajas-desventajas-mantenimiento-a-54.html>. 2010.
- [8] Yada and Brasse, "Toyota working on all-solid-state as mid-term advanced battery solution; prototype cell with 400 Wh/L", *Green Car Congress*, <http://www.greencarcongress.com/2014/06/20140612-toyota.html>. 2014
- [9] Carlos Noya, "El electrolito sólido permitirá baterías más duraderas, más seguras y con más capacidad", *Foro Coches Eléctricos*, <http://forococheselectricos.com/2015/08/el-electrolito-solido-permitira-baterias-mas-duraderas-mas-seguras-y-con-mas-capacidad.html>. 2015.
- [10] "Baterías litio-aire, 800 km de autonomía", *Ingenieros*, <http://www.ingenieros.es/noticias/ver/baterias-litio-aire-800-km-de-autonomia/2414>. 2012.



**Pablo Jiménez Barrios.** Cursó la ESO y Bachillerato en el Colegio San Antonio de Padua (Cáceres). Actualmente estudia Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide (UPO).

# Nanotubos de carbono como biomateriales prometedores para la regeneración del tejido óseo

Patricia Antonia Lucas Rodríguez

**Resumen**—El objetivo de la medicina regenerativa es la reparación y regeneración de los tejidos y órganos del cuerpo humano. Para ello, las terapias regenerativas utilizan células, factores de crecimiento, genes, etc. Sea cual sea el método que se utiliza, un tejido no puede regenerarse sin un “andamio”. Este consiste en una matriz porosa capaz de determinar el destino de las células y guiarlas para promover la regeneración del tejido. La fabricación de materiales que sirvan como andamios y que sean capaces de llevar a cabo esto es algo altamente deseado en el campo de la ingeniería del tejido óseo. En este artículo se analizan las características que ha de tener un andamio, así como de los rasgos y ensayos que han llevado a pensar en los nanotubos de carbono como un buen andamio para regenerar el tejido óseo.

**Palabras Claves**—Bioingeniería, Matriz extracelular, Nanotubos de carbono, Regeneración, Tejido óseo.



## 1. INTRODUCCIÓN

Cada año se realizan en el mundo más de 2,2 millones de injertos óseos, siendo los huesos uno de los tejidos más trasplantados [1]. El tejido óseo es un tejido conectivo mineralizado formado principalmente por tres tipos celulares diferentes (los osteoblastos, los osteocitos y osteoclastos), y conocido por su capacidad regenerativa: los osteoblastos, responsables de la secreción y la mineralización de la matriz extracelular (MEC), y los osteoclastos, que reabsorben ésta, trabajan juntos para regenerar y reparar el tejido dañado del hueso. Sin embargo, esta capacidad puede ser socavada por la gravedad y el tamaño de la lesión o enfermedad [2]. Para regenerar estos defectos graves del hueso se suelen utilizar implantes prostéticos, siendo los autoinjertos los más utilizados debido a que son histocompatibles, no inmunogénicos y tienen la capacidad de inducir la osteogénesis [3]. Sin embargo, estos presentan limitaciones importantes y un 10-30% de los pacientes experimentan complicaciones [4]. En este aspecto, la ingeniería del tejido óseo se ha convertido en una técnica prometedora para fabricar sustitutos biológicos. Su objetivo es restablecer, mantener o mejorar la función del tejido óseo mediante la combinación de andamios sintéticos, moléculas bioactivas y células [5]. Las células tienen un papel central en la regeneración y requieren de un soporte mecánico, o andamio, que además de facilitar su adhesión, imite la MEC natural donde estas se diferencian y/o proliferan. Uno de los materiales más prometedores para ser usado como andamio son los nanotubos de carbono o CNTs (del inglés Carbon Nanotubes), debido a sus excepcionales características, que les permiten mimetizar la MEC natural. Los CNTs son láminas de grafito enrolladas en forma de tubo, y fueron descubiertos por Sumio Iijima en 1991. En este artículo

se analizan las características que debe cumplir un andamio, así como los ensayos que han llevado a pensar en los CNTs como un buen biomaterial para la fabricación de andamios en ingeniería del tejido óseo, basándonos, principalmente, en dos revisiones muy recientes [6], [7].

## 2. COMPOSICIÓN DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo está constituido por una matriz calcificada, formada en un 65 % por cristales de hidroxiapatita, y el resto por una parte orgánica, compuesta en un 90 % por fibras de colágeno tipo 1 y alrededor de un 10 % de otras proteínas, como los proteoglicanos y glucosaminoglicanos. Esta composición le confiere al tejido óseo una gran consistencia, dureza y cierta elasticidad. Sin embargo, la matriz no solo provee de soporte y de resistencia al tejido, sino que también regula funciones celulares esenciales como la diferenciación celular, la proliferación, adhesión y migración.

En cuanto a los tipos celulares, como ya se ha mencionado anteriormente, en el tejido óseo encontramos principalmente osteoblastos, osteocitos, y osteoclastos. Otras células que pueden jugar un papel clave en la formación del tejido son las células madre mesenquimales (MSCs) capaces de diferenciarse en osteoblastos; los fibroblastos (que sintetizan matriz extracelular) y los fibrocitos (células mesenquimales inactivas).

## 3. CARACTERÍSTICAS REQUERIDAS DE UN ANDAMIO

El objetivo de un andamio es mimetizar la MEC natural en la cual se producen los procesos regenerativos, por lo que ha de poseer una serie de características fundamentales relacionadas con el comportamiento de ésta en los tejidos. El objetivo principal, en este sentido, sería obtener un material además de poroso (lo que facilita la proliferación y migración celular así como el transporte de nu-



trientes), biocompatible, que se degrade de forma paulatina a medida que se forma el nuevo tejido, que sea reabsorbible y que no presente ningún tipo de reacción biológica adversa. Además, aparte de dar soporte, ha de permitir la correcta interacción entre las células y entre las células y la matriz para una proliferación y diferenciación al linaje deseado óptima y controlada. Otra característica deseada (y aún no conseguida) es que dé lugar al patrón jerárquico de células, incluyendo las redes microvasculares, encontrado normalmente en la organización de los tejidos naturales [6]. Un andamio puede ser implantado y luego sembrado con células directamente en la zona afectada del tejido o ser sembrado y cultivado con células *in vitro* con el objetivo de formar el nuevo tejido antes de la implantación.

#### 4. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LOS NANOTUBOS DE CARBONO

Los nanotubos de carbono pueden ser de capa simple (SWCNT, del inglés Single Wall Carbon Nanotubes; con un diámetro típico de 1 nm) o de capa múltiple (MWCNT, del inglés Multiwall Carbon Nanotubes; con un diámetro que varía entre 1 y 100 nm) en función del número de capas de grafito concéntricas. Estos poseen algunas características que son esenciales para la formación de un andamio y que son comunes a la matriz extracelular natural: alto grado de flexibilidad [8] y elasticidad [9] (debida a las uniones covalentes de los átomos de carbono); alto grado de porosidad de similar diámetro a la matriz (fundamental para la integración celular además de para obtener una gran superficie de contacto) [10]; pueden ser tridimensionales (lo que mejora la señalización) [11] y además interaccionan con proteínas y ADN [12]. Otra de sus características es que tienen un tamaño y forma muy similar a las fibras de colágeno que componen la matriz extracelular así que pueden formar una matriz mineralizada con hidroxiapatita [13]. Además, pueden ser funcionalizados con distintos grupos funcionales, lo que modifica algunas propiedades y funciones inherentes a ellos. Esto los hace muy eficientes a la hora de hacerlos lo más similares posibles a la matriz. Otra ventaja de los CNTs es que pueden permitir una simulación *in vitro* de condiciones *in vivo*, haciéndolo simple para estudiar o inducir en el laboratorio procesos celulares naturales, tales como la diferenciación celular [6].

#### 5. INTERACCIONES DE LOS CNTs CON COMPONENTES DEL TEJIDO ÓSEO

En 2006, un estudio demostró que tanto los SWCNTs como los MWCNTs promovían la proliferación de los osteoblastos [14]. Sin embargo, en muchos casos los CNTs son mezclados con otros materiales funcionales, usualmente polímeros sintéticos, para formar andamios híbridos más versátiles, biocompatibles y multifuncionales. Ya en el año 2002 un compuesto de ácido poliláctico y nanotubos de carbono demostró promover la proliferación osteoblástica *in vitro* [15]. Similares resultados se obtuvieron con biocompuestos de quitosano/CNT [16], [17] y con

hidrogeles reforzados con CNTs [18], [19]. Dada la abundancia del colágeno en la matriz extracelular del tejido óseo, comenzaron a utilizarse también nanotubos de carbono embebidos en gel de colágeno como andamio, mostrando una estructura tridimensional similar a la de la matriz natural [20] así como un aumento de la deposición de hidroxiapatita [21]. Adicionalmente, era biocompatible y biodegradable. Por otra parte, la inmovilización de fibronectina (glicoproteína con un papel importante en la adhesión celular) en SWCNTs mostró un aumento en la proliferación de las MSCs [22].

Algunos ensayos también han permitido descubrir que algunas características de los andamios de CNTs tienen un efecto sustancial en las células. Por ejemplo, a mayor aumento de la rugosidad de la superficie del andamio mayor es la adhesión y, por tanto, la diferenciación osteoblástica y proliferación de las células sobre la matriz [23]. El diámetro [24] y longitud de los CNTs también tienen un efecto sustancial en la adherencia de los osteoblastos. Una investigación llevada a cabo por Axpe et al. [25] descubrió que si se aumentaba el tamaño del volumen libre (pequeños espacios vacíos encontrados en las moléculas) del biopolímero quitosano a través de la adición de diferentes nanotubos de carbono a la matriz de éste se producía un aumento de la difusividad lo que hace que las células reciban el oxígeno y los nutrientes necesarios. Esto supone una solución para un problema aún sin resolver de la ingeniería que es la deficiencia del transporte de nutrientes en los andamios.

#### 5.1. Tests *in vivo* de andamios basados en CNTs

Se han llevado a cabo un número limitado de experimentos *in vivo* para evaluar la idoneidad y biocompatibilidad de los andamios basados en CNTs. Fue en el año 2008 cuando se demostró por primera vez que los CNTs también promovían la formación de tejido óseo en ratas, mostrando poca reacción inflamatoria local y una alta biocompatibilidad incluso estando en contacto con el hueso [26]. Andamios híbridos de CNTs y polímeros sintéticos también han mostrado biocompatibilidad así como un aumento de la formación de tejido óseo *in vivo* [27], [28], [29]. Adicionalmente, cuando se implantaron en ratones compuestos de éstos con colágeno y BMP-2 (un importante factor de crecimiento que controla la proliferación y diferenciación de las MSCs) se observó la formación casi completa de nuevo hueso a las tres semanas [30].

Estos experimentos *in vivo* e *in vitro* demuestran que los CNTs funcionan como un andamio que interacciona con el cuerpo para promover la osteogénesis y por tanto el proceso de regeneración del tejido óseo. A día de hoy, ningún otro andamio ha interactuado con el cuerpo de esta forma. Por tanto, se espera que los CNTs sean los materiales que permitan el avance de la medicina regenerativa.

#### 5. LA COMPATIBILIDAD ÓSEA DE LOS CNTs

Aunque los experimentos *in vivo* mencionados anterior-

mente muestran una compatibilidad ósea relativamente buena, muchos experimentos *in vitro* han indicado efectos citotóxicos sobre las células óseas. Debido a su alta afinidad con los CNTs, los nutrientes en el medio de cultivo requeridos para el crecimiento celular pueden unirse a los CNTs reduciendo la tasa de proliferación celular [31]. A nivel celular, los CNTs pueden unirse a los receptores y bloquear los poros de la membrana celular o incluso romperla [32]. Esta habilidad, por otra parte, permite la liberación de fármacos o genes en las células usando los CNTs. Una vez internalizados en las células, podría inducirse la producción de especies reactivas de oxígeno debido al elevado ratio volumen-superficie y al aumento de la reactividad superficial de los CNTs [32], [33]. Liu et al. [34] demostraron la inhibición de la proliferación, diferenciación osteogénica y mineralización de las células mesenquimales en CNTs carboxilados la cual achaca a la supresión de la señalización por BMP. Mu et al. [35] también demostraron una supresión de la señalización por BMP en SWCNTs carboxilados.

Varios métodos han sido implementados para mitigar los problemas citotóxicos siendo la forma más efectiva de aumentar la biocompatibilidad la PEGilación. Se basa en la adición de polietilenglicol a CNTs funcionalizados lo que los hace más estables y solubles en agua. Nayak et al. [36] encontraron que MWCNTs pegilados no mostraban ninguna citotoxicidad. Además, la viabilidad de las células mesenquimales aumentó así como su diferenciación osteogénica con simultánea mineralización de la matriz ósea. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la citotoxicidad de los CNTs varía en los diferentes ensayos. Esto hace que sea necesario especificar el ensayo usado cuando se reportan resultados de citotoxicidad de CNTs.

## 6. CONCLUSIONES Y FUTURAS PERSPECTIVAS

En ingeniería de tejidos duros es fundamental la búsqueda y fabricación de materiales andamio capaces de promover el desarrollo tisular y celular deseado. En este aspecto, muchos estudios indican que los nanotubos de carbono son prometedores como biomaterial para el desarrollo de andamios mejorados, debido a sus excepcionales características. Además, ensayos *in vitro* e *in vivo* de varias estructuras e híbridos multifuncionales de éstos mostraron una mejora de la adhesión, aceleración de la proliferación y diferenciación a células óseas así como en la mineralización. Su biocompatibilidad también parece ser relativamente buena *in vivo* aunque en este aspecto es necesario un mayor conocimiento sobre éstos antes de realizar ensayos clínicos con ellos. Otros de los desafíos pendientes son la mejora de sus propiedades mecánicas (para reducir el desajuste en la interfase orgánico-inorgánico que puede llevar al fallo del implante), la creación de estructuras que faciliten el transporte de nutrientes (aunque Nayak et al. [25] han hecho un pequeño avance en este sentido) y un mayor estudio de la funcionalización de los CNTs para conseguir la liberación controlada de factores bioactivos funcionales como los factores de crecimiento. Además, se ha de introducir formas más ef-

caces de mitigar su citotoxicidad. En cuanto a las células madres liberadas por los CNTs, se ha de conseguir mantenerlas en la zona deseable sin que migren así como aumentar sus tasas de diferenciación y proliferación en el linaje osteogénico [7].

## REFERENCIAS

- [1] P.V. Giannoudis, H. Dinopoulos and E. Tsiridis, "one substitute: an update", *Injury*, vol. 36, no.3, pp. S20027, 2005, doi:10.1016/j.injury.2005.07029.
- [2] M.F. Pittenger, "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells", *Science*, vol. 284, no. 5411, pp. 143-147, 1999, doi: 10.1126/science.284.5411.143.
- [3] M.J. Yaszemski, R.G. Payne, W.C. Hayes, R. Langer and A.G. Mikos, "Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone", *Biomaterials*, vol.17, no. 2, pp. 175-185, 1996, doi: 10.1016/0142-9612(96)85762-0.
- [4] E.D. Arrington, W.J. Smith, H.G. Chambers, A.L. Bucknell and N. Davino, "Complications of iliac crest bone graft harvesting", *Clin Orthop Relat Res.*, vol. 329, pp.3000309, 1996.
- [5] R. Langer and J.P. Vacanti, "Tissue engineering", *Science*, vol. 260, no. 5110, pp. 920-926, 1993, doi: 10.1126/science.8493529.
- [6] F.M. Tonelli, A.K. Santos, K.N. Gomes, E. Lorençon, S. Guatimosim, L.O. Ladeira and R.R. Resende, "Carbon nanotube interaction with extracellular matrix proteins producing scaffolds for tissue engineering", *Int J Nanomedicine*, vol. 7, pp. 4511-29, 2012, doi:10.2147/IJN.S33612.
- [7] Z.J. Han, A.E. Rider, M. Ishaq, S. Kumar, A. Kondyurin, M.M. "ilek, I. Levchenko and K. Ostrikov, "Carbon nanostructures for hard tissue engineering", *RSC Adv.*, vol. 3, pp. 11058-11072, 2013, doi:10.1039/C2RA23306A.
- [8] M. Riaz, A. Fulati, G. Amin, N.H. Alvi, O. Nur and M. Willander, "Uckling and elastic stability of vertical ZnO nanotubes and nanorods", *J. Appl. Phys.*, vol. 106, pp. 121-127, 2009, doi: 10.1063/1.3190481.
- [9] E.W. Wong, P.E. Sheeran and C.M. Lieber, "Nanobeam mechanics: elasticity, strength and toughness of nanorods and nanotubes", *Science*, vol. 277, no. 5334, pp. 1971-1975, 1997, doi: 10.1126/science.277.5334.1971
- [10] I.A.A.C. Esteves, F.J.A.L. Cruz, E.A. Müller, S. Agnihotri and J.P. Mota, "Determination of the surface area and porosity of carbon nanotube bundles from a Langmuirian analysis of sub- and supercritical adsorption data", *Carbon*, vol. 47, no. 4, pp. 948-956, 2009, doi:10.1016/j.carbon.2008.11.044.
- [11] E. Hirata, M. Uo, Y. Nodasaka, et al., "3D collagen scaffolds coated with multiwalled carbon nanotubes: initial cell attachment to internal surface", *J Biomed Mater Res.*, vol. 93, no. 2, pp. 544-550, 2010, doi:10.1002/jbm.b.31613.
- [12] X. Liu, H. Liu, X. Niu, et al., "The use of carbon nanotubes to induce osteogenic differentiation of human adipose-derived MSCs *in vitro* and ectopic bone formation *in vivo*", *Biomaterials*, vol. 33, no. 19, pp. 4818-4827, 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.045.
- [13] S.V. Dorozhkin, E. I. Dorozhkina and M. Epple, "A model system to provide a good *in vitro* simulation of biological mineralization", *Cryst. Growth Des.*, vol. 4, pp. 389, 2004, doi: 10.1021/cg034066s.
- [14] T. Akasaka, F. Warari, Y. Sato and K. Tohji, "apatite formation on carbon nanotubes", *Material Science and Engineering*, vol. 26,

- no. 4, pp. 675-678, 2006, doi:10.1016/j.msec.2005.03.009.
- [15] P.R. Supronowicz, P.M. Ajayan, K.R. Ullmann, B.P. Arulandam, D.W. Metzger and R.J. Bizios, "Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation", *Biomed Mater Res.*, vol. 59, no. 3, pp. 499-506, 2002, doi: 10.1002/jbm.10015
- [16] D. Depan and R.D.K. Misra, "Processing-structure-functional property relationship in organic-inorganic nanostructured scaffolds for bone-tissue engineering: The response of preosteoblasts", *J Biomed Mater Res A*, vol. 100, no. 11, pp. 3080-91, 2012, doi:10.1002/jbm.a.34245.
- [17] A. Abarrategi, M.C. Gutierrez, C. Moreno-Vicente, et al., "Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes", *Biomaterials*, vol. 29, no. 1, pp. 94-102, 2008, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.09.021.
- [18] S. R. Shin, H. Bae, J. M. Cha, J. Y. Mun, Y.-C. Chen, H. Tekin, H. Shin, S. Farshchi, M. R. Dokmeci, S. Tang and A. Khademhosseini, "Carbon nanotube reinforced hybrid microgels as scaffold materials for cell encapsulation", *ACS Nano.*, vol. 6, no. 1, pp. 362-72, 2012, doi:10.1021/nn203711s.
- [19] S.K. Yadav, T. Bera, P.S. Saxena, A.K. Maurya, R.S. Garbyal, R. Vajtai, P. Ramachandrarao and ". Srivastava, "MWCNTs as reinforcing agent to the Hap/Gel nanocomposite for artificial bone grafting", *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 93, no. 3, pp. 886-96, 2010, doi: 10.1002/jbm.a.32581.
- [20] Z. Tosun and P.S. McFetridge, "Composite SWNT-collagen matrix: characterization and preliminary assessment as a conductive peripheral nerve regeneration matrix", *J. Neural Eng.*, vol. 7, no. 6, pp. 31-41, 2010, doi: 10.1088/1741-2560/7/6/066002.
- [21] E.E. da Silva, H.H.M. Della Colleta, A.S. Ferlauto, R.L. Moreira, R.R. Resende, S. Oliveira, G.T. Kitten, R.G. Lacerda and L.O. Ladeira, "Nanostructured 3-D collagen/nanotube biocomposites for future bone regeneration scaffolds", *Nano Res.*, vol. 2, no. 6, pp. 462-473, 2010, doi: 10.1007/s12274-009-9042-7
- [22] S. Namgung, T. Kim, K. Y. Baik, M. Lee, J.-M. Nam and S. Hong, "Fibronectin-carbon-nanotube hybrid nanostructures for controlled cell growth", *Small*, vol. 7, no. 1, pp. 56-61, 2011, doi: 10.1002/smll.201001513.
- [23] W. Tutak, M. Chhowalla and F. Sesti, "The chemical and physical characteristics of single-walled carbon nanotube film impact on osteoblastic cell response", *Nanotechnology*, vol. 21, no. 31, 2010, doi:10.1088/0957-4484/21/31/315102.
- [24] K.L. Elias, R.L. Price and T.J. Webster, "Enhanced functions of osteoblasts on nanometer diameter carbon fibers", *Biomaterials*, vol. 23, no. 15, pp. 3279-87, 2002, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00087-X.
- [25] E. "xpe, L. "ugnicourt, D. Merida, et al., "Sub-nanoscale free volume and local elastic modulus of chitosan/carbon nanotube biomimetic nanocomposite scaffold-materials", *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 3, pp. 3169-3176, 2015, doi: 10.1039/x0xx00000x.
- [26] Y. Usui, K. "oki, N. Narita, et al., "Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effects", *Small*, vol. 4, no. 2, pp. 240-6, 2008, doi: 10.1002/smll.200700670.
- [27] A. Abarrategi, M.C. Gutierrez, C. Moreno-Vicente, M.J. Hortiguela, V. Ramos, J.L. Lopez-Lacomba, M.L. Ferrer and F. del Monte, "Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes", *Biomaterials*, vol. 29, no. 1, pp. 94-102, 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.09.021.
- [28] M. Bhattacharya, P. Wutticharoenmongko-Thitiwongsawet, D.T. Hamamoto, D. Lee, T. Cui, H.S. Prasad and M. "hmad, "one formation on carbon nanotube composite", *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 96, no. 1, pp. 75-82, 2011, doi: 10.1002/jbm.a.32958.
- [29] T. Kasai, S. Matsumura, T. Iizuka, K. Shiba, T. Kanamori, M. Yudasaka, S. Iijima and ". Yokoyama, "Carbon nanohorns accelerate bone regeneration in rat calvarial bone defect", *Nanotechnology*, vol. 22, no. 6, pp. 065102, 2011, doi: 10.1088/0957-4484/22/6/065102.
- [30] Y. Usui, K. "oki, N. Narita, et al., "Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effects", *Small*, vol. 4, no. 2, pp. 240-6, 2008, doi: 10.1002/smll.200700670.
- [31] E. Mooney, P. Dockery, U. Greiser, M. Murphy and V. Barron, "Carbon nanotubes and mesenchymal stem cells: biocompatibility, proliferation and differentiation", *Nano Lett.*, vol. 8, no. 8, pp. 2137-43, 2008, doi: 10.1021/nl073300o.
- [32] Z. J. Han, I. Levchenko, S. Kumar, M. M. A. Yajadda, S. Yick, D. H. Seo, P.J. Martin, S. Peel, Z. Kuncic and K. Ostrikov, "Plasma nanofabrication and nanomaterials safety", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 44, no. 17, 2011, doi: 10.1088/0022-3727/44/17/174019
- [33] M. G. Kong, M. Keidar and K. Ostrikov, "Plasmas meet nanoparticles-where synergies can advance the frontier of medicine", *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 44, no. 17, 2011, doi: 10.1088/0022-3727/44/17/174018.
- [34] D. Liu, C. Yi, D. Zhang, J. Zhang and M. Yang, "Inhibition of proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells by carboxylated carbon nanotubes", *ACS Nano*, vol. 4, no. 4, pp. 2185-95, 2010, doi:10.1021/nn901479w.
- [35] Q. Mu, G. Du, T. Chen, B. Zhang and ". Yan, "Suppression of human bone morphogenetic protein signaling by carboxylated single-walled carbon nanotubes", *ACS Nano*, vol. 3, no. 5, pp. 1139-44, 2009, doi: 10.1021/nn900252j.
- [36] T. R. Nayak, L. Jian, L. C. Phua, H. K. Ho, Y. Ren and G. Pastorin, "Thin films of functionalized multiwalled carbon nanotubes as suitable scaffold materials for stem cells proliferation and bone formation", *ACS Nano*, vol. 4, no. 12, pp. 7717-25, 2010, doi:10.1021/nn102738c.



**Patricia A. Lucas Rodríguez** recibió el título de Biología por la Universidad de La Laguna en 2014. Actualmente realiza el máster Biotecnología Sanitaria de la Universidad Pablo de Olavide.

# Influence of oil variety and harvest time on the hydroxytyrosol, tyrosol, secoiridoids and o-diphenols content of Extra Virgin Olive oil

María José Vázquez Bernárdez, Wenceslao Moreda Martino, Cesar Prado Fernández

**Abstract-** Olive oil is a key product of our Mediterranean climate. Owing to its chemical composition, it provides excellent health benefits to its consumers. Hence, nowadays, it is of the utmost importance for scientists to determine the factors that influence its concentration in beneficial chemical compounds and the extent of their influence. In this investigation the influence of harvesting time and variety of olive oil was studied in terms of phenolic concentration. All varieties were evaluated and optimal harvest dates were associated for each variety in terms of greatest concentration of beneficial phenolic compounds.

Palabras Claves - Olive Oil, phenol, hydroxytyrosol, tyrosol, anti-oxidant, anti-inflammatory



## 1. OLIVE OIL, THE HEALTHIEST FAT ON EARTH

As claimed by the official site of Authority Nutrition, [1] olive oil is the healthiest fat on Earth, owing to all of the benefits its components offer. Since its discovery in ancient times, olive oil, also known as liquid gold, famous for its many organoleptic as well as aromatic and pharmacological properties, has fascinated an abundance of consumers and has established itself as the principal nutrient of the Mediterranean diet.

One of the many beneficial factors of Olive oil are its oxidative properties. Oxidative properties of a substance are closely linked to the science behind oxidation and reduction. Oxidation is a process that is constantly occurring, not only in the oil, but also inside our organisms. Free radicals are continually being produced as a result of internal oxidation reactions that give rise to peroxides. Antioxidants counteract the effect of (ROS) Reactive Oxygen Species, preventing damage to organism.

Furthermore, the oxidative properties of olive oil refer,

mainly, to the antioxidative properties of its phenolic fraction, which vary depending on the amount of phenolic compounds, especially on the hydroxytyrosol (Hty), Hty derivatives and tocopherol content. Therefore, the phenolic compounds in olive oil is *"an important factor to consider in order to evaluate the quality of olive oil since they are partly responsible for its autoxidation stability"* [2].

Similarly, the stability of olive oil is caused by its high content in oleic acid, which is a mono-unsaturated fatty acid due to the *"relative degree of oxidation of the fatty acids in it"* [1]

Olive oil is not only beloved for its anti-oxidant properties but also for the anti-inflammatory properties provided by the tyrosol family. Tyrosol (Ty) derivatives coupled up with antioxidant species provide EVOO (Extra Virgin Olive oil) with an excellent healthy profile, making olive oil an excellent agent for the prevention of cardiovascular, cell-damage and degenerative disease.

Likewise, maturation ripening, is led by oxidation deteriorates the content of olive oil. Two oxidation

processes take place during ripening; *photo-* and *auto-oxidation* and many of the components of olive oil are transformed into other oxidized molecules. Nonetheless, the action of antioxidant from phenol groups counteracts this process giving olive oils a longer shelf life (the time before the oil begins to ripe).

Since the quality and composition of olive oil relies on various factors, among many: variety and harvest date, this study gives a better insight into the effects of ripeness in 5 different varieties of fruit collected at 5 different stages of maturation. The phenolic concentrations of each oil will be crucial to establish their antioxidant and anti-inflammatory potential, and hence to determine the best variety and best harvesting time in order to produce a healthy oil.

## 2. VARIETIES OF OLIVE OIL STUDIED

This study analyses 5 different varieties of olive oil which proceed from different zones.<sup>1</sup>

Olive trees are evergreen and usually grow in Mediterranean areas due to the wide range of benefits the climate provides. The characteristics of each zone will result in different properties of each product and hence, the previous knowledge of the characteristics of the zone and the variety of olive are essential in order to determine the qualities of each olive oil.

Within the investigation 4 different varieties of olive oil; 3 from Spain: Hojiblanca, Picual and Arbequina and a fourth one from Italy, Frantoio, will be studied.

### 2.1. Picual

A stable anti-inflammatory olive oil

Picual is one of the most important varieties of olive oil in Spain, being a variety hugely produced, occupying a 30% of the Spanish olive growing zone and producing almost the 50% of Spanish oil [3].

It is an abundant variety, occupying the whole region of Jaén and partially the regions of Granada and Córdoba, as well as some other small zones of Andalusia. Picual trees bloom at an early stage and ripen at a medium phase, adopting a recognizable black colour. Its olive oil has been labelled as a high quality oil due to its stability and richness in oleic acid (78-83%) which coupled up with its abundant phenolic fraction, making the Picual variety the best Spanish olive in terms of bitterness; having also anti-inflammatory properties [1].

### 2.2. Hojiblanca

<sup>1</sup> All varieties analysed in the study were provided by *Instituto de La Grasa (CSIC)* and obtained from official oil reservoirs.

A stable, vitamin E rich, olive oil [4].

Hojiblanca, as stated by the European Market of Olive oil, is a medium-productivity variety [4], which is harvested especially in the South of Spain, mostly in the province of Córdoba and other zones such as Loja, Málaga and Estepa. Its trees are characterized by the big size of its fruit and its asymmetrical shape, as well as their resistance to natural fall and their late harvest date, happening at a black stage.

Although the oily fraction only represents a 20% of the fruit, Hojiblanca oil is famous for its excellent quality and its high content in vitamin E as well as its resistance to ripeness despite its relatively low amount of polyphenols.

### 2.3. Frantoio

As stated by the Australian Olive Agency Information service, Frantoio is "*the most noted olive oil variety of Tuscany, Italy, and one of the most highly acclaimed oil varieties in the world*" [5].

It is grown in regions with Mediterranean climate including Italy, North Africa, Australia, Argentina and California. Frantoio trees produce small and medium sized olives ready to be collected at the mid-to-late season due to the fact that the fruit ripens gradually. It is rich in olive oil, containing between 17 and 22% of oil. Its aromatic and oil qualities are worldwide recognized [4].

### 2.4. Arbequina

A resistant but delicate to oxidation olive oil variety

Arbequina olive oil is a high-production variety. As its name indicates, this variety comes from Arbeca, Lleida, and it is mostly grown in the North of Spain, including Cataluña, Huesca and Zaragoza, and being recently introduced in Andalusia.

Its fruits are small and sphere-shaped, rich in olive oil, 20-22% of oil and bloom and ripen at a medium stage adopting a recognizable green, violet or bright black colour. This variety resists to harsh temperatures and produces an olive oil of an excellent quality, which characteristics vary depending on the harvest date. This, coupled up with its resistance to draughts explains its commercial interest. Its oil, however, is very susceptible to oxidation [3].

### 2.5. Manzanilla

An Andalusian dark green olive oil [6].

Manzanilla is a widespread olive oil variety which can be found in regions of the South and East-centre of Spain. Depending on its source it responds to different names:

'Manzanilla de Sevilla', original of Seville and 'Manzanilla de Cerceña, origin Extremadura'.

As the Official Olive market of the European Union claims, "Manzanilla is a high production variety" [3]; with early blooming and ripening; adopting in a short period of time its early ripening a green colour.

Manzanilla olives are round, sphere shaped and symmetrical. This olive variety originates in Dos Hermanas, Seville, and it is cultivated all over the province of Seville. Manzanilla olive oil is characterized by its dark green colour as well as herbal odour and bitter.

### 3. HARVESTS

Five different harvests of each olive fruit were studied: September, October, November, December and January and all fruits of each variety were collected at the same time. Each of the previous harvests associates with one of the three distinguishable stages of ripening bellow. Being October the earliest, January the latest and November the middle point. October and December are intermediate harvests which can be classified into different categories depending on the variety.

#### **3.1. Green. Immature Fruit**

This corresponds to early harvests and low maturity indexes 1 or 2. At this stage olives are green and firm as well as rich in chlorophyll and polyphenols, which in turn means that oils are very stable due to their high content in antioxidants. The long shelf life of these oils is accompanied by the strong anti-inflammatory properties of the tyrosol content [7].

#### **3.2. Veraison**

Veraison corresponds to a yellow-green harvested olive which starts to ripen due to oxidation. As a result of this process its skin starts to soften and becomes more oily. The chlorophyll content inside olives starts to transform into pheophytins and consequently olives change colour and progressively adopt a red-purple colour.

Polyphenol concentration remains high at this stage, and olives start to develop characteristics of ripened fruits. Similarly, veraison is usually associated with maturity 3, where, according to many studies, olives are said to be at their best peak for oil production.

#### **3.3. Black. Mature fruit**

As the maturation process progresses the fruit turns black due to the shortage of chlorophyll. This is the point where carotenoid content increases whilst polyphenol

concentration decreases. As a result, these oils have less antioxidant and anti-inflammatory properties, are more likely to oxidize and hence have a shorter shelf life.

## 4. EXPERIMENTAL METHOD

Analysis of the 5 varieties was carried out according to the method used by *Instituto de la Grasa (CSIC)* and phenols were counted via HPLC.

### 4.1. Apparatus:

- Rotary vacuum evaporator
- Vortex
- HPLC
- Diol-columns
- Cartridges
- Syringe filter
- Methanol
- *n*-hexane

### 4.2. Procedure: <sup>2</sup>

#### **Part 1.-Sample preparation**

In a 10 mL conical flask 2,5 grams of oil were weighed in a precision balance presenting an uncertainty of  $\pm 0,001$  g). 500 microliters of standard solution: *p*-hydroxyphenylacetic, 0,12 mg/ $\mu$ L and *o*-coumaric acid, 0,01 mg/mL in methanol, were added to the 2,5 grams of olive oil using a double gauge pipette.

The solution was gently shaken and evaporated in a rotary evaporator at 40 °C. Volatile compounds from the solution evaporated due to the decrease in boiling point caused by the dump in pressure inside the device. After 7 minutes, isolated fraction of interest was ready for the next stage.

#### **Part 2.-Isolation of the fraction**

The Solid Phase Extraction (SPE) cartridge (diol-bonded phase, 3 mL) was placed in the SPE equipment (vacuum). The cartridge was activated by passing 6 mL of methanol and 6 mL of *n*-hexane with the aid of a vacuum. It was ensured during the whole elution process (the process of separating the analyte from the rest of the solid phase by the use of methanol and *n*-hexane) that the cartridge remained wet.

To purify the sample, the resulting fraction was placed inside the activated SPE cartridge. The flask was washed with 6 mL of *n*-hexane and placed it into the column, where it was left until it ran out and it was then discarded. 4mL with the eluting mixture were iluted and discarded. After that the solution was eluted with 10 mL of methanol and 10mL of methanol were added into the cartridge and the resulting elution collected in a 25 mL

<sup>2</sup> This method was created by Dr. Wenceslao Moreda and previously tested in Instituto de Grasa (CSIC).

conical flask.

The remaining fraction was then evaporated in a rotatory evaporator at 40°C under vacuum until it dried and a solid fraction obtained. The solid residue was dissolved in 500 microliters of the methanol and water mixture. This solution was shaken vigorously by using a vortex. It was then left to settle under dark and cool conditions for 4 hours.

### Part 3.-HPLC-DAD Determination of the isolated phenolic compounds

The solution obtained in part 1 was filtered with a syringe filter and placed in an Eppendorf vial. 20 microliters of the filtered solution were injected into the HPLC device with a reverse phase column maintained at 30°C. HPLC develops a liquid-liquid chromatography combining the liquid-solid part of a stationary phase with the fraction of olive oil introduced. Two substances were used in this case: *p*-hydroxyphenylacetic acid and *o*-coumaric acid as internal standards for the quantification of the rest of compounds. Likewise, the solubility of the different phenolic fractions and the time they took to appear are related together; being the quickest the less soluble compounds, or the less attracted to the stationary phase and the slowest the most attracted compounds.

Two stationary phases with different polarities were combined for the quantification of phenols; the retention time of each compound being directly proportional to its concentration.

## 5. RESULTS AND DISCUSSION

Olives from 5 different varieties; Picual, Arbequina, Hojiblanca, Manzanilla and Frantoio were collected at 5 different harvest stages: September, October, November, December and January; and quantification of the phenolic fraction was done in *Instituto de la Grasa (CSIC)* following the experimental method listed above to give rise to the following results<sup>3</sup>:

### Determination of the optimal moment for the recollection of each variety in terms of compound concentration

Each variety appeared to have a different evolution according to its phenolic content. Overall, in the first quantifications of phenolic fractions of three olive oils of maturity 3: Hojiblanca, Manzanilla and Frantoio it was observed that Manzanilla was the richest oil in phenolic compounds. Manzanilla presented a high concentration of hydroxytyrosol derivatives as well as an outstanding concentration of tyrosol acetate. Therefore Manzanilla

<sup>3</sup> In order to establish a relationship between the obtained results, data of interest includes hty, ty and all its derivatives. As *o*-diphenols and secoroidoids are also classified as antioxidants they cope with Hty and its derivatives to achieve the antioxidant profile of the oil. The number of ortho-diphenols is a result of the addition of luteolin, 1D-HTy, HTy acetate, and HTy; whilst the sum of secoroidoids is the result of 2D-Ty, 2D-Hty, 1D-HTy and 1D-Ty.

was classified as the compound with the greatest antioxidant and anti-inflammatory potential of all three. Figure 1 is a representation of the chromatogram of Manzanilla M.3 where the peaks corresponding to the phenolic compounds presented greater areas than those of figure 1 and figure 2.

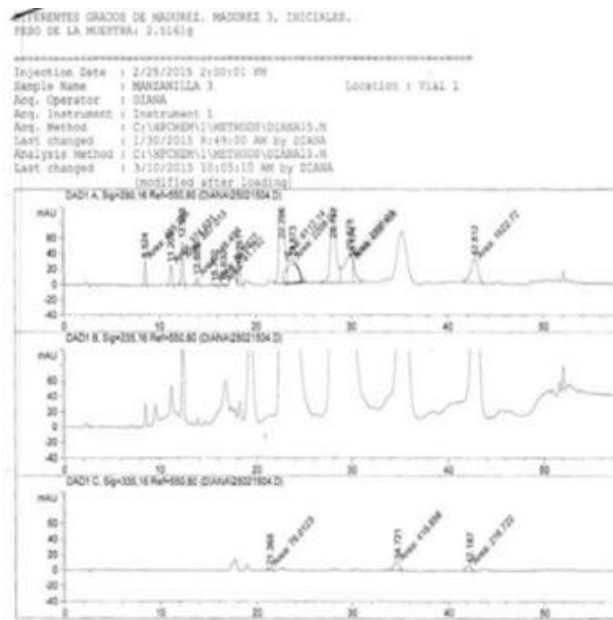


Figure 1: chromatogram of Manzanilla

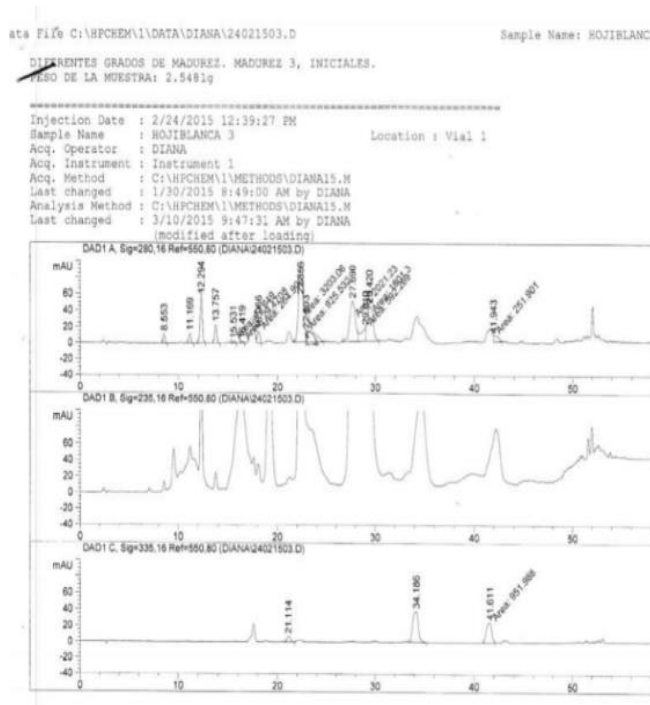


Figure 2: chromatogram of Hojiblanca

Moreover, the phenolic concentrations of all three varieties were compared and Manzanilla was found to be the richest in phenolic, Secoroidoid and o-diphenolic, followed by Frantoio and Hojiblanca as presented in

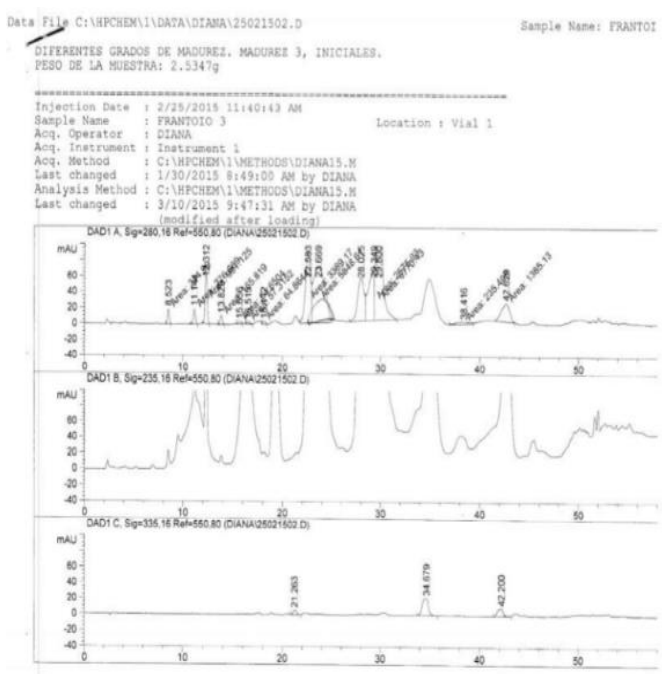


Figure 3. Figure 3: chromatogram of Frantoio

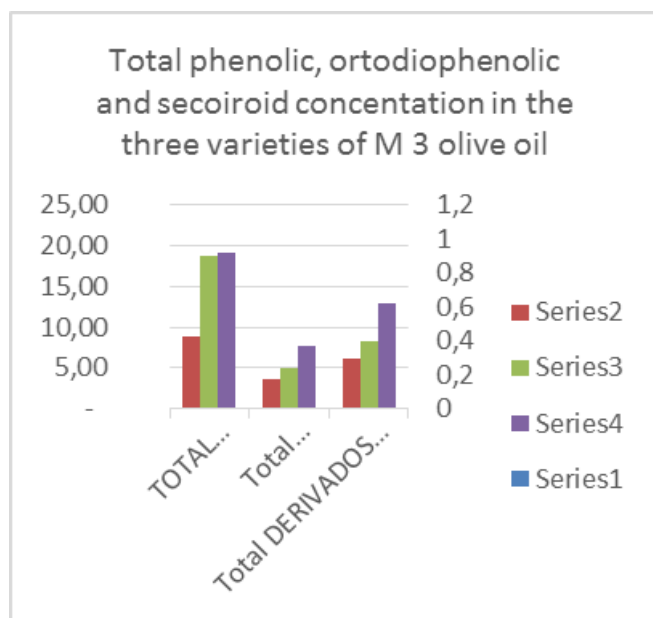


Figure 4: Comparison of concentrations

Further study of all 5 harvesting periods was carried out and chromatograms revealed that early-intermediate harvesting periods between September and November are mostly the best time for the harvesting of olives.

Nonetheless, the optimal point for each olive oil will be

determined by its variety as represented in figure 5.

EVOO	Best for anti-oxidant	Best for anti-inflammatory
Arbequina	October	October
Hojiblanca	November	September-November
Pical	September-October	September
Frantoio	November	November
Manzanilla	November	January

Figure 5: Study of best harvest stage of 5 varieties according to antioxidant and anti-inflammatory potential

Each olive oil has its own perfect harvest date in terms of required properties, however, all coincide in the degradation of the oil from November onwards. Therefore, as stated previously by other authors olive oil ripeness and phenolic concentration draw a bell graph, where phenolic concentration is optimum at middle stages as seen in figure 6.

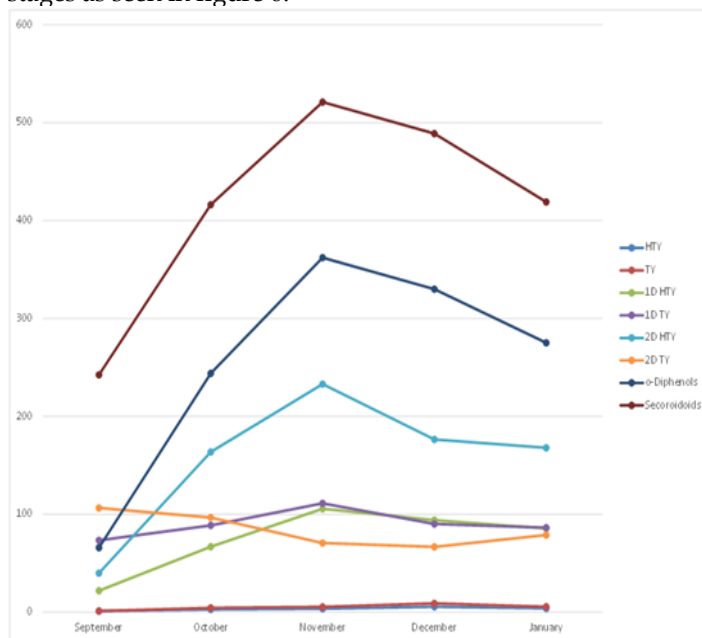


Figure 6: evolution of phenolic content of Frantoio olive oil along the ripening process

Determination of the optimal oil variety per harvest in terms of anti-inflammatory and antioxidant properties. In terms of phenolic concentration and oil variety harvest dates were analysed independently and results showed that overall Frantoio olive oil variety has the richest in polyphenol levels in all harvests.



### 5.1. September harvest.

All 5 oils in September harvest tend to have similar behaviours for tyrosol and hydroxytyrosol content. However, the richest oil in secoroidoids was Manzanilla, followed by Picual, Arbequina, Frantoio and Hojiblanca.

In terms of *o*-diphenols Manzanilla and Arbequina were the richest, followed by Picual, Hojiblanca and Frantoio.

Manzanilla shows the highest levels of oleocanthal 254,9 mg/mL as seen in figure 7 and highest content of tyrosol (2 mg/mL).

Frantoio appeared to have the highest levels of the 2nd derivative of tyrosol (2D-Ty), 106,6 mg/mL, with 73,6 mg/mL of oleocanthal. Therefore we can expect the greatest anti-inflammatory character in Manzanilla olive oil, but also very high in the case of Frantoio oil.

Finally, Manzanilla and Picual, having the highest levels of oleisceine and 2nd derivative of hydroxytyrosol (2D-HTy) respectively can be expected to show the greatest anti-oxidant properties. Arbequina showed the highest level of oleisceine 261,8 mg/mL. Nonetheless HTy and 2D-HTy levels were too small to consider it the greatest antioxidant from all 5. Due to its anti-inflammatory and antioxidant profile, Manzanilla olive oil was revealed to be the best variety for the early-September harvest (Ty 2 mg/mL, oleocanthal 254,9 mg/mL, 2D-Ty 2,8 mg/mL).

	Arbequina	Hojiblanca	Picual	Frantoio	Manzanilla
Hty	0,9	0,6	1,1	1,4	0,9
Ty	1,4	1,6	1,5	1,3	2
1D Hty	261,8	88,1	145,6	22,1	237,2
1D Ty	139,6	178,8	141,1	73,6	254,9
2D Hty	11,6	15	79,4	40,1	50,8
2D Ty	3,5	3,5	69,5	106,6	2,8
<i>o</i> -Diphenols	307,3	108,1	236,4	66,1	307,4
Secoroidoids	416,6	170,4	435,7	242,5	545,7

Figure 7: Phenolic content of all 5 oils in September Harvest

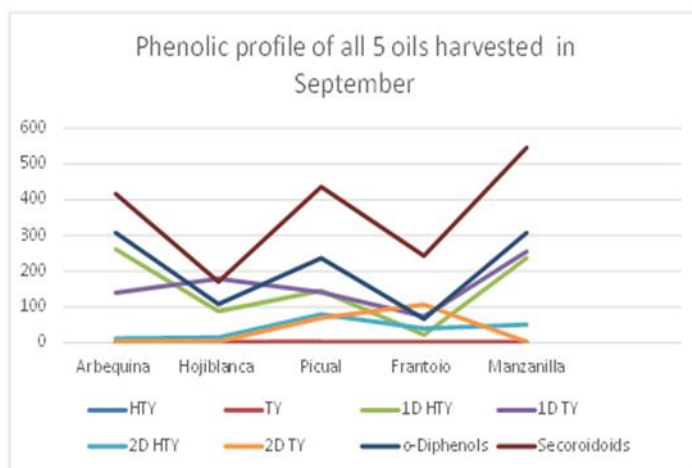


Figure 8: Representation of the phenolic content of all 5 oils in September Harvest

### 5.2. October Harvest

Highest levels of secoroidoids were again reported in Manzanilla (603,8 mg/mL) whilst Arbequina reported again the highest values of *o*-diphenols (378,8 mg/mL) followed by Manzanilla.

In terms of HTy, the highest values of oleisceine were reported in Arbequina and 2D-HTy achieved its greatest concentration in Frantoio. Tyrosol derivatives (oleocanthal) were found at a higher concentration in Manzanilla and Frantoio (2D-Ty) as shown in figures 9 and 10.

Therefore, in October, the best varieties to produce anti-oxidant olive oil are Manzanilla and Frantoio due to their balanced concentration of HTy and Ty content; whilst Arbequina and Frantoio will excellent anti-inflammatory oils.

	Arbequina	Hojiblanca	Picual	Frantoio	Manzanilla
Hty	1,1	0,7	1,9	2,9	2,2
Ty	1,4	1,7	2,7	4,6	3,6
1D Hty	307,2	94,6	102,8	67	237,5
1D Ty	147,5	123,1	81,9	88,8	250,1
2D Hty	34,8	28,9	122,4	163,8	44,4
2D Ty	5,1	8,8	57,2	96,7	71,8
<i>o</i> -Diphenols	378,8	118,5	244,3	244	307,2
Secoroidoids	494,5	195,4	364,3	416,3	603,8

Figure 9: Phenolic concentration of all 5 oils in October

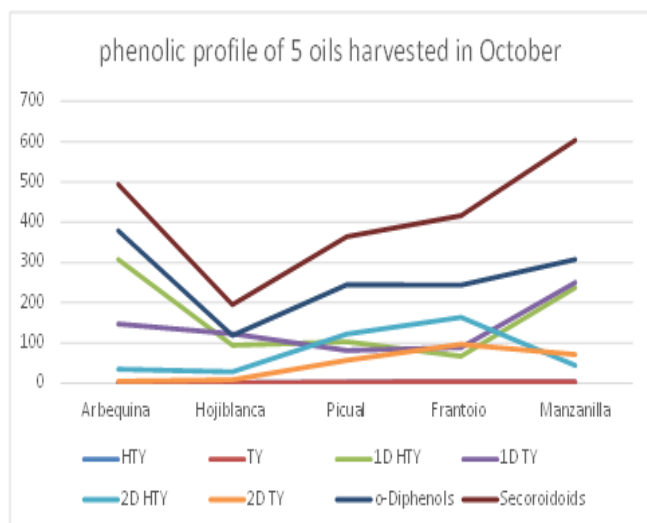


Figure 10: Representation of the phenolic profile of all 5 oils harvested in October

### 5.3. November Harvest

In November harvest secoroidoid content was prevalent in Frantoio olive oil (521 mg/mL) whilst *o*-diphenol content was abundant in Arbequina and Frantoio.

Arbequina was found to be rich in oleisceine and poor in 2D-Hty, whilst Frantoio was rich in 2D-HTy and poor in oleisceine (oxidation) as shown in figure 11.

On the other hand Frantoio was the richest compound in tyrosol derivatives. All in all, due to its anti-inflammatory and anti-oxidant profile Frantoio is the best variety for the November-harvest.

	Arbequina	Hojiblanca	Picual	Frantoio	Manzanilla
Hty	1,3	1,7	1,9	3,8	3,6
Ty	2,1	2,2	2,9	5,5	3,5
1D Hty	292,6	103,1	86,9	105,8	169,6
1D Ty	100,2	103,1	75,8	111,3	137,3
2D Hty	0	40,6	76,7	233	112,4
2D Ty	9,1	12,8	51,5	70,8	3,8
<i>o</i> -Diphenols	376,7	176,9	205,6	362,1	306,8
Secoroidoids	402	259,6	290,8	521	423,1

Figure 11: Phenolic profile of all oils harvested in November

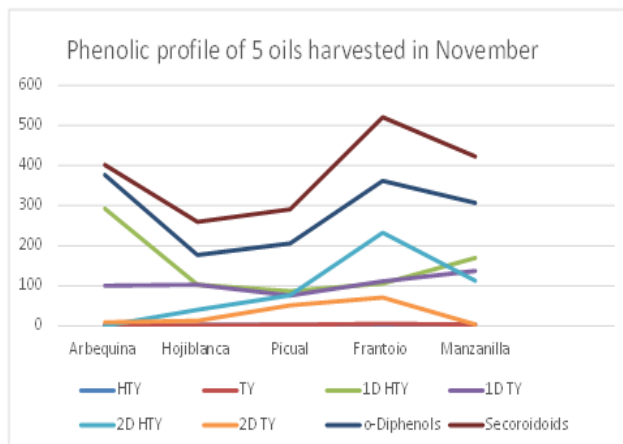


Figure 12: Representation of the phenolic profile of all oils harvested in November

### 5.3. December Harvest

Frantoio appeared to be the richest oil in secoroidoids and *o*-diphenols in December harvest with 330 mg/mL and 488,8 mg/mL respectively. Hydroxytyrosol derivatives predominated in Arbequina and Frantoio whilst tyrosol derivatives; oleocanthal was prevalent in Manzanilla and 2D-Ty in Frantoio as represented in figure 13. All in all, due to its anti-oxidant and anti-inflammatory profile Frantoio is the best olive oil for the December harvest, followed by anti-inflammatory Manzanilla and antioxidant Arbequina.

	Arbequina	Hojiblanca	Picual	Frantoio	Manzanilla
Hty	1,4	2,3	1,6	5,7	5,2
Ty	2,1	3,4	2,7	9,1	8,5
1D Hty	255,8	102,3	81,8	94,2	160,9
1D T	92,6	91,3	70,1	90,3	117,8
2D Hty	0	36	85,6	176,6	96
2D Ty	8,4	13,1	48	66,8	42,1
<i>o</i> -Diphenols	335,9	175,2	183,6	330	282,5
Secoroidoids	356,9	242,6	281,5	488,8	416,7

Figure 13: Phenolic profile of all oils harvested in December

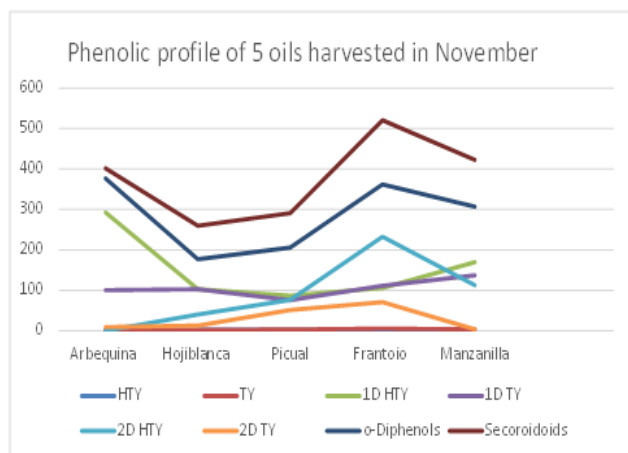


Figure 14: Representation of phenolic profile of all oils harvested in December

#### 5.4. January Harvest

Frantoio olive oil shows again the highest values of secoroidoid and *o*-diphenol species followed by Manzanilla as presented in figure 15. In terms of antioxidant activity Manzanilla and Arbequina manifested the highest values of oleisceine whilst Frantoio was the richest in 2D-HTy. Regarding anti-inflammatory properties Manzanilla was the richest variety in oleocanthal and accompanied by Frantoio, the richest variety in 2D-Ty. All in all, it could be stated that at this stage Frantoio and Arbequina are excellent varieties for the production of anti-oxidant olive oils whilst Manzanilla and Frantoio may have the greatest anti-inflammatory properties. On a balance, Frantoio is again, the best olive oil for the January harvest.

	Arbequina	Hojiblanca	Picual	Frantoio	Manzanilla
Hty	1,2	2,2	2,5	4,1	8,5
Ty	2,3	4,4	3,8	5,7	9
1D Hty	208,9	99,7	78	85,6	238
1D Ty	107,4	57,7	60,4	86,5	189,4
2D Hty	7,1	34,3	70,9	168,1	112,3
2D Ty	7	16,1	45,3	78,9	71,1
<i>o</i> -Diphenols	262,2	183,6	163,8	275,2	268,2
Secoroidoids	330,3	207,8	264,6	419,1	373,4

Figure 15: Phenolic profile of all the oils harvested In January

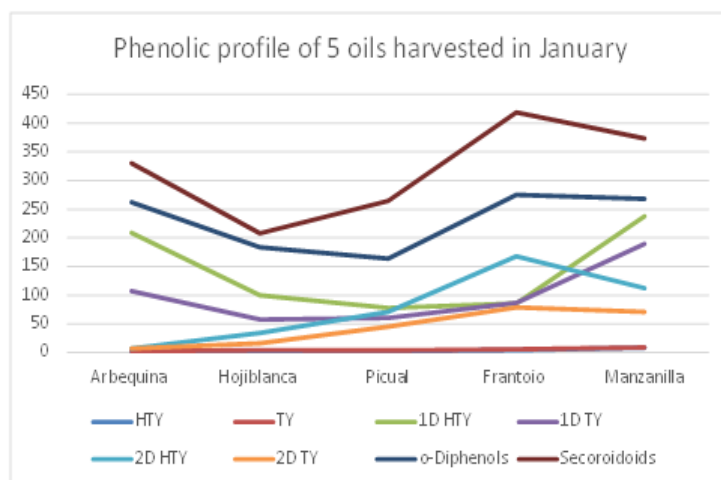


Figure 16: Phenolic profile of all the oils harvested In January

## 6. CONCLUSION

To conclude all results have been collected in the following table:

Harvest time	Variety with the best Anti-oxidant properties	Variety with the best anti-inflammatory potential
September	Manzanilla + Picual	Manzanilla
October	Manzanilla + Frantoio	Arbequina + Frantoio
November	Frantoio	Frantoio
December	Frantoio	Frantoio
January	Frantoio + Arbequina	Frantoio + Manzanilla

Figure 17: Best varieties in terms of anti-oxidant and anti-inflammatory properties

To finish this report we can state that the best anti-inflammatory and anti-oxidant olive oil varieties for all 5 harvests is Frantoio due to the fact that it combines a rich-in-Hty profile with a rich-in-Ty profile, being the best oil on a balance for our organisms and providing our bodies with the benefits of oleocanthal, and Hty derivatives and having a perfect collection moment in November.

Nonetheless, it must be considered that Manzanilla is the best oil for the September harvest, manifesting the highest levels of both, Hty and Ty derivatives. The results of this study should be regarded when considering Frantoio as a suitable agent for the prevention of cardiovascular and degenerative diseases which are closely linked to the anti-oxidant and anti-inflammatory properties of the oil.

## 7. ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank to all staff in *Instituto de la Grasa (CSIC)* and colegio de San Francisco de Paula.

## REFERENCIAS

- [1] Healthy Cooking Oils - The Ultimate Guide. [Online]. Available: <https://authoritynutrition.com/healthy-cooking-oils/>. [Accessed: 17- Jun- 2016].
- [2] "Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva", *Grasas y Aceites*, vol. 24, p. 350, 1973.
- [3] "Spanish Olive Varieties | Olive Oil Market", *Olive Oil Market*, 2013. [Online]. Available: <http://www.oliveoilmarket.eu/all-about-olive-oil/spain-olive-oil-varieties/>. [Accessed: 17- Jun- 2016].
- [4] "Hojiblanca - Modern Olives", *Modernolives.com.au*, 2016. [Online]. Available: <http://www.modernolives.com.au/hojiblanca.html>. [Accessed: 17- Jun- 2016].
- [5] "Frantoio", *Oliveaustralia.com.au*, 2016. [Online]. Available: [http://www.oliveaustralia.com.au/About\\_Olive\\_Trees/Frantoio/frantoio.html](http://www.oliveaustralia.com.au/About_Olive_Trees/Frantoio/frantoio.html). [Accessed: 17- Jun- 2016].
- [6] "GrowOrganic.com | Organic Seeds, Organic Fertilizer, Organic Gardening Supplies, Garden Tools & More!", *Groworganic.com*, 2016. [Online]. Available: <http://www.groworganic.com/manzanilla-olive-tree-potted.html>. [Accessed: 17- Jun- 2016].
- [7] "Chemical Characteristics", *Oliveoilsource.com*, 2016. [Online]. Available: <http://www.oliveoilsource.com/page/chemical-characteristics>. [Accessed: 17- Jun- 2016].



María José Vázquez Bernárdez is currently studying 1º Bachillerato at San Francisco de Paula School. This work is the result of her Personal Project carried out during 4ºESO, with assistance of *Instituto de la Grasa (CSIC)*.

Dr. Wenceslao Moreda Martino belongs to Instituto de la Grasa (CSIC) since 1996 in Lipid Characterization Department. His main activity is the development of analytical methods for the quality and authenticity control of olive oils from the chemical and organoleptic point of view. He is a member of a number of expert committees of the International Oil Council and European Commission. Dr. Moreda also represents to AENOR in the ISO TC34/SC11 of fats and oils.

Dr. César Prado Fernández obtained his European Doctorate in Physical Chemistry in 1995. He was the supervisor of the Personal Project by María José Vázquez at Colegio de San Francisco de Paula in Sevilla, where he is the current Academic Deputy Head.

# Tomas de contacto con microorganismos como sensibilización del sistema inmune ¿Beneficioso o perjudicial?

Laura Santana González

**Resumen**— Desde hace millones de años la conjunción microorganismos y humanos ha servido a este para poder desarrollar un sistema inmune maduro y con memoria, ya sea con una exposición natural, artificial o en convivencia con estos. Recientemente se han incrementado a nivel mundial los rechazos a este tipo de relación así como las inmediatas consecuencias derivadas en rechazos a la vacunación y la elusión a este tipo de contacto, conllevando la inmadurez del sistema inmune y la consecuente floración de enfermedades autoinmunes.

**Palabras Claves**— Inmunidad, microorganismos, exposición temprana, microbioma, vacunas

Actualmente se encuentra en un absoluto *Trending topic* el debate acerca de la exposición durante edades tempranas al contacto con microorganismos, con serias dudas sobre lo beneficioso o perjudicial que es esto para la salud y para el sistema inmune. Día a día podemos verlo en hechos tan cotidianos como una curiosa obcecación parental en una extremada higiene de sus primogénitos, o más allá, desde un punto de vista más extremista como el fuerte movimiento en contra de las vacunas (aplicación de patógenos muertos o atemperados para la lucha contra enfermedades) que lleva unos años extendiéndose entre la población como una epidemia. Y es que parece ser que actualmente el concepto de microorganismo va asociado a una fuerte connotación negativa. Sin embargo, no hay nada más erróneo que el intento de evadir ese necesario contacto entre microbios, patógenos o no, y el ser humano, ya que esto, sea de manera artificial o natural, refuerza el sistema inmune.

El propio ser humano es un gran reservorio y hospedador de un gran microbioma, estableciéndose una cooperación esencial entre el huésped y microorganismos que intervienen en procesos tan diversos y primordiales para el hombre como son los mecanismos de defensa e inmunidad, el metabolismo y la reproducción. Lo que es más, el contacto con microbios es un mecanismo tan esencial que se ha descubierto que ese microbioma es transmitido a través de las generaciones, es heredable.

Ya desde el nacimiento, un ser humano no es un individuo estéril, sino que va a contactar con microbios a través de vías mamarias (alimentación), cutánea y vaginal en el nacimiento [1], desarrollando posteriormente durante el crecimiento su propia microbiota, diferente a la heredada. Existiendo también algunos tipos de prácticas que impiden este contacto temprano, como es la alimentación con biberones, los baños prematuros e intensivos, la cesárea y la temprana exposición a antibióticos[1].

Todas estas prácticas pueden llegar a compartir un resultado común: el incorrecto desarrollo de la inmunidad [2].

Muchos artículos científicos demuestran lo necesario de una exposición temprana en el ser humano a los microbios, ya que la alteración de esta toma de contacto resulta en consecuencias de tipo metabólico e inmunológico como la obesidad, las alergias y las enfermedades autoinmunes [3].

Encontrando, por ejemplo, esta exposición asociada a una determinante protección a enfermedades mediadas por el sistema inmunitario como IBD y el asma [2]. Respecto a estas enfermedades se encontró que en células asépticas de ratones, células Natural Killer T invariantes (iNKT), un tipo de linfocito T con características únicas, se acumulaban sobremanera en la lámina propia del colon y el pulmón, resultando en un incremento en la morbilidad de estas enfermedades, mientras que en ratones neonatales (que no aquellos adultos) que fueron colonizados por una microbiota convencional, esta protegió a los animales de la acumulación de estas iNKT y, por tanto, de las patologías asociadas [2].

Y, si bien es cierto que desde los inicios de la extensión de las condiciones de asepsia generalizadas en la población, ha habido una disminución de las enfermedades infecciosas, también es cierto que el sistema inmune se ha visto debilitado debido a esas prácticas, resultando en un incremento de las enfermedades autoinmunes en los últimos años (Fig. 1) [4].

Por otra parte, es cierto que estos necesarios microorganismos pueden ser de igual manera una fuente de enfermedades, debido a patogenicidad, el desequilibrio entre poblaciones de la microbiota, bajada de defensas y oportunismo, etc...

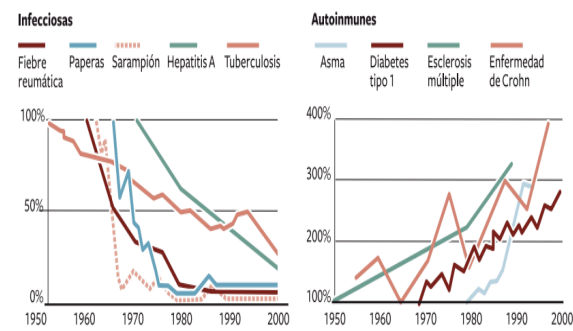


Figura 1. En estas gráficas se muestra cómo desde la extensión en la sociedad de la higiene, y por tanto, la asepsia en los últimos años, se ha conseguido reducir el impacto de enfermedades infecciosas pero al mismo tiempo se ha dado un disparo de las enfermedades autoinmunes. Información obtenida de Microbioma Humano, New England Journal of Medicine y elaboración por parte de El País [4].

Pero quizás la manera de enfrentar ese fenómeno no es el evitar el contacto con estos microbios tan necesarios, sino en el caso del microbioma propio, la mejora metabólica, inmunológica o el desarrollo de nuevas rutas como estrategias para la modificación de este riesgo [1]. Y respecto a la aplicación de métodos para la lucha contra ciertas enfermedades como las vacunas, a pesar de las polémicas, este método de sensibilización del sistema inmune ha constituido uno de los logros más importantes de la medicina. Las vacunas han constituido un recurso que ha permitido la erradicación de enfermedades como la viruela, posibilitando que en un futuro podamos establecer lo mismo con la poliomielitis y sarampión [5], así como han podido permitir una importante reducción de incidencia en aquellas enfermedades infecciosas evitables [6].

La vacunación tiene un beneficio colectivo, en el sentido en el que vacunar a una persona puede conducir a la protección de un determinado grupo de la sociedad, pudiendo traspasar fronteras, resultando en un impacto global. Los altos ratios de vacunación en un país puede beneficiar a otros, así como vacunar a una generación puede beneficiar a las siguientes (Fig. 2) [7].

Incidencia de las vacunas en la reducción de la mortalidad

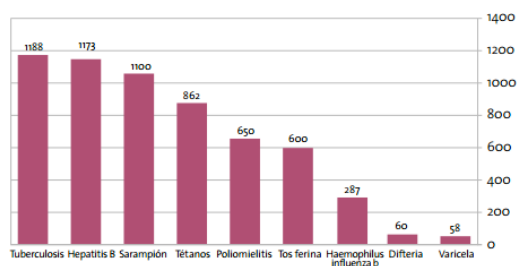


Figura 2. En este diagrama se plasma la aportación de las vacunas a la sociedad y a las generaciones, viendo cómo disminuye el número de muertes anualmente en el mundo en cada tipo de enfermedad a través de la vacunación [7].

Es a través de estos datos aportados y estas observaciones globales que se puede extraer la importancia de la exposición del sistema inmunitario a un temprano contacto con microorganismos con la finalidad de, independientemente el mecanismo seguido para ello, reforzar y dar memoria al sistema inmunitario, consiguiendo resultados que no podrían obtenerse de otra forma.

## REFERENCIAS

- [1] The human microbiome: at the interface of health and disease por Ilseung Cho y Martin J. Blaser. Nature, marzo 2012.
- [2] Microbial exposure during early life has persistent effects on Natural Killer T Cell function por Torsten Olszak, Dingding An ,Sebastian Zeissig, Miguel Pinilla Vera, Julia Richter, Andre Franke, Jonathan N. Glickman, Reiner Siebert, Rebecca M. Baron, Dennis L. Kasper and Richard S. Blumberg, Science, Marzo de 2012.
- [3] Development of the infant intestinal microbiome: A bird's eye view of a complex process, por Meropol SB y Edwards A. Birth Defects Res C Embryo Today Diciembre de 2015.
- [4] Web de diario El País [http://elpais.com/diario/2009/07/03/sociedad/1246572001\\_850215.html](http://elpais.com/diario/2009/07/03/sociedad/1246572001_850215.html)
- [5] Estudio seroepidemiológico: situación de las enfermedades vacunables en España por Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Epidemiología. Ministerio de Sanidad y Consumo.
- [6] La aportación de las vacunas a la salud: El valor del medicamento por Fundación farmaindustria. Septiembre de 2003.
- [7] The global value of vaccination por Jenifer Ehret. Elsevier, vaccine 21 2003, 596-600

# Influencia de la microbiota en la regulación del Sistema Inmune

Pedro Manuel Medina Venegas y Almudena Sánchez García

**Resumen**—La composición del microbioma intestinal está íntimamente relacionada con la correcta regulación del metabolismo del hospedador y su alteración podría ser responsable de la aparición de trastornos de tipo autoinmune. En este sentido, la administración de probióticos podría servir como mecanismo de prevención y tratamiento para enfermedades como la diabetes o la obesidad, que suponen un problema sanitario de creciente importancia en la sociedad moderna.

**Palabras Clave**— Autoinmunidad, Diabetes, Microbiota, Obesidad, Probióticos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La relación entre el sistema inmune y la microbiota juega un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis metabólica y determina el desarrollo de patologías como alergias, enfermedades intestinales y cardiovasculares, cáncer, diabetes y obesidad. Aunque el conocimiento de esta interacción a nivel molecular aún es incompleto, se ha logrado establecer una relación entre la alteración de la composición de la flora intestinal y una desregulación del sistema inmune a nivel de respuesta innata y adaptativa. De esta manera, el progreso en los campos de la genómica y la metagenómica ha permitido identificar y caracterizar los microorganismos menos abundantes de la microbiota, así como aquellos no cultivables, haciendo posible un estudio más exhaustivo de los cambios en el equilibrio de la microbiota, que pueden causar, por ejemplo, la inflamación del tejido adiposo, provocando alteraciones en el proceso de diferenciación de los preadipocitos, la retención anormal de líquidos y la destrucción de células  $\beta$  productoras de insulina por células del propio sistema inmune [1], [2].

## 2. INTERACCIÓN MICROBIOTA – HOSPEDADOR

El microbioma humano está compuesto por bacterias, arqueas, virus y eucariotas unicelulares que cohabitan en la piel y los tractos intestinal, respiratorio y urogenital. Aunque la composición de la microbiota es variable según los factores ambientales y la expresión génica del individuo, los filos dominantes son Bacteroidetes y Firmicutes, teniendo en cuenta que un desequilibrio en la proporción de los distintos grupos puede tener consecuencias relacionadas con la intolerancia alimentaria y la desregulación de los linfocitos T [1].

Dentro de la gran diversidad de especies que componen la flora microbiana se han identificado microorganismos como *Bacteroides fragilis*, que promueven la diferenciación de linfocitos T, la producción de interleuquina-10 y la secreción de polisacáridos que cohesionan la barrera intestinal. Otros, como *Clostridium*, favorecen la expresión de TFG- $\beta$  en el colon y la secreción de IgE lo que tiene efectos beneficiosos en la inducción de la respuesta inmune. Estos descubrimientos fundamentan el uso po-

tencial de estos microorganismos y sus productos metabólicos en la prevención y tratamiento de enfermedades inmunomediadas, como la diabetes tipo 1 y la obesidad [1], [2].

## 3. DIABETES Y OBESIDAD

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción de las células  $\beta$  productoras de insulina debido a linfocitos T CD8<sup>+</sup> y la expresión de la interleuquina-17, ligada a otros procesos de autoinmunidad. Su incidencia ha aumentado durante los últimos años en los países desarrollados, sugiriendo una relación entre los factores ambientales, como la dieta o el microbioma, y el desarrollo de la enfermedad [2].

Esta misma relación se ha observado en el caso de la obesidad, que representa un problema de creciente importancia en los países del primer mundo y se asocia además con la predisposición genética y con trastornos de tipo psicológico. La inflamación del tejido adiposo y la acumulación anormal de grasa debida a la ingesta excesiva de calorías que caracterizan esta patología pueden favorecer el desarrollo de nuevas alteraciones metabólicas que correlacionan con una escasa diversidad bacteriana en la flora intestinal y con modificaciones en su patrón de expresión génica [1].

### 3.1. Cambios en la microbiota

El equilibrio en la composición del microbioma resulta esencial en la correcta modulación del sistema inmune y la homeostasis metabólica en el páncreas. Esto queda patente en numerosos estudios en modelos murinos que han demostrado que la alteración de la composición del microbioma intestinal puede provocar un estado de insulinitis debido a la inflamación de los islotes de Langerhans, al aumento de la expresión del factor de regulación linfocítico FOXP3 en células T en el páncreas, a su descenso en íleon y colon y al aumento de IL-7 e IFN- $\gamma$  en linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los nódulos linfáticos pancreáticos [Fig. 1], [3].

En lo que respecta a pacientes humanos, los individuos que padecen diabetes tipo 1 presentan altas proporciones de *Clostridium*, *Bacteroides* y *Veillonella* y bajas de

Bifidobacterium y Lactobacillus, además de tener menor diversidad en la composición de la microbiota en comparación con los controles sanos. Por otra parte, se observa un incremento en la ratio entre Bacteroidetes y Firmicutes (Ruminococcaceae, Lachnospiraceae y Eubacteriaceae) en niños diabéticos, aunque también se puede encontrar este incremento en enfermos de Crohn y pacientes obesos, que suelen presentar desviaciones adicionales en la proporción normal de Proteobacteria [Fig. 1], [2].

En cualquier caso, el perfil de la microbiota comienza a establecerse en la infancia, adquiriendo progresivamente una mayor complejidad hasta que el individuo alcanza la edad adulta. La importancia de este proceso de desarrollo y su relación con la incidencia posterior de las enfermedades inmunomediadas previamente descritas queda de manifiesto gracias a estudios de modulación del microbioma mediante antibióticos en fases tempranas del desarrollo [3]. Estas investigaciones, junto con otras que tratan de determinar las alteraciones de la microbiota debido infecciones víricas o el efecto de los productos del metabolismo microbiano sobre la fisiología del hospedador, permitirán obtener un conocimiento cada vez más profundo sobre las bases moleculares que gobiernan las interacciones entre la flora microbiana y el sistema inmune [Fig. 1], [2].

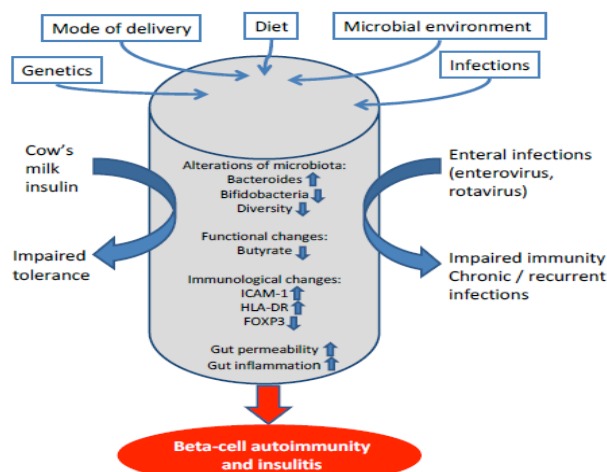


Fig. 1. Interacción entre microbiota, hospedador, medioambiente, y mecanismos de la enfermedad en el desarrollo de autoinmunidad en células  $\beta$  y diabetes de tipo 1. Tanto la genética como los factores ambientales, incluyendo la dieta, afectan a la composición del microbioma. La diabetes tipo 1 correlaciona con la abundancia de Bacteroides y la disminución de productoras de butirato, lo que aumenta la permeabilidad e inflamación intestinal y disminuye la tolerancia a alimentos como la leche, además de afectar a la protección inmune frente a las infecciones enterovíricas [2].

### 3.2. Mecanismos moleculares

Una de las respuestas inmunes más relevantes por su relación con el padecimiento de enfermedades tan diversas como Alzheimer, cáncer, diabetes u obesidad es la respuesta inflamatoria. En el caso concreto de la obesidad, la inflamación del tejido adiposo y la creciente infiltración celular local están relacionadas con el papel de monocitos y macrófagos, ya que la proporción de monocitos diferen-

ciados a macrófagos M1 (productores de factores proinflamatorios) frente a los M2 (con efecto antiinflamatorio) es mucho mayor de lo normal. Adicionalmente, se observa una mayor producción de quimioquinas responsables del reclutamiento de macrófagos M1, la proliferación creciente de los adipocitos y la sobreexpresión de IL-6 y TNF- $\alpha$ , con acción proinflamatoria. Por otra parte, existe una migración masiva de neutrófilos y linfocitos T CD4 (mayoritariamente Th17 y Th1), cuya interacción con los macrófagos M1 a nivel de MHC de clase II resulta esencial para el desarrollo del proceso inflamatorio y la resistencia a insulina [1].

La inducción de la transcripción de los genes que codifican los efectores responsables de esta respuesta inmunitaria se debe en buena parte al reconocimiento de patrones moleculares no conservados en eucariotas por parte de los receptores *toll-like* (TLR), que activan la respuesta innata al promover la síntesis de NF- $\kappa$ B y MAPKs. De este modo se establece una relación fundamental entre el reconocimiento de estructuras exógenas y el desarrollo de enfermedades como la obesidad o la diabetes [1], [2].

Los receptores TLR no sólo se encuentran en células del sistema inmune, sino que también aparecen en otros tipos celulares, como los adipocitos. En concreto, la activación de TLR2 por ácidos grasos saturados o peptidoglicanos bacterianos correlaciona con bajos niveles de factores proinflamatorios, lo que previene el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Por el contrario, la activación de TLR5 y TLR4 está relacionada con la inhibición de la señalización por insulina y la expresión de factores con potencial efecto tóxico y proinflamatorio a nivel de tejido, como el LPS bacteriano o distintas interleuquinas endógenas, respectivamente. De esta manera, el bloqueo con anticuerpos de los receptores TLR4 podría tener un efecto preventivo sobre el desarrollo de obesidad, inflamación y resistencia a la insulina, debido en gran parte a la polarización de los monocitos hacia macrófagos M2 [Fig. 2], [1], [3]. Sin embargo, la inactivación de estos receptores no basta por sí sola para inducir los cambios en la composición del microbioma que correlacionan con el efecto preventivo frente al desarrollo de fenómenos de autoinmunidad, ya que otros factores que participan en la cascada de señalización molecular proinflamatoria, como el factor 88 de diferenciación mielóide (MyD88), son elementos clave en la regulación de este proceso. En cualquier caso, las alteraciones en la microbiota intestinal (baja ratio de Firmicutes sobre Bacteroidetes y altos niveles de *Lactobacillus* y *Porphyromonadaceae*) son las responsables últimas de la mejora en la condición de pacientes diabéticos y obesos, a través de la activación de mecanismos tolerogénicos [2], [3].

### 3.3. Dieta

La composición de la microbiota intestinal está influida en gran medida por la dieta, de forma que un exceso de nutrientes como los ácidos grasos poliinsaturados o la escasez de oligosacáridos pueden alterar el metabolismo microbiano. Por ejemplo, las dietas ricas en grasas favorecen una menor proporción de bacterias Gram<sup>-</sup> productoras



ras de butirato, que presenta propiedades antiinflamatorias, en individuos diabéticos, lo que supone un incremento de la permeabilidad intestinal por la producción creciente de ROS a consecuencia de la oxidación de los ácidos grasos [Fig. 1], [4].

En cualquier caso, la barrera intestinal permite la correcta

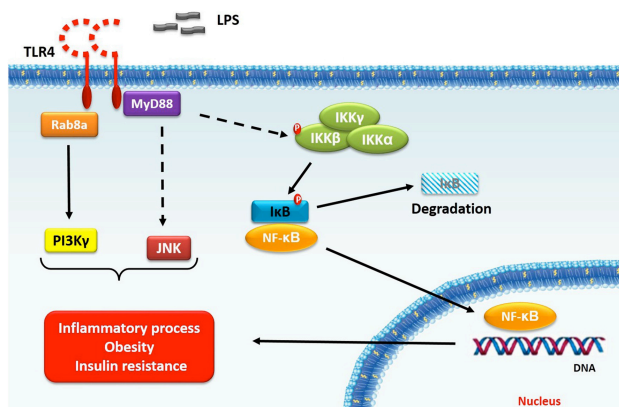


Fig. 2. Mecanismo de señalización dependiente de TLR4 en diabetes tipo 1 y obesidad. La activación de TLR4 por elementos exógenos, como el lipopolisacárido bacteriano, induce una cascada de señalización que implica a los reguladores MyD88, IKK $\beta$  y NF- $\kappa$ B. Este último es responsable, junto con PI3K $\gamma$  y JNK, de la activación de genes implicados en la respuesta inflamatoria, la resistencia a insulina y el desarrollo de obesidad [1].

interacción entre los antígenos de la flora bacteriana y el hospedador y se compone de una espesa capa mucosa, células secretoras de IgA y péptidos antimicrobianos y una barrera epitelial fuertemente unida. Su alteración y debilitamiento pueden provocar la traslocación de los hacia el torrente sanguíneo de los microorganismos de la flora intestinal o de sus elementos antigénicos, como el lipopolisacárido bacteriano, la flagelina o el ADN microbiano, promoviendo finalmente la inflamación de los tejidos por activación de receptores como TLR4 o CLR [4].

Por otra parte, los probióticos son microorganismos que, consumidos en la dosis adecuada, tienen efectos favorables para la salud del hospedador debido a la secreción de compuestos antimicrobianos con los que compiten con otros microorganismos y logran mantener un equilibrio microbiano más saludable. Los más habituales son los del género *Bifidobacteria* y *Lactobacillus* y entre los efectos beneficiosos que provocan se encuentran el fortalecimiento de las uniones entre las células del epitelio intestinal y las fibras del citoesqueleto, la supresión de procesos inflamatorios y de la eliminación autoinmune de células  $\beta$  productoras de insulina o la producción de interleuquina-10, cuyo efecto antiinflamatorio se potencia con una dieta rica en caseína. Consecuentemente, la administración de probióticos como *Lactobacillus johnsonii* como suplementos en la dieta de pacientes diabéticos y obesos ha resultado en la reducción de la acumulación de grasa, de la producción de citoquinas proinflamatorias y de la peroxidación lipídica y en el aumento de la sensibilidad a insulina gracias a la síntesis de análogos del glucagón. Estos procesos tienen en común el incremento de la expresión del inhibidor de la lipoproteína lipasa ANGTL4, la disminución de la producción de NF- $\kappa$ B y la inducción de la expresión de IL-17 en bazo y nódulos linfáticos mesentéricos, lo que

sugiere una relación entre el desarrollo de enfermedades autoinmunes y la regulación de los linfocitos Th17 por el microbioma [2], [4].

Finalmente, además de tener en cuenta la acción directa de *L. johnsonii* en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal, existen mecanismos indirectos relacionados con el efecto preventivo de estas enfermedades, mediado por cascadas de señalización dependientes de IL-17 que promueven una respuesta antimicrobiana combinada con mecanismos de reparación de la mucosa [2].

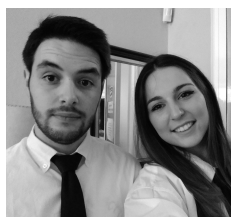
#### 4. CONCLUSIONES

Tomando en cuenta la influencia de la flora microbiana en el mantenimiento de la homeostasis metabólica y la regulación del sistema inmune, se puede establecer una relación entre la alteración de la composición normal de la microbiota intestinal y el aumento anómalo de la permeabilidad del tracto intestinal, la inflamación local del intestino, los fenómenos de intolerancia alimentaria, la inflamación del tejido adiposo y la resistencia a la insulina, que acaban siendo causa de patologías de tipo autoinmune. En este sentido, la administración de probióticos puede resultar eficaz en la prevención y tratamiento de estos síntomas, aunque se requiere un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares implicados con vistas a ensayos clínicos completos en humanos. Esto supone un reto hoy en día y en el futuro, las investigaciones se enfocarán en análisis metabólicos y metagenómicos que permitirán monitorizar de forma paralela la filogenética del microbioma, la composición funcional de la flora intestinal y el estado inmunológico del hospedador, clarificando los marcadores y bases moleculares de la obesidad y diabetes. Esto hará posible adoptar un nuevo enfoque en el desarrollo de terapias paliativas frente a este tipo de enfermedades aprovechando los efectos beneficiosos de la modulación de la microbiota intestinal sobre el metabolismo.

#### REFERENCIAS

- [1] L.H. Cavalcante-Silva et al., "Obesity-Driven Gut Microbiota Inflammatory Pathways to Metabolic Syndrome," *Frontiers in Physiology*, vol. 6, Nov 2015, doi: 10.3389/fphys.2015.00341.
- [2] O. Vaarala, "Gut Microbiota and Type-1 Diabetes," *The Review of Diabetic Studies*, vol. 9, no. 4, Dec/Jan 2013, doi: 10.1900/RDS.2012.9.251.
- [3] L. Wen et al., "Innate Immunity and Intestinal Microbiota in the Development of Type-1 Diabetes," *Nature*, vol. 455, no. 7216, pp. 1109-13, Oct 2008, doi: 10.1038/nature07336.
- [4] A.C. Gomes et al., "Gut Microbiota, Probiotics and Diabetes," *Nutrition Journal*, vol. 13, no. 60, 2014.

**Pedro Manuel Medina Venegas** y **Almudena Sánchez García** son alumnos de 4º curso del Grado de Biotecnología de la Universidad Pablo de Olavide durante el curso 2015-16.



# Ingeniería de anticuerpos

Carlos Salas Sierra

**Resumen**— Desde la producción de anticuerpos en mamíferos inmunizados hasta el uso de la mutagénesis dirigida para aumentar la afinidad al antígeno han pasado ya varias décadas. El desarrollo actual de la ingeniería de anticuerpos ha llevado hasta un nuevo nivel los posibles tratamientos de muchas enfermedades. La inmunoterapia contra tumores o el transporte de un fármaco citotóxico hacia sus células diana son dos de las muchas aplicaciones de los anticuerpos terapéuticos, algunos de los cuales ya han sido aprobados por la FDA.

**Palabras Claves**— intranscuerpo, biespecífico, quimera, fármaco, inmunoterapia

## 1. ESTRUCTURA DE UN ANTICUERPO

Los anticuerpos (Ab) o inmunoglobulinas son proteínas que reconocen agentes peligrosos mediante una interacción altamente específica con su antígeno. Existen cinco clases inmunoglobulinas: IgM, IgG, IgE, IgA e IgD, de las cuales la más importante desde una perspectiva biomédica es la IgG. Estas proteínas son tetrámeros formados por dos péptidos idénticos de 50 kDa (cadenas pesadas) y otros dos idénticos de 25 kDa (cadenas ligeras) que se organizan en forma de Y y se dividen funcionalmente en dos fragmentos: Fab (antigen-binding fragment) y Fc (crystallizable fragment) [1]. Esta estructura se representa en la Figura 1.

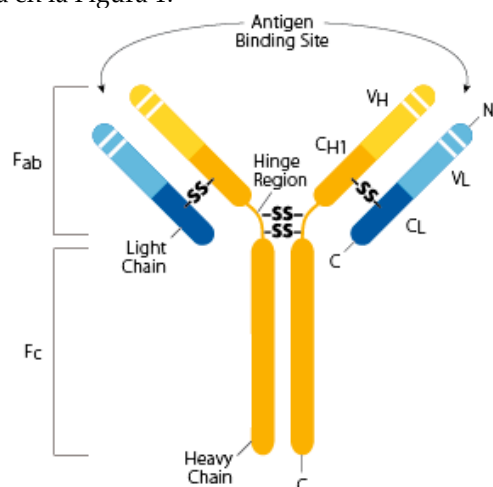


Fig. 1. Estructura de una inmunoglobulina. En amarillo se muestran las cadenas pesadas y en azul las ligeras; los extremos de color más claro corresponden a la región variable (V). También pueden observarse los puentes disulfuro intercatenarios (SS), los extremos C y N-terminal (C y N) y la región hipervariable (rayas blancas).

En el presente artículo se describirá como modificando esta estructura (eliminando fragmentos, reorganizando los dominios, etc.) se pueden obtener una gran diversidad de anticuerpos de uso terapéutico.

## 3. ANTICUERPOS DE USO TERAPÉUTICO

En esta sección se describirá brevemente los distintos tipos de anticuerpos terapéuticos que existen, algunos de los cuales ya se encuentran en fase clínica.

### 3.1. Anticuerpos quimera y humanizados

Estos Ab consisten en inmunoglobulinas completas que presentan una parte propia de ratón y otra de humano, como se representa en la Figura 4.

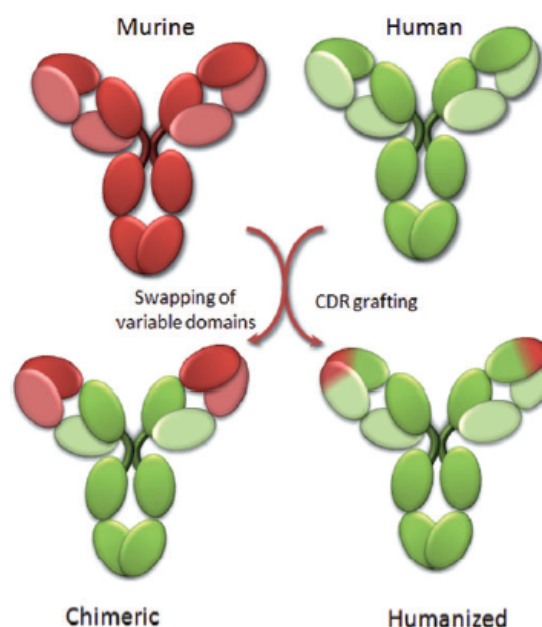


Fig. 4 Generación de anticuerpos quimera y humanizados a partir de anticuerpos humanos y murinos, mediante intercambio del dominio variable e hipervariable respectivamente.

Para su producción se usa la tecnología del hibridoma, es decir, la fusión de linfocitos B con células del mieloma para generar una célula híbrida que expresa el Ab de interés en grandes cantidades. La razón por la que los Ab quimera tengan parte de ratón es que la tecnología del hibridoma se realiza generalmente sobre este mamífero [2]. La ventaja de los anticuerpos quimera es que son menos inmunogénicos que los murinos, ya que la parte humana representa hasta un 65% de la proteína completa. Los Ab humanizados son incluso menos inmunogénicos que los anteriores, ya que sólo un 5% del mismo procede del Ab murino [3].

### 3.2. Fragmentos de anticuerpos

Muchos estudios han demostrado que es posible producir fragmentos de anticuerpos que mantienen la capacidad de unión al antígeno de la molécula completa [4]. En la Figura 2 se representan varios fragmentos de anticuerpos; consistentes en las regiones variables unidas con distintos *linkers*.

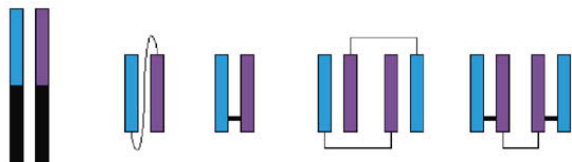


Fig. 2. De izquierda a derecha, Fab, scFv (single-chain variable fragment), dsFv (double-chain variable fragment), diacuerpo y (dsFv)<sub>2</sub>.

Estos fragmentos tienen aplicaciones muy variadas. Son de especial interés en radioinmunoterapia, ya que al tener un tamaño más reducido penetran mejor en los tumores. Por ese mismo motivo tienen un aclaramiento renal más rápido que los Ab completos, lo que permite su uso en técnicas de imagen clínica. Sin embargo, la baja vida media en el suero puede ser a veces un problema, como en el caso anterior de la inmunoterapia. Muchas líneas de investigación están encaminadas a prolongar esta vida media sin que se vea afectada su capacidad de unión al antígeno. Algunas de las estrategias usadas son la conjugación con polietilenglicol o con la albúmina sérica humana. Por último, destacar que los fragmentos de Ab son tan pequeños que el rango de epítomos que a los que pueden acceder aumenta enormemente, pudiendo bloquear incluso sitios activos en una enzima [5].

### 3.3. Intracuerpos

Los intracuerpos no se tratan realmente de inmunoglobulinas completas, sino de fragmentos scFv, pero su principal característica es que han sido diseñados para que reconozcan antígenos intracelulares y que por lo tanto no son accesibles a los Ab convencionales. Su diana puede encontrarse en varias localizaciones subcelulares: el citosol, el núcleo, el retículo endoplasmático, la mitocondria, los peroxisomas y la membrana plasmática. Los intracuerpos se dividen en dos tipos según dónde se expresen y actúen: los que quedan retenido en el retículo gracias a la secuencia señal KDEL y los que se expresan en el citosol. Estos Ab tienen un gran potencial en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer, pero tiene la gran limitación de que hay que transformar las células diana del paciente *in vivo*, al contrario que otros Ab terapéuticos que simplemente se administran por vía intravenosa [5].

### 3.4. Anticuerpos biespecíficos

Consisten en fragmentos de Ab capaces de unirse fuerte y específicamente a dos antígenos diferentes. La aplicación más llamativa de los anticuerpos biespecíficos es la de dirigirse a las células tumorales y activar a las propias células del sistema inmune. De esta forma, un anticuerpo

biespecífico para un marcador tumoral como el antígeno carcinoembriogénico y el receptor CD16a sería capaz de activar las células NK sin necesidad de señales coestimuladoras, dirigiendo e incrementando la actividad citotóxica de estas células del sistema inmunitario innato [6].

### 3.5. Fusión a proteínas efectoras

En este caso, el Ab o fragmentos de este se fusionan con otra proteína, para generar lo que en inglés se conoce como *Magic bullet* o bala mágica. La proteína efectora puede ser de cualquier naturaleza y funcionalidad, lo que ofrece una gran variedad de posibilidades. Una aplicación es la unión del Ab a toxinas o fármacos, de forma que el efecto de estos sólo actúe en la diana del anticuerpo. El Ab también puede fusionarse a enzimas para transformar un profármaco inocuo en un fármaco altamente citotóxico en la cercanía de las células diana. De esta forma se reduce el daño a las otras células que no están involucradas en la enfermedad. Otra de las proteínas que pueden guiarse hacia las células de interés son las citoquinas. Para el tratamiento de tumores se administran sistémicamente citoquinas activadoras del sistema inmune, lo que tiene importantes efectos secundarios. Esto podría evitarse si en su lugar se usaran anticuerpos conjugados con estas moléculas [7].

### 3.6. Incremento de la afinidad al antígeno

La mejora de Ab destinada a aumentar la capacidad de unión al antígeno es una de las áreas más estudiadas de la ingeniería de anticuerpos. El método usado para generar Ab con alta afinidad al antígeno de interés es el *phage display*. En la Figura 3 se esquematiza esta técnica, que se utiliza en otros ensayos que requieren el estudio de interacciones proteína-proteína, proteína-péptido o proteína-ADN.

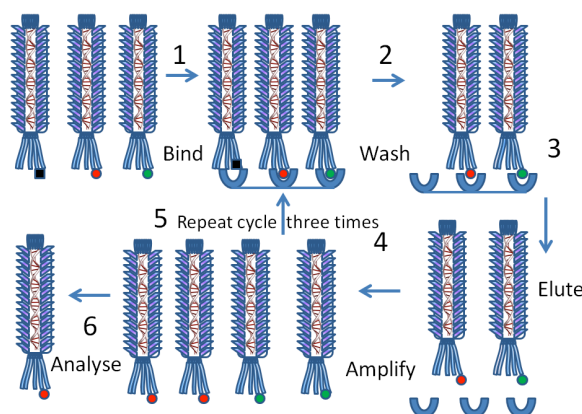


Fig. 3 Técnica del *phage display*. En el extremo del virus se representan con cuadrados y círculos los anticuerpos, cuya afinidad será evaluada en cada ciclo [9].

Para ello se generan grandes librerías de bacteriófagos transformados con la región variable mutada y se seleccionan los que tienen mayor afinidad al antígeno tras varios ciclos de unión, lavado y amplificación. El desarrollo de estos Ab es importantísimo, ya que mayor afinidad supone mayor índice terapéutico, menores dosis y menores costes [7].

## 2. SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

Antes de alcanzar el actual desarrollo de la ingeniería de Ab, el sistema de expresión de esta proteína era muy básico, ya que consistía en la simple extracción de suero en animales inmunizados. Para ello se exponía el patógeno o la toxina al animal (normalmente un caballo debido a su gran volumen sanguíneo) y una vez que se disparaba la respuesta inmune se extraía el antisuero: la sangre con una alta carga en el Ab de interés [9]. Sin embargo, hoy día es posible usar organismos tanto procariotas como eucariotas para producir Ab. *Escherichia coli* constituye el sistema de expresión de proteínas recombinantes más importante, alcanzando rendimientos volumétricos de gramos por litro. La estrategia más utilizada es la secreción de los fragmentos de Ab en el espacio periplásmico ya que su ambiente oxidativo permite la formación de puentes disulfuro; para ello se usan secuencias señal dirigidas al *Sec* pathway. Algunas bacterias Gram-positivas también se han usado en la producción de fragmentos de Ab, como son *B. brevis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *L. zeae/casei* y *L. paracase*. Estas dos últimas son GRAS (*generally regarded as safe*), por lo que los Ab que producen pueden administrarse por vía oral. Las levaduras presentan las ventajas propias de organismos eucariotas y además tienen requerimientos nutricionales simples. La más utilizada para la producción de Ab es *Pichia pastoris*, que segrega la proteína recombinante gracias al uso de secuencias señal y tiene un rendimiento de hasta 8 g/L bajo coexpresión de la chaperona BiP. Además las levaduras permiten la producción de fragmentos de anticuerpos más complejos de los que se consiguen en bacterias (el dímero scFv-Fc y Fab) e incluso IgG completa. Los hongos filamentosos de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus* también se han usado para producir Ab. El fundamento de este sistema de expresión es similar a los anteriores, con la diferencia de que en lugar de utilizar secuencias señal, las cadenas de los Ab se fusionan a proteínas completas. Con el parásito *Leishmania tarentolae* se ha conseguido producir scFv con un rendimiento de 2-6 mg/L. El uso de este microorganismo (que por supuesto no es GRAS) se justifica porque realiza patrones de N y O-glicosilación similar al de los mamíferos. En cuanto a los sistemas de expresión en insectos, estos consisten en cultivos de las líneas Sf-9 y Sf-21 de *Spodoptera frugiperda*, la línea DS2 de *D. melanogaster* o las células High Five de *Trichoplusia ni* transfectada con un baculovirus. Estos Ab son funcionales pero contienen oligosacáridos potencialmente alérgenos. Las plantas y animales transgénicos también constituyen un sistema de expresión adecuado para los Ab. Las primeras tienen la ventaja de tener un escalado fácil y poco costoso mientras que los animales transgénicos permiten producir cualquier Ab, induciendo la expresión de uno u otro mediante la exposición al antígeno de interés. No obstante, pese a la gran cantidad de opciones y los altos costes de producción, el 95% de los anticuerpos terapéuticos aprobados se generan en células de mamífero. Esto se debe a que el plegamiento, la secreción y las modificaciones post-traduccionales de las células de mamífero permiten que

este sistema de expresión genere anticuerpos indistinguibles de los humanos. Algunas de los sistemas de expresión de Ab son las células CHO y la línea celular Per.C6, con la que se ha conseguido el mayor rendimiento documentado: 27 g/L [10].

## 4. CONCLUSIONES

En este artículo se han descrito diferentes anticuerpos terapéuticos desarrollados gracias a los continuos avances en inmunología e ingeniería de proteínas. Estos podrían representar la cura para muchas enfermedades, pero aún queda mucho camino para que sean accesibles al público, ya sea por los elevados costes del tratamiento o limitaciones de su uso impuestas por la FDA. Sin embargo, está claro que los anticuerpos terapéuticos y otras moléculas como los receptores de antígenos quiméricos tendrán un papel esencial en la medicina del futuro.

## REFERENCIAS

- [1] Wang, W., Singh, S., Zeng, D. L., King, K., & Nema, S. (2007). Antibody structure, instability, and formulation. *Journal of pharmaceutical sciences*, 96(1), 1-26.
- [2] Artículo de la Wikipedia en inglés sobre la tecnología del híbrido: [https://en.wikipedia.org/wiki/Hybridoma\\_technology](https://en.wikipedia.org/wiki/Hybridoma_technology)
- [3] Beck, A., Wurch, T., Bailly, C., & Corvaia, N. (2010). Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature Reviews Immunology*, 10(5), 345-352.
- [4] Holliger, P., & Hudson, P. J. (2005). Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature biotechnology*, 23(9), 1126-1136.
- [5] Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., & Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British journal of pharmacology*, 157(2), 220-233.
- [6] Chames, P., & Baty, D. (2009, November). Bispecific antibodies for cancer therapy: the light at the end of the tunnel?. In *MABs* (Vol. 1, No. 6, pp. 539-547). Taylor & Francis.
- [7] Kim, S. J., Park, Y., & Hong, H. J. (2005). Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells*, 20(1), 17- 29.
- [8] "Phage display protocol" by Dr Graham Beards - Own work. Licensed under CC BY-SA 3.0 via Commons - [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phage\\_display\\_protocol.png#/media/File:Phage\\_display\\_protocol.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phage_display_protocol.png#/media/File:Phage_display_protocol.png)
- [9] Artículo sobre la inmunización pasiva de la página *History of vaccines*: <http://www.historyofvaccines.org/content/articles/passive-immunization>
- [10] Frenzel, A., Hust, M., & Schirrmann, T. (2013). Expression of recombinant antibodies. *Frontiers in immunology*, 4.



**Carlos Salas Sierra** es estudiante de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide de Sevilla, finalizando el cuarto curso este año. En el mes de mayo de 2015 colaboró como alumno interno en el departamento de Ingeniería bioquímica.

# Cuando nuestro sistema inmune nos ataca: Tiroiditis de Hashimoto

Irene García Roldán

**Resumen**—La Tiroiditis de Hashimoto es una enfermedad autoinmune que afecta a la glándula del tiroides y que da lugar a su destrucción. Se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos que se producen como consecuencia de un funcionamiento anómalo del proceso de tolerancia inmunológica. Actualmente no se encuentran perfectamente dilucidados los mecanismos que la causan, por lo que se requiere la realización de estudios futuros que permitan conocerla a fondo y disminuir así su prevalencia.

**Palabras Claves**— Tiroiditis de Hashimoto, Autoanticuerpos, Tolerancia Inmunológica, Linfocitos T, Citoquinas

## 1. ¿QUÉ ES LA TIROIDITIS DE HASHIMOTO?

El sistema inmune juega un importante papel en la protección del organismo frente a la entrada de organismos patógenos. Normalmente, las células del sistema inmune reconocen antígenos extraños y desencadenan una respuesta para eliminarlos. Sin embargo, a veces, las células del sistema inmune actúan contra antígenos propios, dando lugar al desarrollo de una enfermedad autoinmune [1]. Dos de las enfermedades autoinmunes más comunes son la tiroiditis de Hashimoto (HT) y la enfermedad de Graves (GD), ambas pertenecientes a un grupo denominado enfermedades autoinmunes del tiroides (AITD), que constituyen un 30% del total de enfermedades autoagresivas.

La tiroiditis de Hashimoto es una de las enfermedades autoinmunes del tiroides más comunes y fue descrita por Hakaru Hashimoto en 1912 aunque no fue considerada enfermedad autoinmune hasta los 50s [2]. El desarrollo de la patología depende del defecto inmune en un individuo con susceptibilidad genética a padecer la enfermedad junto con los factores ambientales [2]. Sin embargo, actualmente, su patogénesis no se conoce por completo. [1] [2] [3]. Concretamente, la enfermedad consiste en una atrofia gradual del tiroides seguido de la infiltración por linfocitos, produciéndose una destrucción progresiva y la sustitución del tejido parenquimatoso tiroideo [2] [3]. Además, se ha visto que la prevalencia de la HT es superior en mujeres que en hombres (casi el doble) y su incidencia incrementa con la edad, siendo la media de 45-65 años de edad [1] [3]. Por otro lado, la prevalencia de la HT es superior en individuos que padecen otras enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus tipo I, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, etc [1].

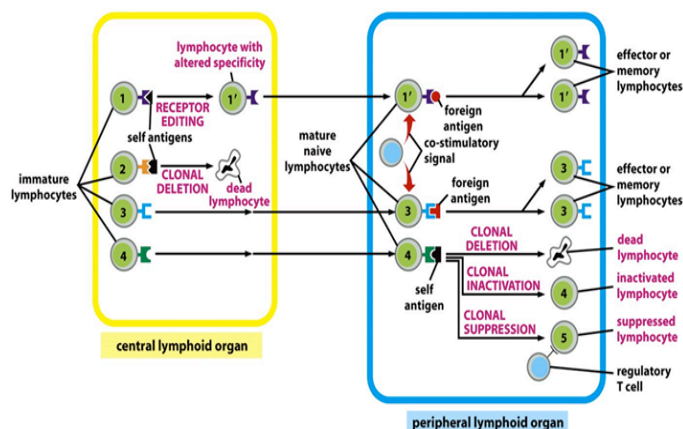
Al inicio de la enfermedad apenas aparecen síntomas; sin embargo, conforme progresa la enfermedad e incrementa su severidad, empiezan a aparecer diversos síntomas tales como intolerancia al frío, ganancia de peso, fatiga, sequedad en la piel, pérdida del cabello, etc [1].

Por otro lado, la HT puede presentarse con una gran variedad de manifestaciones que van desde la presencia de autoanticuerpos tiroideos (TAb) con un funcionamiento normal del tiroides hasta el desarrollo de una disfunción severa de esta glándula [3]. Además, la HT puede dar lugar a la aparición de hipotiroidismo [2].

Debido a la falta de conocimiento sobre esta enfermedad, en la última década se han realizado diversos estudios cuyo fin es la ampliación de los conocimientos en cuanto a la etiología y patogénesis de la HT, y en general, de las enfermedades autoinmunes del tiroides [3].

## 2. ¿CÓMO NOS PROTEGEMOS DE LA AUTOINMUNIDAD?

Existen dos mecanismos encargados de la tolerancia inmunológica: tolerancia central y periférica [Figura 1].



**Figura 1.** Mecanismos de tolerancia inmunológica: central y periférica

En cuanto a la tolerancia central, esta ocurre en los órganos linfoides primarios y consiste en la eliminación de linfocitos T y B autorreactivos mediante la reedición del

receptor o por apoptosis (delección clonal). Por otro lado, la tolerancia periférica ocurre en los órganos linfoides secundarios y evita la activación de linfocitos maduros autorreactivos mediante procesos como inactivación clonal, apoptosis o supresión clonal, interviniendo en esta última los linfocitos T reguladores [5].

### 3. ¿CUÁLES SON LAS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LA TIROIDITIS DE HASHIMOTO?

En cuanto a la bioquímica de la enfermedad, ésta se caracteriza por la presencia de TABs en el suero contra los dos antígenos principales presentes en el tiroides: peroxidasa tiroidea (TPO) y la tiroglobulina (Tg) [2] [3]. El antígeno TPO se localiza en la membrana apical de los tirocitos y es esencial para la síntesis de hormonas tiroideas como la tiroxina (T<sub>4</sub>) y la triyodotironina (T<sub>3</sub>), las cuales son sintetizadas en los folículos tiroideos sobre la glicoproteína Tg, los cuales también sirven como almacén de dichas hormonas [3] [4] [5]. Aunque se conoce con seguridad que estos autoanticuerpos están presentes en pacientes que sufren esta patología, su papel exacto en la enfermedad no se ha confirmado. Actualmente, no se conoce a ciencia cierta si la presencia de estos autoanticuerpos desencadena la enfermedad o si éstos son resultado de un ataque autoinmune [1].

Los autoanticuerpos contra TPO (TPOAbs) y Tg (TgAbs) son de tipo IgG y muestran una alta afinidad por sus antígenos específicos [3]. Además, tienen la capacidad de fijar el complemento [1]. En HT, los TPOAbs se encuentran presentes en aproximadamente el 90% de los pacientes mientras que los TgAbs se encuentran aproximadamente en un 80%. Por esta razón son utilizados como marcadores para el diagnóstico de esta enfermedad [3] [6].

Los TPOAbs son capaces de unirse a distintos componentes del sistema del complemento. Este sistema juega un importante papel en la inmunidad innata y sus funciones son la destrucción de membranas celulares mediante la formación de poros y la quimiotaxis. Además, se puede activar por diversas vías, entre ellas la clásica, la cual está mediada por anticuerpos. Es por esto que existe la teoría de que los TPOAbs son los responsables de la muerte de los tirocitos observada en HT [1].

### 4. ¿CUÁLES SON LAS CAUSAS DE LA TIROIDITIS DE HASHIMOTO?

#### 4.1. Factores genéticos

Existen evidencias de la existencia de una fuerte predisposición genética en el desarrollo de la HT. Varios estudios han demostrado que, cuando ambos parentales sufren esta patología la prevalencia de TPOAbs y TgAbs es del 42% en hijas y 33% en hijos mientras que cuando solo la sufre un parental, dicha prevalencia disminuye hasta un 28.9% y un 16.7%, respectivamente [7]. Además, varios estudios en gemelos revelaron que los factores genéticos

son responsables en un 73% de la susceptibilidad a desarrollar TABs y que la producción de autoanticuerpos TPOAbs está determinada genéticamente [8][9].

Con respecto a los genes, el primer locus que se relacionó con las AITD fue el del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) localizado en la región cromosómica 6p21, la cual es altamente polimórfica y consta de numerosos genes implicados en la respuesta inmune como, por ejemplo, los antígenos leucocitarios humanos (HLA). Los HLA se encuentran en las células presentadoras de antígenos (APC) y presentan péptidos a los linfocitos T ayudantes (Th), desencadenándose así una respuesta inmune. Existen alelos HLA específicos que presentan una alta afinidad por autoantígenos del tiroides y por tanto, contribuyen al desarrollo de HT [5]. En concreto, la expresión aberrante de moléculas HLA de clase II en los tirocitos lleva a estas células a presentar autoantígenos y dar lugar al desarrollo de la HT [10].

Por otro lado, el gen CTLA-4 está relacionado con las AITD y se encuentra en el cromosoma 2q33. CTLA-4 es una molécula que se expresa en la superficie de los linfocitos T y que provoca la inhibición de la activación de los linfocitos T [1]. Algunos alelos de este gen pueden dar lugar a la reducción de la expresión del antígeno CTLA-4 y por tanto, disminuir la inhibición de la proliferación de dichos linfocitos, lo cual puede incrementar la susceptibilidad al desarrollo de una respuesta inmune. Es más, diversos estudios han demostrado que diversos SNPs del gen CTLA-4 se encuentran altamente asociados con la producción de TABs [5].

Un gen regulador de la respuesta inmune que recientemente se ha asociado con la HT es PTPN22, el cual codifica una proteína linfoide tirosina fosfatasa y se localiza en el cromosoma 1p13. Su función es similar a la de CTLA-4 pues es un regulador negativo de la activación de los linfocitos T. Se han descubierto diversos alelos de este gen que están implicados en esta enfermedad pues inhiben los linfocitos T reguladores, los cuales se encargan de proteger al organismo de la autoinmunidad [5].

Además de los genes descritos en este apartado, se han descubierto otros genes relacionados con la HT como son el gen de la tiroglobulina, del receptor de la vitamina D y de diversas citoquinas [5].

#### 4.2. Factores ambientales

Son diversos los factores ambientales que intervienen en el desarrollo de la HT, entre los cuales se encuentran la ingesta de yodo, fármacos, infecciones y químicos.

##### 4.2.1. Ingesta de yodo

La excesiva ingesta de yodo es un importante factor reconocido que desencadena enfermedades autoinmunes como la HT. Diversos estudios han demostrado un mayor predominio de TABs en zonas con un mayor aporte de este elemento; concretamente, en zonas con deficiencia de yodo la prevalencia de TABs es de un 13% mientras que en áreas con una gran concentración de yodo dicha preva-

lencia se ve incrementada hasta un 25% [5] [11]. Además, existen evidencias de que los linfocitos T presentan una mayor afinidad por antígenos Tg altamente yodados que por Tg poco yodados [1].

#### 4.2.2. Fármacos

Por otro lado, existen evidencias de que ciertos fármacos pueden desencadenar HT en determinados individuos. El interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) es un factor que se utiliza como tratamiento para la hepatitis crónica y se vincula a la HT ya que, al parecer, los pacientes sometidos a dicho tratamiento presentan hasta un 40% de TAbs. El IFN- $\alpha$  está implicado en la supresión de la función de los linfocitos T reguladores, en la activación de las células del sistema inmune, en la expresión de MHC de clase I en las células del tiroides, etc. Otras evidencias demuestran que el uso de la interleuquina 2 (IL-2) como tratamiento en melanomas y carcinomas renales implica la aparición de TAbs e hipotiroidismo en pacientes con dichas patologías. Además, parece ser que la amiodarona, fármaco antiarrítmico, puede dar lugar a la presentación de autoantígenos en el tiroides lo cual puede desencadenar la aparición de HT [5].

#### 4.2.3. Infecciones

En cuanto a las infecciones, se ha visto que la hepatitis C por sí sola puede desencadenar HT debido al mimetismo molecular entre los antígenos virales y los autoantígenos. Además, la liberación de mediadores proinflamatorios causada por la infección da lugar a la activación de linfocitos T autorreactivos [12]. Aparte del virus de la hepatitis, diversos virus han sido relacionados con la HT como parvovirus, herpes, Epstein Barr, entre otros [5].

Además, las infecciones causadas por bacterias como *Y. enterocolitica* también están vinculadas al desarrollo de HT, aunque existen controversias en cuanto al mecanismo molecular implicado en ello [1].

Sin embargo, las evidencias son escasas y son requeridos un mayor número de estudios para poder dilucidar el papel de las infecciones en el desarrollo de la HT.

#### 4.2.4. Químicos

Existen diversos compuestos químicos presentes en el medio que resultan tóxicos para los humanos y que pueden dar lugar al desarrollo de diversas enfermedades como las autoinmunes. Por ejemplo, existen evidencias de que los hidrocarburos aromáticos y los biofenilos polihalogenados, ambos utilizados en el ámbito industrial, pueden provocar HT pues en áreas cercanas a industrias, la prevalencia de dicha patología es superior a la de otras zonas no cercanas. Sin embargo, no se conocen los mecanismos implicados en ello [5].

Además, se ha comprobado que dos componentes del tabaco, la nicotina y el alquitrán, afectan a la expresión de los HLA lo que causa cambios en la presentación de antígenos por las APCs y por tanto, fallos en el proceso de tolerancia inmunológica. Sin embargo, algunos estudios muestran que existe una correlación negativa entre fumar y TPOAbs en los pacientes con HT, lo cual puede ser explicado por el hecho de que el tiocinato, componente del tabaco, inhibe la incorporación de yodo a la Tg en un proceso denominado organificación del yodo [1].

#### 4.3. Factores endógenos

Además de los factores genéticos y ambientales, parece ser que existen factores endógenos que son capaces de incrementar el riesgo de padecer HT. Entre estos factores se encuentra el sexo, el embarazo y el microquimerismo fetal.

En cuanto al sexo, son numerosos los estudios que han indicado que el número de TAbs en mujeres es hasta 3 veces mayor que en hombres [13]. Esto puede deberse a que la HT puede estar asociada al cromosoma X, el cual contiene diversos genes sexuales y relacionados con la inmunidad que son importantes en la conservación de la tolerancia inmunológica. Por tanto, el incremento de la inmunoreactividad puede estar relacionada con defectos en dicho cromosoma [5] [14].

Con respecto al embarazo, se ha descubierto que los niveles de linfocitos T reguladores se ven aumentados rápidamente durante el embarazo. Por eso, las respuestas humoral y celular se atenúan y la inmunidad se ve suprimida. Además, se ha visto que durante la preñez se produce una disminución en los niveles de TPOAbs y TgAbs [5] [15].

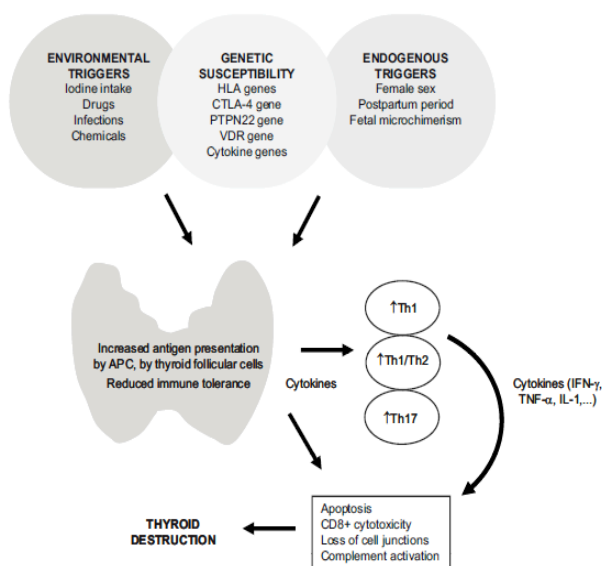
Por último, el microquimerismo fetal se define como la presencia de células fetales en los tejidos maternos, los cuales se transfieren durante el embarazo. Uno de estos tejidos es el tiroides y se ha demostrado que las células inmunes fetales presentes en él pueden activarse en el período post-parto, lo cual puede desencadenar una AITD [5]. En concreto, en pacientes con HT se ha encontrado células microquiméricas fetales en un 28-83% de los individuos, un porcentaje elevado en comparación con individuos que no presentan esta patología [16].

### 5. ¿CÓMO SE PRODUCE?

En una AITD se produce la interacción entre las células del tiroides, APCs y los linfocitos T. Como resultado se secretan una serie de citoquinas que van a dar lugar a una respuesta por parte de los linfocitos Th1. Los linfocitos T proliferan y, tras ser estimulados por dos señales, secretan diversas citoquinas. En cuanto a estas señales, la primera se corresponde con la activación del receptor de los linfocitos T por la unión de un péptido presentado por los MHC en la superficie de las APCs. La segunda señal es la unión del CD28 de los linfocitos T a su ligando B7 presen-

te en las membranas de las APCs. La activación de los linfocitos T induce la expresión del inhibidor CTLA-4 el cual, como se ha mencionado anteriormente, suprime la activación de estos linfocitos uniéndose al ligando B7 e impidiendo que se produzca la segunda señal [5].

En enfermos de HT, se produce un incremento en la presentación de antígenos en el tiroides por parte de las APCs y de las células foliculares del tiroides, lo cual desemboca en una tolerancia inmunológica reducida [Figura 2]. Como consecuencia, se liberan diversas citoquinas por las células del tiroides y del Sistema inmune, las cuales estimulan la respuesta de los linfocitos Th, sobre todo, de los Th1. Estos linfocitos, a su vez, producen más citoquinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1, las cuales desencadenan diversos procesos que, en última instancia, darán lugar a la destrucción del tiroides. Entre estos procesos se encuentran la apoptosis, citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8+, pérdida de uniones celulares y la activación del sistema del complemento [5].



**Figura 2.** Factores que influyen en el desarrollo de la HT y mecanismos relacionados con el Sistema inmune implicados en él.

## 6. CONCLUSIONES

La tiroiditis de Hashimoto es una de las enfermedades autoinmunes que más prevalece y puede desencadenarse por diversos factores, entre los que se encuentran factores genéticos, ambientales y endógenos. Se caracteriza por la presencia de TPOAbs y TgAbs, dos autoanticuerpos contra antígenos presentes en el tiroides.

Actualmente se conoce que una compleja interacción entre los distintos factores pueden incrementar la presentación de antígenos y reducir el proceso de tolerancia inmunológica, dando lugar al desarrollo de la enfermedad y por tanto, a la destrucción de la glándula tiroidea.

Dada la falta de información respecto a los mecanismos implicados en esta patología se estima necesario la realización de estudios futuros que permitan obtener un pro-

fundo conocimiento de dichos mecanismos, lo cual permitiría el diagnóstico temprano de la enfermedad y el desarrollo de tratamientos que puedan eliminarla y/o mejorar la calidad de vida de aquellos que la padecen.

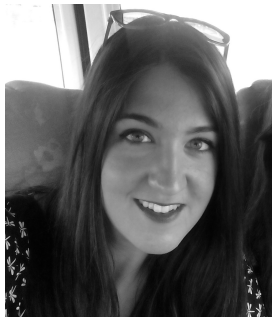
## REFERENCIAS

- [1] Abigail Zeitlin, "The role of the HLA region in Hashimoto's Thyroiditis". Department of Medicine Division of Medical Sciences. University of Birmingham. January 2010
- [2] Aleksandra Pyzik, Ewelina Grywalska, Beata Matyjaszek-Matuszek and Jacek Rolinski. "Immune Disorders in Hashimoto's Thyroiditis: What Do We Know So Far?" *Hindawi Publishing Corporation. Journal of Immunology Research*. Volume 2015, Article ID 979167, 8 pages
- [3] Anna PopBawska-Kita, Maria KoVcieszko-Zdrodowska, Katarzyna Siewko, Beata Telejko, Justyna Hryniewicka, Robert Milewski, Saeid Soleman Abdelrazek, MaBgorzata Szlachowska and Maria Górska. "High Serum IgG4 Concentrations in Patients with Hashimoto's Thyroiditis". *Hindawi Publishing Corporation. International Journal of Endocrinology*. Volume 2015, Article ID 706843, 6 pages
- [4] Zaletel, K. "Determinants of thyroid autoantibody production in Hashimoto's thyroiditis". *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2007, 3, 217-223.
- [5] Katja Zaletel and Simona Gaberscek. "Hashimoto's Thyroiditis: From Genes to the Disease". *Current Genomics*, 2011, 12, 576-588.
- [6] McLachlan, S.M.; Rapoport, B. "Why measure thyroglobulin autoantibodies rather than thyroid peroxidase autoantibodies?" *Thyroid*, 2004, 14, 510-520.
- [7] Phillips, D.I.; Shields, D.C.; Dugoujon, J.M.; Prentice, L.; McGuffin, P.; Ree Smith, B. "Complex segregation analysis of thyroid autoantibodies: are they inherited as an autosomal dominant trait?" *Hum. Hered.*, 1993, 43, 141-146.
- [8] Hansen, P.S.; Brix, T.H.; Iachine, I.; Kyvik, K.O.; Hegedüs, L. "The relative importance of genetic and environmental effects for the early stages of thyroid autoimmunity: a study of healthy Danish twins". *Eur. J. Endocrinol.*, 2006, 154, 29-38.
- [9] Brix, T.H.; Hegedüs, L.; Gardas, A.; Banga, J.P.; Nielsen, C.H. "Monozygotic twin pairs discordant for Hashimoto's thyroiditis share a high proportion of thyroid peroxidase autoantibodies to the immunodominant region A. Further evidence for genetic transmission of epitopic "fingerprints"". *Autoimmunity*, 2011, 44, 188-194.
- [10] Jacobson, E.M.; Huber, A.; Tomer, Y. "The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: from epidemiology to etiology". *J. Autoimmun.*, 2008, 30, 58-62.
- [11] Kasagi, K.; Takahashi, N.; Inoue, G.; Honda, T.; Kawachi, Y.; Izumi, Y. "Thyroid function in Japanese adults as assessed by a general health checkup system in relation with thyroid-related antibodies and other clinical parameters". *Thyroid*, 2009, 19, 937-944.
- [12] Tomer, Y. "Hepatitis C and interferon induced thyroiditis". *J. Autoimmun.*, 2010, 34, J322-326.
- [13] Hollowell, J.G.; Staehling N.W.; Flanders, W.D.; Hannon, W.H.; Gunter, E.W.; Spencer, C.A.; Braverman, L.E. "Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, 87, 489-499.
- [14] Larizza, D.; Calcaterra, V.; Martinetti, M. "Increased prevalence



of autoimmunity in Turner syndrome--influence of age". *J. Autoimmun.*, 2009, 33, 25-30.

- [15] Weetman, A.P. "Immunity, thyroid function and pregnancy: molecular mechanisms". *Nat. Rev. Endocrinol.*, 2010, 6, 311-318.
- [16] Klitschar, M.; Schwaiger, P.; Mannweiler, S.; Regauer, S.; Kleiber, M. "Evidence of fetal microchimerism in Hashimoto's thyroiditis". *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, 86, 2494-2498.



**Irene García Roldán.** Estudiante del último curso del grado de Biotecnología en la Universidad Pablo de Olavide.

# Electrical signals within the nerve cells

Adrián Coutteau, Elena de la Mata, Fernando Delgado y Alejandro Ferreiro

**Abstract**—Neurons generate electric signals to carry information to different parts of our bodies which are able to respond to ambient and external stimuli, as the muscle tissue that is responsible for movement. The way the neurons generate and transmit the electric impulse is based on the different electrochemical gradients through the membranes, known as resting and action potentials. Those potentials can be measured, and they are created thanks to ionic pumps that transport specifically different ions, increasing membrane's permeability to it. It is important to take into consideration both components of an electrochemical gradient: the electrical gradient, due to a different distribution of charges, and the chemical one, due to different concentration of species at both sides of the membrane.

**Key words**— Action potential, Electric potential, Electric signal, Nerve cell, Resting potential.

## 1. INTRODUCTION

Nerve cells are capable to generate electrical signals to transmit information over considerable distances and send it to other cells via synaptic connections.

The signals that have been generated are dependent on changes in the electrical potential across the neuronal membrane, which in turn is permeable to one or more ion species that undergo an electrochemical gradient producing a negative resting potential. This negative resting potential is partially neutralized by an action potential that makes the gradient of the membrane positive. The mentioned action potential is then propagated through the axons of the neurons, constituting the fundamental electrical signal of these cells.

Generation of both resting potential and action potential can be explained in terms of the selective permeability of nerve cells to different ions or in terms of an unequal distribution of these ions across the cell membrane [1].

## 2. ELECTRIC POTENTIALS THROUGH NERVE CELL MEMBRANES

Electric signalling is crucial for information transfer at the nervous system. However, an important problem arises as axons are not good electricity conductors, since they resemble a simple wire. To balance this deficiency, neurons have developed a reinforcement system that allows the transmission of electric signals at far distances. Electric signals produced by this reinforcement system are known as action potentials, but also as impulses.

Action potentials can be quantified by using an intracellular electrode that measures electric potential across the plasma membrane of neurons. A voltmeter registers the transmembrane potential of a nerve cell. When an electrode is set in a neuron, a negative potential is registered, meaning this that cells have a way to generate a constant voltage across their membrane when they are at rest. This voltage is called resting membrane potential and normally takes values between -40 mV and -90 mV.

Action potentials represent transitory changes in resting membrane potential of neurons. They can be obtained in laboratory by passing electric current through a neuron, as it would happen naturally at the nervous system. If the

provided current is enough to turn even more negative the membrane potential (hyperpolarization), the latter changes proportionally to the injected current. Hyperpolarization responses are not exclusive from neurons, so they are called passive electric responses. However, if an inverted polarity current applies and membrane potential of nerve cells turns more positive the contrary effect happens: depolarization of the membrane [2].

## 3. HOW IONIC MOVEMENTS PRODUCE ELECTRIC SIGNALS

Electric potentials are generated through neurons (and actually all cells) membranes due to differences in ionic concentrations at both sides of membranes and selective permeability of these to some ions. Ionic concentration gradients are set by proteins called ionic pumps, which actively transport ions to one or another side of a membrane. Ionic channels allow selective permeability. These are proteins that allow only some ions to passively diffuse through the membrane.

If a membrane with permeability to the passage of only one ion, potassium ion ( $K^+$ ) for example (Fig. 1), is set and  $K^+$  concentration at both sides of the membrane is the same, then no electric potential will be measured through it. If  $K^+$  concentration is larger at one side of the membrane (compartment 1), its electric potential will be negative towards the other side (compartment 2). Electric potential difference is generated due to the flux of ions favouring their concentration gradient. This situation actually happens in nerve cells, as these have  $K^+$  channels and pumps, which keep  $K^+$  ions at cytosol where they are responsible of the nerve cells membrane resting potential.

---

*Adrián Coutteau, Elena de la Mata, Fernando Delgado y Alejandro Ferreiro.  
Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad Pablo de Olavide.*

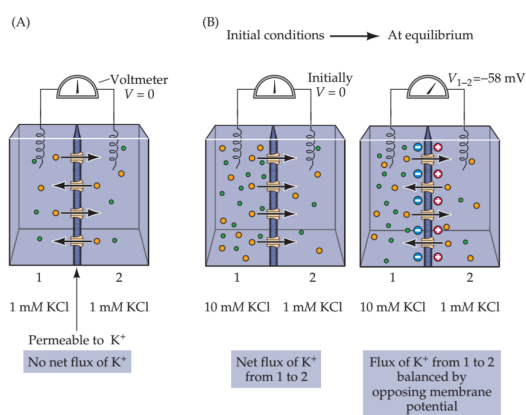


Fig. 1. (A) Electrochemical equilibrium. (B) Small movement of ions to compartment 2 (initial conditions) until the electromotive force balances the concentration gradient, so the net movement of  $K^+$  becomes zero (at equilibrium). Picture from Dale Purves, *Neuroscience Third Edition*.

As  $K^+$  ions move from compartment 1 to 2 an electric potential that prevents further  $K^+$  flux increase, as  $K^+$  po-

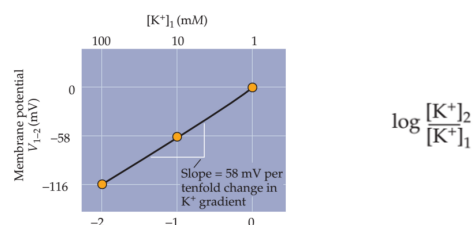


Fig. 2. Relationship between transmembrane concentration gradient ( $[K^+]_2/[K^+]_1$ ) and membrane potential. As predicted by the Nernst equation, this relationship is linear when plotted on semi-logarithmic coordinates. Picture from Dale Purves, *Neuroscience Third Edition*.

tential gradient rejects positive ions as they pass through the membrane (Fig. 2). Net flux of ions stops when electrochemical equilibrium is reached, so there is an exact balance of two opposite forces: 1) concentration gradient that triggers the movement of  $K^+$  from compartment 1 to 2 and 2) an opposite electric gradient that increasingly tends to stop  $K^+$  movement.

The necessary amount of ions to generate this electric potential is very low ( $10^{12}$  moles of  $K^+$ /cm of membrane approx.). This fact is of a great importance for two reasons: (1) ion concentrations remain essentially constant at both sides of the membrane and (2) small  $K^+$  fluxes do not disturb chemical electroneutrality of the membrane as these have counter-ions (as  $Cl^-$ ) to maintain solution neutrality at both sides [1], [3].

#### 4. FORCES THAT CREATE MEMBRANE POTENTIALS

We are able to predict the electric potential generated across a membrane at electrochemical equilibrium (equilibrium potential) by using the Nernst equation:

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[x]_2}{[x]_1} \quad (1)$$

Where  $E_x$  is the equilibrium potential for any ion  $x$ ,  $R$  is the gas constant,  $T$  is the absolute temperature (Kelvin scale),  $z$  is the valence (electrical charge) of the permeant ion and  $F$  is the Faraday constant (the amount of electrical charge contained in one mol of an univalent ion). As it is easier to perform calculations using base 10 logarithms and to perform experiments at room temperature, this relationship is usually simplified to:

$$E_x = \frac{58 \text{ mV}}{z} \ln \frac{[x]_2}{[x]_1} \quad (2)$$

Where  $\log$  is the base 10 logarithm of the concentration ratio. The equilibrium potential is conventionally defined in terms of the potential difference between the reference compartment and the other side. In biological systems the reference compartment is the outside of the cell and it is defined as zero potential. For example, when the concentration of  $K^+$  is higher inside than out in neurons, a negative potential shall be measured across the  $K^+$  permeable neuronal membrane.

For simple hypothetical systems with one ion present and/or a membrane that is just permeable to this single ion, Nernst equation predicts exactly the electrical potential across the membrane at equilibrium.

More generally, if membrane potential is plotted against the logarithm of the ion concentration gradient, Nernst equation predicts a linear relationship with a slope of  $58/z$  per tenfold change in the gradient. Additional conclusions could be considered with some experiments and they may extend the concept of electrochemical equilibrium:

- If a different monovalent cation would be present instead of  $Na^+$ , no potential will be created as the membrane is permeable just to  $Na^+$ .
- If we had that the membrane was permeable to a divalent cation, as  $Ca^{2+}$ , half of the potential would be measured, as the valence of  $Ca$  is 2.
- And if we had that the membrane was permeable to a monovalent anion, as  $Cl^-$ , the potential would be exactly the same as in the case of  $Na^+$ .

In this way it is seen how electrical potential equilibrium at the membrane is determined by the ion concentration gradient. But the balance between chemical and electrical forces at potential equilibrium means that electrical potential may determine ionic fluxes across the membrane in the exact same way it is happening the other way around. To examine this case, imagine a membrane set in a way so that we can control the electric potential difference between the two sides (with a battery for example). If the battery is used to make one of the compartments more negative (the highest  $K^+$  concentration compartment) than the other one, there will be less  $K^+$  flux, because the negative

potential will keep  $K^+$  in the most negative of the two compartments. The more negative the compartment is with respect to the other one, the larger its will be the attraction by the cations and the less flux there will be. Reaching a point when there is no flux at all, and this point is given by Nernst equation. And if the charge overcomes this point, the flux could be passing from compartment with less concentration to the other most concentrated one. So we may conclude that in some circumstances the electrical potential can overcome an ionic concentration gradient [4].

## 5. DIFFUSION POTENTIAL IN AN ENVIRONMENT WITH MORE THAN ONE ION

If the membrane is not permeable to one single ion and there are more ions in solution, the potential would depend on the relative permeability of each of the ions.

Because there is no permeability term in the Nernst equation, which only considers the simple case of a single permeant ion species, a more elaborate equation is needed that takes into account both the concentration gradients of the permeant ions and the relative permeability of the membrane to each permeant species.

Such an equation was developed by David Goldman. For the case most relevant to neurons, in which  $K^+$ ,  $Na^+$ , and  $Cl^-$  are the primary permeant ions, the Goldman equation is written as:

$$V = 58 mV \times \log \frac{P_K[K]_2 + P_{Na}[Na]_2 + P_{Cl}[Cl]_2}{P_K[K]_1 + P_{Na}[Na]_1 + P_{Cl}[Cl]_1} \quad (3)$$

Where  $V$  is the voltage across the membrane and  $P$  indicates the permeability of the membrane to each ion.

In the resting state,  $P_K$  of the neuronal plasma membrane is much higher than  $P_{Na}$ ; since, as a result of the action of ion transporters, there is always more  $K^+$  inside the cell than outside, the resting potential is negative. As the membrane potential is depolarized (by synaptic action, for example),  $P_{Na}$  increases. The transient increase in  $Na^+$  permeability causes the membrane potential to become even more positive, because  $Na^+$  rushes in (there is much more  $Na^+$  outside a neuron than inside, as a result of ion pumps that require energy in form of ATP). Because of this positive feedback loop, an action potential occurs. The rise in  $Na^+$  permeability during the action potential is transient, however; as the membrane permeability to  $K^+$  is restored, the membrane potential quickly returns to its resting level [5].

## 6. IONIC BASIS OF RESTING AND ACTION POTENTIALS

At rest, a negative membrane potential (resting potential) is the result of a net flux of  $K^+$  through the neuronal membranes, which are mostly permeable to those ions. An action potential is created when a net flux of  $Na^+$  arises, due to a temporary increase of membrane's permeability to potassium, which is now mostly permeable to it. The mem-

brane potential is now positive, as the membrane is depolarized. It allows transmission of the electric impulse. The intracellular concentration of  $K^+$  is higher than that outside the cell, and  $Na^+$  is present in much higher concentration outside the cell. Other ions, mostly  $Cl^-$  and  $Ca^{2+}$ , also contribute to the membrane potentials, but in low degree.

Once the concentrations are known, we can use Nernst equation to prove that the equilibrium potential for  $K^+$  is more negative than the one of any other ion. It implies that the membrane is more permeable to potassium ions than to the others. If the membrane at rest is only permeable to  $K^+$ , Goldman's equation predicts that the membrane potential varies proportional to the logarithm of the concentration gradient of  $K^+$  through the membrane. The contribution of the other ions is significant in low extracellular  $K^+$  levels, as predicted by previous equation [6].

## 7. CONCLUSIONS

Nerve cells generate electrical signals to transmit information from cell to cell to the final tissues that generate the specific response to the stimuli. These signals depend on the changes in the resting electrical potential across the neuronal membrane, due to an unequal distribution of ions at both sides of it.  $K^+$  and  $Na^+$  are the ions that are mostly involved in the maintenance of the resting potential and generation of an action membrane potential. On the one hand, a negative membrane potential at rest results from a net flux of potassium ions across nerve cell membranes, whose permeability to  $K^+$  is larger than to any other ion. On the other hand, an action potential is generated when a net flux of  $Na^+$  in the opposite direction appears as a consequence of a transient increase of membrane's permeability to sodium ions, which is now predominantly permeable to them. This process is followed by a secondary increase in membrane's permeability to  $K^+$  again, which ends up in the depolarization of the membrane in an all-or-none way during an action potential. When electrochemical conditions at both sides of the membrane return to the original ones, a resting membrane potential is reestablished because of the high permeability to  $K^+$ .

## REFERENCIAS

- [1] Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. Neuroscience. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001. Chapter 2, Electrical Signals of Nerve Cells.
- [2] Hodgkin, A. L. (1967). The Conduction of the Nervous Impulse. Springfield, IL: Charles C.Thomas.
- [3] Keynes, R. D. (1951). The ionic movements during nervous activity. J. Physiol. (London) 114: 119-150.
- [4] Sabah NH, Leibovic KN. The Effect of Membrane Parameters on the Properties of the Nerve Impulse. Biophysical Journal. 1972;12(9):1132-1144.
- [5] Goldman, D. E. (1943) Potential, impedance, and rectification in membranes. J. Gen. Physiol. 27: 37-60.
- [6] Mac Lean PD. Nerve Impulse. The Yale Journal of Biology and Medicine. 1954;27(3):224-225.

**Adrián Coutteau Robles, Elena de la Mata Santaella, Fernando Delgado Chaves y Alejandro Ferreiro Morales**, estudiantes de segundo curso del Grado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad Pablo de Olavide (Sevilla).

# Thermal materials in aerospace

Marta Manzano Crespo, José Manuel García Reyes, Luna García-Parra Gil, Laura Lalaguna Díaz

**Abstract**— Thermal insulators share the property of having a very low thermal conductivity. They are nowadays a common field of study that emerges mainly from the investigation of new materials that stand up under the extreme heat conditions found in aerospace. The most studied ones are heat shields, aerogels and radiant barriers which leading role is to provide a way of dissipating or avoiding heat fluctuations as well as being resistant to high pressures and weights.

**Keywords**— Aerogel, Aerospace, Barrier, Conductivity, Heat, Insulator, NASA, Radiation, Shield, Spacecraft, Thermal material.



## 1. INTRODUCTION

Thermal insulation is defined as the resistance to dry heat transfer by the way of conduction, convection and radiation[1]. A thermal insulator establishes a barrier to the passage of heat between two media which naturally tend to balance in temperature, avoiding heat to pass through the walls of the target system with the surroundings[2].

The importance of thermal materials in aerospace lies in the extremely low and high temperatures that we can find either on a planet or in the space. Therefore, the usage of appropriate thermal insulators is crucial to prevent high temperature fluctuations (around 100°C between the day and the night in Mars). Thermal insulation has always been a problem in this industry due to the working temperature range of the materials used. For this reason, many materials have been tested to obtain optimal properties[3].

In general, every material offers resistance to the flow of heat, that is, they are thermal insulators. The difference between them relies on their thermal conductivity ( $\lambda$ ). Specific thermal insulators are those which  $\lambda$  is lower than 0,08 W/m ·°C[1]. Due to this characteristic, thinner layers of these materials can exert a higher resistance to heat transfer. It is evaluated primarily in terms of Fourier's Law (1).

$$q'' = -\lambda \frac{dT}{dx} \quad (1)$$

$q''$  = heat transferred per unit time (W)

$\lambda$  = thermal conductivity of the material (W/m ·°C)

T = Temperature (°C)

X = Thickness of the material (m)

The three principal thermal materials in aerospace industry are heat shields, aerogels and radiant barriers. Aerogels are probably the main ones; they even form part of heat shields, another material. In the case of radiant barriers, they are also made up with polymers, but nowadays

they are considered as an independent material in their own since their structure always follow the same pattern. As we see, they share some characteristics, but they can be separated in these three categories because of some specific properties they have.

## 2. THERMAL MATERIALS

### 2.1. Heat shield

In aeronautics, the heat shield is an external structure designed to protect spaceships or ballistic missiles from the heat generated when re-entering the atmosphere [4]. The external layers of the atmosphere exerts a strong friction on the objects that cross them [5]. Spacecrafts, which get through the atmosphere at very high speeds, make use of that friction force to slow themselves down [6]. However, this power produces great amounts of heat (known as aerodynamic heating), which, in excess, can be destructive [6]. To insulate the spacecraft structure, to make it safe and stable, the heat shield is comprised of a special material capable of either dissipating, reflecting or simply absorbing the heat [4].

This insulator material is specially used on those parts

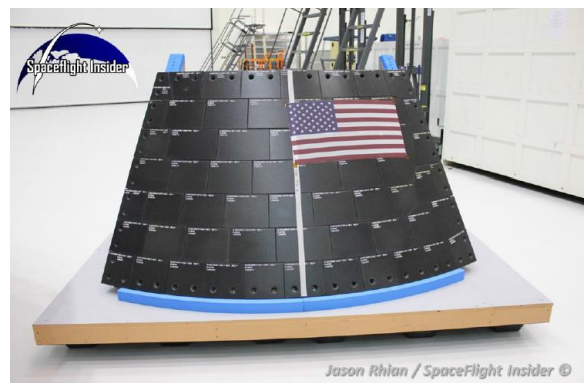


Fig. 1. Heat shield cover of a spacecraft propulsion rocket.

From: <http://www.spaceflightinsider.com/gallery/>

of the structure which are subject to the highest temperatures, such as wings, fuel deposits or the nose of the spacecraft [4]. The heat shield protection consists of several ceramic or composite tiles. They are formed by an

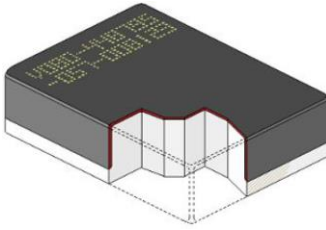


Fig. 2. Draft of the structure of a heat shield tile.

external ceramic coating, and an internal aerogel consisting of ceramic fibers and air. The ceramic coating absorbs around the 95% of the generated heat, while the internal composition of the structure allows the heat shield to absorb around the remaining 5% [7].

Actually, it can not be possible for the heat shield to avoid the transfer of all the generated heat since the perfect thermal insulator does not exist, but it is an essential for the spacecraft structure insulating it from high temperatures (from almost the 100% of the heat produced by friction). These tiles stand temperatures of around 1500°C [7].

Regarding further applications, apart from its usage facing high temperatures, the heat shield also insulate the spaceship structure from low temperatures [7]. Besides, recent studies have demonstrated its importance in the reduction of water losses [4]. Although the heat shield can be thought to be a very sophisticated material, similar insulating principles are used in daily-life objects such as the sun shield we use to protect our cars [7].

## 2.2. Aerogels

Aerogels have extraordinary thermal properties (low conductivity and even lower when working in vacuum) combined with good mechanical properties that become even better sometimes adding carbon [3]. We can distinguish three different mechanisms of thermal conductivity: solid, gaseous and radiative components. The composition of aerogels includes a 99% of air, what gives them the structure of a very porous foam with a high degree of connectivity between its granules. This peculiarity makes the solid component of thermal conductivity extremely low in aerogels, therefore providing an excellent resistance to adverse temperatures [8].

The major component of aerogels, which is the gas, occupies the remaining space left by the solid. Then, the gaseous component of thermal conductivity is the most important one thanks to the energy transported by the collision of gas molecules [8]. This mode of transport is the easiest to control. In fact, if we fill the aerogel with a gas which mean free path is longer than the available space left by the pore, the molecules will collide easier with the pore walls than between themselves, and the thermal energy of the gas would be transferred to the solid portion of the aerogel. Another option of getting the same result is reducing the diameter of the pore or lowering the pressure of the gas inside the aerogel [9].

The final mechanism of thermal transport involves infrared radiation (radiative component). As temperature increases, we need to add a second component which absorbs the infrared radiation, taking into account that it should not alter its mechanical properties nor the thermal conductivity of the solid [8]. Thus far, the most skilled material for this seems to be elemental carbon.

These peculiar materials can resist up to more than 1000 times its own weight, as shown in the right side of figure 3, where two grams of an aerogel are supporting a brick of 2.5 kg. They are also considered some of the best thermal insulators, resisting up to 1300 °C. This last point is demonstrated in the left side of figure 3, where a flower is not burnt with a thin layer of aerogel between it and the flame [9].

Regarding the applications of these materials, we can find it as a component of:

- Mars exploration rovers, to protect the primary battery.
- Spacecrafts.
- It is being investigated to be used in space suits.
- Commercial products (translucent panels).
- It is also used in desalination plants thanks to its microscopic structure that simulates that of a sponge, therefore absorbing salt from the sea [9],[3].

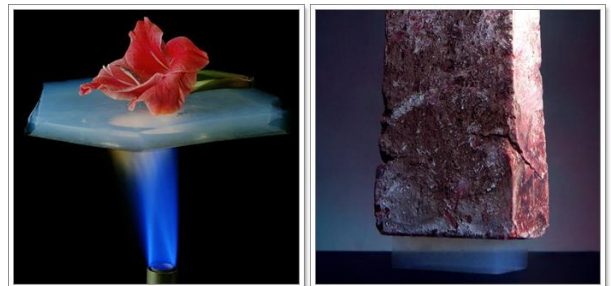


Fig. 3. Application of aerogels.

From: <http://stardust.jpl.nasa.gov/photo/aerogel.html>

## 2.3 Radiant barriers

Radiant barriers are a type of thermal insulators that inhibit heat transfer by thermal radiation. They usually work by reflection of the radiation in certain wavelength. At that wavelength they have really low emissivity (emits low levels of radiant thermal energy)[10].

Radiant Barriers for spacecraft are made of a thin aluminized polymer film that reflects the 95% of the heat. Most used polymers are: polyester, polyamide, polyethylene, polycarbonate and polypropylene [11].

These barriers are used in spacecraft since the heat transfer in space is only by radiation, so radiant barriers are much more efficient than on Earth [12].

Radiant barriers contribute to maintain consistent temperatures. These metalized films are not just used to protect spacecraft, they also protect the equipment of the astronauts from thermal radiation or to hold back heat in extreme fluctuations of temperature in space[11].

Applications of Radiant Barriers are:

- Spacecrafts: used in most of them as explained before.
- Space suits: to protect astronauts during space walks.
- Other NASA projects: it was also used for James Webb Space Telescope and Skylab, the

- first space station.
- Window treatments: to achieve low emissivity.
- Ceiling insulation: for roof insulation and ventilation; a lack of proper roof insulation can lead to temperature spikes of up to 25% [3].

### 3. CONCLUSION

Thermal insulators industry is being developed continuously; but there is still a long path to walk. Some of the most important insulators were recently discovered so they are still emerging from multiple tests and investigations.

As we have seen, aerogels are the most important ones because of their profitable properties. In space, on other planets and on our own Earth, Polymer-enhanced aerogels and Polymer-based ones have great potential multiple applications. Scientists have conferred qualities to aerogels such as lightness and durability and have always stood out their remarkable efficacy in preventing insulation and heat transmission. The hidden world of aerogels is being studied by NASA discovering new applications and possibilities for these amazing materials [9]. However, it is still rather expensive in terms of funding and tools in comparison to other standard commercial materials. Thus, in spite of being a superior insulator for your home, there are low possibilities to give them that use in the near future. Meanwhile, at Jet Propulsion Laboratory, researchers are looking for unknown features that can make aerogels more versatile so that they can enter the group of competitive materials, and start to be commercialized [3].

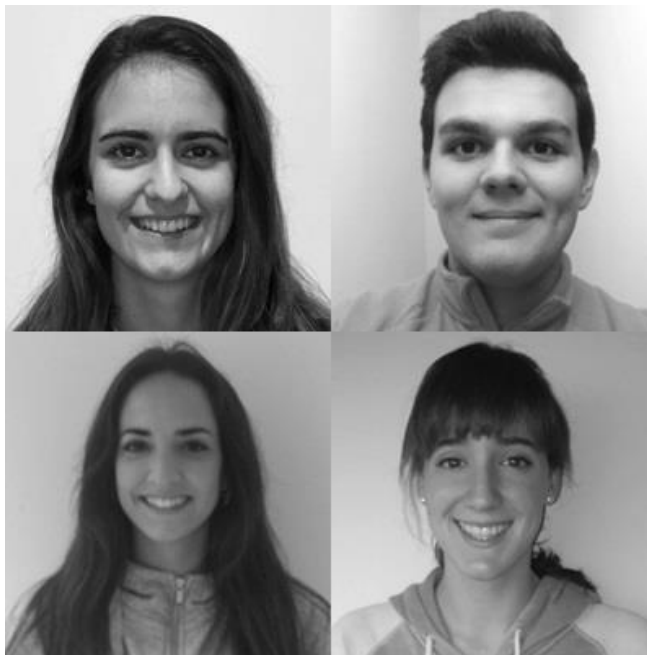
Regarding the latest discoveries, NASA has done a recent addition to its insulation materials: Low density Lightweight Ceramic Ablator material (LCA) which is in comparison to other standard insulators far lighter in spacecraft. But this is not the only feature that makes it interesting; it is also able to withstand high temperatures remaining stable at 2,760 degrees Celsius. These qualities are possible due to the interaction between a thin layer formed of an organic polymer resin and the foundation fibers layer. NASA expects to develop LCA as a good heat shield in order to introduce it in their plans for future space missions [9].

In conclusion, although new materials might be discovered at any moment surprising us with new outstanding properties, we must also take into account that those which have already been discovered are yet being studied so they may hide undiscovered properties that could revolutionize this industry.

### REFERENCES

- [1] J. Huang, "Theoretical Analysis of Three Methods for Calculating Thermal Insulation of Clothing from Thermal Manikin," *Ann. Occup. Hyg.*, vol. 56, no. 6, pp. 728-735, Jul. 2012.
- [2] D. P. De Witt and F. P. Incropera, *Fundamentals of Heat and Mass Transfer*. John Wiley & Sons, 1990.
- [3] G. Chapline, C. Snapp, A. Rodriguez, M. Pessin, P. Bauer, B. Steinetz, and C. Stevenson, "Thermal Protection Systems," NASA, 2009. [Online]. Available: [http://www.nasa.gov/centers/johnson/pdf/584728main\\_Wings-ch4b-pgs182-199.pdf](http://www.nasa.gov/centers/johnson/pdf/584728main_Wings-ch4b-pgs182-199.pdf). [Accessed: 27-Jan-2016].
- [4] C. W. Fitch and S. B. Korones, "Heat shield reduces water loss," *Arch. Dis. Child.*, vol. 59, no. 9, pp. 886-8, Sep. 1984.
- [5] F. P. Incropera, *Fundamentos de transferencia de calor*. México: Prentice Hall, 1999.
- [6] H. J. Allen and A. J. J. Eggers, "A study of the motion and aerodynamic heating of ballistic missiles entering the earth's atmosphere at high supersonic speeds," Jan. 1958.
- [7] E. P. Weidmann, *Experimentelle und theoretische Untersuchung des Nachheizverhaltens an Kraftfahrzeugen*. expert verlag, 2008.
- [8] "Thermal Properties : Silica Aerogels." [Online]. Available: <http://energy.lbl.gov/ecs/aerogels/sa-thermal.html>. [Accessed: 29-Jan-2016].
- [9] N. Administrator, "Aerogels: Thinner, Lighter, Stronger," Apr. 2015.
- [10] "Radiant Barrier Reflective Insulation | Space Foundation." [Online]. Available: <http://www.spacefoundation.org/programs/space-certification/certified-products/space-technology/radiant-barrier-reflective>. [Accessed: 29-Jan-2016].
- [11] "NASA Spinoff Technology," 2006.
- [12] "NASA Spinoff," 2004.

**Marta Manzano Crespo, José Manuel García Reyes, Luna García-Parra Gil and Laura Lalaguna Díaz** (in order of appearance), are a group of students of the Degree in Biotechnology, in Pablo de Olavide University. They wrote this article for the subject Thermodynamics and Chemical Kinetics, studied in the first semester of the second year of the degree.





# Ansiolíticos: la nueva forma de “acabar” con la “ansiedad”

Celia Esperanza González Ramallo

**Resumen**—Ansiofíticos e hipnóticos han sido durante años uno de los grupos farmacológicos más prescritos en la mayoría de los países desarrollados debido al estilo de vida acelerado imperante en los últimos tiempos. La relativa facilidad con que se obtienen dichos fármacos actualmente, está provocando una mayor tendencia a la dependencia de este tipo de medicamentos. De la ingesta prolongada de los mismos se desprenden gran cantidad de efectos negativos, sin olvidar, el peligro existente dada la posibilidad de darles uso, por sus efectos sedantes, como medio comisivo de ciertos delitos.

**Palabras Claves**—Ansiofíticos, Benzodiacepinas, ansiedad, sedación, parricidio.

## 1. INTRODUCCIÓN

En la vida hay situaciones que nos provocan estrés y nuestro cuerpo responde físicamente frente a ellas con los siguientes síntomas: el pulso del corazón se acelera, sudoración, temblor, boca seca, heces sueltas, respiración rápida, nudo en el estómago, sensación de ahogo etc. Todo el mundo reconoce estos síntomas. La ansiedad se da cuando alguno o varios de estos síntomas empiezan a aparecer en nuestra vida diariamente, sin que haya ninguna situación de estrés aparente. Muchas veces, dentro de las depresiones existen cuadros de ansiedad. Los ansiofíticos son medicamentos que utilizamos para calmar estos síntomas que se acaban de describir[1].

## 2. ¿QUÉ SON LOS ANSIOFÍTICOS?

Los ansiofíticos o tranquilizantes menores son un fármaco depresor del sistema nervioso central con el objetivo de disminuir o eliminar los síntomas de la ansiedad. Técnicamente el grupo más grande dentro de los ansiofíticos es el de las Benzodiacepinas. Es importante saber que las benzodiacepinas, además de utilizarse para tratar cuadros de ansiedad, se utilizan de manera generalizada en el tratamiento del insomnio[1].

Existen ansiofíticos con un efecto más sedante o hipnótico que otros y en función de esta capacidad se administran como fármacos para poder dormir o como fármacos para combatir la ansiedad. Se clasifican según la duración de su efecto en: ansiofíticos de duración larga (>24h), intermedia (10-24h) y corta (<10h). Algunos ejemplos de ansiofíticos son: Diazepam, Tranxilium, Alprazolam-Trankimazin, Lexatin. Y con efecto sedante: Noctamid-Lormetazepam, Etumina, Loracepam-Orfidal, Sedotime[2].

### 2.1. ¿Cómo actúan en nuestro organismo?

La función principal de los mismos es que el sistema nervioso central reduzca y ralentice sus funciones y ritmo. Hemos de saber que el sistema nervioso central se compone del encéfalo (Cerebro, Cerebelo y Tronco encefálico) y la médula espinal y que el sistema nervioso central atiende y

satisface las necesidades vitales y da respuesta a los estímulos. Ejecuta tres acciones esenciales, que son:

- La detección de estímulos
- La transmisión de informaciones
- La coordinación general

Por lo que nos podemos hacer una idea de qué nos ocurre cuando nuestro sistema nervioso se enlentece debido a un ansiofítico. La ansiedad desaparece, pero al mismo tiempo, muchas otras funciones se reducen considerablemente. Por ello, por ejemplo, no podemos conducir bajo los efectos de un ansiofítico, debido al elevado riesgo de accidente, ya que nuestras reacciones ante estímulos, cómo recibimos la información y nuestra coordinación general se encontrarían ralentizadas [2,3].

### 2.2. Toxicidad

Las benzodiacepinas presentan propiedades ansiofíticas, hipnóticas y sedantes. Su potencia, duración y metabolismo son variables. Las muertes debido a benzodiacepinas por vía oral son extremadamente raras, a no ser que se ingieran al tiempo con otros fármacos como barbitúricos, etanol y antidepresivos. En general el nivel de toxicidad para las benzodiacepinas es muy alto. Los efectos de la sobredosis por vía oral son leves o moderados. Se han descrito ingestiones de diazepam de 15-20 veces la dosis terapéutica sin presentarse deterioro importante de la conciencia; sin embargo, la administración intravenosa rápida, aun en dosis terapéuticas, puede inducir paro respiratorio[4].

### 2.3. Estructura

El término benzodiacepina se refiere a la parte de la estructura, como se observa en la Figura 1, compuesta por un anillo benceno (A) fusionado con un anillo de diazepina de siete miembros (B). Sin embargo, como todas las benzodiacepinas importantes contienen un sustitutivo 5-aril (anillo C) y un anillo 1,4-diazepina, el término se refiere ahora a las 5-aril-1,4-benzodiazepinas.

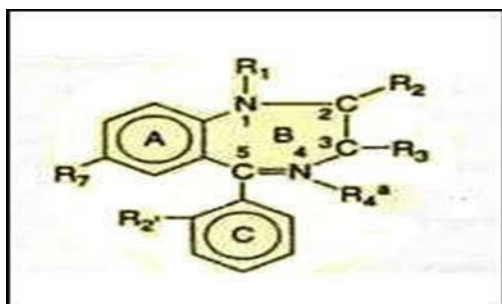


Fig. 1. Estructura general de las benzodiazepinas.

Cada benzodiazepina específica surgirá por sustitución de radicales en diferentes posiciones.

La naturaleza química de los sustitutos en las posiciones 1 a 3 puede incluir anillos triazol o imidazol fusionados en las posiciones 1 y 2. La sustitución del anillo C con una función ceto en la posición 5 y un sustitutivo metilo en la 4 son aspectos estructurales importantes del antagonista de la benzodiazepina llamado flumazenil.

La denominación de estos compuestos, suele peculiarizarse por la terminación -lam o -lan (triazolam, benzazepam, oxazolam, estazolam) y por la terminación -pam o -pan (diazepam, lorazepam, lormetazepam, flurazepam, flunitrazepam, clonazepam). Hay excepciones como el clorazepato dipotásico o el clordiazepóxido[5].

### 3. FRECUENTE USO DE ANSIOLÍTICOS EN LA ACTUALIDAD

El competitivo ritmo de vida característico de las sociedades occidentales del siglo XXI, ha propiciado el hecho de recurrir a estos medicamentos como vía de escape fácil y rápida para aplacar los síntomas derivados del estrés provocado por tal manera de vivir. Así, se van relegando a un segundo plano lo que podríamos denominar "ansiolíticos naturales" tales como la realización de ejercicio físico, llevar una vida más calmada, menos agitada, sin sobrecarga de actividades... A estas circunstancias estresantes (como podrían ser el pluriempleo precario, la cada vez mayor y necesaria formación educativa...), se encuentra sometida la mayor parte de la población debido a la situación de crisis económica a nivel europeo que venimos arrastrando. Por ello, la ingesta de ansiolíticos es cada vez mayor. Dicha conclusión puede extraerse de un estudio ecológico descriptivo del consumo de los mencionados fármacos en España (a partir de datos de medicamentos dispensados en oficinas de farmacia y facturados a través de receta oficial con cargo al Sistema Nacional de Salud).

El consumo anual y total se expresó en dicho estudio en dosis diarias definidas por 1.000 habitantes y día (DDD/1.000 hab/día) en cada subgrupo terapéutico, principio activo y atendiendo a la semivida plasmática. También se establecieron comparaciones aproximativas con otros países. Las conclusiones de dicha investigación se resumen en que durante el período estudiado (2000- 2011), el consumo de ansiolíticos e hipnóticos se incrementó en a) España, como muestra la Figura 2, siendo el incremento superior incluso al reportado en otros países europeos[6].

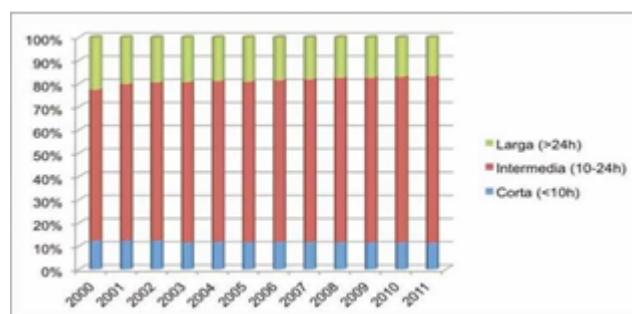


Fig. 2. Evolución del consumo de ansiolíticos e hipnóticos en España (2000-2011) según su semivida plasmática.

### 4. LA MODERNA FORMA DE "ACABAR" CON LO QUE TE "PROVOCA" ANSIEDAD

Recientemente hemos podido observar de forma continuada a través de los medios de comunicación, una oleada de casos de asesinato parricida, al parecer cada vez con mayor frecuencia, en los cuales, padres han acabado presuntamente con la vida de sus hijos menores por medio de la utilización de ansiolíticos como sedantes para la posterior consumación del delito. Parece ser que el móvil principal de dichos asesinatos podría ser el hecho de la pretensión de deshacerse de sus hijos al resultarles factores estresantes y molestos para sus relaciones conyugales, de ocio, venganza entre los progenitores... La presencia de estos medicamentos en cantidades excesivas en el cuerpo de un niño puede derivar en el coma y posterior muerte por sobredosis del menor (aparentemente el propósito principal por parte del agresor). En los casos en que no se consiga dicho objetivo, se utilizaría este efecto de sedación o somnolencia, tanto como para actuar con alevosía como para facilitar la consiguiente consumación del delito a través de otros métodos tales como la sofocación, incineración, etc... Creo que en estos casos, al ser la víctima hijo/a del agresor, podría entenderse que si el parricida pretende acabar con la vida de su hijo, querrá hacerlo de la manera más rápida posible y que "menos sufrimiento" le cause.

A modo ejemplificativo puede hacerse mención a los casos que han sido más mediáticos en los últimos tiempos; Casos "Asunta" (especial referencia al mismo por su inminencia) y "Bretón" o más conocido como el caso de "Los niños de Córdoba".

#### 4.1. Caso "Asunta"

Hace pocos días, recibíamos la noticia del veredicto del jurado popular que condenaba a los padres adoptivos de la pequeña Asunta como autores del asesinato de la menor. Según el texto que el jurado ha presentado como veredicto:

EL SUMINISTRO DE LORAZEPAM. De común acuerdo, los acusados suministraron repetidamente desde al menos tres meses antes del fallecimiento a su hija

Asunta un medicamento que contenía Lorazepam (produce somnolencia y sedación). El padre, retiró en al menos tres ocasiones, una cantidad de cómo mínimo, 125 comprimidos de Orfidal de la farmacia.

- b) LA ÚLTIMA COMIDA. Los acusados deciden de mutuo acuerdo acabar con la vida de su hija. Comieron en el domicilio del padre de la niña y le suministraron una cantidad tóxica de Lorazepam para posteriormente, cuando tuviese efecto, asfixiarla. Los informes revelan que la niña presentaba un alto grado de microgramos de Lorazepam (0,68 microgramos) por mililitro de sangre además de en el contenido gástrico.
- c) EL CRIMEN. Los acusados asfixiaron a su hija por medio de la compresión que le aplicaron sobre la nariz y la boca. Antes de morir fue atada por los brazos y los tobillos por medio de cuerdas de plástico cuando se encontraba bajo los efectos del medicamento, con una dosis casi mortal (según el Instituto Nacional de Toxicología), por lo que no pudo defenderse [7].

#### 4.2. Caso “Bretón”

En este caso, el padre de los niños, como venganza hacia su mujer causó la muerte de sus dos hijos suministrándoles ansiolíticos y barbitúricos (fármacos de efectos sedantes y depresores del Sistema Nervioso Central similares a los ansiolíticos) a él recetados con anterioridad por un psiquiatra, para posteriormente, consumir su delito con la incineración de los menores.

### 5. CONCLUSIONES

El empleo de ansiolíticos casi se está convirtiendo en un medicamento de ingesta cotidiana entre un gran número de personas de nuestra población para tratar los síntomas del estrés y la ansiedad con efectividad y sobre todo, rapidez. Los médicos advierten de la dependencia que generan y de los efectos negativos para la salud que producen a largo plazo. Considero que es necesario tener especial precaución por parte de los especialistas a la hora de recetar este tipo de medicación a la ligera debido a sus potentes efectos sedativos, y principalmente por el posible uso desviado que puede hacerse de ellos, tal y como hemos podido comprobar con los casos ejemplificados, para fines totalmente opuestos al destino previsto de estos fármacos, fines que, solo la condición humana puede llegar a inventar.

### REFERENCIAS

- [1] <http://quemedaspara.es/los-ansioliticos-tratamiento/>
- [2] <http://tratamiento-ansiedad-depresion.com/blog/tratamientos/como-funcionan-los-ansioliticos/>
- [3] <http://es.slideshare.net/yukijenn/el-encefalo-sus-partes-y-funciones>
- [4] [http://www.aibarra.org/apuntes/criticos/guias/intoxicaciones/in\\_toxicacion\\_por\\_benzodiazepinas.pdf](http://www.aibarra.org/apuntes/criticos/guias/intoxicaciones/in_toxicacion_por_benzodiazepinas.pdf)
- [5] <http://www.monografias.com/trabajos82/benzodiazepinas/benzodiazepinas.shtml>

enzodiazepinas.shtml

- [6] M.P. Vicente Sánchez, D. Macías Saint-Gerons, C. de la Fuente Honrubia, D. González Bermejo, D. Montero Corominas y F. Catalá-López. *Evolución del uso de medicamentos ansiolíticos e hipnóticos en España durante el período 2000-2011*, pp. 247 y 249.
- [7] <http://www.lavozdeg Galicia.es/galicia/2015/10/30/00161446245035325165892.htm>



**Celia Esperanza González Ramallo** Estudiante de Derecho y Criminología de quinto curso en la Universidad Pablo de Olavide.

# Bioterrorismo, la amenaza masiva

Katima del Mar Hernández Domínguez

**Resumen**—El bioterrorismo es el tipo de terrorismo que utiliza armas biológicas para llevar a cabo sus ataques. Se consideran armas de destrucción masiva por sus efectos devastadores de muerte y enfermedad. Los ataques bacteriológicos existen desde tiempos inmemorables hasta la actualidad, en la que los avances biotecnológicos suponen un riesgo exponencial en este sentido. La cooperación y compromiso internacional, además de una importante inversión, son cruciales para la prevención de este tipo de eventos. No debemos sobredimensionar su amenaza, ya que, aunque real, es muy difícil salir exitoso de un ataque masivo. Es necesaria una política de información responsable a la sociedad civil sobre esta realidad, de modo que no genere una situación de pánico en la población y evitar objetivos terroristas de propaganda.

**Abstract**— Bioterrorism is the kind of terrorism that uses biological weapons to carry out its attacks. These arms are considered mass destruction weapons due to their devastating death and disease effects. The bacteriological attacks exist since ancient times until today, when biotechnological progress implies a risk of exponential growth in this sense. The international cooperation and commitment, in addition to an important investment in this field, are crucial to accomplish successful prevention politics of such events. We must not oversize the dimension of its threat, even if it is potential, it is very hard to get a prosperous mass attack. It is necessary a responsible information policy towards civil society concerning this reality, so that it does not generate a situation of panic within population and avoid terrorist propaganda.

**Palabras Clave**— Amenaza, Armas biológicas, Ataque, Bioterrorismo, Seguridad

## 1. INTRODUCCIÓN

El término bioterrorismo puede impactar de primera mano. Suena a algo muy peligroso y desolador. ¿En qué consiste realmente? ¿Cuál es verdadera dimensión de su amenaza? ¿Es algo novedoso? ¿Se puede prevenir? Éstas son algunas de las cuestiones que se tratarán de abordar a lo largo de este trabajo, dando un enfoque esclarecedor a la amenaza latente que supone este tipo de terrorismo.

Desafortunadamente los ataques bacteriológicos no sólo forman parte de la ciencia ficción, son una realidad y de consecuencias que podrían resultar catastróficas. Esto, sumado al estado de alerta de (in)seguridad que actualmente se sufre a nivel mundial, además de la controvertida desinformación por parte de los gobiernos, crea un estado de pánico en la sociedad civil muy peligroso que pone a prueba el balance de políticas de seguridad y libertad individuales que debe haber en todo estado social y democrático de derecho.

## 2. ¿QUÉ ES EL BIOTERRORISMO? ARMAS QUÍMICAS VS ARMAS BIOLÓGICAS

El bioterrorismo es el terrorismo que utiliza armas biológicas en sus ataques.

Las armas biológicas son consideradas comúnmente como armas de destrucción masiva (ADM). Las armas de destrucción masiva fueron definidas por el Consejo de Seguridad de la ONU como “armas explosivas atómicas, armas de material radiactivo, armas letales químicas y biológicas y cualquier arma desarrollada en el futuro que tenga características comparables en efecto destructor a aquéllas de la bomba atómica o alguna otra de las antes

mencionadas”[1]. Esta definición las diferenciaba de las armas convencionales, centrándose en las consecuencias del empleo de las ADM: la devastación, la muerte y la enfermedad en las sociedades humanas incompatibles con su supervivencia.

Por su parte, la OMS se basó en los conceptos de toxicidad y contagiosidad para distinguir las armas biológicas y químicas de otros tipos de armas. Definió los agentes de la guerra química como “todas las sustancias empleadas por sus efectos tóxicos en personas, animales y plantas” y como agentes de la guerra biológica a aquéllos “cuyos efectos dependen de su multiplicación dentro de los organismos blanco y cuyo uso en la guerra busca causar enfermedad o muerte en personas, animales o plantas”[2]. Desde un punto de vista técnico las características entre agentes químicos y agentes biológicos son diferentes. Los agentes químicos normalmente provocan un cuadro agudo en el mismo lugar donde se produce la exposición al agente químico. Los biológicos, tenderán a provocar el cuadro clínico en horas o días posteriores a la exposición, pues se contrae la enfermedad a raíz de la infección causada por el agente biológico (característica de multiplicarse en el huésped), causando un mayor impacto en los sistemas sociosanitarios. La detección de ambos agentes también será diferente. Los biológicos carecerán de olor y de sabor (o serán muy difícilmente detectables) y no dejarán rastro en la ropa; por el contrario, los químicos tendrán un olor que puede ser apreciado (con lo que normalmente habrán de transportarse en contenedores específicos más fácilmente detectables –por rayos X, por ejemplo, si aquéllos son metálicos) y podrán dejar rastros so-

bre la ropa. Por último, el número de afectados ante un ataque biológico es potencialmente mucho mayor que el de un ataque químico. [1]

### 3. ANTECEDENTES Y PANORAMA ACTUAL

Las armas biológicas han sido utilizadas desde tiempos inmemorables, pudiendo remontarnos al siglo VI antes de Cristo, cuando los asirios envenenaban los pozos enemigos con comezuelo [1]. En el siglo XIV los tartessos catapultaron los cuerpos de sus soldados infectados de peste en un asedio, provocando la mayor epidemia de peste negra en la historia mundial –murió cerca del 30% de la población europea. Los ataques bacteriológicos fueron también importantes en el continente americano, donde se produjo la contaminación intencional con cólera del río Mississippi durante la guerra civil estadounidense, así como la distribución de cobijas de enfermos con viruela a los indígenas norteamericanos por el ejército de EEUU. Asimismo, tanto en la primera y segunda guerra mundial como el período entre guerras, se desarrollaron programas de armas bacteriológicas en varios países, y esta amenaza y peligro continúan y proliferan en la actualidad.

Pocos días después de los acontecimientos del 11 de septiembre de 2001, el panorama de la medicina se enfrenta con un nuevo escenario: la amenaza del uso de agentes biológicos con propósitos criminales, que hoy se presenta en un contexto de terrorismo [2]. La distribución del carbunco (ántrax) por correo, que causó varias víctimas en los meses finales de 2001, provocó una extraordinaria reacción a nivel mundial. A pesar del escaso número de víctimas mortales, el ataque podría catalogarse de muy exitoso, ya que movilizó a grandes sectores a realizar intervenciones y fue motivo de miedo, pánico e histeria en la población, no sólo de EEUU, sino en todo el mundo [3].

El conflicto entre EEUU e Irak reveló la existencia de plantas productoras de agentes biológicos infecciosos para ser usados como armas dispersables inclusive en misiles, lo que hipotéticamente podría resultar en una catástrofe, no sólo para los países en conflicto sino para la humanidad. [4]

Además, el actual desarrollo biotecnológico permite imaginar escenarios escalofriantes ante la potencial creación de organismos que combinen alta transmisibilidad, elevada mortalidad y ausencia de tratamientos eficientes [5]. Este es un buen ejemplo del riesgo exponencial que supone la ciencia en manos del mal.

De otro lado, cabe apuntar la relativa facilidad de producir “en casa” algunos de estos agentes en tanto la tecnología para hacerlo es accesible, y la única limitación es el

conocimiento técnico. [6]

### 4. PLANIFICACIÓN Y RESPUESTA

La vulnerabilidad de las poblaciones humanas a terrorismo químico, biológico, radiológico y nuclear ha sido ampliamente discutida pero insuficientemente analizada.

En el cuadro I se muestran las principales acciones institucionales que se deben diseñar como respuesta de los sistemas de salud ante un ataque biológico.

Sin embargo, existe controversia entre los países líderes mundiales, ya que resulta inexacta la posibilidad de cuantificar y caracterizar los agentes biológicos utilizados con precisión, así como la escala del ataque y la magnitud de sus efectos. Particularmente, se debate si existe una infraestructura disponible para ofrecer una respuesta efectiva, y si el procedimiento de actuación sería proporcional al daño causado. [7]

#### CUADRO 1

##### Acciones Institucionales de los Sistemas de Salud ante un Ataque Biológico [8]

###### Respuesta internacional

- a) Acuerdos internacionales que prohíben el uso de agentes biológicos con fines de guerra o defensa
- b) Intercambio académico y tecnológico

###### Recomendaciones a nivel nacional

- 1) Necesidad de una estrategia legal de defensa contra bioterrorismo
- 2) Educación es la clave para defensa contra bioterrorismo a) pregrado; b) especialización; c) educación médica continua
- 3) Creación de un programa nacional de coordinación interinstitucional antibioterrorista, que incluya asistencia de urgencias médicas y la obtención de evidencia médica forense
- 4) Instalación de un sistema de vigilancia epidemiológica ante el uso de armas biológicas
  - a) Evidencias epidemiológicas
  - b) Reconocimiento y notificación
  - c) Cerco epidemiológico
- 5) Instauración de un laboratorio de análisis de material biológico asociado con incidentes terroristas
- 6) Preparación de campañas públicas de información
- 7) Garantía de abasto de material diagnóstico, protección especial y tratamientos de urgencias ante ataques biológicos
- 8) Descentralización de sistemas de alerta para detección oportuna de terrorismo biológico
- 9) Respuesta a acciones bioterroristas dirigidas contra animales y plantas
- 10) Creación de Comités de Ética ante situaciones de urgencia por un ataque biológico

### 5. DIMENSIÓN DE LA AMENAZA BIOTERRORISTA

Resulta esencial no sobredimensionar la amenaza, el riesgo, sino evaluarlo en su justa medida. Necesitamos actuar eficaz y eficientemente, tomando decisiones responsables para combatir estos peligros.

Como se ha hecho referencia, la fabricación de armas biológicas no requiere de técnicas sofisticadas, pero la probabilidad de vivir un ataque masivo con agentes biológicos es reducida. Los ataques biológicos pueden situarse entre

dos categorías extremas, la de ataque mínimo y la de ataque masivo, y su posición variará en función del tipo de agente empleado, la forma de utilizarlo y la vulnerabilidad de la población amenazada. [2] Las dificultades técnicas a la hora de manipular los agentes son importantes, de ahí que las probabilidades de un ataque masivo sean escasas. La selección de la cepa adecuada, las necesarias pruebas, el mantenimiento de la virulencia durante el cultivo, la cosecha, el procesamiento, el almacenamiento, la carga de las armas, la liberación y el desplazamiento en aerosol son obstáculos difíciles de superar. Además, existen medidas legales en la mayoría de los países y en el ámbito internacional que dificultan el acceso a estas sustancias [3].

Así, es preciso un compromiso firme por parte de los Estados con el desarme biológico, ya que la clave de un posible ataque masivo bioterrorista reside en el respaldo por un Estado de la organización criminal.

La información que ese Estado puede suministrar a los criminales, la infraestructura de que puede dotarlos y la financiación con la que puede nutrirlos hacen de esta combinación una bomba de relojería. [4]

Por otro lado, existe un nexo claro entre publicidad y aumento del riesgo. Uno de los objetivos principales de los terroristas es conseguir que su mensaje llegue al mayor número de personas. Esta propaganda del terror pretende la polarización de la sociedad internacional: reclutar para su causa a más fanáticos y hacer que las sociedades atacadas se vean atrapadas por un estado de alarma y miedo permanente que lleve a dudar de su propia identidad [5]. Prueba de ello es que los ataques biológicos terroristas se dispararon desde el atentado en Japón a finales de los 90, cuya cobertura mediática fue verdaderamente abrumadora.

## 6. CONCLUSIONES

Es preciso una comprometida cooperación internacional en la lucha contra el bioterrorismo, cumpliendo los tratados firmados y prestando especial atención a los regímenes autoritarios.

Si bien es cierto que es necesario hacer consciencia en la sociedad civil de la gravedad que supone este tipo de amenaza y así hacer efectiva la presión de la opinión pública sobre una respuesta institucional efectiva, deberá hacerse de modo responsable, sin sembrar el pánico y evitando la proliferación propagandística, ambos objetivos terroristas.

Ante las actuales amenazas de seguridad internacional que suponen grupos terroristas extremistas, tales como el ISIS (por sus siglas en inglés), que atraviesan con creces las barreras morales y éticas que antes impedían atentar con este tipo de armamento, necesitamos una inversión

importante en este campo ya que las ADM suponen el instrumento ideal para alcanzar su objetivo de exterminar con todo aquél "infidel" contrario al Estado Islámico.

## REFERENCIAS

- [1] Documento del Consejo de Seguridad de la ONU, S/C.3/SC.3/7/Rev.1, 8 de Septiembre de 1947.
- [2] Organización Mundial de la Salud. "Health aspects of chemical and biological weapons: report of a WHO Group of Consultants", 2ª edición, World Health Organisation, Washington DC, 2003.
- [3] I. Ibáñez Ferrándiz, *Bioterrorismo: la amenaza latente*. Serie de Documentos de Trabajo del Instituto de Estudios Europeos de la Universidad San Pablo-CEU, no 5, 2006.
- [4] M. Alía Plana, "La prohibición de armas químicas y biológicas en sede internacional y en sede española". *Revista Electrónica de Estudios Internacionales*, no 6, p.47. <http://www.reei.org/reei6/articulos6.htm> 2003.
- [5] S. Ponce de León-Rosales, et al. *Bioterrorismo: apuntes para una agenda de lo inesperado*. Salud pública de México 43.6, pp. 589-603, 2001
- [6] S. Ponce de León-Rosales, et al. *Bioterrorismo: apuntes para una agenda de lo inesperado*. Salud pública de México 43.6, pp. 589-603, 2001
- [7] R.A. Zilinskas, "Iraq's biological weapons". *Jama*, vol. 278, no. 5, pp.418-424, 1997
- [8] I. Ibáñez Ferrándiz, *Bioterrorismo: la amenaza latente*. Serie de Documentos de Trabajo del Instituto de Estudios Europeos de la Universidad San Pablo-CEU, no 5, 2006.
- [9] L.A. Cole, "The specter of biological weapons". *Sci Am*, vol. 275, no. 6, pp 30-35, 1996.
- [10] J.B. Tucker, *National health and medical services response to incidents of chemical and biological terrorism*. *Jama*, pp. 362-368, 1997.
- [11] S. Ponce de León-Rosales, et al. *Bioterrorismo: apuntes para una agenda de lo inesperado*. Salud pública de México 43.6, pp. 589-603, 2001
- [12] "The terror next time?". *The Economist*, [http://www.economist.com/displaystory.cfm?story\\_id=806202](http://www.economist.com/displaystory.cfm?story_id=806202). 2001.
- [13] OMS, op.cit. p.13.
- [14] I. Ibáñez Ferrándiz, *Bioterrorismo: la amenaza latente*. Serie de Documentos de Trabajo del Instituto de Estudios Europeos de la Universidad San Pablo-CEU, no 5, 2006.
- [15] M. R. Torres Soriano, "Violencia y acción comunicativa en el terrorismo de Al Qaeda". *Política y Estrategia*, no 96, pp.83-93, Oct/Dic 2004.



**Katima del Mar Hernández Domínguez**

Alumna de quinto año de Derecho y Criminología en la Universidad Pablo de Olavide, con foco hacia Seguridad Internacional.

# El diésel y los óxidos de nitrógeno: divorcio inevitable

Pablo Caetano Ríos

**Resumen**—Hace apenas 3 meses se puso de manifiesto un importante fraude en el sector automovilístico en relación con las emisiones de óxidos de nitrógeno en los vehículos diésel. ¿Por qué estos óxidos han provocado una alarma en la salud y medio ambiente?

**Palabras Claves**— Combustión, diésel, normativa europea, óxidos de nitrógeno, salud y medio ambiente.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las emisiones producidas por los vehículos pueden clasificarse atendiendo a los elementos contaminantes que producen como son los óxidos de nitrógeno, los óxidos de carbono y los hidrocarburos, principalmente.

Estos contaminantes, algunos muy perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente, se originan por la combustión de los gasóleos, gasolinas, querosenos, aceites ligeros, parafinas y asfaltos. [1]

## 2. EL DIESEL: MOTOR, COMBUSTIBLE Y RESIDUOS

También llamado gasóleo, es uno de los compuestos derivados del petróleo, el cual se obtiene al calentar el crudo a una temperatura, que posteriormente se condensará, en un proceso llamado destilación fraccionada (Figura 1).

La palabra diésel, proviene del inventor alemán Rudolf Diesel, que hace referencia también a los motores que este ingeniero inventó. Éstos transforman la energía térmica, proveniente del proceso de combustión en energía mecánica. Estos motores permiten mayor rendimiento que los de gasolina, ya que se introduce primero el aire en la cámara y se comprime hasta el mínimo volumen. Luego se introduce el combustible mediante un inyector de gotas, que se vaporizan inmediatamente, consiguiendo presiones y temperaturas más elevadas que en los motores a gasolina.

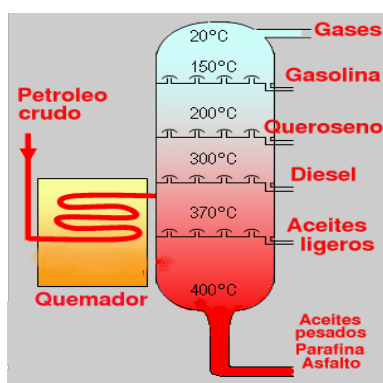
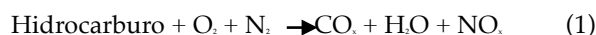


Fig. 1. Proceso de destilación del petróleo.

El proceso de combustión origina una serie de compuestos químicos, lo cuáles no todos son contaminantes; básicamente en una reacción de combustión aeróbica (en presencia de oxígeno), los productos originados son agua y dióxido de carbono, y en menor cantidad monóxido de carbono, hidrocarburos, aldehídos y óxidos de nitrógeno, entre otros. Así, en este proceso podemos distinguir dos elementos: el gasóleo, denominado combustible y el oxígeno, denominado comburente. [2] El comburente no está formado exclusivamente por oxígeno, sino que contiene un alto porcentaje de nitrógeno. Cuando se introduce en la cámara de combustión, a altas presiones y temperaturas rondando los 500 °C, parte del nitrógeno reacciona con el oxígeno produciendo, entre otros componentes, óxidos de nitrógeno, tal y como se indica en la ecuación química. (1).



### 2.1. Diferencias con la gasolina

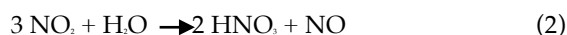
Una razón básica por la que la tecnología diésel se ve obligada a emplear mayores compresiones reside en el combustible: el diésel. Básicamente se trata de fracciones distintas del petróleo, provenientes de fases diferentes en la destilación del mismo. En la gasolina predominan hidrocarburos con 7 y 8 átomos de carbono, y el diésel está formado por hidrocarburos de cadena más larga, de 12 átomos de media. Este hecho provoca que la gasolina se vaporice y entre en ignición más fácilmente que el diésel (a temperaturas y presiones más bajas).

Tanto la gasolina como el diésel se emplean en los motores de combustión interna que funcionan en 4 ciclos: admisión, compresión, combustión y escape. De esta forma, la principal diferencia es que el motor a gasolina, ingresa a la cámara de combustión una mezcla aire-gasolina que se comprime y enciende cuando salta la chispa de la bujía; por el contrario, en los motores diésel la explosión se produce al comprimir en alta presión y temperatura la mezcla de aire con gasoil pulverizado.

### 2.2. Especial referencia al NO<sub>x</sub>

Las altas temperaturas y presiones en las cámaras de los cilindros son las causantes de que los radicales del nitrógeno presentes en el aire reaccionen con el oxígeno, originando los óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>), ya que el aire atmosférico que entra en las cámaras del motor está formado por

un 20% de oxígeno y un 79% de nitrógeno. El término  $\text{NO}_x$  hace referencia a todos aquellos compuestos que se originan tanto en los procesos de combustión como en otras actividades industriales, como son por ejemplo el  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$  o el  $\text{N}_2\text{O}$ . Particularmente, la molécula de  $\text{NO}$  es muy inestable en condiciones normales ya que tiende a oxidarse rápidamente, convirtiéndose en dióxido de nitrógeno, razón por la cual se la considera como un radical libre. La molécula de dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ), reacciona con el agua dando lugar a ácido nítrico y nitroso, como se indica en la ecuación (2).



Es importante mencionar que el tetraóxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ) es un dímero del  $\text{NO}_2$ , es decir, es una molécula doble que resulta de la combinación química de dos moléculas de dióxido de nitrógeno.

Los óxidos de nitrógeno resultan al combinarse el oxígeno elemental en aquellas zonas de la cámara de combustión en las cuales bruscamente se eleva la temperatura, debido a la reacción química de oxidación de los hidrocarburos del combustible. La cantidad de óxidos de nitrógeno originados depende de las proporciones de nitrógeno y oxígeno en los productos de la combustión.

La magnitud del coeficiente, denominado factor Lambda ( $\lambda$ ), que determina la relación existente entre la masa real de aire y la masa teórica para producir una combustión completa, indica la variabilidad en torno a los límites en los cuales los motores proporcionan máximo rendimiento, y por ende, originan una mayor o menor cantidad de contaminantes. [3]

Podemos encontrar tres tipos de situaciones distintas en las cuales la producción de contaminantes (y en especial los óxidos de nitrógeno) van a ser dispares entre sí, dentro de los motores diésel:

- **Mezcla rica:** es aquella que se produce debido a un exceso de combustible en la mezcla respecto al aire o cuando hay un déficit de oxidante; la reacción será incompleta por lo que la proporción de óxidos de nitrógeno será baja. En esta situación, el factor  $\lambda$  será menor a 1.
- **Mezcla estequiométrica:** puede considerarse como la mezcla ideal, en la que no hay ni exceso ni defecto de ningún compuesto por lo que el factor  $\lambda$  será igual a 1.
- **Mezcla pobre:** se da cuando hay un exceso del oxidante o una escasez del combustible; la concentración de óxido de nitrógeno será muy alta, por lo que el factor  $\lambda$  será mayor a 1.

De esta forma la dosificación de la mezcla va a influir en las emisiones de  $\text{NO}_x$  obteniendo la máxima cantidad de óxidos de nitrógeno cuando los valores de  $\lambda$  son un poco mayores que la unidad (en torno a 1,04) (Figura 2).

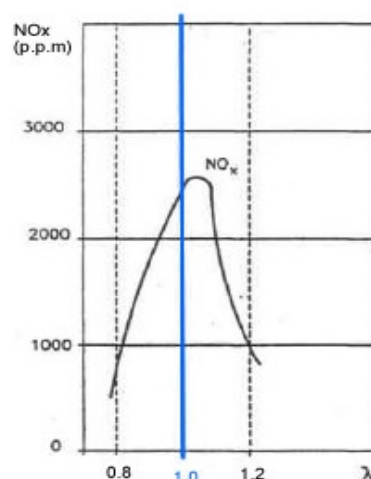


Fig. 2.  
Pro-  
de

ducción  
 $\text{NO}_x$  en  
relación con el factor  $\lambda$ .

### 3. EFECTOS DEL $\text{NO}_x$

Desde el punto de vista de la protección de la salud humana, los óxidos de nitrógeno y en especial el  $\text{NO}_2$ , están catalogados como agentes carcinógenos por la OMS, aunque esta afirmación ha sido puesta en duda por diferentes organismos como la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), la EPA o el Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS) de EEUU. Todo el mundo está expuesto a pequeñas cantidades de óxidos de nitrógeno en el aire; es la exposición a niveles muy altos la que puede ocasionar daños graves en las vías respiratorias, ojos y piel. [4]

Una exposición breve al  $\text{NO}_2$  puede provocar irritación del sistema respiratorio y ocular y, a largo plazo, puede originar la aparición de enfermedades respiratorias crónicas y cerebrales.

Los óxidos de nitrógeno, y algunos hidrocarburos ligeros no quemados liberados por los automóviles, son los principales contaminantes que producen el smog fotoquímico, que afecta sobre todo a las grandes ciudades. El término proviene de la abreviatura de dos palabras inglesas, smoke (humo) y fog (niebla); La formación del smog implica centenares de reacciones químicas, y provoca un estancamiento del aire. Los efectos del smog en la fauna son semejantes a los de los humanos, ocasionando principalmente problemas respiratorios. También tiene efectos sobre algunos cultivos o plantaciones, dañando el propio tejido de la planta, perdiéndose las hojas, decreciendo la producción del polen, etc.

La lluvia ácida es otra de las consecuencias de la combinación de los óxidos de nitrógeno con el vapor de agua atmosférico, convirtiéndose en nitratos o ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), que al precipitarse, origina la lluvia ácida, provocando daños en masas forestales, ríos, acuíferos, etc.



#### 4. NORMATIVA EURO 6 SOBRE EMISIONES

La Norma Euro 6 es una normativa de ámbito europeo que tiene por objetivo regular las emisiones de contaminantes por los nuevos vehículos vendidos; se limitará la emisión de los contaminantes más perjudiciales como son los óxidos de nitrógeno, el monóxido de carbono, los hidrocarburos y partículas.

Concretamente, en lo relativo a los óxidos de nitrógeno, la primera Norma Euro 1, de 1993, limitaba las emisiones a un máximo de 780 mg/km, la cual fue renovándose hasta el año 2000, con la entrada en vigor de la Euro 3 que establecía una limitación de 500 mg/km. Actualmente, la Norma Euro 6, de septiembre de 2014, permite la emisión de NO<sub>x</sub> hasta 80 mg/km.

Esta evolución, desde el 1993 en la que se introdujo la Euro 1 hasta la actualidad, ha permitido que las emisiones de partículas de los motores diésel hayan bajado alrededor del 99%, y emitan un 98% menos de óxidos de nitrógeno que los vehículos comparables en la década de los 90. [5]

Una de las principales diferencias de esta norma Euro 6 con respecto a la anterior, es que se pretende reducir las emisiones de los vehículos destinados al transporte al 50%, así como se reducen de 230 a 170 mg/km las emisiones de NO<sub>x</sub> e hidrocarburos.

#### 5. CONCLUSIONES

Es posible que el umbral establecido no sea de una gran utilidad a efectos de establecer normas que protejan la salud colectiva de los contaminantes, ya que encontramos algunos grupos individualizados como ancianos, niños o personas asmáticas, especialmente sensibles a los efectos de dichos contaminantes inclusive a niveles bajos.

Por el contrario, sí es de menester destacar los esfuerzos que se han llevado a cabo para reunir pruebas acerca del comportamiento y efectos que los contaminantes ocasionan, tanto en la salud humana como en el medio ambiente. Estos estudios bastan para recomendar políticas adicionales cuyo fin sea la reducción de las emisiones de todas estas partículas contaminantes, siendo necesario también una vigilancia más exhaustiva para llevar a cabo estrategias que prevean y regulen dichas emisiones, tanto a nivel nacional como a nivel europeo y mundial.

La paulatina implantación de vehículos eléctricos, en los que las compañías automovilísticas están invirtiendo grandes cantidades de dinero, puede ser una solución a la contaminación originada por los motores de combustión, que daña la salud humana y el medio ambiente.

Así, y en relación con la problemática actual de la entidad Volkswagen S.A., ante el incumplimiento de la normativa Euro 6, se pone de manifiesto la imperiosa necesidad de someter a las grandes multinacionales a controles técnicos exhaustivos de sus vehículos con el fin de evitar cualquier ilegalidad en lo que respecta a la homologación de la normativa europea.

#### REFERENCIAS

[1] Tema 3 Química Forense, Grado en Derecho y Criminología, Universidad Pablo de Olavide.

- [2] <http://didacfomer.net/la-quimica-de-los-motores-diesel-y-el-escandalo-volkswagen/> (Último acceso: 10 de diciembre de 2015).
- [3] <http://www.aficionadosalamecanica.net/sonda-lambda.htm> (Último acceso: 11 de diciembre de 2015).
- [4] División de Toxicología, "Óxidos de Nitrógeno: monóxido de nitrógeno, dióxido de nitrógeno, etc." *Agency For Toxic Substances and Disease Registry*, n° CAS #10102-43-9, pp.1-2.
- [5] <http://www.abc.es/motor-reportajes/20140904/abci-norma-euro-segun-bosch-201409031842.html>
- [6] Reglamento (UE) N° 459/2012 de la Comisión, de 29 de mayo de 2012, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 715/2007 del Parlamento Europeo en lo que respecta a las emisiones procedentes de turismos y vehículos comerciales ligeros (Euro 6), Anexo VI, Categoría N.



**Pablo Caetano Ríos** es estudiante de quinto curso del Doble Grado en Derecho y Criminología en la Universidad Pablo de Olavide, curso 2015-16.