

Perspectivas de los polisacáridos sulfatados de algas marinas como agentes antivirales

María C. Matulewicz¹ y Elsa B. Damonte²

INTRODUCCIÓN

La forma más efectiva de combatir las enfermedades virales es mediante su prevención por aplicación de vacunas, tal como ha ocurrido, entre otras, con la viruela, la poliomielitis y el sarampión. Sin embargo, existen muchas virosis de importancia sanitaria, como las infecciones producidas por el virus de inmunodeficiencia humana, hepatitis C, dengue y los herpesvirus, para los que no hay vacunas efectivas, en cuyo caso la única forma de enfrentar la enfermedad es mediante la quimioterapia antiviral.

En la búsqueda de agentes antivirales efectivos, los productos naturales representan una alternativa promisorio frente a los productos de síntesis dada su gran diversidad molecular, funcionalidad biológica y facilidad de obtención. Esta tendencia se ha incrementado notoriamente en los últimos años, frente al desafío de la emergencia continua e incrementada de nuevas infecciones.

En este campo de la química de los productos naturales, las algas marinas han representado desde hace tiempo una fuente co-

nocida de sustancias con variadas propiedades de aplicación en la industria y con fines terapéuticos. En particular, las algas son una fuente ventajosa para la obtención de polisacáridos sulfatados por el alto contenido de estos compuestos presentes en la matriz extracelular, lo que garantiza altos rendimientos a muy bajo costo. La evaluación de las actividades biológicas de estos polisulfatos naturales ha conducido al hallazgo de varios compuestos con actividad antiviral muy efectiva y potencial terapéutico muy promisorio.

ACTIVIDAD ANTIHERPÉTICA IN VITRO DE LOS POLISACÁRIDOS SULFATADOS

En los últimos años, el estudio de distintas algas rojas y pardas de las costas sudamericanas realizado en colaboración por grupos de investigación especializados en Química Orgánica, Bioquímica y Virología de las Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (Argentina), la Universidad Federal de Parana (Brasil) y la Universidad de Santiago de Chile (Chile) ha permitido el aislamiento y evaluación de la efectividad antiviral de una gran diversidad de polisacáridos sulfatados, de variada estructura química de acuerdo al tipo de alga [1]. La **Tabla 1** muestra un resumen de los dis-

tintos polisacáridos algales ensayados, que incluyen galactanos, carragenanos, agaranos, mananos, fucanos y fucoidanos. Estos polisacáridos fueron efectivos inhibidores de los virus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) y tipo 2 (HSV-2), asociados principalmente a infecciones recurrentes en el humano en las mucosas orales y genitales.

Los compuestos más activos fueron capaces de bloquear la multiplicación de HSV-1 y HSV-2 en cultivos celulares a concentraciones muy bajas, 0.01-1 µg/ml, sin efectos tóxicos sobre la viabilidad celular aún a concentraciones del orden de 1-10 mg/ml. Por lo tanto, el **índice de selectividad**, es decir la relación entre la citotoxicidad (medida como la concentración citotóxica 50%, CC_{50} , es decir la concentración del compuesto que reduce la viabilidad celular al 50%) y la actividad antiviral (medida como la concentración efectiva 50%, CE_{50} , es decir la concentración requerida para reducir el efecto citopático viral al 50%) está en el orden de 1000-10000. Estos valores de índice de selectividad, que es el parámetro utilizado universalmente para medir el potencial de una droga como agente antiviral, no son fáciles de obtener con cualquier tipo de compuesto químico, y ponen de manifiesto la potencialidad de los polisulfatos para la quimioterapia antiviral.

1. Departamento de Química Orgánica.

2. Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, 1428 Buenos Aires.

e-mail: edamonte@qb.fcen.uba.ar

Tabla 1. Polisacáridos sulfatados de algas sudamericanas con actividad antiherpética

Alga	Polisacáridos sulfatados con actividad antiviral
Rojas	
<i>Nothogenia fastigiata</i>	Xilomananos y Xilogalactanos
<i>Pterocladia capillacea</i>	Agarano y DL-Galactano híbrido
<i>Cryptopleura ramosa</i>	Agarano
<i>Bostrychia montagnei</i>	Agaranos
<i>Acanthophora spicifera</i>	Agarano
<i>Gymnogongrus torulosus</i>	DL-Galactanos híbridos
<i>Cryptonemia crenulata</i>	DL-Galactanos híbridos
<i>Schizymenia binderi</i>	Galactano
<i>Callophyllis variegata</i>	Galactano
<i>Gigartina skottsbergii</i>	Carragenanos
<i>Stenogramme interrupta</i>	Carragenanos
<i>Gymnogongrus griffithsiae</i>	Carragenanos
<i>Meristiella gelidium</i>	Carragenanos
Pardas	
<i>Leathesia difformis</i>	Fucoidanos
<i>Adenocystis utricularis</i>	Fucoidanos

Otra propiedad beneficiosa de los polisacáridos sulfatados para su utilización como antivirales es su mínima capacidad de inducir variantes virales resistentes luego de prolongados períodos de pasaje del virus en presencia de la droga, condiciones requeridas para el tratamiento de las infecciones herpéticas crónicas en los pacientes inmunosuprimidos.

El **mecanismo de acción** antiherpética de los polisacáridos se basa en su capacidad de interferir con la unión inicial del virus a la célula. Esta unión se produce entre los residuos de heparan sulfato presentes en los proteoglicanos de la membrana plasmática celular y la glicoproteína gC de la envoltura del virus. Dada la similitud estructural entre los polisacáridos sulfatados extraídos de las algas y el heparan sulfato celular, en presencia de los polisulfatos no

Editorial

(viene de pág. 1)

ducidos en los Estados Unidos se preparan a partir de fuentes petroquímicas, y las refinerías de petróleo abarcan el 15% de la energía total usada allí. Sin embargo, las fuentes agrícolas pueden ser un excelente recurso renovable para la producción de energía y compuestos químicos. En nuestra región, la inmensa riqueza de recursos naturales presenta un espectro invaluable de fuentes alternativas para la producción de compuestos químicos, tanto de los considerados materia prima como de medicamentos, agroquímicos, aditivos alimentarios, etc. que constituyen la denominada *química fina* ("fine chemicals"). Esta inmensa riqueza, aún fuertemente inexplorada, puede contribuir enormemente al crecimiento económico de la región.

En el marco de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (www.ancefn.org.ar) se han organizado dos cursos Latinoamericanos de QS (Mendoza Nov. 2005 y Bahía Blanca Nov. 2006), en el que se desarrollan temas tales como la transformación de Biomasa para la preparación de combustibles líquidos; de fuentes agrícolas para la producción de compuestos como fragancias, perfumes, aditivos, etc.; hidratos de carbono como precursores de síntesis y de polímeros biodegradables; síntesis alternativas que minimizan el costo energético, y reducen o eliminan el uso de solventes orgánicos; el uso de fluidos super-críticos (SCF), etc. En QS se privilegian los métodos catalíticos a los que usan cantidades estequiométricas, y, aquéllos que usan

catalizadores que puedan recuperarse, e.g. remoción catalítica de NOx en la atmósfera, bio-catalizadores, etc. Relacionado con el deterioro de la capa de ozono, se proponen estrategias de reemplazo de halocarbonos; y para la remediación sustentable de medios contaminados, procesos tales como la degradación fotoquímica (reactores solares) y los procesos de oxidación avanzada (AOP), etc.

Confiamos de esta manera colaborar en la difusión de las nuevas tecnologías de QS para contribuir al crecimiento armónico de la industria química de la región, y al desarrollo de conocimientos y nuevas habilidades en nuestros jóvenes universitarios que promuevan la capacitación individual y contribuyan a la promoción de la población en general. Por otro lado, tanto a nivel gubernamental por parte de los organismos de control pertinentes, como en el sector productivo en la industria química y petroquímica, existe continua concientización sobre la necesidad de implementar y mejorar procesos de producción más limpia. El desarrollo sustentable para la región latinoamericana puede lograrse en plazos razonablemente breves con el esfuerzo mancomunado de diversos sectores tales como académico, tecnológico, industrial, gubernamental, etc. y contribuir al intercambio de experiencias entre los diversos países, tanto a nivel de educación como en el de investigación y desarrollo.

Norma Sbarbati Nudelman

ocurre la interacción membrana-envoltura, queda bloqueada la entrada del virus a la célula huésped y no progresa la infección.

RELACIONES ENTRE ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD - CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES REQUERIDAS PARA LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Las algas rojas biosintetizan principalmente galactanos y, menos frecuentemente,

xilanos neutros y xilomananos sulfatados. Dentro del grupo de los galactanos, se encuentran los agaranos y los carragenanos. Los **carragenanos** tienen una estructura basada en una secuencia alternante de β -D-galactopiranososa enlazada por la posición 3 y α -D-galactopiranososa o su 3,6-anhidro derivado enlazados por la posición 4 (Figura 1). Las unidades de galactosa o 3,6-anhidro galactosa pueden estar sulfatadas y la unidad de β -galactosa puede estar sustituida con el cetal cíclico del ácido pirúvico.

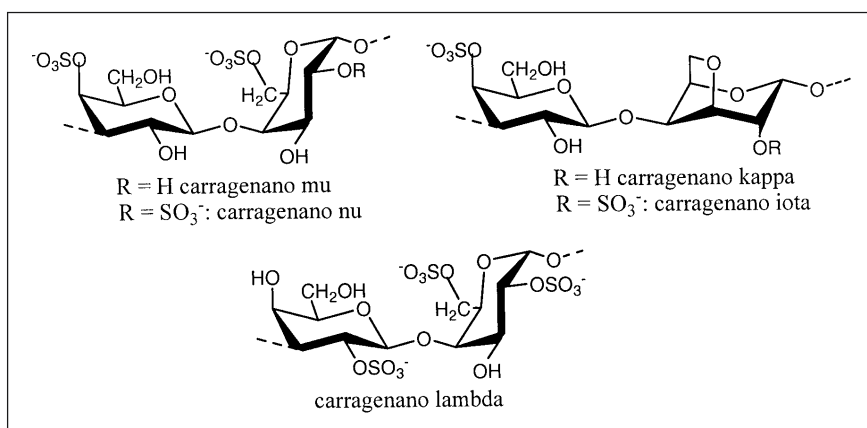


Figura 1. Estructuras básicas de algunos tipos de carragenano.

En los **agaranos** la unidad α pertenece a la serie L; los polisacáridos con un alto contenido de 3,6-anhidro galactosa poseen poder gelificante, el cual es máximo en el caso de la agarosa, una molécula con residuos alternados de 3,6-anhidro- α -L-galactosa unida por la posición 4 y β -D-galactosa unida por la posición 3, sin grupos carga-

dos (Figura 2). Los agaranos presentan un esquema de sustitución más complejo que los carragenanos: además de sulfatación o sustitución con el cetal cíclico del ácido pirúvico, la cadena puede poseer grupos metil éter en distintas posiciones y ramificaciones simples de D-xilosa o 4-O-metil-L-galactosa.

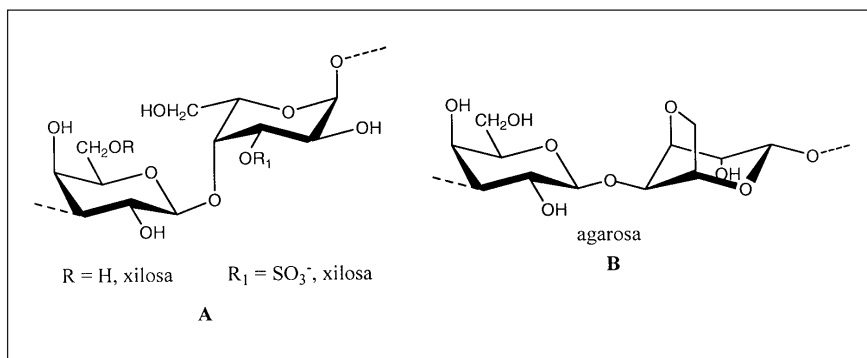


Figura 2. (A) Estructura de un agarano de *Pterocladia capillacea*.
(B) Estructura de la agarosa

A la división general entre carragenanos y agaranos se agrega otro grupo de polisacáridos con una gran variabilidad estructural en los cuales las unidades enlazadas por la posición 4 poseen tanto la configuración D como la L. Estos polisacáridos se denominan **híbridos DL**. Es importante destacar que en los últimos años también se han detectado estructuras híbridas en algas productoras de agarosa (*Pterocladia capillacea*) y carragenanos (*Gigartina skottsbergii*).

El alga roja *Nothogenia fastigiata* biosintetiza un complejo sistema de polisacáridos solubles en agua constituido por un xilano neutro, un xilogalactano de tipo agarano y una familia de xilomananos sulfatados. Dichos xilomananos poseen unidades de α -D-manopiranososa enlazadas por la posición 3 sustituidas con sulfato y ramificaciones simples de D-xilosa.

Los **fucanos** son una familia de polisacáridos que se extraen de algas pardas y están constituidos principalmente por una cadena de unidades de α -L-fucosa enlazadas por la posición 3, sulfatadas y con ramificaciones simples de L-fucosa. Cuando están presentes, además, unidades de xilosa, ácidos urónicos, galactosa y manosa los polisacáridos se denominan **fucoidanos**.

Si bien la formación del complejo célula-virus involucra mayormente interacciones de tipo iónico, hay también interacciones de tipo hidrofóbico. Los polisacáridos sulfatados con factores estructurales que mimetizan los dominios de unión básicos del receptor heparan sulfato de la superficie celular, interactúan con gC, impidiendo de esta forma, desde el comienzo la infección de la célula por bloqueo de la unión del virus a la misma.

Los factores estructurales que determinan la actividad antiviral de los polisacáridos sulfatados son:

a) El **peso molecular**.- La actividad antiviral

de los polisacáridos sulfatados aumenta con el peso molecular, siendo máxima en el rango de 10000-100000 Da; por encima de 100000 Da, la actividad permanece virtualmente constante hasta un valor de 500000 Da.

b) El contenido de grupos sulfato y su distribución.

- La formación del complejo polisacárido-virus, involucra la interacción entre grupos complementarios, las cargas negativas de los grupos sulfato del polisacárido y las cargas positivas de los aminoácidos de la glicoproteína gC del virus. Los polisacáridos sulfatados con grados de sulfatación menores del 20-22%, por lo general, no presentan actividad antiviral, a menos que otros factores estructurales compensen la deficiencia del sulfato. Uno de estos factores es la distribución de los grupos sulfato: un bajo contenido de sulfato no descarta la posibilidad de regiones altamente cargadas en la cadena de polisacárido.

c) La posición del grupo sulfato en la cadena.

- En particular, la elevada actividad antiviral de los carragenanos lambda (Fig. 1) se puede explicar en base a que su estructura, con grupos sulfato en el C-2 de la unidad α y en el C-6 de la unidad β , mimetiza el dominio básico de unión del heparan sulfato a gC.

d) La forma de las moléculas.

- La interacción entre los grupos complementarios podría aumentar considerablemente si el polisacárido no sólo se acercara a la superficie del virus pero, aún más, si se adaptara a ella. El examen de las estructuras secundarias de los carragenanos, agaranos, híbridos D/L, xilomananos sulfatados y fucanos sugiere que, a temperatura ambiente, se encuentran en una conformación de enrollamiento al azar pero pueden ad-

quirir conformaciones ordenadas bajo ciertas condiciones. La conformación de enrollamiento al azar, que confiere flexibilidad a la cadena, ha sido invocada para explicar la elevada actividad antiviral de los dextran sulfatos. Por otra parte, la presencia de ramificaciones en la cadena interferiría en la formación del complejo polisacárido-virus, tal como se determinó para los xilomananos de *Nothogenia fastigiata*.

e) La influencia de sitios hidrofóbicos.

- La elevada actividad antiviral demostrada por algunos fucanos, aún mayor en algunos casos que la de algunos carragenanos y dextranos sulfatados, sugieren que los sitios hidrofóbicos (grupos metilo en C-6) de los fucanos intervendrían en la formación del complejo polisacárido-virus.

La sulfatación adicional de polisacáridos de algas rojas para producir potenciales agentes antivirales, es sólo efectiva en el caso de polisacáridos no sulfatados o con bajo contenido de sulfato. Los polisacáridos sulfatados nativos con elevada actividad antiviral y peso molecular en el rango adecuado no modifican su actividad por sulfatación posterior, posiblemente debido a que los nuevos grupos sulfato ingresan en posiciones no activas.

PERSPECTIVAS DE USO CLÍNICO

A pesar de los muy exitosos resultados obtenidos en cultivos de células infectadas in vitro, los polisulfatos parecen presentar algunos inconvenientes para su aplicación clínica [1, 2].

En primer lugar, por la amplia heterogeneidad de peso molecular y grado de sulfatación entre distintas moléculas de un mismo compuesto es muy difícil obtener preparaciones rigurosamente estandarizadas. Tanto en

modelos animales como en humanos se ha observado una muy baja absorción y biodisponibilidad después de la administración del polisacárido por vía oral. Aún si son volcados directamente al torrente sanguíneo por vía endovenosa, los polisulfatos presentan dos inconvenientes: por un lado, son degradados en el plasma, y además, por sus cargas negativas, tienden a asociarse en forma inespecífica a proteínas del plasma, disminuyendo aún más la llegada real del compuesto a su célula blanco. La actividad anticoagulante es otra propiedad de muchos polisulfatos que debe ser controlada. Sin embargo, ha quedado demostrado que la actividad antiviral es independiente de la actividad anticoagulante, por lo que este problema puede resolverse eligiendo compuestos que naturalmente carezcan de efecto anticoagulante.

Trabajos recientes han mostrado dos posibles alternativas que permitirían la utilización efectiva de este tipo de compuestos in vivo. Una estrategia que se encuentra en las etapas iniciales de desarrollo es la modificación química, utilizando oligosacáridos de menor peso molecular y adicionados de grupos lipofílicos que aumenten la posibilidad de anclaje en membrana y llegada efectiva a la célula de este tipo de sustancias.

Otra alternativa que ya ha demostrado ser efectiva es la **utilización tópica** de los polisacáridos sulfatados en forma profiláctica. En efecto, las infecciones por herpesvirus se encuentran dentro de las llamadas enfermedades de transmisión sexual, así como el virus de inmunodeficiencia humana, agente del SIDA, el virus de papilloma y otros patógenos virales. De hecho, el tratamiento por vía vaginal con carragenanos u otros compuestos polianiónicos relacionados otorga protección frente a la infección genital herpética en modelos murinos [3], y también se están extendiendo a HIV las pruebas clínicas en humanos con compuestos microbicidas de estas características [4].

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados obtenidos hasta el presente demuestran: i) la factibilidad de obtención de polisacáridos sulfatados a partir de algas marinas, con buenos rendimientos y bajo costo de producción; ii) la potente efectividad antiviral de estos compuestos naturales cuando se controlan los determinantes estructurales de dicha actividad; iii) las excelentes perspectivas de administración profiláctica de los polisacáridos sulfatados para frenar la diseminación de las enfermedades virales de transmisión sexual, así como en otras infecciones loca-

lizadas que permitan el uso tópico de estos compuestos de alto peso molecular; iv) la posibilidad de mejorar la utilización sistémica a través de modificaciones químicas sobre las estructuras oligosacáridicas de menor tamaño.

AGRADECIMIENTOS

Las investigaciones realizadas en los laboratorios de las autoras han sido financiadas con subsidios de la Universidad de Buenos Aires, la Agencia Nacional para la Promoción Científica y Tecnológica y el Consejo

Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). M.C.M. y E.B.D. son miembros de la Carrera del Investigador Científico del CONICET.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] E. B. Damonte, M. C. Matulewicz, A. S. Cerezo, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2399-2419.
- [2] M. Luscher-Mattli, *Antiviral Chem. Chemother.* **2000**, *11*, 249-259.
- [3] M. J. Carlucci, L. A. Scolaro, M. D. Nosedá, A. S. Cerezo, E. B. Damonte, *Antiviral Res.* **2004**, *64*, 137-141.
- [4] R. Spieler Trager, *Science* **2003**, *299*, 39-40.

LISTADO DE ANUNCIANTES

¿Las fábricas de celulosa son realmente una amenaza para el ecosistema del Río Uruguay?

Lázaro F.R. Cafferata¹ y José A. Caram²

Es evidente que nuestro planeta se encuentra cada vez más contaminado con diversas sustancias químicas. Pruebas de ello se tienen no muy lejos, si se analiza la atmósfera que respiramos, las aguas superficiales y profundas, los sedimentos y los suelos, que influyen en el grado de salubridad de las poblaciones. Felizmente es también evidente una política mundial tendiente a su preservación, poniendo límites cada vez más estrictos a los niveles de polución en los distintos ámbitos creativos del quehacer humano. Es así como se ha elaborado una saludable premisa de que "tenemos que dejar de contaminar". La movilización ciudadana sobre el grado de deterioro del medio ambiente que producirían en su funcionamiento las dos fábricas de celulosa que ya se están instalando sobre la ribera del Río Uruguay (Fig. 1), vecinas a la Ciudad de Fray Bentos (República Oriental del Uruguay), constituye un hecho trascendente y a la vez inédito por su magnitud y divulgación mun-

1. LABORATORIO LADECOR (UNLP) y CINDECA (CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calles 47 y 115, (1900) La Plata
(<http://www.quimica.unlp.edu.ar/Centros>)

2. Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas, INIFTA (CONICET), C.C. 16, Suc. 4, Diagonal 113 y 64, (1900) La Plata, República Argentina.
E-mail <caferata@quimica.unlp.edu.ar ; caram@inifta.unlp.edu.ar>



Figura 1. Fotografía de la ribera del Río Uruguay donde se están instalando actualmente dos Pasteras en la vecindad de la Ciudad de Fray Bentos (R.O.U.), obtenida desde el lugar de esparcimiento y balneario situado a 21 Km desde la Ciudad de Gualeguaychú (Provincia de Entre Ríos).

dial, que ha contribuido a esclarecer sus probables efectos.

En este tema es necesario discutir rigurosamente todas sus implicancias (e.g. socio-económicas), como también las de orden técnico y científico, dado que ese tipo de empresas se encuentran en el tercer orden de categorización de industrias altamente contaminantes del medio ambiente [1].

La Sra. Petra Theman, Primer Secretario de la Embajada de Finlandia en nuestro país (E-

mail: petra@theman.fomin.fi. (<http://www.finlandia.org.ar>) ha expresado textualmente lo siguiente en un Documento Técnico producido (20 pp.) sobre la instalación de una de esas fábricas de celulosa. "La industria papelera es una actividad compleja que comprende muchos procesos y diferentes productos, que incluyen desde el blanqueo de la celulosa hasta la fabricación de papeles de distintos tipos. El proceso de fabricación de pasta al sulfato o Proceso Kraft es el más utilizado en todo el mundo, debido a las excelentes propiedades del

producto y su aplicabilidad a todo tipo de maderas. Los vertidos de las aguas residuales [del proceso], las emisiones atmosféricas, incluidos los gases fétidos y el consumo de energía son sus principales problemas medioambientales, aunque también lo son los residuos que pueden llegar a serlo en algunos países. Algunos de los compuestos vertidos por las industrias papeleras son tóxicos para los organismos acuáticos. Las emisiones de sustancias coloreadas pueden perjudicar a los seres vivos que habitan en el medio receptor. Las emisiones de nutrientes (nitrógeno y fósforo) pueden contribuir a la eutrofización de las aguas receptoras. Las aguas residuales contienen metales extraídos de la madera en bajas concentraciones, pero la carga total puede ser importante debido al gran caudal de los vertidos. Gracias a la aplicación de medidas en el propio proceso, se ha logrado reducir notablemente la concentración de sustancias orgánicas cloradas y no cloradas en los vertidos de estas industrias. Los principales contaminantes son óxidos de nitrógeno, compuestos sulfúreos como el dióxido de azufre y compuestos sulfúreos reducidos de olor fétido. También se producen emisiones de partículas. Algunos de los compuestos vertidos por las papeleras son tóxicos para los organismos acuáticos. Los contaminantes que predominan en las emisiones a las aguas son sustancias orgánicas disueltas o dispersas en la fase acuosa. También se aplican medidas para evitar vertidos accidentales en el suelo y en las aguas, como consecuencia de la manipulación y almacenamiento de productos químicos"....

El documento en su parte final, agrega: "La oficina europea de medio ambiente también ha expresado algunas opiniones discrepantes, como que el blanqueado sin cloro elemental en las fábricas de pasta Kraft NO CUMPLE LOS CRITERIOS DE MTD con respecto a los principios de precaución y prevención y que, en general, el

tratamiento terciario de las aguas residuales debería incluir el tratamiento con ozono, peróxidos o radiación ultravioleta, seguido de una fase de biofiltrado... Grado de consenso: La mayoría del grupo de trabajo técnico y de los participantes en la Séptima Reunión del Foro de Intercambio de Información han expresado su respaldo al presente documento técnico. Sin embargo, no ha sido el caso de la CEPI, entidad que representa a la Industria Papelera y de algunos estados miembros, que han puesto en duda algunas de las conclusiones alcanzadas en el borrador final".

Si bien ya existen en el ecosistema a que se refiere el título de este trabajo, y desde hace mucho tiempo, evidentes fuentes de contaminación que han desmejorado las condiciones de vida en la región, esto no constituye una razón para dejar de preocuparnos y llamar la atención sobre la importancia de la preservación de lo que todavía existe y disfrutamos.

Es ya bien conocido que en el caso particular de las fábricas modernas de celulosa, una de las materias primas utilizadas para su blanqueo final es precisamente el dióxido

de cloro, con excelentes propiedades como biocida. Esa sustancia, además de pertenecer funcionalmente a la familia de los peróxidos, tiene una estructura electrónica de radical libre [2]. De allí su reactividad química particular con la materia orgánica. Es conocido que el elemento cloro cuando entra en la estructura de moléculas de materias primas o de los solventes u otros materiales utilizados en los procesos industriales, generalmente trae aparejado para los químicos serios problemas para la neutralización de sus ya conocidos efectos nocivos. Aún adoptando la tecnología más moderna (ECF) en el proceso de las fábricas de celulosa, el peróxido de cloro constituye, por su mecanismo de acción sobre los complejos fenoles poliméricos (e.g. ligninas) de las maderas, una seria amenaza para la vida en la región aludida. Además de ser un gas agresivo que absorbe la luz solar (a 360 nm) genera entre otros compuestos inorgánicos, pequeñas cantidades de cloro elemental [2]. Sin embargo, la reacción química más conocida en el proceso de blanqueo de la celulosa es la de destrucción de las ligninas (Fig. 2), con formación también de especies cloradas inorgánicas, oxidantes y halogenantes.

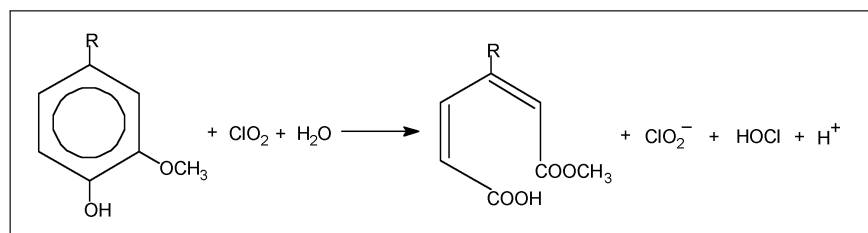


Figura 2. Representación de las reacciones de destrucción de ligninas [3], donde R=grupos atómicos de moléculas de ligninas, con la formación de derivados del ácido mucónico.

Es decir que el dióxido de cloro, que debe producirse *in situ* para su utilización industrial por la peligrosidad del manejo, transporte y almacenamiento, se caracteriza por su enérgica acción blanqueadora e indirectamente, halogenante de la materia orgánica en general, sea ésta viviente o no. Por su intrínseca y peculiar reactividad origina en el proceso Kraft, aún en pequeñas concentraciones, derivados orgánicos secundarios

[3] cuyas moléculas poseen también el elemento cloro (e.g. 3-cloro-4 (diclorometil-5-hidroxi-2 (5H) furanona, informada en el estudio medio-ambiental AMES). Esta sustancia representa solamente ca. 0,0001 % de los compuestos orgánicos encontrados en efluentes de Pasteras de celulosa. Sin embargo, la misma es responsable de un 30-50 % del total de las mutaciones que se producen en los organismos vivientes [3].

Es de mencionar que la acción genotóxica del peróxido de cloro, ya sea indirecta a través de sus productos de reacción [3], o también probablemente directa, podría relacionarse con la observación visual experimental (*in vitro*) [4] del daño producido sobre la estructura de la molécula de ADN, si bien verificada con otros peróxidos orgánicos en solución. Además, esa sustancia en el proceso de blanqueo de la celulosa produce grandes cantidades de cloratos, con energéticas acciones herbicidas y de formación de algas. No obstante, es de destacar que aun cuando se observe una velocidad razonable de degradación de los compuestos clorados en los experimentos de laboratorio, la real evaluación cuantitativa de su persistencia en el medio ambiente es función de sus condiciones fisicoquímicas y biológicas (e.g. biota, salinidad de sus aguas, temperatura del aire o aguas, vientos reinantes, etc.) [5]. Asimismo, muchos xenobióticos descargados inicialmente en áreas geográficas muy restringidas se distribuyen a otros lugares muy distantes por variados procesos de transporte. Un ejemplo de esto es la observación de los hidrofóbicos PAHC en los hielos de la Antártida Argentina, bastante alejada de los lugares donde se supone que se produjeron [6]. Es conocido que la degradación biológica de algunos compuestos químicos de-

pende de la actividad enzimática de los microorganismos presentes en el medio, la cual resulta específica para un dado contaminante. En este tema conviene definir el proceso de biomagnificación por el cual un compuesto se incorpora a la cadena alimentaria si bien en concentraciones iniciales relativamente pequeñas, por su pasaje por diferentes tipos de organismos resulta en definitiva acumulado en el hombre con consecuencias sobre su estado de salud y también de sus descendientes.

En el proceso inicial de blanqueo de la celulosa de la madera, realizado en medio alcalino fuerte en presencia de sulfuro de sodio y a elevadas temperaturas, seguido en otra etapa por el tratamiento con peróxido de cloro, se producen [7] también pequeñas concentraciones de dioxinas (TCDD, Fig. 3) pero significativas por su gran impacto ambiental [1]. Esa denominación genérica comprende un gran número de sustancias policloradas producidas secundariamente en las condiciones del proceso global de blanqueo de la celulosa. Las mismas han sido evaluadas cualitativamente y cuantitativamente en efluentes acuosos de Pasteras en otras partes del mundo, por métodos químicos e indirectamente, mediante ensayos bioquímicos.

ppt, o sea 1 ng / Kg de peso corporal [8] ya que su dosis letal (L^{50}) se encuentra en el ámbito de 1-10 μg / Kg de peso corporal [10]. Referido al tema de la presencia de TCDD en los efluentes de fábricas de celulosa, se ha determinado [5] que sus velocidades de eliminación en aves de corral (gallinas) que bebían efluentes contaminados, se produce en la albúmina de sus huevos. Es evidente que su consumo por otros animales (y también por el hombre) conduce, en definitiva, a la diseminación de las TCDD y a su acumulación biológica debido a la gran estabilidad química de sus moléculas [5].

Todo esto equivale a decir que el daño producido por el agente blanqueante y a la vez indirectamente halogenante dióxido de cloro, que se utilizaría en el proceso industrial de la celulosa, si bien de acción inmediata sobre la materia orgánica por su extraordinaria reactividad, constituye también una amenaza sobre las futuras generaciones de seres humanos y otros organismos que habitan la aludida región. Esto sin considerar un eventual accidente industrial durante el manejo del dióxido de cloro, dadas sus características de gas irritativo de los vegetales y las mucosas de los organismos, con también informados riesgos de explosión [2].

Un artículo científico titulado "Dioxin and Matrix Metalloproteinases" [11] y tomado al azar entre los numerosos existentes sobre el tema y por lo tanto con el rigor y la validez de resultados experimentales, se refiere a la influencia que tienen las TCDD y en particular la muy tóxica 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina sobre el desarrollo de endometriosis (enfermedad que resulta de la invasión ectópica del tejido endométrico de la mujer dentro de su cavidad peritoneal). Las TCDD constituirían un disruptor prototípico por la modulación de la producción endócrina de esteroides, tanto en sus metabolismos y en los transportadores séricos del organismo humano [9]. La exposición a las TCDD también impactaría

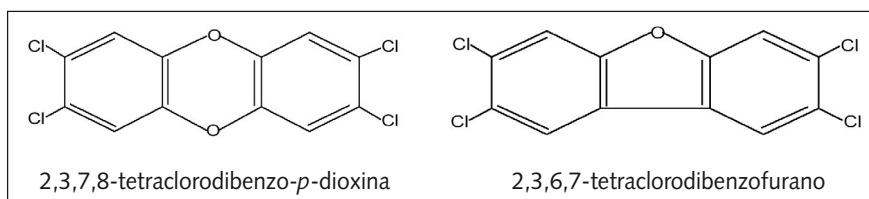


Figura 3. Fórmulas estructurales de representantes de las genéricamente denominadas TCDD

Es de tener en cuenta que todos nosotros tenemos TCDD en nuestros cuerpos [8], además de otros derivados organoclorados, principalmente en los tejidos grasos, en concentraciones que dependen de la exposición a esas sustancias provenientes de distintas fuentes (e.g. incineración de basuras, combustiones diversas, etc.) a lo largo de nuestras vidas [8]. Precisamente, a la mayoría

de las sustancias orgánicas cloradas, entre las cuales se encuentran también las TCDD, se le atribuyen acciones genotóxicas, es decir que actúan sobre la estructura del ADN [9], como es sabido responsable de llevar la información genética en los seres vivos. La WHO recomienda por razones sanitarias que la ingestión diaria de TCDD incluidas en los alimentos no debería ser superior a 1

negativamente sobre sistemas enzimáticos vitales y alterarían gravemente elementos celulares y la función específica de diferentes tejidos (e.g. a través de mecanismos de generación de radicales libres del oxígeno). La exposición a las TCDD conduce también a inflamación y activación de factores de necrosis de tumores. Investigaciones llevadas a cabo sobre monos *Rhesus* y también en humanos, sugieren que la exposición a agentes clorados del tipo de las TCDD puede afectar adversamente el desarrollo de la función de sistemas reproductivos. Notablemente, se ha establecido también [11] que la acción de las TCDD produciría un impacto negativo en la función del endometrio durante el embarazo, aumentando el riesgo de abortos espontáneos.

Por otra parte, existe un gran interés en conocer el destino y efectos que tienen otros numerosos compuestos clorados de efluentes de plantas de celulosa en condiciones de anaerobiosis ya que algunos de ellos como los PCBs, fenoles policlorados y otras sustancias orgánicas muy diversas y persistentes, han sido encontrados en sedimentos hídricos [5]. Hay que tener en cuenta que la persistencia de esos compuestos es determinada también, y en gran medida, por la actividad de bacterias deshalogenantes, cuya identidad en un ecosistema debe establecerse con seguridad a fin de realizar un estudio de Impacto Ambiental que sea representativo.

Han sido publicadas [5] algunas conclusiones de estudios de Impacto Ambiental de fábricas de celulosa en diferentes zonas del planeta. En uno de ellos se evaluó un ecosistema muy restringido como lo es el del Mar Báltico y el Golfo de Botnia [5]. Allí se determinó solamente el efecto de algunos xenobióticos, con diferentes estructuras moleculares sobre la biota de esos lugares. Otro estudio [5] está relacionado con fábricas de celulosa funcionando en Escocia (Gran Bretaña), evaluando el impacto

ambiental producido por la descarga en el mar de sus efluentes, trabajo realizado en un periodo bastante prolongado de varios años. Es de destacar que la complejidad química de los efluentes crea dificultades para seleccionar acertadamente los compuestos testigo característicos, como es el caso de los efluentes producidos y arrojados al Golfo de Botnia (Finlandia), determinándose el cloro orgánico en los compuestos extraídos únicamente con ciclohexano como solvente. Este método no resultó representativo del daño que se puede producir, agravado por el hecho de que en ese estudio [5] no fueron identificados la totalidad de los compuestos presentes.

Téngase en cuenta que en este artículo no se han considerado las reacciones químicas que ocurrirán en la atmósfera de la región y zonas más distantes y muy pobladas, por las importantes emisiones gaseosas que producirían las fábricas de celulosa en su funcionamiento [12, 13]. Por otra parte, el clima templado de la región aludida se caracteriza por significativos periodos de calma en su atmósfera, donde no predomina el benefactor viento del sector Sur, como estamos acostumbrados los habitantes de la Ciudad de La Plata. Allí tendrían lugar lentos procesos gaseosos térmicos y fotoquímicos con la producción de sustancias azufradas tóxicas, al menos malolientes, pero peligrosas para la vegetación e irritativas de las mucosas. Sin embargo, trastornos respiratorios debidos a la vecindad de plantas de celulosa ya se han comenzado a evaluar en diferentes partes del mundo (e.g. realizado estadísticamente por la *North Carolina School Asthma Survey* en adolescentes de escuelas de Estados Unidos [14]. Surge así la pregunta de cuáles serían las consecuencias para la región del Río Uruguay en el caso que también ocurriera un accidente durante el funcionamiento de las plantas de celulosa: serían catastróficas por la naturaleza de las sustancias involucradas (e.g. amoníaco, monóxido de

carbono, cloruro de sulfurilo, dióxido de cloro, cloroformo, ácidos orgánicos clorados, dioxinas, furanos, cloruro de hidrógeno, metanol, óxidos de nitrógeno, óxidos de azufre, sulfuros orgánicos, resinas ácidas, alcoholes, terpenos, acetaldehído, nitratos, benceno, clorobenceno, fenoles y clorofenoles, iones metálicos como cadmio, mercurio y zinc, sin mencionar otros numerosos compuestos volátiles. Al respecto resulta útil mencionar el Informe de la *Trade Union* acerca de la fábrica de celulosa Veracel, ubicada en el estado de Bahía (Brasil). Allí se destacan las sustanciales diferencias analíticas entre lo informado por la fábrica y los estudios realizados por fuentes independientes, incluyendo accidentes ocurridos y en algunos casos, fatales.

Cabe decir además, que la región de Fray Bentos-Gualeguaychú no es la única en la cual los proyectos de instalación de Pasteras ha generado intensas polémicas. Ejemplos de esto son las pretendidas instalaciones en el valle del río Tamar en Tansmania (Australia), por parte de la empresa Gunns Limited. Este hecho trajo aparejado un gran debate en la sociedad a todos los niveles, el cual todavía continúa.

Por otra parte, se podría aducir que este proceso de contaminación en la región mencionada podría estar muy bien controlado y monitoreado a fin de exigir el mantenimiento de los niveles de contaminantes inevitablemente producidos, dentro de las normas internacionales vigentes, lo que en la práctica resultaría imposible de realizar con los recursos analíticos disponibles en nuestro medio y también de fiscalizar por los Organismos competentes. Las determinaciones de algunos contaminantes clorados y oxigenados producidos en el proceso de blanqueo de la celulosa (e.g. TCDDs) requieren equipos sofisticados a fin de obtener resultados incuestionables y precisos [8, 15] con una exactitud de ca. 20 % en niveles de concentración de 1 ppbillón. Estos análisis

son también muy costosos y emplean necesariamente cromatografía gaseosa con alta resolución y niveles de detección (HRGC-HRMS/MS) con patrones isotópicos de ^{13}C . Esto equivale a detectar 1 g de arena en 1000 toneladas de alimentos, dadas las muy pequeñas concentraciones de contaminantes con similares estructuras moleculares. La anterior aseveración está relacionada con el valor actual de un único dosage de TCDDs en medios biológicos (e.g. en sangre humana está comprendido entre 1400-1500 U\$A y valores un poco menores, en efluentes acuosos). Por lo tanto, es lógico pensar que el monitoreo conjunto Argentino-Uruguayo que recientemente propuso la República Oriental del Uruguay para avalar la instalación de las Pasteras tampoco es factible ahora. Por otra parte, en este momento el daño a ser producido al ecosistema del Río Uruguay no se puede evaluar con total exactitud dado que las mencionadas fábricas aún no están en funcionamiento y todas las consideraciones efectuadas hasta la fecha sobre el tema son pura especulación.

Para finalizar los autores desean transcribir lo expresado por otros investigadores [5], lo que resulta muy ilustrativo y resume la situación actual del problema tratado en este artículo.

"Los problemas del medio ambiente son extraordinariamente complejos y los estudios sobre impacto ambiental deberían ser basados de la mejor manera posible, en hechos científicos indiscutibles en el área de los análisis químicos de la química orgánica, de la distribución de los contaminantes, su persistencia y ecotoxicología, sin descuidar las reacciones catalizadas por acción microbiológica sobre los contaminantes eventualmente presentes".

CONCLUSIONES

Este trabajo analiza algunas de las conse-

cuencias de la instalación de las fábricas de pasta de celulosa blanqueada especialmente en lo referente a la salud de las poblaciones que se verían afectadas, tratando sus autores de ser objetivos desde el punto de vista científico. Para ello se ha efectuado una revisión de la bibliografía más reciente sobre la naturaleza química y propiedades físicas de efluentes gaseosos y líquidos producidos por plantas de ese tipo, que utilizan la tecnología más moderna disponible y ubicadas en distintas partes del mundo, en su relación con efectos derivados de su introducción en el ecosistema del Río Uruguay, dado que otros tratamientos del problema, si bien muy generales (e.g. lineamientos de los procesos industriales a ser empleados, consecuencias socio-económicas derivadas, implicancias climáticas, etc.), ya han tenido considerable difusión.

Se aportan evidencias recogidas de publicaciones científicas internacionales, como también de la experiencia profesional de los autores, sobre el manejo de las sustancias químicas involucradas, en relación al posible daño que produciría el procesamiento de la materia prima vegetal (e.g. materiales ligno-celulósicos), como también los muy diversos reactivos químicos (e.g. ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, sulfuro de sodio, dióxido de cloro) y otras sustancias inorgánicas y orgánicas consideradas muy agresivas para los seres humanos, los vegetales y la fauna. Cabe destacar que los productos químicos secundarios derivados del proceso, y muy especialmente los compuestos clorados, en virtud de sus inherentes características fisicoquímicas y volumen estimado de producción, al ser incorporados al ecosistema afectarían seriamente su ya inestable equilibrio ambiental actual.

Es de aclarar que si bien los autores de este artículo no se oponen a la industrialización de la región como factor de progreso humano, consideran que en este caso particular el lugar geográfico elegido para la insta-

lación de las Pasteras sobre las riberas del Río Uruguay no es adecuado, lo cual lamentablemente será constatado recién al cabo de décadas de su funcionamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS CITADAS

- [1] Informe de la Delegación Argentina al Grupo de Trabajo de Alto Nivel (GTAN). Ministerio de Relaciones Exteriores, Comercio Internacional y Culto, Pacific Consultants International & Malcom. Pirnie *et al.*, borrador de Estudio de Impacto Ambiental Acumulado. Buenos Aires, 3/2/2006. pp.33.
- [2] R. A. Larson, E. J. Weber, *Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry*, Lewis Publishers, Boca Raton CRC Press, 1994, pág. 433, p. 332 y siguientes.
- [3] K. Solomons, R. Bergmann, D. Huggel, D. Mackay, K. J. Lehtiner, B. Mc Kague, *A Review and assesment of the ecological risks associated with the use of chlorine dioxide for the bleaching of pulp*. Report prepared for the Alliance for Environmental Technology, Scientific Progress Since 1993. *Web site:* (Google) Septiembre 2006. pp 111.
- [4] L. F. R. Cafferata, 1989, observación personal (*in vitro*) no publicada.
- [5] A.H. Neilson. *Organic Chemicals in the Aquatic Environment. Distribution Persistence and Toxicity*. Lewis Publishers, CRC Press. Inc USA, 1994, pág. 438.
- [6] Lilia Ventajas. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, Año 2004.
- [7] *Interim report on data and methods for assessment of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin risks to quatic life and associated wild life*. U.S. EPA. EPA / 600 /R-93 / 055. Office Research and Development, Washington D.C. 20460, 1993.
- [8] A. Schechter, A.L. Piskac, E.I. Grosheva, N. I. Matorova, J.J. Ryan, P. Furst, Levels of dioxins and dibenzofurans in breast milk of women residing in two cities in the Irkutsk Region of Russian Siberia compared with American levels. *Chemosphere*, 2002, 47, 157-167.
- [9] Y. Heimler, R.G. Rawlins, H. Owen, R.J. Hutz, Dioxin perturbs, in a dose- and time-dependent fashion, steroid secretion, and induces apoptosis of human luteinized granulosa cells. *Endocrinology*, 1998, 139, 4373-4379.

- [10] A. I. Varsavsky, *Bifenilos policlorados. Desde su síntesis hasta su prohibición*, Industria & Química, 2006, (352), 3-6 y referencias allí existentes.
- [11] T. Nayyar, K. L. Bruner-Tran, K. G. Osteen, *Dioxin and metalloproteinases* acceso personal a Informe Científico).
- [12] The Determination of Sulfur Gases in Point Source Emissions of a Pulp Mill. Norman Kirshen, Danielle Beland and Elizabeth Almasi. Varian Chromatography Systems. Varian Application Note Number 42.
- [13] C.J. Koster and R.A. Hites, Wet and dry deposition of chlorinated dioxins and furans. *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26, 1375-1382, (1992).
- [14] M. C. Mirabelli, S. Wing, Proximity to pulp and paper mills and wheezing symptoms among adolescents in North Carolina (USA), *Environmental Research*, 2006, 102, 96-100.
- [15] A. Mayani, S. Barel, S. Soback, M. Almagor, Dioxins concentrations in women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 1997, 12, 373-375.
-

El control del posicionamiento de los huéspedes en las cavidades de las nanocápsulas anfitrionas

Eduardo A. Castro*

En el campo de la química supramolecular las reglas que determinan el posicionamiento de las moléculas huéspedes que se encuentran encerradas dentro de las supramoléculas anfitrionas todavía no han sido totalmente establecidas. Este conocimiento es importante porque estos sistemas podrían ser utilizados extensamente en áreas tales como la catálisis, la liberación de drogas, la síntesis química limpia y la ciencia de la separación. Asimismo, las nanocápsulas autoensambladas que albergan un huésped también pueden servir como modelos apropiados en el estudio de sistemas biológicos complejos, tales como los virus.

Visto la importancia del tema, muchos equipos de trabajo de químicos supramoleculares están investigando el modo de disposición interna de los huéspedes en las cavidades anfitrionas de las nanocápsulas y también se encuentran desarrollando métodos que pueden ser utilizados para manipular en tales ámbitos a los huéspedes. La comprensión detallada de la acción recíproca y orientaciones relativas de las moléculas huéspedes hasta el presente ha estado restringida

a unas pocas instancias de complejidad limitada [1]. Así, se han descrito dos avances importantes relacionados con las nanocápsulas con volúmenes interiores entre 1,2 y 1,5 Å. En primer lugar, se demostró que es posible ordenar a los huéspedes en el interior de esas cápsulas. Luego se demostró que estas cápsulas grandes se comunican entre ellas, al menos en el estado sólido y probablemente en solución, a partir de la formación de uniones por puentes de hidrógeno intercapsulares. Esta clase de comunicación conduce a un ordenamiento completamente distinto de los huéspedes dentro de las cápsulas respecto de lo que sucede cuando tales uniones no existen.

Se estudiaron tres materiales cristalinos monocapsulares. Las monocápsulas en cada material son hexámeros globulares consistentes de seis bloques constitutivos macrocíclicos ligados entre sí por 72 uniones hidrógeno. Los bloques constituyentes son moléculas de pirogalol[4]-areno que tienen diferentes cadenas alquílicas para cada una de estas 3 clases de materiales. Las nanocápsulas se forman cuando el acetato de etilo se evapora a partir de una solución de este compuesto de los bloques macrocíclicos. El análisis de difracción de

rayos X de cristales simples revela que cada clase de nanocápsula contiene 6 moléculas huéspedes de acetato de etilo y una sola molécula de agua. Se pudieron presentar una serie de estructuras notables de rayos X de cápsulas moleculares examéricas. También se pudo demostrar que las interacciones entre las cápsulas influyen en el modo de encapsulamiento de las moléculas de acetato de etilo en la cavidad en lo referente a la orientación. Cuando no hay comunicación entre las cápsulas las 6 moléculas de acetato de etilo están orientadas de manera tal que los grupos metilo apuntan hacia la base de los macrociclos. Pero cuando las cápsulas se comunican, las moléculas de acetato de etilo se reorientan. Este fenómeno también se encuentra en los sistemas biológicos.

El interés de las cápsulas moleculares no covalentes, específicamente aquellas basadas en las uniones hidrógeno, surge a partir de la capacidad para aislar reversiblemente a los anfitriones encapsulados de su entorno. Las cápsulas diméricas ligadas por puentes de hidrógeno basadas en calixarenos sustituidos fueron informadas por vez primera en 1995.

Pero el interés en cápsulas más grandes nació en 1997 [2], cuando se demostró que el

* INIFTA, División Química Teórica, Sucursal 4, Casilla de Correo 16, 1900 La Plata, Argentina
e-mail: castro@quimica.unlp.edu.ar

C-metilresorcin[4]areno forma una cápsula examérica con 8 moléculas de agua en el estado sólido y se logró evidencia de que la estructura de la cápsula se mantiene en solución. En 2001 se mostró que el C-undecilresorcin[4]areno forma cápsulas examéricas conteniendo sales de amonio en solución de cloroformo.

Actualmente, se está usando la espectroscopía de resonancia nuclear magnética (NMR) de difusión para estudiar la estructura de las nanocápsulas en solución y para probar el proceso de encapsulamiento. La NMR difusional es una herramienta poderosa para caracterizar a las super-estructuras de multicomponentes, tales como las cápsulas examéricas en solución. En efecto, ahora se puede probar la naturaleza examérica de esas cápsulas, determinar la estabilidad relativa de ellas y el papel de las moléculas de agua en distintos arreglos y finalmente determinar el auto-reconocimiento del proceso de auto-ensamblaje.

Esta técnica se empleó para estudiar el autoensamblaje y las propiedades huésped-anfitrión de los resorcin[4]arenos y pirogalol[4]arenos. Así, se pudo probar que, en contraposición a lo que se suponía hasta el presente, los autoensamblajes del C-undecilresorcin[4]areno cambian espontáneamente a una cápsula examérica en soluciones de cloroformo saturadas de agua. Las medidas de difusión permiten determinar inequívocamente que las 8 moléculas de agua forman parte de la estructura de la cápsula examérica en analogía con la estructura encontrada en el estado sólido.

Un aspecto interesante es la demostración por medio de esta técnica que cuando las cápsulas de agua y hexámeros encapsula una sal de amonio, tal como el bromuro de tetraetilamonio, las 8 moléculas de aguas se separan de la estructura. También se comprobó que el isobutil análogo del resorcin[4]areno y del C-isobutilpirogolol[4]areno y su análogo unde-

cílico forman todos ellos cápsulas examéricas en solución. Las moléculas de agua no son parte de la superestructura capsular de pirogalol[4]areno examérico. Las cápsulas contienen alquilaminas terciarias pero no sales de amonio, en tanto que las cápsulas del resorcin[4]areno contienen tanto a las aminas como a las sales de amonio en soluciones de cloroformo.

Además, los estudios por NMR difusional revelan que cuando las cápsulas de pirogalol[4]areno se protonan en solución de agua-cloroformo, las alquilaminas terciarias son eyectadas y las moléculas de cloroformo ingresan a las cápsulas. Esto ha permitido concluir que las cadenas alquílicas en las cápsulas examéricas tienen poca influencia sobre las características de las cápsulas, en tanto que el número de grupos hidroxilos poseen un efecto muy marcado.

Recientemente se utilizó la NMR difusional para investigar las propiedades del auto-ensamblaje y el auto-reconocimiento de las cápsulas formadas por dos macrociclos diferentes [3]. Se demostró que las cápsulas heteroexaméricas se forman a partir de soluciones de dos resorcin[4]arenos a dos pirogalol[4]arenos dejándolas en contacto un tiempo suficiente o calentándolas para acelerar el proceso de formación. También se pudo constatar que los heteroexámeros sólo se forman cuando se mezclan macrociclos del mismo tipo. Por ello, al mezclar cápsulas de resorcin[4]areno con cápsulas de pirogalol[4]areno, no se detectan heteroexámeros.

Una de las razones por la cual hay un gran interés en los ensamblajes del resorcin[4]areno y pirogalol[4]areno es que poseen grandes dimensiones. En efecto, ellas son las cápsulas más espaciales que se conocen en la actualidad. Esto facilita la captura de un rango más amplio de moléculas y también un mayor número de ellas. El contenido de una cápsula se puede descri-

bir en términos de su isomería orientacional, o sea la orientación relativa que dos o más moléculas presentan una respecto de la otra, y su isomería posicional, que es la posición relativa que presentan 2 ó más moléculas una respecto de la otra. El control de la constitución, posición y orientación de los huéspedes encapsulados es una función de la dimensión de la cápsula. Cuanto más grande es la cápsula más cuesta controlar los contenidos pues la moléculas huéspedes pueden estar más alejadas a las paredes capsulares.

Un grupo de trabajo ha preparado dímeros formados por autoensamblajes de moléculas con forma de contenedores (cavitantes) que poseen un esqueleto de tipo resorcina-reno, una envoltura exterior de 8 ácidos carboxílicos y un bolsillo interno con características hidrofóbicas. Las cápsulas díméricas son más pequeñas que las cápsulas examéricas descritas anteriormente. En un trabajo reciente, se emplearon técnicas de espectrometría de fluorescencia y métodos fotoquímicos para examinar las zonas interiores de las cápsulas díméricas y se investigó la capacidad de las cápsulas para ejercer una influencia en el resultado de las fotoreacciones de los huéspedes encapsulados [4]. Se usó el efecto hidrofóbico para autoensamblar las cápsulas en agua. Al desarrollar las reacciones de fotólisis dentro de las cápsulas, los radicales generados se reorientan para ubicarse de manera más eficiente dentro de la cavidad antes de recombinarse para dar lugar a productos que no se pueden formar en soluciones libres.

La mayoría de los compuestos orgánicos generalmente son menos solubles o directamente insolubles en agua. Los huéspedes solubles en agua, tal como el octa-ácido, se desempeña como un transportador para solubilizar en agua a los compuestos orgánicos y con ello facilitar la química selectiva bajo condiciones ambientales amigables. El

propósito de estos trabajos es apelar al uso de la luz y el agua para controlar el comportamiento de las moléculas orgánicas durante el transcurso de las reacciones fotoquímicas. El nanoentorno interior de la cápsula formada a partir de dos moléculas cavitantes está esencialmente seco y es a prueba de fugas acuosas en la escala de tiempo de la fotólisis de los estados excitados de las moléculas reactantes. Las cápsulas no sólo permiten desarrollar las reacciones de fotólisis en agua sino también controlar el resultado de las reacciones con selectividades comparables a aquellas que se efectúan en el estado sólido.

En un trabajo recientemente publicado [5] se ha investigado la influencia de la rotación mecánica de una molécula huésped en una cápsula dimérica unida por enlaces hidrógeno por la presencia de otra molécula huésped distinta. Así, se co-encapsularon moléculas de [2,2]-paraciclofano con otras moléculas de dimensiones diferentes, tal como el cloroformo ó ciclohexano, en cápsulas consistentes de dos subunidades de la tetraimida del resorcinareno. Esto ha permitido concluir en forma tentativa y a partir de datos limitados, que los huéspedes más grandes frenan la velocidad de rotación del huésped paraciclofano. Y en forma inversa, las fuerzas atractivas entre co- huéspedes podrían acelerar esa rotación empujando al [2,2]-paraciclofano hacia el centro de la cápsula.

En otro trabajo vinculado al anterior, se apeló al uso de la espectroscopía de RNM para investigar la cinética y la termodinámica del proceso de encapsulación por puentes de hidrógeno en solventes próticos, tal como el dodecano y el naftaleno [6]. Se pudo de-

mostrar que las velocidades de asociación-disociación de la cápsula son comparables a las velocidades de intercambio de huéspedes voluminosos en el proceso de entrada-salida. Los resultados sugieren que el intercambio del huésped sucede por disociación completa de la cápsula en los solventes próticos.

Otro reciente artículo acerca de los procesos de ingresos y egresos en las encapsulaciones moleculares, consideró el mecanismo de intercambio de huéspedes con cápsulas formadas reversiblemente en solventes orgánicos no-próticos [7]. Las primeras propuestas que involucran la disociación completa del agregado, el intercambio con solutos o solventes y la posterior recombinación, es muy probable que no sean correctas. En tal sentido, ahora se propone que el mecanismo de intercambio del huésped probablemente involucre la apertura de alas en los cavitandos que se unen entre sí para formar las cápsulas.

Haciendo una proyección hacia el futuro, se puede señalar la existencia de tres grandes áreas de trabajo en esta especialidad: tecnología de transferencia, materiales y modelado del comportamiento celular y viral. El uso de nanocápsulas para la tecnología de transferencia puede vislumbrarse para las drogas en las aplicaciones más elegantes y también para los herbicidas, los pesticidas y los cosméticos. Por ejemplo, un campo interesante es la encapsulación de drogas con moléculas pequeñas, que se transfieren en sitios específicos mediante el proceso de derivatizar el exterior de las cápsulas. Esta metodología posee un gran potencial para revolucionar la terapia por drogas con esta clase de cápsulas.

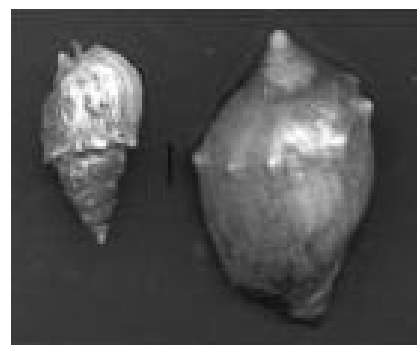
Las cápsulas también pueden alojar porciones bien definidas de materiales magnéticos. Entonces, la manera en que la cápsula acoge a esos materiales se constituye en el punto central de la organización de las sustancias magnéticas. Se debe destacar que ya se han producido avances significativos en el desarrollo de arreglos extensos en forma esférica con diámetros de cerca de 80 nm y grandes tubos con diámetros de alrededor de 20 nm y longitudes tan extensas como 500 nm. Estas estructuras están basadas en cápsulas como bloques constitutivos.

Finalmente, hace falta contar con sistemas modelo en forma urgente para estudiar a los sistemas celulares y virales. Las cápsulas están llamadas a realizar una contribución importante en este campo de especialización visto la variedad de efectos que tienen lugar en estos ensamblajes y sus huéspedes, así como la disponibilidad creciente de nuevos conocimientos acerca de ellos.

REFERENCIAS

- [1] G. W. V. Cave, J. Antesberger, L. J. Barbour, R. M. McKinlay, J. L. Atwood, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5263-5266.
- [2] L. R. Macgillivray, J. L. Atwood, *Nature* **1997**, *389*, 469-472.
- [3] L. Avram, Y. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11556-11563.
- [4] L. S. Kaanumalle, C. L. D. Gibb, B. C. Gibb, V. Ramamurthy, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14366-14367.
- [5] A. Scarso, H. Onagi, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12728-12729.
- [6] T. Amaya, J. Rebek, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14149-14156.
- [7] L. C. Palmer, J. Rebek, Jr., *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 3051.

Aditivos anti-incrustantes en pinturas y sus efectos sobre organismos marinos



N. Sbarbati Nudelman*

Los compuestos orgánicos de estaño ("organotins", OTs) tienen un uso industrial muy abundante, uno de los más difundidos es su empleo como aditivos en pinturas de grandes barcos, sondas marinas, sistemas refrigerantes, etc y en polímeros de usos diversos. El acrónimo TBT (del inglés "tributyltin") se utiliza para denominar a un considerable número de compuestos de trialquil-estaño, siendo los contra-iones más comunes: metacrilato, cloruro y óxidos. Sus usos más intensivos son: como aditivos anti-incrustantes ("anti-fouling") en pinturas, como estabilizantes (luz y calor) en polímeros de PVC, en la industria de plásticos, y como preservantes de maderas. Se entiende por "fouling" en inglés (que se podría traducir como incrustaciones, en un sentido amplio en este contexto) el depósito y crecimiento de una variedad de organismos marinos sobre estructuras inmersas en agua de mar, tales como: bases de los barcos, embarcaciones, guarderías marinas, equipos sonar; cañerías de enfriamiento por agua de mar, etc lo que causa muy serios problemas [1, 2].

Los derivados de TBTs son compuestos extremadamente dañinos, son los compues-

tos más tóxicos deliberadamente introducidos por el hombre en el ambiente [3]. La literatura reciente [4] es muy abundante en la información de severos daños causados por TBTs, incluso a concentraciones de pocos nanogramos por litro, y en los países desarrollados es, en la actualidad, el tópico más conspicuo de discusión pública referida a la protección ambiental de los puertos [5]. En la última reunión del Comité de Expertos de Productos Químicos (CCRC) de la Convención de Róterdam (RC), celebrada en Ginebra en febrero 2006, se recomendó agregar a los TBTs a la lista de compuestos PICs [6].

ANTECEDENTES

Los organismos que se adhieren a las estructuras comprenden una variedad de especies que incluye: algas, bacterias, protozoos, moluscos, poliquetos, etc. Estos organismos se fijan eficazmente al sustrato desarrollando un rápido crecimiento y vasto potencial reproductor. Como consecuencia, se producen daños sobre estructuras móviles y estacionarias afectando a embarcaciones, plataformas petrolíferas o de gas, plantas de conversión de energía térmica, instrumentos de investigación oceanográfica, y equipos de sondas subacuáticas. También

daña las instalaciones de acuicultura (acuarios, jaulas, conductos, bombas) y a los propios organismos cultivados [7]. Además, el "fouling" acelera los procesos de corrosión de los materiales y provoca pérdidas en la eficacia operativa de las estructuras. Así, en las embarcaciones se incrementa la fricción entre el casco y el agua lo que conduce a un aumento del consumo de combustible (hasta un 40-50% con un fouling poco denso) y la pérdida de velocidad y capacidad de maniobra. Un barco no protegido puede acumular, durante seis meses en el mar, hasta 150 kg de estos organismos por metro cuadrado lo que en un petrolero con 40.000 m² de obra viva supone incrementar su peso en 6.000 tm. Todo ello se cifra en cuantiosas pérdidas económicas [7].

Por esa causa, y desde hace mucho tiempo, distintos biocidas se han utilizado como anti-incrustantes, entre los cuales merecen especial mención los derivados de sales de cobre como principal biocida, pero también se usaban aditivos con arsénico y con DDT. A partir de la década del '60 se introdujeron aditivos basados en compuestos organoestánicos, mucho menos dañinos que los anteriores. En los '70 las pinturas con TBTs, especialmente en la formulación con copolímeros auto-limpiantes (SCP), marcaron un impacto revolucionario en la in-

* Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

dustria de los grandes barcos; para mediados de los '80 ya se usaban en el 80% de toda la flota comercial mundial. Como resultado, la producción de compuestos organo-estánicos que era de 50 tm en los '50 superó las 40.000 tm a mediados de los '80. El impacto económico fue tan importante que no puede soslayarse. En la tabla 1 se muestran algunos índices comparativos. Antes de la introducción de TBTs, los barcos debían pintarse cada año, (pues ya a los 6 meses gastaban un 40% más de combustible), con pinturas con TBT el mantenimiento se redujo a pintura cada 8-10 años [8]. El ahorro financiero debido a la mayor eficiencia del combustible; reducción en los costos de mantenimiento; períodos mucho más prolongados de tiempos hábiles; etc. supera los 3 billones de u\$/año para la flota mercante marina [9].

un impactante trabajo publicado recientemente [11] revela niveles de concentración detectable de TBT aún en el polvo hogareño del 50% de las casas analizadas en Berlín y Hamburgo, datos similares se han obtenido también en Inglaterra y en Holanda.

EFFECTOS EN ORGANISMOS VIVOS

Los derivados de TBTs causan a los seres vivos (desde bacterias a peces) una amplia gama de efectos dañinos desde subletales hasta letales, tales como: daños al ARN, neurotoxicidad, alteraciones en el crecimiento, producción de anomalías anatómicas y reproductoras, bioacumulación tisular e inducción de cambios de comportamiento. Los macroinvertebrados que resultan más afectados son los moluscos debido a su alta

década del '80 se detectaron los primeros daños causados por el TBT: la deformación de las ostras del Pacífico *Crasostrea gigas* tuvo un gran impacto público y político: el engrosamiento de la concha provocó una disminución del tamaño del cuerpo inaceptable para fines comerciales y una declinación en las ventas de ostras provenientes de zonas de Francia. Abundantes publicaciones actuales y de la década del '90 informan la observación de calcificaciones de conchas en especies de Nueva Zelandia, Australia, Canadá, Japón y España. Otro de los efectos notorios e impactantes de la contaminación por TBT es el llamado "imposex", descrito como la superposición de caracteres sexuales masculinos sobre las hembras, la cual se manifiesta por la formación de un pene y vaso deferente que bloquea la salida de las cápsulas de huevo, de forma tal que las hembras se vuelven funcionalmente estériles, la acumulación de cápsulas abortadas puede conducir a la muerte del animal, llevando, a la extinción local de esas especies. El primer informe de extinción correspondió a *Nucella lapillus* en la costa de Inglaterra [13], la más reciente a *Nucella lima* en Vancouver [14]. Omae [1] recopila la observación de "imposex" en 140 especies de gasterópodos a las que deben agregarse dos especies de la zona de Mar del Plata [2] y otras dos en el sur de la Patagonia. Colegas de Brasil y Chile, nos han informado sobre casos de "imposex" observados en especies de Fortaleza y de la Bahía de Guanabara (Brasil), y en varios sitios de la costa chilena, respectivamente. Varias especies de moluscos chilenos muy apreciados por su parte comestible, han mostrado índices del orden de 100% en varios sitios, lo que está provocando la extinción de esas especies.

Casi todos los artículos publicados hasta el presente, describen daños causados por TBT en especies marinas, no obstante nosotros hemos informado sobre los efectos tóxicos del TBT en especies de agua potable. Tra-

Tabla 1. Cuadro comparativo de las ventajas económicas de aditivos de TBT

Antecedentes	Consideraciones económicas del "fouling"
➤ '60 Pinturas basadas en estaño	➤ Consumo de combustible: aumenta 40 % en 6 meses debido al "fouling" (incrustaciones)
➤ '70 copolímeros autolimpiantes	➤ Limpieza y re-pintado frecuentes (6-8 meses)
➤ '80s más del 80% de los barcos usan estas pinturas	➤ Pérdida de rédito por demoras en diques-secos
Producción de Organoestánicos	Barcos pintados con aditivos de TBT
➤ '50 : aprox. 50 ton/año	➤ 2-4 veces mayor eficiencia del combustible
➤ '90 : 60.000 ton/año	➤ Menor mantenimiento (pintura 8-10 años)
➤ Mercado actual TBT > USD 3.000 millones	➤ Reducción de tiempo en diques-secos.

Las pinturas basadas en TBT se usan en embarcaciones de todos los tamaños y en muchas otras estructuras inmersas en agua marina, lo que ha provocado una dispersión global de TBTs en el ambiente marino desde las zonas costeras hasta el océano abierto [10]. Publicaciones recientes demuestran que la contaminación con TBT dejó de ser un problema exclusivo de las zonas costeras,

tasa de bioacumulación y a su baja tasa de depuración. Dentro de éstos, los grupos más sensibles son gasterópodos y bivalvos. Trabajos recientes informan del hallazgo de TBT también en peces y en sangre humana [12].

Los daños más importantes en organismos marinos son: engrosamiento de concha en ostras e "imposex" en gasterópodos. En la

bajando con *Euglena gracilis* y con *Chlorella* hemos determinado que los efectos observados (medidos por la velocidad de crecimiento y el contenido de clorofila) eran dependientes de la concentración de TBT en el medio [15]. Este trabajo fue el primer informe de la literatura sobre toxicidad de TBTs en especies de agua dulce, recientemente se publicó el efecto deletéreo de trifenil-estaño en el alga *Spirulina subsalsa*. Además de los efectos de *imposex* en numerosas especies de gasterópodos, también se ha informado sobre el hallazgo de TBT en músculo y/o hígado de salmón, atún y aún en ballenas del tipo *Beluga*. En nuestro laboratorio desarrollamos un método para la determinación de TBT también en muestras biológicas y detectamos la presencia de TBT en hígado de *Buccinanops monilifer* y de *Adelomelon brasiliana* [16]. Por otro lado, en ovicápsulas (huevos) de *A. brasiliana* colectados en la zona del puerto de Mar del Plata determinamos concentraciones de TBT muy importantes aún en huevos de estadíos tempranos de embriogenesis [2].

ESTUDIOS REALIZADOS EN LA COSTA ATLÁNTICA DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

El objetivo de este estudio estuvo dirigido al relevamiento de la contaminación costera por TBTs en la provincia de Buenos Aires. Debido a su gran actividad pesquera y portuaria algunos puertos de la provincia se han convertido en sitios de alta contaminación, y no existe reglamentación nacional ni regional sobre estos aditivos en ningún aspecto de la actividad marítima. Los sitios de muestreo se indican en la Figura 1.

A fin de comprobar el grado de relevancia del problema, se tomaron muestras de agua, sedimentos y biota (caracoles y cápsulas de huevo de *A. Brasiliana* y *Buccinanops monilifer* (ver fotos arriba) del Puerto de Mar del Plata (en la zona de gran tráfico de

barcos), de la escollera norte, y de la playa. También se muestreó una zona de escasa navegación ubicada en la localidad de Mar Chiquita, y por último en Valeria del Mar. Se identificó claramente la presencia de *imposex* en *Buccinanops monilifer* en la zona de Mar del Plata. La determinación del sexo se realiza por la presencia/ausencia de la glándula de la cápsula-albúmina. Se mide la longitud del pene (LP, en mm) en machos y hembras con *imposex*.

Se calcula el porcentaje de *imposex*:

$$\% \text{ Imposex} = \left[\frac{(\text{♂} \ominus)}{(\text{♀} + \text{♂} \ominus)} \right] * 100$$

♂ \ominus representa el número de hembras con *imposex*.
 ♀ \ominus el número de hembras con *imposex*.

El Índice RPL (índice relativo de longitud del pene) se calcula como:

$$\text{Índice RPL} = \left[\frac{X \text{ LP}_{\text{♀}}}{X \text{ LP}_{\text{♂}}} \right] * 100$$

$X \text{ LP}_{\text{♀}}$ es la longitud media del pene total de hembras.

$X \text{ LP}_{\text{♂}}$ es la longitud media del pene en machos.

El porcentaje de *imposex* en las muestras estudiadas recogidas en diversas horas y en diferentes áreas de Mar del Plata, varía en-

tre 33.3% a 85.7% [17]. Los especímenes de *A. Brasiliana* recogidos de la misma área también demostraron la presencia de *imposex*, con una variación porcentual de 38.9-50% [17]. Las mismas especies colectadas en el área de Mar Chiquita no mostraron signos de *imposex* y, coincidentemente, no se detectó TBT en muestras de sedimento y agua de la zona.

Es importante tener en cuenta que el puerto de Mar del Plata alberga la flota costera más importante de la industria pesquera Argentina, constituida por cerca de 200 barcos y concentra 82.5 % de los desembarcos de pesca de la provincia de Buenos Aires, el puerto tiene además una flota mercante de alrededor de 100 barcos [18]. Los valores encontrados de TBT en agua y sedimentos de esta zona se resumen en la Tabla 2.

Se puede apreciar en la tabla, que las muestras provenientes de Mar del Plata muestran altas concentraciones de TBT, por encima de las informadas en otras partes del mundo [19], lo que refleja los altos niveles de contaminación y la falta de un adecua-

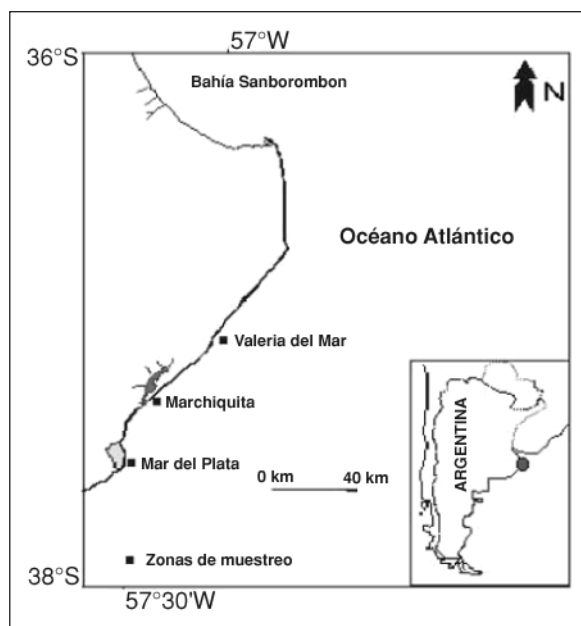


Figura 1. Las zonas sombreadas indican lugares de recolección y toma de muestras

Tabla 2. Concentraciones de TBT determinadas en muestras de agua y sedimento

Muestra	Concentración de TBT ^a		Sn total ^b	
	Agua	Sedimentos	Agua	Sedimentos
	ng L ⁻¹	ng g ⁻¹	ng L ⁻¹	ng g ⁻¹
1	Playa de Mar del Plata	180	160	
2		190	240	
3	Costa de Mar del Plata	200	no determin.	195
4		400	no determ.	405
5		300	no determ.	
6	Puerto de Mar de Plata ^c	4800 ^d	4300	
7		8000 ^d	6500	7900
8		7500 ^d	5000	6400
9	Escollera Norte	4800	1300	4780
10		4000	1100	
11		4500	1400	
12	Mar Chiquita	0	0	
13		0	0	
14	Valeria del Mare	0	2.5	
15		0	0	

^a Concentración expresada como ng Sn. Límite de detección para cuantificación: 80 ng/L. ^b Sn total determinado por H G A A S. Error \pm 5%. ^c Zona de gran actividad naviera del puerto de Mar del Plata ^d Líquido sobrenadante de sedimento profundo. ^e Las muestras fueron recolectadas luego de una sudestada (tormenta común en la zona con fuertes vientos del sur).

do control, existentes en dicho puerto. Por otro lado, no se detectó TBT en muestras de agua provenientes de la zona de Mar Chiquita, y escasa contaminación en la zona de playa de la vecina Valeria de Mar.

Los valores de TBT en el sedimento son un tema muy importante debido a su acumulación y persistencia. En contraste con su relativamente rápida degradación en agua marina (los tiempos van desde semanas y hasta meses [20]), esta probado que TBT tiene una vida media en sedimentos que va de 0.9-5.2 años [21], por lo que la concentración de TBT en sedimentos suele ser mucho mayor que la encontrada en agua. Los valores hallados en zonas de playas de Mar del Plata no son mucho mayores a los encontrados en muestras de agua lo que sugiere que la contaminación en esta área es reciente. Por otro lado, en la zona de la escollera norte (donde el tránsito de barcos es intenso y la renovación de las aguas está

restringida) y del puerto, los valores de TBT encontrados en el sedimento son muy elevados, no se encuentran antecedentes de valores tan altos en la literatura actual. Los estudios en el puerto de Mar del Plata, revelaron índices de TBT promedio de 4800

ng/l en agua y 6500 ng/g en sedimentos; índices tan altos revelan una acumulación de TBT de, por lo menos, 15 años [2].

Los datos obtenidos del análisis de las muestras de biota se muestran en la tabla 3

Tabla 3. Concentración de TBT determinadas en huevos ^a

Estadio de Desarrollo	Fase sólida ng / ovicaps.	Fase líquida	
		ng mL ⁻¹	ng / ovicápsulas
0	14.2 ^b	3.2	250
		2.9	240
0	41.8 ^b	5.6	437
		4.2	328
1	390 ^c	7.1	618
		2.4	213
		5.3	460
3	1180 ^d	5.3	683
		6.0	484
3	800	6.8	5.0
		548	456

^a Concentración expresada como ng Sn según ref. ^b Sólido disperso. ^c Fase sólida poco abundante. ^d Ambas fases tenían límites agudos

En este estudio las cápsulas de huevo de la especie *A. brasiliana* se recolectaron en la zona alemana a las áreas de mayor contaminación, determinándose la concentración de TBT en la fase líquida y también en la fase sólida. Como se deduce de la tabla 3 aun en los estadios más tempranos de la embriogénesis, TBT está presente en la fase líquida, así también como en la fase dispersa; de hecho, la cantidad de TBT encontrado en cada huevo es mayor en la fase líquida que en la fase dispersa. Es muy probable que si los huevos maduran, los gasterópodos recién nacidos muestren un alto grado de imposex, y otros desórdenes producidos por la acción de los compuestos organoestánicos. Aún cuando estas ovicápsulas son permeables, las concentraciones observadas en estadios de desarrollo 0 son mucho mayores a aquéllas determinadas en agua, lo que sugiere que el TBT puede ser transferido desde los gasterópodos hembra a los huevos. Nuestro trabajo es el primer informe en la literatura del hallazgo de TBT en huevos y reviste una importancia ambiental muy relevante: la observación de que la concentración de TBT en ovicápsulas es mucho mayor que la determinada en el ambiente de la misma zona, sugiere la transferibilidad del TBT de la madre contaminada al huevo [2].

La casi extinción de *B. monilifer* y la notable disminución en la población de *A. brasiliana* deja en claro la necesidad de un control del riesgo ambiental asociado a la contaminación con TBT y la necesidad urgente de regular el uso de las pinturas anti-incrustantes basadas en compuestos organoestánicos, al menos en su uso en botes de pesca y paseo, así también como controlar la limpieza y el re-pintado de botes a lo largo de la costa de Mar del Plata.

ESTUDIOS PRELIMINARES EN LA COSTA PATAGÓNICA

En el marco de un proyecto coordinado por

el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente, se comenzó un relevamiento de la contaminación por TBT en la costa patagónica, en colaboración con equipos de trabajo de la zona. Debido a la gran actividad pesquera y/o mercante, muchos puertos de la patagonia se han convertido en verdaderas zonas de riesgo, incluso se ha determinado la presencia de un importante porcentaje de imposex en algunas especies. Por lo tanto, los resultados de estos estudios serán de importancia en la toma de decisiones sobre la reglamentación que se debe adoptar a fin de preservar la fauna marina. Se han procesado muestras de agua y sedimentos provenientes de sitios en las zonas de San Antonio Oeste (Río Negro), Comodoro Rivadavia y Puerto Madryn, (Chubut) y se proyecta extender este estudio a diferentes sitios a lo largo de la costa patagónica. En la zona de Comodoro Rivadavia, las muestras se tomaron en el Puerto y en una zona más alejada, mientras que en la provincia de Chubut, las muestras se tomaron en Puerto Madryn, en el puerto Almirante Storni y en el Muelle de Piedrabuena. En todos los sitios muestreados se detectó la presencia de TBTs.

Simultáneamente, se están realizando estudios de *imposex* en especies de diversos sitios de la costa patagónica. Se ha detectado la presencia de imposex en *Buccinanops globulosum*, y su distribución en dos bahías patagónicas: Bahía San Antonio (Golfo San Matías) y Bahía Nueva (Golfo Nuevo) [22]. Los estudios se complementaron con mediciones de estaño total en sedimentos marinos superficiales de la zona intermareal y en tejidos de caracol, y de tres metales en sedimentos (Zn, Pb y Cu). Se determinó la concentración de estaño en sedimentos y tejido de *B. globulosum* por plasma de acoplamiento inductivo (ICP). El mismo método fue aplicado para la medición de Zn, Pb y Cu en sedimentos. Pudo correlacionarse el porcentaje de imposex con el contenido de estaño. La concentración de estaño en

tejido fue mayor en las zonas portuarias que en los sitios control de ambos golfos. La concentración del estaño total estuvo correlacionado con el biodisponible (coeficiente de correlación = 0,87; $P < 0,05$). Tanto en la fracción biodisponible como total, se encontró una correlación significativa entre el estaño y el cobre ($P < 0,05$). Este resultado es de significativo interés dado que el cobre es otro de los componentes que se emplea en las pinturas anti-fouling. Los resultados preliminares sugieren que *B. globulosum* desarrolla modificaciones morfológicas del aparato reproductor en zonas costeras con impacto antrópico, particularmente en áreas portuarias, estas malformaciones se relacionan con la presencia de TBT. Los estudios de imposex ya realizados demuestran que *B. globulosum* puede emplearse como bioindicador de contaminación por TBT en la zona norte de Patagonia.

Si bien los resultados son aún parciales se puede observar la tendencia a una mayor concentración de TBT en zonas de mayor actividad, donde ya se han detectado casos de imposex. Pese a que los niveles determinados son más bajos que en las costas de Mar del Plata, los estudios muestran la presencia de TBTs en todos los sitios muestreados. Es necesario realizar mayor cantidad de análisis tanto en agua como en sedimentos: en diferentes épocas del año y con regímenes de marea variable de forma de poder tener una imagen completa de la variación de los niveles de contaminación en la costa patagónica.

ESTUDIOS EN AMBIENTES DE AGUA DULCE

Tomando en cuenta los efectos de TBT que habíamos observado en especies de agua dulce [15], fue de interés realizar análisis de muestras en tales ambientes. Se analizaron muestras provenientes de la Laguna de Chascomus, en la provincia de Buenos Aires. (Figura 2)

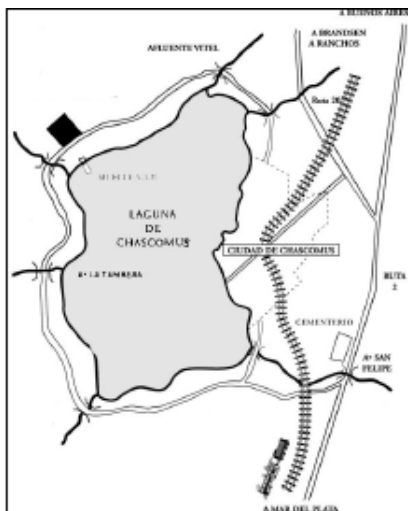


Figura 2. Laguna de Chascomús

Se tomaron muestras de la zona de mayor actividad de pequeños veleros, y de la zona de la playa. Los resultados arrojaron valores de TBT, del orden de los 2-3 ng/l en la zona de la playa, y de aproximadamente 4 ng/l en la zona de mayor tránsito y actividad naviera. Si bien estos contenidos de TBT son, naturalmente, menores que en zonas portuarias, ellos demuestran que aún en espejos de agua dulce donde la actividad naviera es muy reducida, la presencia de TBT es real y que la diseminación de este contaminante ambiental no sólo está limitada a puertos de gran envergadura o con gran actividad. Estos resultados indican que no sólo la actividad de grandes barcos es responsable por la liberación de TBT al ambiente acuático sino que embarcaciones más pequeñas, y otras instalaciones fijas como tomas de agua o muelles pueden ser también responsables de esta contaminación. Limitar el uso de aditivos con TBT en las pinturas de estas estructuras es más sencillo de realizar, y es imperioso para evitar la diseminación de estos compuestos tóxicos, que pueden afectar seriamente la biodiversidad en ambientes sensibles.

Todos los estudios de toxicidad de TBT y de

determinaciones de TBT en el ecosistema, registrados en la literatura se refieren a países del Hemisferio Norte, en muchos de ellos hay control legislativo en la actualidad. Recientemente se publicó el primer estudio de monitoreo de TBT en caracoles de países asiáticos en desarrollo [23]; el estudio muestra que áreas contaminadas como Hong Kong, Malasia, India, las Filipinas y Tailandia tienen niveles de TBT comparables a los países desarrollados. De Latinoamérica existen las escasas publicaciones ya comentadas. La dispersión del TBT es un problema global y no hay reglamentación sobre su uso en ningún país de América Latina, por lo que son de fundamental importancia los estudios apuntados al relevamiento de la contaminación con TBT en diversos sitios así también como mostrar la dependencia entre la concentración observada en agua y sedimento, y los daños que está causando en especies marinas de la región [24].

CONCLUSIÓN

Tanto los abundantes estudios en países desarrollados como los realizados a nivel nacional, descritos en este capítulo, han demostrado que el uso de aditivos basados en TBTs como agentes anti-incrustantes ("anti-fouling") en pinturas de grandes barcos, yates, marinas, embarcaciones pesqueras, etc. y en la industria de plásticos, ha provocado una marcada contaminación en aguas y el ecosistema, y atenta seriamente sobre la biodiversidad de especies sensibles. Si bien todavía no se han informado efectos en el hombre, la presencia de TBT en músculo de atún, salmón, ballena, y aún en cabello y sangre humana, revelan la diseminación que ha alcanzado este tóxico ambiental. Por esa razón, en varios países desarrollados (e.g. la Unión Europea y Canadá) su uso está restringido y/o prohibido. Japón recientemente ha prohibido también la producción de TBTs y no permi-

te llegar a sus puertos barcos pintados con estos aditivos. Es deseable que las autoridades nacionales y regionales, como así también la industria pesquera y naviera, comiencen a restringir el uso de esos aditivos.

REFERENCIAS

- [1] I. Omae, *App. Organometal. Chem.* **2003**, *17*, 81.
- [2] R. Goldberg, A. Averbuj, M. Cledón, D. Luzzatto, N. S. Nudelman, *App. Organometal. Chem.* **2004**, *18*, 117-123.
- [3] R. J. Maguire, *Water Quality Res. J. Canada*, **2000**, *35*, 633.
- [4] a) C. Lee, T. Wang, C.Y. Hsieh, C. J. Tien, *Environ. Poll.* **2005**, *137*, 198-208. b) M. M. Santos, M. A. Reis-Henriquez, M. A. Vieira, M. Solé, *Ecotoxicol. Environm. Safety*, **2005**, *54*, 147.
- [5] M. Schaefer, *Water, Air and Soil Poll.* **2005**, *165*, 265-278.
- [6] NSN es la experta designada por la Cancillería Argentina en el CCRC, e integra el Bureau del RC como presidente del GRULAC (Grupo de América Latina y el Caribe).
- [7] M. Quintela Sánchez, *Cambio de sexo en moluscos gallegos*. *Consuma seguridad* **2002**, Nov. 27.
- [8] S. J. de Mora, *Tributillín: Case Study on an Environmental Contaminant*, Cambridge University Press, Cambridge, 1998, pág. 1-20.
- [9] European Chemical Industrial Council (CEPIC). *TBT Copolymer anti-fouling paints: the Facts The Organotin Environmental Project (ORTEP)*, 1992.
- [10] S. J. de Mora, S. W. Fowler, R. Cassi, I. Tolosa, *Mar. Poll. Bull.*, **2003**, *46*, 401-409.
- [11] a) H. Fromme, A. Mattulat, T. Lahrz, H. Ruden, *Chemosphere* **2005**, *58*, 1377-1383 b) W. Kersten; T. Reich; *Luft* **2003**, *63*, 85-91.
- [12] a) R. Catlin, H. Shah, A. Bankhurst, M. Whalen, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2005**, *20*, 395-403. b) S. Ohno; Y. Nakajima; S. Nakajin, *Steroids*, **2005**, *70*, 645-651.
- [13] P. E. Gibbs; G. W. Bryan, P. L. Pascoe, *Mar. Environ. Res.* **1991**, *32*, 79-87.
- [14] T. Horiguchi, Z. Li, S. Uno, M. Shimizu, H. Shiraishi, M. Morita, J. A. J. Thompson, C. D. Levings, *Mar.*

- Environ. Res.*, **2003**, *57*, 75-88.
- [15] M. A. Nudelman, C. Carro, N. S. Nudelman, *App. Organometal. Chem.*, **1998**, *12*, 117.
- [16] R. G. Goldberg, L. Peppas, M. L. Castelli, N. S. Nudelman, *J. Chromat.* **2005**, submitted.
- [17] P. E. Penchaszadeh, A. Averbuj, M. Cledon, *Mar. Poll. Bull.* **2001**, *42*, 790.
- [18] E. Errazti, M. I. Bertolotti, Frente Marítimo; **1998**, *17*, 63-71.
- [19] T. Suzuki, I. Yamamoto, H. Yamada, N. Kaniwa, K. Kondo. M. J. Murayama, *Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 304.
- [20] A. H. Jacobson, G. L. Willingham, *Sci. Total Environ.* **2000**, *258*, 103.
- [21] C. Stewart, S. J. de Mora S J, *Environ. Technol.* **1990**, *33*, 565.
- [22] N. S. Nudelman, C. Rodríguez, M. Narvarte, V. Willers, En *El agua en la Argentina: una visión desde la Academia*, Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Argentina, 2006, en prensa.
- [23] A. Sudaryanto, S. Takahashi, I. Monirith, A. Ismail, M. Muchtar, J. Zheng, B. J. Richardson, A. Subramanian, M. Prudente, N. D. Hue, S. Tanabe, *Environ. Toxicol. Chem.* **2002**, *21*, 2119-2130.
- [24] R. Goldberg., C. Rodríguez. N. Nudelman, *Environ. Tech.* **2006**, En redacción.
-

Nuevas oportunidades para productos bacterianos

Alejandra de Almeida, Beatriz S. Méndez y M. Julia Pettinari*

Las bacterias se caracterizan por su enorme diversidad y flexibilidad metabólica. Estas propiedades hacen que sean empleadas en diferentes procesos, en los cuales hacen gala de su capacidad de degradar, transformar o sintetizar diversos tipos de compuestos, con una eficiencia y especificidad que en muchos casos es imposible de lograr por métodos químicos.

Existen numerosos compuestos que son sintetizados actualmente en procesos fermentativos industriales, como los aminoácidos y las vitaminas.

Hay muchos otros productos que pueden obtenerse alternativamente por fermentación bacteriana o mediante otros procesos. En estos casos, la elección del método de obtención depende de diferentes factores, dentro de los cuales el costo del producto obtenido con cada uno suele ser el de mayor peso. Puede haber circunstancias que alteran el costo relativo de cada proceso de producción, haciendo que el que resulta el

más conveniente en un determinado momento no lo sea en otro contexto.

Un ejemplo de esto se encuentra en el caso de los productos que actualmente se obtienen a partir del petróleo o sus derivados. Debido a la última crisis del petróleo, que ha surgido hace unos pocos años y se piensa que irá en aumento, se plantea la necesidad de encontrar alternativas para la obtención de productos que actualmente se producen a partir del mismo.

APRENDIENDO A VIVIR SIN PETRÓLEO...CON LA AYUDA DE LAS BACTERIAS

Uno de los principales grupos de productos obtenidos del petróleo son los combustibles. Entre las alternativas de mayor aceptación y proyección está la utilización de biodiesel, obtenido a partir de aceites vegetales. Como subproducto de la obtención del biodiesel se producen grandes cantidades de glicerol, que puede ser luego utilizado como sustrato para la obtención de diferentes productos microbianos [1].

Por ejemplo, hay bacterias que acumulan

aceites (triacilglicéridos) utilizando residuos orgánicos como el glicerol como materia prima. De esta manera, el glicerol que proviene de la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales se utiliza como sustrato para el cultivo de bacterias con capacidad de acumular aceites, los que luego de ser extraídos se utilizan para producir biodiesel a través de reacciones de transesterificación. Este proceso bacteriano (biorefinería) acoplado a la producción de biodiesel primaria (a partir de aceites vegetales), permitiría el reciclado continuo del glicerol residual, además de contribuir en la obtención de aceites, que se piensa que van a ser el factor limitante si se encara la producción de biodiesel a una escala que permita el reemplazo de una parte significativa del gasoil utilizado en la actualidad. Además, existen actualmente desarrollos que analizan la producción de un biodiesel especial: el microdiesel, en bacterias recombinantes [2] utilizando diferentes tipos de sustratos orgánicos.

Otra alternativa es la utilización de etanol, puro o mezclado en distintas proporciones con otros combustibles, que por supuesto puede obtenerse a partir de procesos

* Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
E-mail: jul@qb.fcen.uba.ar

fermentativos utilizando diferentes tipos de microorganismos, tanto levaduras como bacterias, capaces de producir etanol a partir de numerosos sustratos.

Junto con los combustibles, los plásticos son los productos derivados del petróleo de mayor consumo e importancia económica, y también podrían ser reemplazados por productos de origen bacteriano. Existen polímeros de origen biológico que tienen propiedades similares a las de los plásticos tradicionales. Estos polímeros pueden obtenerse a partir de fuentes de carbono renovables, y, lo que representa una enorme ventaja adicional, son biodegradables.

LOS POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)

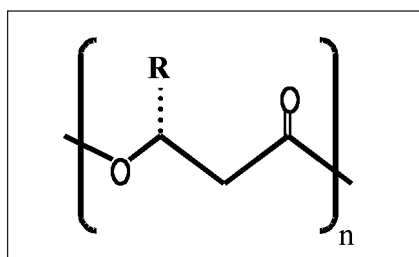


Figura 1. Estructura general de los polihidroxicanoatos

Los PHA son polímeros lineales de (R)-3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente (Figura 1). Los PHA se depositan intracelularmente en forma de cuerpos de inclusión y pueden llegar a representar más del 90% del peso seco de las células que los producen [3]. El primer PHA descubierto fue el poli(3-D-hidroxi butirato)(PHB), un homopolímero que fue detectado en la bacteria *Bacillus megaterium* en el año 1925 por Maurice Lemoigne. Hasta su descubrimiento, se ignoraba que las bacterias podían sintetizar poliésteres [4].

Posteriormente, se encontraron inclusiones de PHA en una extensa variedad de especies bacterianas, en las cuales el polímero actúa como reservorio de carbono y poder reductor, mejorando su capacidad de resistencia al estrés y su adaptabilidad a los cambios ambientales [5,6]. Los PHA han cobrado una gran importancia durante los últi-

mos años en el campo de la industria debido a sus propiedades termoplásticas. Por este motivo, han sido considerados como posibles sustitutos de los plásticos derivados del petróleo. Dependiendo del tipo de monómeros que los componen, los PHA pueden tener diferentes propiedades físicas (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades físicas de PHA y de polipropileno

Parámetro	P(EHB)	P(3HB-3HV)	P(3HB-4HB)	P(3HC-3HH)	PP
Tm (°C) ^a	177	145	150	61	176
Tg (°C) ^b	2	-1	-7	-36	-10
Cristalinidad (%)	70	56	45	30	60
Extensión hasta quebrar (%)	5	50	444	300	400

P(3HB) es poli(3-hidroxi butirato), P(3HB-3HV) es poli(3-hidroxi butirato-co-hidroxi valerato) conteniendo 20% 3HV, P(3HB-4HB) es poli(3-hidroxi butirato-co-4-hidroxi butirato) conteniendo 16% de 4 HB, P(3HC-3HH) es poli(3-hidroxi octanoato-co-3-hidroxi hexanoato), PP es polipropileno.

^a Tm es temperatura de melting.

^b Tg es temperatura de transición vitrea.

Tabla adaptada de Madison et al. 1999 [7]

Existen varios caminos metabólicos para la síntesis de PHA. El más difundido en la naturaleza es la biosíntesis de poli(3-D-hidroxi butirato) (PHB), cuya síntesis involucra tres enzimas: una b-cetotiolasa, que condensa dos moléculas de Acetil CoA para formar

Acetoacetyl-CoA, una Acetoacetyl-CoA reductasa, que convierte este compuesto en 3-hidroxi butiril-CoA, y una polimerasa, que polimeriza los monómeros (Figura 2). Este camino metabólico es el que utilizan la mayoría de las bacterias productoras de PHB.

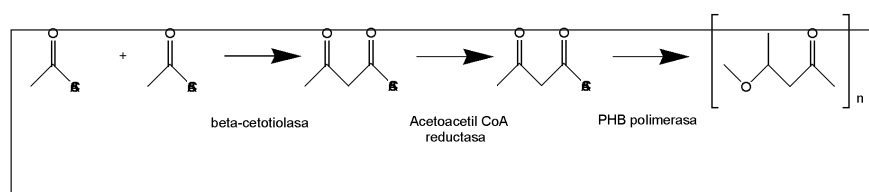


Figura 2

PLÁSTICOS TRADICIONALES VS. BIOPLÁSTICOS

Los bioplásticos pueden obtenerse por fermentación utilizando productos derivados de la agricultura o la industria como fuente de carbono. Además de obtenerse a partir de diversos sustratos renovables, los PHA poseen

otra característica fundamental: son totalmente biodegradables. En la naturaleza los microorganismos son capaces de degradar los PHA mediante la acción de PHA depolimerasas y PHA hidrolasas extracelulares, dando como resultado CO₂ y agua. De esta manera, mientras que los plásticos derivados de hidrocarburos utilizan las escasas re-

servas petroleras del planeta, la producción de PHA se basa en la utilización de recursos renovables.

La progresiva acumulación de los desechos sólidos a medida que aumenta la industrialización y el consumo es un problema global que comenzó a advertirse en el siglo pasado y se hace cada vez más apremiante. Uno de los materiales de desecho más persistentes son los plásticos, que permanecen en la superficie terrestre prácticamente inalterables por miles de años. Los residuos plásticos se acumulan en grandes cantidades, y su degradación es lenta. En un estudio reciente publicado en la revista Science se observó que hay partículas de plástico presentes en los mares de todo el mundo, aún en lugares deshabitados [8]. El reciclado de los plásticos aliviaría un poco la situación, pero sólo en parte. Por este motivo, el reemplazo de los plásticos no degradables por biopolímeros totalmente degradables obtenidos a partir de fuentes de carbono renovables sería una solución mucho más completa para los diferentes aspectos de este problema.

PRODUCCIÓN COMPETITIVA DE PHA

A pesar de las evidentes ventajas que presentan frente a los plásticos derivados del petróleo, el precio de los bioplásticos sigue siendo demasiado alto como para que puedan desplazar a los plásticos tradicionales. Debido a esto, es necesario diseñar estrategias para obtener polihidroxialcanoatos a un costo similar. El precio final de los biopolímeros depende de varios factores, entre ellos los costos de la producción, el rendimiento de polímero obtenido y los costos de procesamiento. Existen actualmente varios enfoques para lograr producir PHA a precios competitivos. Las plantas serían la

alternativa ideal para la producción de biopolímeros, debido a la posibilidad de cultivarlas en grandes cantidades utilizando la fuente de energía más económica que existe: la luz solar. Se han logrado introducir y expresar los genes bacterianos necesarios para la síntesis de PHA en plantas de cultivo [9] lográndose obtener pequeñas cantidades de polímero. Sin embargo, para poder utilizar plantas para la producción de PHA es necesario solucionar una serie de problemas. Por ejemplo, el metabolismo vegetal está altamente compartimentalizado, lo cual complica la tarea, ya que es necesario que los genes *pha* se expresen en el compartimiento celular que contiene la mayor concentración de Acetil-CoA, y al mismo tiempo impedir que se vea afectado el crecimiento de la planta [7].

PRODUCCIÓN DE PHA EN MICROORGANISMOS

Para poder desarrollar un proceso de producción de PHA mediante fermentación utilizando microorganismos es necesario optimizar el rendimiento y la facilidad de purificación del polímero, y fundamentalmente abaratar el costo de los sustratos utilizados para su obtención. Los primeros procesos desarrollados para la producción de PHA en microorganismos se realizaron mediante fermentación utilizando a la bacteria *Ralstonia eutropha*, la cual es capaz de producir PHB a partir de glucosa, o polihidroxibutirato-valerato (PHBV) a partir de glucosa y propionato, sustratos cuyo alto costo incide en el precio final del polímero obtenido.

Existen varios procesos desarrollados para la producción de PHA por fermentación a partir de sustratos económicos: en Brasil se producen a partir de melaza de caña, y en

Estados Unidos y Corea a partir de varios sustratos de origen vegetal o animal.

UN NUEVO SUSTRATO ECONÓMICO

Recientemente ha surgido el glicerol como una nueva alternativa de sustrato, ya que debido al aumento de la producción de biodiesel se producen cantidades cada vez mayores de glicerol. Se espera que la cantidad de glicerol producido exceda ampliamente la demanda existente, con lo cual deberá ser destruido, generando un costo adicional, e importantes emisiones de CO₂, con el consiguiente impacto ambiental.

La cantidad de glicerol originada como subproducto de la síntesis de biodiesel (10% del producto obtenido) hacen que su utilización requiera múltiples estrategias para generar una variedad de productos útiles a las industrias plásticas, alimentarias, químicas, etc. La utilización del glicerol en nuevos procesos industriales implicaría entonces la utilización de un sustrato de costo nulo o incluso negativo.

Debido a esto, se espera que la utilización de este sustrato ayude a mejorar las condiciones de producción de los polihidroxialcanoatos, y por lo tanto su factibilidad comercial.

PRODUCCIÓN DE PHA EN *Escherichia coli* RECOMBINANTE

Los productores naturales de PHA se han adaptado a la acumulación de estos polímeros durante la evolución, pero normalmente tienen un tiempo de generación largo y temperaturas de crecimiento relativamente bajas. Además, son difíciles de lisar y poseen enzimas que degradan el polímero acumulado. Estas características dificultan su

uso en la producción industrial de los biopolímeros.

Entre las cepas bacterianas comúnmente utilizadas en procesos biotecnológicos, *Escherichia coli* es el microorganismo mejor conocido, ya que su metabolismo ha sido extensivamente estudiado y caracterizado. Estas características lo convierten en un microorganismo modelo, ideal para su uso en fermentaciones. Además, debido al gran número de herramientas disponibles para realizar manipulaciones genéticas, es el organismo adecuado para realizar ensayos previos al traspaso de los genes a plantas. *E. coli* no posee naturalmente la capacidad de sintetizar o degradar PHA, pero crece rápido y es fácil de lisar. Se han expresado los genes *pha* de varias especies bacterianas en *E. coli*, obteniéndose buenos rendimientos del polímero. Asimismo, al no poseer enzimas que degraden a los PHA, permite la acumulación de polímero de alto peso molecular.

OPTIMIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS RECOMBINANTES PARA LA OBTENCIÓN DE BIOPRODUCTOS

Se pueden realizar diferentes tipos de manipulaciones para optimizar distintos aspectos del proceso de producción. Algunas de estas manipulaciones permiten obtener cepas bacterianas que utilizan la mayor canti-

dad posible de fuente de carbono para la producción del polímero. Otras manipulaciones pueden ayudar a optimizar otras variables del proceso, reduciendo la necesidad de enfriar o airear el reactor.

El uso de *E. coli* permite realizar todo tipo de manipulaciones genéticas. Esta bacteria tiene la capacidad de regular su metabolismo de acuerdo a la disponibilidad de oxígeno, reduciendo la formación de poder reductor cuando la concentración de oxígeno es baja. Muchos de los productos que se obtienen por fermentación bacteriana, y en particular los PHA, son productos altamente reducidos, que utilizan grandes cantidades de poder reductor.

En el laboratorio hemos desarrollado una cepa de *E. coli* productora de PHB que tiene mutaciones que afectan su balance redox. Esta cepa tiene la característica de mantener un metabolismo aerobio en condiciones de baja aireación, en que las cepas salvajes reprimen su uso [10]. Esta cepa produce, entonces, mayor cantidad de equivalentes de reducción, por lo que es especialmente adecuada para la producción de compuestos reducidos. Como ventaja adicional, esta cepa produce compuestos reducidos aún con bajas cantidades de oxígeno presente, disminuyendo la necesidad de airear el fermentador, reduciendo a la vez los costos y el uso de energía [11].

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Y. Dharmadi, A. Murarka, R. Gonzalez, *Biotechnology and Bioengineering*. **2006**, *94*, 821-829.
- [2] R. Kalscheuer, T. Stolting, A. Steinbuechel, *Microbiology* **2006**, *152*, 2529-36.
- [3] A. J. Anderson, E. A. Dawes, *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*, 450-472.
- [4] R. W. Lenz, R. H. Marchessault. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1-8.
- [5] N. I. López, M. E. Floccari, A. F. García, B. S. Méndez. *FEMS. Microbiol. Ecol.* **1995**, *16*, 95-112.
- [6] J. A. Ruiz, N. I. Lopez, R. O. Fernandez, B. S. Mendez, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 225-230.
- [7] L. L. Madison, G. W. Huisman, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 21-53.
- [8] R. C. Thompson, Y. Olsen, R. P. Mitchell, A. Davis, S. J. Rowland, A. W. John, D. McGonigle, A. E. Russell, *Science* **2004**, *304*, 838.
- [9] Y. Poirier, C. Somerville, L. A. Schechtman, M. M. Satkowski, I. Noda, *Int. J. Biol. Macromol.* **1995**, *17*, 7-12.
- [10] P. I. Nikel, M. J. Pettinari, M. A. Galvagno, B. S. Méndez, *Applied and Environmental Microbiology*. **2006**, *72*, 2614-2620.
- [11] A. de Almeida, R. O. Fernández, M. A. Galvagno, B. S. Méndez, P. I. Nikel, M. J. Pettinari, J. A. Ruiz, Patente presentada (CONICET): *Cepa transformada de Escherichia coli productora de biopolímeros intracelulares, procedimiento para producir biopolímeros y procedimiento para producir al menos un polipéptido heterólogo en una cepa de E. coli cultivada en microaerobiosis*. **2006**. N° de acta: P060100619.

Análisis sensorial descriptivo

Carlos Acurso*

RESUMEN

En las últimas dos décadas la necesidad de las personas que trabajan en Investigación y Desarrollo de productos alimenticios se viene centrando más en las características que los mismos presentan en términos de impresiones sensoriales que en mediciones instrumentales. Dicha necesidad ha sido cubierta por el Análisis Sensorial Descriptivo el cual es un importante desarrollo en la ciencia sensorial ya que solamente los seres humanos podemos describir y cuantificar con precisión las propiedades sensoriales de productos y materiales a través de los sentidos de la vista, tacto, oído, gusto y olfato.

El análisis descriptivo complementa muy bien las técnicas de aceptabilidad y preferencia de productos, lo cual es en definitiva el objetivo central del desarrollo de productos.

INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS SENSORIAL DESCRIPTIVO

A principios de la década de los años 50, la compañía Arthur D. Little desarrolló un método al cual denominó Flavor Profile (perfil de sabor), siendo este la piedra fundamental de las actuales metodologías descriptivas de análisis sensorial.

El análisis sensorial descriptivo es una técnica con vocabulario propio utilizada para obtener un detalle objetivo de las propiedades sensoriales de productos y materiales en general teniendo su máxima expresión dentro de la industria alimenticia y cosmética, pero brindando también un importante apoyo a otras industrias como por ejemplo la textil.

Luego de haber sido creado el Flavor Profile, muchos otros métodos han sido desarrollados. Entre otros podemos citar el Quantitative Descriptive Analysis (QDA) desarrollado por la Tragon Corporation a mediados de los años 70, el Spectrum Descriptive Analysis Method realizado por la compañía Spectrum Inc a fines de los 70 o el Quantitative Flavor Profile (QFP) diseñado por el departamento de evaluación sensorial de la división sabores de la empre-

sa Givaudan-Roure en Suiza a principios de la década del 90.

Desde sus desarrollo, el análisis sensorial descriptivo se ha estado utilizando en control de calidad para mantener las características sensoriales de los productos, comparando prototipos, entendiendo respuestas de los consumidores en relación a las características de agrado de un producto, explorando mercados a través de mapeos sensoriales para encontrar oportunidades de nuevos productos o mejorando productos existentes.

Otra importante aplicación del análisis sensorial descriptivo es la optimización de fórmulas en la cual se utiliza el principio científico de diseño de experimentos.

El éxito en el uso de los testeos descriptivos depende fundamentalmente de cuatro factores: el entrenamiento y experiencia de los jueces, el líder del panel, la forma de llevar a cabo los testeos y el compromiso a largo plazo de los gerentes de las compañías.

El entrenamiento en este tipo de técnicas, es producto dependiente dado que los atributos varían de producto en producto, por

* Sensory Evaluation Manager - Givaudan Argentina S.A.
carlos.acurso@givaudan.com

ejemplo las características de un jamón no son las mismas que las de un vino. La selección de estos atributos está ligada a las propiedades físicas y químicas propias de cada producto y que pueden ser percibidas por los sentidos. El tiempo de entrenamiento de los panelistas o jueces también depende de cada producto, siendo algunos más largos que otros. El líder o administrador de los paneles de análisis descriptivo tiene un papel muy importante en el establecimiento y mantenimiento de los mismos, especialmente en lo relacionado a la motivación de sus miembros. La ejecución de los testeos incluye el cambio permanente de los estándares de referencia y la ejecución y diseño de los ensayos. El compromiso de la gerencia es el principal factor de conducción de éxito en programas sensoriales, ya sean estos académicos o industriales.

La ejecución de pruebas con consumidores es en general más cara en relación a un análisis descriptivo, pero en el desarrollo de productos, el análisis descriptivo es realizado en primer lugar para seleccionar y eliminar prototipos que no cumplen con el criterio sensorial establecido. Una vez seleccionados los prototipos se puede realizar un testeo preeliminar de nivel de agrado y los resultados correlacionarlos con los datos obtenidos de un análisis descriptivo.

El proceso de desarrollo de un producto es más efectivo cuando el mismo ha experimentado un proceso descriptivo sensorial antes de ser sometido a un testeo de consumidores marketinero como puede ser un Central Location Test (CLT).

Cuando se utiliza el análisis sensorial descriptivo para interpretar las respuestas hedónicas de los consumidores se debe tener en cuenta la terminología utilizada, dado que esto puede llevar a que el consumidor acepte o rechace el producto. Por ejemplo, un término muy utilizado en la descripción

de quesos es el descriptor "butyric acid" (nombre químico) el cual si lo nombráramos tal cual huele, su nombre sería probablemente "vómito de bebé".

El análisis sensorial descriptivo entrega normalmente un resultado objetivo, pero dependiendo de la técnica utilizada la descripción podrá ser más o menos objetiva así como también cualitativo o cuantitativo.

IMPORTANCIA DE LAS REFERENCIAS ESTÁNDAR Y DEL ENTRENAMIENTO DE PANELISTAS

Cuando se realiza el entrenamiento de un panel sensorial especializado en análisis descriptivos, las referencias estándar (también llamadas "referencias" o "estándares") tienen un papel muy importante en el desarrollo del vocabulario adecuado, el establecimiento de los rangos de intensidad y la interacción de los ingredientes que componen un producto además de documentar la terminología a ser utilizada.

De la calidad del entrenamiento de panelistas y la elección adecuada de las referencias propias de cada producto dependerá el éxito del análisis descriptivo.

IMPORTANCIA DE LAS REFERENCIAS ESTÁNDAR Y DEL ENTRENAMIENTO DE PANELISTAS

Las referencias estándar son herramientas imprescindibles en el entrenamiento de un panel descriptivo de evaluación sensorial ya que ayudan a los jueces (o panelistas) a desarrollar la terminología adecuada para describir productos, determinar intensidades, muestra la acción de un ingrediente y la interacción entre ellos, acorta los tiempos de entrenamiento, documenta la terminología, identifica carac-

terísticas importantes de los productos y provee información relevante para el desarrollo, mejora y reducción de costos de productos sean estos ya existentes o nuevos en el mercado.

La importancia de las referencias estándar es hoy en día asumida y entendida por toda la comunidad científica sensorial.

Una referencia estándar se la puede definir como cualquier compuesto químico, especia, ingrediente o producto que puede ser usado para caracterizar, identificar o cuantificar un atributo encontrado en cualquier tipo de producto (alimento o no) y que está siendo evaluado por un panel sensorial entrenado. En general, cuanto más simple sea la sustancia a ser utilizada como referencia mejor será la respuesta que se obtendrá de los panelistas para describir un producto. Una referencia ideal es aquella que es simple, reproducible, identifica un solo atributo y puede ser diluida sin cambiar sus características originales. (por ejemplo una solución de cloruro de sodio que identifica unívocamente al descriptor "salado"). Obviamente no todos los atributos son descritos por una referencia estándar ideal. Suele pasar que un compuesto químico simple o un ingrediente no describa apropiadamente lo que los panelistas están encontrando en el o los productos. En este caso, los productos deben ser tratados como si fueran referencias para mostrar que cada uno de ellos tiene características similares con posibles diferencias en las intensidades y compararlas mutuamente (por ejemplo la nota "terrosa" en un determinado producto). Este último caso debe ser más una excepción que una regla. Se debe tratar por todos los medios encontrar una sustancia o mezcla de ellas que permita describir el atributo deseado recordando siempre que cada referencia estándar debe estar acompañada siempre por una descripción escrita de la misma.

El aspecto más importante de usar referencias estándar en el entrenamiento de un panel sensorial radica en el hecho de ayudar a los panelistas a desarrollar la terminología que usarán para describir los productos que se les presentarán.

Ejemplo de referencias estándar y su etiquetado

Descriptor	Reference Standard	Concentration	Type
terroso	concepto terroso		
verde	cis-3-hexenol	0.5% PG	olfato
mermelada	jugo conc. de frutilla	puré	olfato
maduro	butirato de etilo	1.0% PG	olfato
balsámico	cinamato de metilo	5.0% PG	olfato
vainillina	vainillina	1.0% PG	olfato
silvestre	antranilato de metilo	1.0% PG	olfato

Ahora bien, hasta el momento solo hemos hablado de las referencias propiamente dichas, pero nada hemos dicho de otra componente muy importante que es la "memoria olfativa" de los panelistas. Según la hipótesis de Engen y Ross (1973), sugiere que los olores son codificados como eventos perceptuales únicos con poca redundancia, lo cual da una pobre retención inmediata pero una gran resistencia a distorsionarse con el paso del tiempo. Como ejemplo de esto podríamos citar nuestras experiencias olfativas personales como ser el aroma de un postre o comida elaborado en el pasado por algún familiar nuestro, el cual seguramente sería muy difícil de describir con palabras, pero que si lo oliésemos nuevamente diríamos que corresponde exactamente a lo que percibíamos en aquella época.

Harry Lawless (1978) encontró que la curva de olvido se achata cuando a la referencia estándar se le genera una buena etiqueta verbal. Según William Cain (1979), el éxito en la identificación de olores depende de:

- sustancias comúnmente encontradas
- conexiones a largo tiempo entre el olor y su nombre

- ayuda para recordar el nombre

La ausencia de estos factores hace caer el desempeño en la identificación de una manera notable. Cuando se le pide a una persona que identifique aromas, lo más común es que acierte entre un 40-50% de los olores:

- una persona va a fallar inicialmente en la identificación de un olor que todo el mundo dice conocer bien (Ej. banana o manzana) si no se le da ninguna pista del olor
- la persona puede decir que conoce el olor muy bien, pero que se siente temporalmente incapaz de nombrarlo
- entre la primera y la segunda presenta-

ción, el nombre verídico puede llegar a la mente espontáneamente.

Cain y colaboradores (1984) concluyen diciendo que mucha gente no puede identificar olores porque no ha aprendido las palabras correctas para describirlos. Y si lo pensamos desde nuestra propia experiencia de vida vemos que esto es realmente así. En una sociedad occidental en donde se le da más importancia a lo visual y auditivo que a lo olfativo, aprendemos muy bien desde pequeños el nombre correcto de los colores, podemos definir formas diversas y describir el canto de un pájaro, el sonido de un arroyo corriendo o una determinada melodía musical, pero nos falta vocabulario para definir olores aunque estos sean simples en su composición.

Afortunadamente todos estos escollos pueden ser salvados siguiendo un entrenamiento adecuado en análisis sensorial descriptivo en donde se le da al panelista todas las pautas necesarias para memorizar y describir con un vocabulario único el producto bajo análisis.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices: Harry Lawless and Hildegarde Heymann, 1998.
- [2] Descriptive Sensory Analysis in Practice: M.C.Gacula Jr., 1997.
- [3] Quantitative Flavour Profiling Technique, Perfumer and Flavorist, Nov-Dec 1993, Chantal Stampanoni.
- [4] Food Quality and Preference, Novembre 1999.
- [5] Guidelines Manual on Sensory Training: Givaudan, 1996.

Derrames de petróleo en el mar: problemas ambientales y remediación

Alberto A. Viale*

NATURALEZA Y ORIGEN DEL PETRÓLEO

El petróleo es una mezcla compleja constituida principalmente por hidrocarburos alifáticos (entre un 60% a un 90%), alicíclicos y aromáticos. También contiene una menor proporción de componentes tales como ácidos nafténicos, fenoles, tioles, compuestos heterocíclicos de nitrógeno, compuestos azufrados y metaloporfirinas. Se encuentran además, pequeñas cantidades de metales como vanadio, níquel, plomo y hierro. Estas mezclas se originaron naturalmente por la transformación anaeróbica de biomasa en condiciones de temperatura y presión elevadas. Cada tipo de crudo tiene varios cientos de componentes diferentes. Su composición varía ampliamente según su génesis, su edad y de su lugar de procedencia.

El petróleo es la materia prima no renovable más importante del mundo actual. Su producción anual llega a 3.000 millones de toneladas y se ha constituido en el sustento de las actividades de transporte, de un 40% de la producción de energía y de variadas

industrias químicas. La producción, el transporte, la destilación y el empleo a gran escala del mismo o sus derivados, inevitablemente producen pérdidas del material al medio ambiente.

DERRAMES DE PETRÓLEO

El conocimiento de los efectos contaminantes y tóxicos del petróleo y sus derivados se originó, y fue actualizándose, por los accidentes de buques petroleros y oleoductos que se han producido en los últimos años. Algunos de ellos ocasionaron graves episodios de contaminación y alteración de ecosistemas. A los derrames accidentales debe agregarse los episodios ocurridos en la guerra Irán – Irak, y durante la Guerra del Golfo cuando los ocupantes iraquíes derramaron el petróleo extraído en pozos petrolíferos de Kuwait a las aguas del Golfo Pérsico. Muchos de estos episodios han tenido gran repercusión en la prensa mundial, sensibilizando a la opinión pública y estimulando los estudios de prevención y tratamiento de los vertidos.

En una evaluación realizada en 1985 por el National Research Council de Estados Unidos se estimó que 3,2 millones de tonela-

das de petróleo que entraron en aguas marinas en ese año. El 38% de ellas tuvo su origen en descargas desde tierra como residuos urbanos e industriales, mientras que un 33% se originó en operaciones de limpieza de buques; los accidentes en transporte contribuyeron con el 12% y las plataformas petrolíferas con el 2%; la combustión incompleta y la evaporación aportó el 9% de la masa contaminante; las filtraciones naturales y la erosión contribuyeron con el 7% de la masa contaminante.

Los mayores vertidos en áreas marinas proceden de operaciones normales de los barcos, ya sean o no petroleros; en los primeros por el lastrado de las cisternas y limpieza de las mismas, en los segundos como consecuencia del bombeado de las sentinas y otras operaciones de limpieza.

La mayoría de los componentes del petróleo son biodegradables, esto es, son consumidos por microorganismos presentes en el ecosistema en el cual pueden derramarse, pero este proceso es relativamente lento. Como se ha mencionado, las actividades de obtención, transporte, refinado y eliminación de residuos arrojan al mar aproximadamente 3,2 millones de toneladas anuales de petróleo y sus derivados. Esta cantidad

* Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires
email: aaiviale@qb.fcen.uba.ar

se concentra principalmente en las zonas de extracción en el mar, en las principales rutas de navegación, en las proximidades de las refinerías y de procesamiento para la obtención de derivados. Los vertidos que se producen en estos lugares exceden generalmente la capacidad de autopurificación del ecosistema local. Esto último es válido para vertidos en aguas marinas o dulces, e incluso, para ambientes terrestres. Se originan así una variedad de efectos deletéreos para el ambiente, tales como la emisión de gases y toxicidad para la biota local. El costo de eliminación de vertidos es elevado, alrededor de 3 a 4 dólares por litro de petróleo derramado. Los efectos tóxicos y los costos de eliminación de vertidos se potencian cuando se trata de vertidos de productos derivados obtenidos por la industria petroquímica.

Merecen un comentario aparte los vertidos accidentales. En la Tabla 1 se hace una reseña de los más graves accidentes en los últimos cuarenta años, incluidos acontecimientos bélicos.

La tabla anterior no es exhaustiva, sino tan sólo un resumen de los accidentes más graves que se han registrado. Además de ellos, ha habido cientos de derrames accidentales, en los que afortunadamente, no se vertieron cantidades tan grandes como en los mencionados en la Tabla 2.

TOXICIDAD DEL PETRÓLEO O SUS DERIVADOS DERRAMADOS EN AGUAS

Algunas propiedades del petróleo crudo, que comparte con varios de sus componentes hidrocarburos y sus derivados, influyen notablemente en su comportamiento en las aguas. Ellas son, entre otras, su baja solubilidad en agua, su menor densidad y su carácter más o menos biodegradable.

Desde el punto de vista medioambiental

Tabla 1. Catástrofes ecológicas ocasionadas por importantes vertidos de petróleo

Año	Accidente	Lugar	Toneladas vertidas
1967	Petrolero Torrey Canyon	Costas de Gran Bretaña	130.000
1972	Petrolero Taxanita y Oswego Guardian	Costas de Sudáfrica	100.000
1972	Petrolero Showa Maru	Estrecho de Malaca	237.000
1976	Petrolero Olympic Breavery	Costa norte de Francia	250.000
1976	Petrolero Urquiola	España, costa de La Coruña	95.000
1978	Petrolero Amoco Cádiz	Costa noroeste de Francia	234.000
1979	Petrolero Atlantic Empress y Aegean Captain	Costa este de Tobago	141.000
1979	Plataforma Ixtoc I	Golfo de México	476.000
1980	Pozo petrolífero	Libia	143.000
1983	Guerra Irán - Irak	Golfo Pérsico	420.000
1983	Petrolero Castillo de Bellver	Cabo de Buena Esperanza	267.000
1987	Petrolero Amoco Cádiz	Costa de Francia	200.000
1988	Petrolero Odyssey	Canadá	146.000
1989	Petrolero Exxon Valdez	Estrecho Prince William, Alaska	37.000
1991	Guerra del Golfo	Golfo Pérsico	1.400.000
1992	Oleoducto	Uzbekistán	272.000
1992	Petrolero Mar Egeo	Costa noroeste de España	79.000
1993	Petroleros Maerks Navigator y Sanjko Honor	Costa de Sumatra	360.000
1994	Petrolero Nassia y un carguero	Estrecho del Bósforo	98.000
1994	Rotura de oleoducto	Rusia	104.000
1996	Petrolero Sea Empress	Costas de Gales	70.000
1999	Petrolero Erika	Costas de Bretaña	37.000
2002	Petrolero Prestige	Costas de Galicia	30.000

pueden distinguirse los siguientes aspectos contaminantes del petróleo o derivados:

- Son compuestos que requieren consumo de oxígeno para su degradación, por lo que disminuyen considerablemente la cantidad de oxígeno disuelto en las aguas.
- Sus componentes pueden ser tóxicos *per se*. Los efectos tóxicos tienen como blancos principales tanto la vida vegetal, provocando asfixia de algas y líquenes, como la animal, por su toxicidad sobre peces y aves acuáticas. Los hidrocarburos de la fracción aromática liviana (benceno o derivados sencillos del mismo) son los más peligrosos por su elevada toxicidad y por ser los más solubles en agua.

- Forman una película superficial que disminuye la transmisión de luz, alterando la actividad fotosintética y la difusión del oxígeno molecular.
- Afectan a las características organolépticas del agua. En concentraciones superiores a 10 ppb los aceites minerales confieren un sabor desagradable a las aguas.

Como resumen de los aspectos cuantitativos de la toxicidad del petróleo en aguas, puede afirmarse que en concentraciones de 1 a 10 ppb se ve afectado el crecimiento del fitoplancton; concentraciones de 100 ppb afectan el desarrollo normal de peces; cantidades entre 1 y 10 ppm matan larvas y

PLIEGO COLOR DE AVISOS

PLIEGO COLOR DE AVISOS

PLIEGO COLOR DE AVISOS

PLIEGO COLOR DE AVISOS

PLIEGO COLOR DE AVISOS

PLIEGO COLOR DE AVISOS

PLIEGO COLOR DE AVISOS

PLIEGO COLOR DE AVISOS

ejemplares jóvenes de peces; entre 10 y 50 ppm mueren crustáceos y especies bentónicas; por encima de 500 ppm mueren la flora marina y los moluscos gasterópodos, y se presentan efectos tóxicos severos para todos los ejemplares adultos de la mayoría de los organismos marinos.

Un factor importante en la toxicidad de un hidrocarburo es la solubilidad en agua. Dentro de un mismo grupo de estos compuestos, aquellos de menor peso molecular son los más solubles. Comparando las solubilidades de hidrocarburos de similar peso molecular, el orden de solubilidad es aromático > cicloalcano > alcano ramificado > *n*-alcano. Como ejemplo de lo anunciado se puede mencionar que la solubilidad en agua de *n*-hexano es 9,5 ppm, las del 2-metil-pentano es 13,8 ppm, la del ciclohexano es 55 ppm y la del benceno 1.780 ppm. Las moléculas con heteroátomos (nitrógeno, azufre u oxígeno) son en general las especies químicas más solubles del vertido, especialmente las de menor peso molecular.

Es de señalar que, en general, los hidrocarburos tienen en aguas marinas una solubilidad del 75% respecto del valor en agua pura debido a la presencia de sales, y el hecho tiene su influencia en la evolución de vertidos de petróleo en estos tipos de aguas.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) constituyen un grupo de contaminantes particularmente peligroso por el carácter cancerígeno de muchos de ellos. La solubilidad en agua de este tipo de compuestos es generalmente menor que la de hidrocarburos alifáticos o aromáticos con un solo anillo. Por otra parte son muy solubles en solventes orgánicos no polares, lo que

es un índice de su capacidad de bioacumulación en tejidos grasos en toda la escala alimentaria. El benzo(a)pireno es el más tóxico de toda la serie, y es el compuesto que se determina para evaluar el riesgo de emisiones o derrames. Se ha demostrado que éste hidrocarburo y el benzo(a)antraceno provocan cáncer en humanos.

EVOLUCIÓN DE LOS DERRAMES DE PETRÓLEO

En el devenir de un derrame de petróleo intervienen una serie de procesos físicos, químicos y biológicos que, según su cinética e intensidad, van a definir el impacto ambiental del vertido.

a) *Expansión y deriva*

Las fuerzas hidrostáticas y la tensión superficial hacen que la masa de petróleo tienda a formar una fina capa ($\leq 0,1$ mm) de espesor. La velocidad de esparcimiento es mayor en los crudos o aceites más ligeros. La extensión del vertido es el primer problema a considerar para atajar el derrame, que debe hacerse necesariamente en las primeras horas. El movimiento (deriva) de la mancha de petróleo es resultado de las corrientes de agua y de la fuerza del viento.

b) *Evaporación y disolución*

Afecta a los componentes más volátiles, llegando a evaporar entre el 20 y el 50% de la masa total. Es el proceso más importante de remediación que tiene lugar en las primeras horas de vertido. La velocidad de evaporación depende de la concentración de los componentes y de su presión de vapor. Los hidrocarburos de menor masa molecular son los más solubles. Más del 1% de la masa original del vertido se disuelve. Estos procesos provocan cambios significa-

tivos en muy pocos días tras el derrame. Si el vertido es de gasolinas y nafta, desaparece casi totalmente por evaporación en pocos días. En el caso del Amoco Cádiz se perdió un 30% del petróleo por acción conjunta de ambos procesos.

c) *Dispersión*

Además de disolverse, el petróleo puede introducirse en la columna de agua en mayor cantidad que en proceso de disolución, al dispersarse como gotitas coloidales o en suspensión. Estas gotitas tienen diámetros entre 0,01 y 1 mm y pasan al seno del agua.

d) *Emulsión*

Las emulsiones son sistemas coloidales de un líquido disperso en otro. En el caso del petróleo y agua son posibles dos emulsiones: aceite en agua y agua en aceite. La emulsión de aceite en agua es inestable pero puede estabilizarse por acción de agentes emulsionantes y la agitación continua. El proceso más importante es la formación de emulsiones de agua en aceite, en las que aumenta el volumen del vertido y se agrega en grandes grumos, lo que origina mezclas muy viscosas, conocidas como *mousse*, de color marrón, que contienen hasta un 80% de agua. Estas emulsiones dificultan las operaciones de recolección, se adhieren a sólidos e inhiben la degradación microbiana.

e) *Sedimentación*

Una vez evaporadas y disueltas las fracciones más ligeras del petróleo, el aumento de la densidad provoca el hundimiento de parte del crudo, que pasa a formar parte de los sedimentos. A largo plazo, este proceso es la mayor amenaza medioambiental de los vertidos de petróleo. El proceso de sedimentación toma un carácter muy importante después de la primer semana del derrame.

f) Fotooxidación

En presencia de oxígeno y luz solar los componentes del petróleo, en las zonas más superficiales del agua, pueden llegar a oxidarse originando productos oxigenados (alcoholes, cetonas, ácidos, etc.) que en general son más solubles en agua que los precursores, y también más tóxicos. El proceso de fotooxidación también afecta a los hidrocarburos evaporados y a los aerosoles, aumentando la contaminación atmosférica.

g) Biodegradación

Es un proceso lento que comienza a producirse a la semana del derrame, aumentando en intensidad con el transcurso del tiempo. Este proceso es llevado a cabo por microorganismos que transforman y eventualmente, mineralizan a los hidrocarburos. Las transformaciones tienen lugar tanto sobre las moléculas disueltas o dispersas en la fase acuosa, como en la interfase agua / hidrocarburo. Los alcanos lineales son biodegradados con mayor facilidad que los ramificados o los cicloalcanos. Dado que en muchas regiones marinas el número de microorganismos es muy bajo, tan sólo cuando aquellos que biodegradan a los hidrocarburos alcanzan un número de 10^7 individuos por litro de agua, comienza a ser significativa su contribución a la desaparición del petróleo. El nitrógeno y el fósforo, dos nutrientes esenciales para el desarrollo microbiano, pueden ser escasos y ello limita la velocidad de biodegradación.

Eliminados los compuestos de pequeña masa molecular, quedan todavía los alquitrantes de masa molecular elevada, que forman grumos alquitranados, no tóxicos, con tiempos de vida de varios años y que frecuentemente se los encuentra en playas y paisajes costeros, degradando la calidad del ambiente, especialmente para fines turísticos.

**ALGUNAS CONSECUENCIAS
MEDIOAMBIENTALES DE DERRAMES
MASIVOS DE PETRÓLEO**

Las consecuencias dependen mucho del lugar en que se produce el derrame. Si ocurre lejos de las costas, afectará a los organismos marinos ubicados en o cerca de la superficie. Si se produce cerca de las costas, afectará no sólo a los anteriores sino también a los habitantes de los ecosistemas bentónicos y costeros, ricos en aves, alevinos de muchas especies de peces y mariscos.

Los efectos del petróleo son de dos tipos. Uno, físico-mecánico, que incluye el recubrimiento con petróleo de los organismos acuáticos. Los organismos que más se ven afectados son aves marinas tales como pingüinos, patos y otras especies, que pasan la mayor parte de su vida en la superficie del mar y son poco voladores o no vuelan, y que ante un peligro se sumergen en lugar de remontar vuelo. Es muy improbable que estas aves escapen a un derrame de petróleo ya que vuelven a la superficie tras cada inmersión. En condiciones normales las plumas son muy esponjosas, con espacios llenos de aire que dan al ave flotabilidad y aislamiento térmico. Cuando las plumas se empapan de petróleo los espacios con aire se llenan de crudo o agua y desaparecen. El peso extra en sus plumas les imposibilita el vuelo, les hace perder flotabilidad y hundirse. Al quedarse sin aislamiento pueden morir por hipotermia.

El segundo efecto deriva de la toxicidad de los componentes del petróleo. Los hidrocarburos se incorporan a la parte lipídica de las membranas celulares afectando el intercambio de sustancias entre el exterior y el interior celular. En condiciones extremas pueden llegar a disolver las membranas celula-

res con lo cual se provoca la lisis celular y por tanto la muerte. Los efectos letales dependen de las concentraciones, como se ha mencionado anteriormente. Cuando las aves empapadas y embadurnadas pretenden limpiar sus plumas, ingieren hasta un 50% del petróleo del plumaje y mueren por los efectos tóxicos provocados por la ingesta.

Se calcula que cientos de miles de aves marinas mueren al año como consecuencia de derrames de petróleo.

Si el vertido ocurre lo suficientemente lejos de tierra, la mayoría de los componentes del petróleo habrán desaparecido, o al menos reducido considerablemente sus concentraciones, cuando la mancha alcance las costas. Este hecho no debe soslayar el grave problema que origina un derrame sobre las aves marinas, los peces y mariscos, la flora marina y el depósito de residuos insolubles en el lecho marino

Cuando el vertido ocurre cerca de las costas el daño ecológico es mucho mayor. El petróleo puede alcanzar las zonas costeras antes que los procesos de evaporación y biodegradación hayan reducido mucho de la toxicidad y se verán afectados los organismos costeros y bentónicos. Los organismos móviles, como los peces, pueden evitar la mancha, pero no es un mecanismo de defensa infalible, tal como lo demuestra el gran número de peces muertos que se produce al ocurrir un derrame, hecho comprobado en todos los derrames estudiados.

Muchos autores sostienen, tal vez en forma optimista, que no son un motivo de preocupación los posibles efectos tóxicos del petróleo para el hombre, ya que es muy improbable que se beba agua contamina-

da por las peculiares características organolépticas que adquiere cuando hay hidrocarburos disueltos, que denuncian su presencia aún en concentraciones no tóxicas. Sin embargo debe considerarse como vía de ingestión el consumo de pescado o marisco contaminado. La concentración en estos seres va incrementando al pasar a escalas superiores de la cadena trófica, en un proceso llamado *bioamplificación*, debido a la permanencia de los hidrocarburos en los tejidos grasos. Particularmente graves son los efectos de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, ya discutidos anteriormente.

TRATAMIENTO DE LOS DERRAMES DE PETRÓLEO

Se han empleado, y se continúa desarrollando, una gran variedad de métodos para contener y limpiar derrames de petróleo, especialmente en aguas marinas y costas. El problema es muy complejo, por lo que la prevención es la política indicada en el manejo de hidrocarburos u otros compuestos potencialmente contaminantes. Si se produjeran derrames muy severos es preciso contenerlos y limpiar las áreas. Los métodos más utilizados se desarrollan en dos fases:

FASE PRIMERA: contención del derrame
Ello se logra habitualmente mediante:

- *Botalones flotantes*: son efectivos en aguas calmas y vertidos relativamente pequeños.
- *Barreras de burbujas de aire*: se logran mediante aire comprimido que forma una cortina de finas burbujas. Se emplean para impedir el movimiento de la capa de petróleo. Esta tecnología es útil en puertos.

- *Barreras químicas*: se logran mediante el empleo de aditivos que gelifican o solidifican al petróleo. Se aplican en los bordes de la mancha y forman una pared de contención. Sirven en zonas de mar abierto.

FASE SEGUNDA: Limpieza y eliminación

Diversas tecnologías se emplean para lograr estos objetivos:

- *Métodos mecánicos*: utilizando bombas de aspiración y espumaderas.
- *Degradación biológica acelerada*: la biodegradación es un proceso en el que participa el oxígeno disuelto en las aguas y que reacciona con los componentes del petróleo mediante el uso de catalizadores específicos (llamados *enzimas*) que forman parte de la dotación de los microorganismos adaptados al proceso. El problema principal es que 1 litro de petróleo necesita el oxígeno disuelto en 320.000 litros de agua de mar. Muchas veces se siembra la zona con microorganismos específicos y se fertilizan con nutrientes adecuados. Factores críticos para el desarrollo de los microorganismos es un correcto suministro de fuentes de nitrógeno (N) y de fósforo (P), los cuales suelen suministrarse en la forma de fertilizantes oleofílicos, siendo un ejemplo de ellos la formulación conocida como Inipol EAP 22, de Elf. Aquitaine, Artix, Francia. Estos métodos se conocen como *biorremediación* y constituyen un campo de investigación actual, no exento de problemas teóricos y prácticos, como ser la introducción de especies microbianas foráneas al ecosistema. En muchos países se han dictado regulaciones, especialmente si se trata de microorganismos modificados genéticamente.

- *Agentes dispersantes*: emulsionan el petróleo para producir su dispersión y facilitar la degradación natural. Estos productos están constituidos por agentes tensioactivos, disolvente y estabilizantes. Algunos componentes pueden ser tóxicos y no deben ser empleados en playas.

- *Combustión*: conduce a una importante contaminación del aire, por lo que debe evitarse en zonas costeras. Este proceso origina un residuo negrozco fácil de recoger. Se corre el peligro de producir contaminaciones adicionales si se forman HAPs.

- *Empleo de absorbentes*: tales como paja, aserrín, espuma de poliuretano. El petróleo se embebe en el absorbente y puede ser retirado con mayor facilidad. El uso de poliuretano permite recuperar un elevado porcentaje de crudo.

- *Agentes de hundimiento*: tales como arena, ladrillo molido, cemento, siliconas, cenizas. Su uso provoca la contaminación del fondo marino y por ello es un método desaconsejado. La contaminación de los sedimentos marinos y la toxicidad sobre la fauna y flora béntica pueden permanecer durante prolongados períodos de tiempo.

ESTUDIOS SOBRE LA BIODEGRADACIÓN DE CRUDOS PETROLÍFEROS Y DERIVADOS EN LABORATORIO Y DERRAMES EN AGUAS MARINAS Y SUELOS

Un vertido de petróleo crudo en el mar (marea negra), abandonado a su transformación natural, es degradado por los mecanismos biológicos y no biológicos que se

acaban de discutir. La autooxidación en ausencia de luz tiene poca importancia, pero la oxidación fotoquímica contribuye en forma importante a la autopurificación del medio ambiente. En experimentos de laboratorio se comprobó que la luz solar puede destruir por fotooxidación 0.2 toneladas de petróleo por kilómetro cuadrado en ocho horas. Es probable que en la naturaleza los valores sean un poco menores pero el proceso es importante, especialmente porque ataca a los átomos de carbono ramificados (terciarios) que suelen bloquear la biodegradación.

Las comunidades microbianas expuestas a los hidrocarburos se adaptan a ellos. Se observa un enriquecimiento selectivo y cambios genéticos que conducen a una mayor proporción de bacterias degradadoras de hidrocarburos. Las comunidades microbianas adaptadas son capaces de responder en pocas horas a la presencia de hidrocarburos contaminantes. En el caso de los vertidos del *Amoco Cadiz* y el *Tanio* en la costa de Bretaña, Francia, las poblaciones de microorganismos degradadores de hidrocarburos habían aumentado en varios órdenes de magnitud un día después de producirse la marea negra. En los días siguientes al accidente la tasa de biodegradación igualaba a la de evaporación.

Las mediciones de biodegradación en condiciones de laboratorio, de por sí favorables para el proceso microbiano indican que se puede mineralizar hasta 60 g de petróleo por metro cúbico de agua de mar y por día. Estas mediciones son extremadamente optimistas. Cuando el estudio se hace *in situ* los valores caen a niveles de miligramos de hidrocarburo mineralizado por metro cúbico y por día. Este hecho es debido a las bajas temperaturas de las aguas, a la escasez de nutrientes minerales, especialmente ni-

trógeno y fósforo, al agotamiento del oxígeno disuelto y, en zonas pelágicas sin exposición previa a este tipo de contaminantes, a la escasez de organismos degradadores.

Las bajas temperaturas invernales limitan la biodegradación de hidrocarburos. Esto es especialmente crítico cuando el vertido de petróleo o derivados se produce en aguas árticas o antárticas. El buque polar ARA Bahía Paraíso se hundió frente a la península Antártica, cerca de la Base Palmer, provocando un derrame de gasoil en aguas frías. En este accidente se aspiró todo el combustible de la superficie del mar, se sacaron de abordó todos los elementos considerados como potencialmente contaminantes, se aspiró el combustible remanente en los tanques y se hicieron inspecciones visuales en superficie, terrenas y aéreas de las que participaron científicos de la Dirección Nacional del Antártico y de la Base Palmer de los EE.UU. Aunque la mayor parte del combustible fue recuperado del casco, personal de la Base Palmer continuó informando sobre la presencia de películas de combustible en el área años después del accidente. A pesar de todo no se advirtieron daños visibles en el ecosistema local, en particular en el caso de la fauna, debido en parte a la volatilidad de los componentes del vertido. En este caso las técnicas ingenieriles prontamente aplicadas dieron excelentes resultados, si bien debe considerarse que el derrame no fue de gran magnitud.

En ecosistemas acuáticos la dispersión y la emulsificación del petróleo son un requisito para su rápida biodegradación ya que se incrementa la superficie oleosa expuesta a la fase acuosa, facilitando así su unión a los microorganismos degradadores que establecen su residencia en la interfase aceite – agua. Cuando las grandes masas de petró-

leo forman capas espesas, *mousse*, bolas de alquitrán, o acumulaciones en ambientes quiescentes, persisten más tiempo porque la superficie disponible para el ataque microbiano es limitada.

En los suelos, el petróleo se adsorbe en gran cantidad a la materia particulada. Esto disminuye su toxicidad pero aumenta su persistencia. A corto plazo el petróleo y sus componentes asfálticos no se degradan significativamente. Los residuos y los productos de polimerización formados por reacciones de oxidación en oscuridad y fotooxidación, forman bolas de alquitrán, resistentes en extremo a la biodegradación.

Los vertidos de petróleo accidentales en tierra suelen ser más fáciles de contener y limpiar que en las aguas. No obstante, la gasolina y otros productos de destilación de baja viscosidad pueden penetrar en el subsuelo y persistir, debido a las condiciones anóxicas predominantes. También pueden contaminar acuíferos y representar un peligro potencial de explosión en sótanos y sistemas de alcantarillado.

Los vertidos de hidrocarburos en suelos destruyen la vegetación por su elevada toxicidad y por las condiciones de anoxia que se producen en las raíces por el gran consumo de oxígeno que efectúan los microorganismos al consumir a los hidrocarburos derramados. La carencia de oxígeno y la formación de derivados del azufre, tal como el sulfuro de hidrógeno (H_2S) matan las raíces de la mayoría de las plantas, incluidas las de grandes árboles bien establecidos

Una de las dificultades para realizar biorremediación es la baja temperatura predominante en determinada zona. Científicos argentinos, utilizando microorganismos adaptados a esas temperaturas (psicrófilos)

aislados de suelos saturados de hidrocarburos cercanos a los tanques de almacenamiento de combustible en bases antárticas, demostraron que la remediación biológica es posible en esa región, aunque no hay una estrategia única, sino que depende de la cantidad de contaminantes y de la historia de los suelos a tratar. Para acelerar el proceso se adicionaron nutrientes, con lo que se logró eliminar más de 80 por ciento de los hidrocarburos en menos de 60 días.

EL CASO DEL EXXON VALDEZ

El 24 de marzo de 1989 se hundió el petrolero Exxon Valdez sobre los arrecifes Bligh en el golfo de Alaska, derramando aproximadamente 41.000 m³ de petróleo originado en la bahía de Prudhoe. Se realizó un gran esfuerzo para recuperar el petróleo del mar, pero por las condiciones predominantes se produjo la contaminación de 2.900 km de costas. Algunas playas resultaron extremadamente dañadas, particularmente las situadas en islas del estrecho Prince William, ubicadas directamente en la deriva de la mancha.

Se emplearon muchas técnicas para la limpieza de la línea de costas del estrecho, que incluían lavados con agua caliente y fría, lavados con vapor, y recuperación manual del crudo. Inicialmente, el objetivo principal fue remover las mayores cantidades posibles de crudo y minimizar el impacto sobre la vida silvestre y la pesca. A pesar de todo, se calculan en 100.000 las aves muertas por el derrame.

Poco tiempo después del accidente se propuso realizar una biorremediación basada en enriquecimiento de nutrientes, para lo cual se realizaron ensayos en la misma zona del derrame. En agosto de 1989 se comen-

zó a realizar aplicaciones en todas las playas afectadas.

Hacia 1990, los esfuerzos de limpieza y las tormentas de invierno redujeron la extensión de la línea de costas contaminadas y los procesos de remediación naturales ya estaban muy adelantados. En esa época, la National Oceanic and Atmospheric Administration aplicó el concepto de análisis de beneficio ambiental neto para evaluar la alternativa principal a la biorremediación, la excavación y el tratamiento para lavado de rocas. Se concluyó que estas técnicas serían particularmente dañinas para el ambiente, y sobre la base de esto se adoptó la biorremediación como la estrategia principal para la limpieza. El 12 de junio de 1992 la Guardia Costera americana y el estado de Alaska declararon oficialmente concluidas las tareas de limpieza del derrame considerando que mayores esfuerzos no traerían aparejados mayores beneficios ambientales a la zona.

En el otoño de 1992 ya no quedaba nada de petróleo flotando sobre el mar. Un 14% se había recuperado; un 20% se había evaporado y degradado en la atmósfera mediante reacciones fotoquímicas o de otro tipo; un 50% se había biodegradado en las playas o en la superficie marina o en la columna de agua; un 13% permanecía en los sedimentos, un 2% en la región costera y un 1% dispersado en la columna de agua.

Los conocimientos adquiridos durante los esfuerzos para remediar el desastre han sido sumamente valiosos y sus resultados fueron aplicados a otros casos con éxito. Los componentes de los fertilizantes oleofílicos desarrollados para administrar nutrientes a las poblaciones bacterianas locales han recibido algunas observaciones por parte de toxicólogos, especialmente el 2-butoxieta-

nol, utilizado como surfactante y estabilizante de la emulsión. Hubo algunos juicios por parte de trabajadores que se vieron afectados por estos compuestos. De todas formas, la línea de trabajo es promisorio y se necesita más investigación para lograr formulaciones en las cuales estén minimizados todos los riesgos posibles.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Buenos Aires por su apoyo financiero al proyecto UBACYT X061.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] R. M. Atlas., R. Bartha, *Microbial Ecology. Fundamentals and applications*. Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, California, USA, 1998.
- [2] J. E. Figuerelo, M. Marino Dávila, *Química Física del Ambiente y de los Procesos Medioambientales*. Reverté S. A., Barcelona, España, 2004.
- [3] J. C. Hurst, R. L. Crawford, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach, *Environmental Microbiology*, 2nd. Edition, 2002. American Society for Microbiology, Washington D.C., U.S.A..
- [4] J. G. Leahy, R. R. Colwell, *Microbiological Reviews* 1990, 54, 305 - 315.
- [5] W. P. MacCormack, L. A. M. Ruberto, *Ciencia Hoy* 2003, 13, 40 - 47.
- [6] M. D. Moreno Grau, *Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana*. McGraw-Hill / Interamericana de España, Madrid, España, 2003.
- [7] C. Orozco Barrenetxea, A. Pérez Serrano, M. N. González Delgado, F. J. Rodríguez Vidal, J. N. Alfayate Blanco. *Contaminación Ambiental. Una visión desde la Química*. Editorial Thomson, México D. F. México, 2003.
- [8] R. P. J. Swannell, K. Lee, M. McDonagh, *Microbiological Reviews* 1996, 60, 342 - 365.