



Magister en Ciencias  
Mención Radicales Libres  
en Biomedicina

**ESTRÉS OXIDATIVO EN *Echinolittorina peruviana*  
(Gasteropoda: Littorinidae, Lamarck, 1822), PRESENTE EN  
SECTORES COSTEROS CON ACTIVIDAD MINERA.**

**MAGISTER EN CIENCIAS  
MENCIÓN RADICALES LIBRES EN BIOMEDICINA**

CARLOS ESTEBAN JARA GUTIÉRREZ

**Directora de tesis**

Dra. María Eliana Hidalgo Lillo

**Co-director de tesis**

Dr. Hernán Jesús Gaete Olivares

## INDICE

- Resumen.....	4
- Abstract.....	6
- Introducción.....	8
- Hipótesis.....	18
- Objetivo General y específicos.....	18
- Metodologías.....	19
- Obtención de muestras.....	19
- Figura 1: Sitios de Muestreo, Caleta Palito (26°17'S), Chañaral (26°21'S), Caldera (27°03'S) y Huasco (28°27'S), Punta Choros (29°15'S), Quintero (32°47'S) y Montemar (32°58'S).....	19
- Figura 2: Morfología de <i>E. peruviana</i> . A) Morfología de la concha, B) Morfología externa y corte realizado para los experimentos, C) fracción utilizada para los análisis y D) órgano reproductor masculino (esquema modificado y extraído del trabajo de Castillo & Brown, 2008).....	20
- Determinación de metales en agua y tejido.....	20
- Determinación de capacidad antioxidante total.....	21
- Determinación de proteínas totales.....	21
- Determinación de SOD.....	22
- Determinación de Catalasa.....	22
- Determinación de lipoperoxidación.....	22
- Determinación de carbonilos.....	22
- Análisis estadístico de datos.....	23
- Resultados.....	24
- Tabla 1: Metales presentes en el agua de cada sitio de muestreo.....	25
- Tabla 2: Metales bioacumulados en los diferentes sitios de muestreo en el pie del caracol <i>E. peruviana</i> .....	25
- Tabla 3: Factor de bioacumulación en el pie del caracol <i>E. peruviana</i> obtenido desde los diferentes sitios de muestreo.....	26

- Tabla 4: Datos obtenidos del análisis de componentes principales, los datos con un $r < 0,6$ de correlación fueron omitidos.....	27
- Figura 3: Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) en el musculo del caracol <i>E. peruviana</i> , para cada sitio de muestreo.....	28
- Figura 4: Actividad enzimática de catalasa (CAT) en el musculo del caracol <i>E. peruviana</i> , para cada sitio de muestreo.....	29
- Figura 5: Capacidad antioxidante total (TRAP) en el musculo del caracol <i>E. peruviana</i> , para cada sitio de muestreo.....	30
- Figura 6: Oxidación de lípidos en el musculo del caracol <i>E. peruviana</i> , para cada sitio de muestreo.....	31
- Figura 7: Oxidación de proteínas en el musculo del caracol <i>E. peruviana</i> , para cada sitio de muestreo.....	32
- Figura 8: Distribución de las variables en el plano definido por el análisis de componentes principales.....	33
<b>- Discusión y Conclusión.....</b>	<b>34</b>
<b>- Bibliografía.....</b>	<b>41</b>
<b>- Anexos.....</b>	<b>49</b>
- Anexo 1: Resultado de la prueba a posteriori, hecha para el análisis Kruskal-Wallis ( $p= 0,0000$ ) donde se uso como variable de respuesta la actividad de SOD en los diferentes sitios de muestreo (statistica 7.0).....	49
- Anexo 2: Resultados de la prueba de correlación entre la actividad de SOD y metales bioacumulados analizados.....	50
- Anexo 3: Resultado de la prueba a posteriori, hecha para el análisis Kruskal-Wallis ( $p= 0,0000$ ) donde se uso como variable de respuesta la actividad de CAT en los diferentes sitios de muestreo (statistica 7.0).....	50
- Anexo 4: Resultados de la prueba de correlación entre la actividad de Catalasa y metales bioacumulados analizados.....	51
- Anexo 5: Resultado de la prueba a posteriori, hecha para el análisis Kruskal-Wallis ( $p= 0,0000$ ) donde se uso como variable de respuesta a la capacidad antioxidante total (TRAP) en los diferentes sitios de muestreo (statistica 7.0).....	52
- Anexo 6: Resultados de la prueba de correlación entre la capacidad antioxidante total (TRAP) y metales bioacumulados analizados.....	53

- Anexo 7: Resultado de la prueba a posteriori, hecha para el análisis Kruskal-Wallis (p= 0,0000) donde se uso como variable de respuesta la Lipoperoxidación (TBARS) en los diferentes sitios de muestreo (statistica 7.0).....	54
Anexo 8: Resultados de la prueba de correlación entre la lipoperoxidación (TBARS) y metales bioacumulados analizados.....	55
- Anexo 9: Resultado de la prueba a posteriori, hecha para el análisis Kruskal-Wallis (p= 0,0187) donde se uso como variable de respuesta la oxidación de proteínas (Carbonilos) en los diferentes sitios de muestreo (statistica 7.0).....	55
- Anexo 10: Resultados de la prueba de correlación entre el daño a proteínas (Carbonilos) y metales bioacumulados analizados.....	56
- Anexo 11: Resultados de las pruebas de correlación entre los parámetros oxidativos analizados.....	57
- Anexo 12: Limites máximos permitidos para la descarga de residuos líquidos a cuerpos de agua marinos dentro de la zona de protección litoral, contenidos en la Tabla N° 4 de la norma de emisión de contaminantes permitida para residuos líquidos descargados por las fuentes emisoras, a los cuerpos de agua marinos y continentales superficiales de la República de Chile.....	58
- Anexo 13: Tabla numero uno del trabajo realizado por Conti <i>et al.</i> 2011.....	59
- Anexo 14: Tabla numero uno del trabajo realizado por Conti <i>et al.</i> 2012.....	59
- Anexo 15: Corrientes marinas de la Bahía de Quintero, A) Circulación de corrientes marinas superficiales y profundas de la bahía de Quintero (Escobar <i>et al.</i> 1971), B) Patrón de circulación de corrientes marinas superficiales en llenante y vaciante de la bahía Quintero (Bakovic & Balic, 1984), C) Modelo de circulación superficial de las aguas de la bahía de Quintero (Malet & Andrade, 1991).....	60
- Anexo 16: Circulación de corrientes marinas superficiales y profundas de la bahía de Concón año 2008 (A) y 2009 (B) (Tesis de grado Kroeger, 2011. Microfitoplancton en la Bahía de Concón, Chile (71° 32'W 32° 55'S): Variabilidad asociada al caudal del río Aconcagua y a las condiciones de surgencia durante el periodo 2008-2009. Universidad de Valparaíso).....	61

## RESUMEN

La minería en Chile, concentrada entre las regiones de Atacama y Coquimbo, genera ingresos por más US\$ 40.000 millones de dólares al año, posicionando al país como el principal productor de cobre. Producto de la actividad extractiva minera se generan residuos que contienen metales, metaloides y subproductos del refinado de algunos metales, los cuales alteran las características naturales de los ecosistemas y afectando la biodiversidad de estos.

Cuando un organismo es expuesto a algún agente estresor, como los metales pesados vertidos en la zona costera, sus parámetros fisiológicos y bioquímicos pueden verse afectados, entregando información fidedigna de lo que está ocurriendo en un sitio específico, convirtiéndose en una herramienta útil para identificar el nivel de deterioro fisiológico de un organismo frente a la contaminación. Los metales pesados, alteran el metabolismo de los organismos a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), producidas por la reacción de Fenton y la de Haber-Weiss. El estar sometido a la producción de ERO, le exige a los organismos contar con una batería múltiple de defensa contra las diversas especies oxidantes, que por un lado tiendan a impedir su formación y por otro las neutralicen. Entre estas defensas están los antioxidantes de bajo peso molecular (principalmente aquellos que ingresan a través de la dieta) y enzimáticos (como SOD y Catalasa).

Los moluscos marinos destacan como bioindicadores de contaminación y se consideran como herramientas de alerta temprana. El gastrópodo *Echinolittorina peruviana* (Lamarck, 1822), es una especie herbívora que presenta una amplia distribución geográfica lo que permite encontrar a esta especie en sitios con diferente grado de intervención y poder comparar, convirtiéndose en un excelente biomonitor.

Ante la escasa información existente, que relaciona la actividad minera con cambios en los biomarcadores de estrés oxidativo en gastrópodos marinos en Chile, se hace necesario evaluar el efecto causado por este factor sobre la especie *E. peruviana*.

En el presente trabajo se determinó estrés oxidativo en *E. peruviana*, presente en sectores costeros con y sin actividad minera, Caleta Palito (26°17'S), Chañaral (26°21'S), Caldera (27°03'S) y Huasco (28°27'S), además de Punta Choros (29°15'S), Quintero (32°47'S) y Montemar (32°58'S), respectivamente.

Se encontró en esta especie estrés oxidativo aumentado en zonas con actividad minera, existiendo un desbalance entre las especies reactivas y la actividad antioxidante, traduciendo en daño oxidativo de lípidos y proteínas.

Las enzimas antioxidantes y el daño oxidativo, en especial los niveles de lipoperoxidación, pueden ser usados como respuesta rápida y específica, para

identificar el efecto tóxico provocado por componentes contaminantes presentes en el hábitat.

El presente estudio, en conjunto a estudios relacionados, sienta las bases para futuros trabajos que relacionen a los biomarcadores con la contaminación por metales pesados y/u otras fuentes generadoras de estrés oxidativo en Chile.

## ABSTRACT

The mining industry in Chile, is concentrated between Atacama and Coquimbo regions, produces more than US\$ 40.000 million dollars a year in revenues, positioning the country as the main copper producer. As a result of the mining extractive activity, the residues produced, contain metals, metalloids and other byproducts of the refining of metals, which alter the natural characteristics of ecosystems and affect their biodiversity.

When an organism is exposed to a stressing agent, like heavy metals discharged on coastal areas, their physiological and biochemical parameters can be affected, providing reliable information, regarding what is happening in any specific site, and making it a useful tool for the identification of physiological deterioration level of an organism due to contamination. Heavy metals can alter the organisms' metabolism by generating reactive oxygen species (ROS), produced through Fenton and Haber-Weiss reactions. To control the production of ROS, organisms have several defenses against the diverse oxidative species, that both tend to impede their formation, and on the other neutralize them: enzymatic and non enzymatic systems.

Marine mollusks stand out as pollution biomonitors because they deliver trustworthy information about the conditions of their environment, therefore are regarded as early alert tools. The gastropod *Echinolittorina peruviana* (Lamarck, 1822), is an herbivore species that has a wide geographic distribution and could be considered as an appropriated biomonitor organism.

Due to the lack of information, about the relationship between mining activity with changes in biomarkers of oxidative stress in marine gastropods, it is necessary to evaluate the effect caused by this factor over *E. peruviana*.

In this study, the oxidative stress on *E. peruviana* was determined, organisms were collected from coasts with and without mining activity: Caleta Palito (26°17'S), Chañaral (26°21'S), Caldera (27°03'S) and Huasco (28°27'S), and Punta Choros (29°15'S), Quintero (32°47'S) and Montemar (32°58'S), respectively.

Oxidative stress was higher in areas with mining activity, showing an imbalance between reactive species and antioxidant activity, inducing an oxidative damage of lipids and proteins.

The antioxidant enzyme activities, and oxidative damage, specially in lipid peroxidation levels, can be used as a fast and specific response in the identification of toxic effects due to the presence of pollutants in the habitat.

This study, and other related studies, might serve as base line for future studies relating biomarkers with heavy metal pollution or other sources of oxidative stress in Chile.

## INTRODUCCIÓN

Chile es un país de grandes reservas minerales, en especial aquellas consideradas metálicas, donde se destacan la producción de cobre, hierro, molibdeno, manganeso, plomo, zinc, oro y plata, siendo los de mayor interés el cobre y molibdeno, este último un subproducto del cobre.

El cobre es el principal mineral metálico producido en Chile, concentrándose entre la región de Tarapacá y la región de Coquimbo, ocupando un 89,5% del total exportado y generando ingresos por US\$ 40.342 millones de dólares el año 2010 (Ministerio de minería, 2011). Como resultado de esta abundancia, Chile se ha posicionado como principal productor de cobre en el mundo.

Producto de la actividad extractiva minera se generan residuos que contienen metales, metaloides y sus subproductos, los cuales alteran las características naturales de los ecosistemas, afectando la biodiversidad de éstos (Duffus, 2002). Aunque existen estándares y normativas, como la Ley 19.300 de Bases del Medio Ambiente de Chile, que regulan la eliminación de residuos provenientes de las faenas mineras, las características de éstos hacen que se acumulen en los sustratos, aumentando la contaminación, en especial de ecosistemas acuáticos costeros donde desembocan las vías de eliminación de los residuos industriales (Castilla & Nealler, 1978). Es importante destacar que 70% de las especies de importancia pesquera lo constituyen organismos que habitan o aquellos que algún período de su vida lo transcurren en ecosistemas acuáticos costeros, representado por algas, peces, crustáceos y moluscos (Comin *et al.*, 1999).

Los moluscos son un grupo muy diverso y se pueden considerar como un phylum con un muy alto éxito evolutivo, se pueden encontrar en desiertos, zonas polares, trópicos y grandes profundidades oceánicas, aunque es en la zona intermareal donde alcanzan su máxima diversidad. Los hay desde consumidores primarios, herbívoros, detritívoros, depredadores sumamente especializados, oportunistas y parásitos (Ruppert & Barnes, 1996). El número de especies marinas representantes de este phylum se estima en 78.805 (Appeltans *et al.*, 2012).

Han sido utilizados como biomonitores en muchos estudios, dado que su respuesta a la contaminación puede advertirse tanto a nivel individual como poblacional, reflejándose en modificaciones del comportamiento, fisiológicas o simplemente como

tolerancia o intolerancia a los contaminantes. Existen estrategias usadas por estos organismos para enfrentar dichas situaciones, entre éstas se encuentra la fuga y atracción, que les permite evadir condiciones adversas del ambiente y a fuentes puntuales de contaminación a través del movimiento (Villarreal & Lozada, 2004), pero en ocasiones son atraídos hacia éstas, en particular cuando las cargas de materia orgánica son altas (Horiguchi *et al.*, 2004). Los bivalvos como *Dreissena polymorpha* y *Mytilus edulis* se liberan de su bisco cuando se ven sometidos a agentes irritantes, permitiendo ser arrastrados por las corrientes, además cierran las valvas de forma hermética por varias horas frente a condiciones de estrés (Gundacker, 1994; Almeida *et al.*, 2003). Otra estrategia es la tolerancia, aclimatación y adaptación, descritas por Klerks & Weis el año 1987, esta estrategia se puede adquirir por la exposición a concentraciones subletales durante etapas tempranas del ciclo de vida, adquiriendo resistencia genética por medio de selección natural de individuos con resistencias diferenciales (Je *et al.*, 2004). La tolerancia varía entre especies, por ejemplo, en ostiones se han encontrado concentraciones de metales trazas (Cu, Zn y Ag) altas, mientras que en mejillones estas concentraciones son 3 órdenes de magnitud más elevadas que en la especie previamente mencionada (Franco *et al.*, 2002). La tolerancia se genera por aclimatación y además se crea cierta impermeabilidad que restringe el ingreso de algunos metales, como lo demostró por primera vez el trabajo de Frazier y George (1983) en *Ostrea edulis*, donde se observó que cuando los especímenes provenían de ambientes limpios, acumulaban el doble de Cd que aquellos provenientes de ambientes contaminados. Sin embargo, esta respuesta los hace más susceptibles a otros tipos de presiones ambientales, resultando en modificaciones etológicas y fisiológicas (Horiguchi *et al.*, 2004). La supervivencia es el principal resultado de la estrategia anterior y corresponde a la tolerancia que poseen ciertos organismos frente a la contaminación, en ambientes donde otros grupos ya han desaparecido (Baqueiro-Cárdenas *et al.*, 2007).

Así por ejemplo, Franco *et al.* (2002) realizaron un programa de monitoreo durante 11 años en Costa Basque al norte de España, registrando los cambios en el predominio de dos especies de bivalvos, ostiones y mejillones, frente a la contaminación por metales pesados. En un comienzo estaban en una proporción de 1:5 (ostiones:mejillones), al finalizar el estudio la proporción fue de 4:1. Otro ejemplo, es el que registra Gillies *et al.* (2002) donde la tasa de extinción para gastrópodos es mayor que la de bivalvos en Atlanta, extinguiéndose 2 géneros, perdiéndose el 54% de las especies en 4 años en algunos cuerpos de agua, producto de la contaminación. La respuesta a este fenómeno puede estar dada por el aumento en la mortalidad de

estadios tempranos de moluscos presentes en un ambiente contaminado, entre un 37% a un 70% con respecto a lo normal (Cataldo *et al.*, 2001).

El cambio en el comportamiento es una de las estrategias más útiles para sobrevivir en la zona intermareal, donde los organismos están expuestos a variaciones en el nivel de mareas, lo cual implica estar sujetos a frecuente desecación, cambios de salinidad, de pH, de temperatura, radiación y al fuerte embate de las olas en la rompiente. Cuando cualquiera de estos factores se vuelve intolerante, los bivalvos cierran sus valvas y modifican el proceso respiratorio, aumentando el ácido láctico en la hemolinfa, similar a lo que ocurre en respuesta a una alta concentración de Cu en el ambiente, donde reducen la tasa de filtración y la tasa de captación de oxígeno (Almeida *et al.*, 2003). La respuesta en el cambio de comportamiento puede ser reflejo de un cambio fisiológico inducidos por los contaminantes, provocando el adelanto en el desove o modificando los niveles de algunas hormonas y neurotransmisores, importantes para mantener el tono muscular o que participan en el ciclo reproductivo (Almeida *et al.*, 2003; Binelli *et al.*, 2001).

Cuando los contaminantes no interfieren con procesos vitales o las concentraciones son suficientemente bajas para permitir la tolerancia, aclimatación o adaptación del organismo, se produce la bioacumulación y biomagnificación, las cuales dependen de: la biodisponibilidad del contaminante en el medio, la movilidad de los metales en el agua y su especiación química (por ejemplo Cu>Pb>Zn>Cr>Cd, en algunas algas), la transformación de metales como el As, Hg, Pb y Sn por metilaciones, el control ejercido por los componentes del sedimento (óxido de hierro y materia orgánica), la competencia entre metales por ingresar en los organismos (Cu, Ag, Zn y Cd) y los efectos de la bioperturbación (salinidad, coeficiente de redox y pH) (Baqueiro-Cárdenas *et al.*, 2007; Baumann *et al.*, 2009).

Los problemas, generados por la exposición a metales pesados, se acentúan en los tejidos de animales situados en los niveles superiores de la trama trófica debido a su biomagnificación (Fang *et al.*, 2006). Sin embargo no siempre ocurre esto, por ejemplo el trabajo de Lewis (1990) hace mención a que los ostiones bioacumulan Cu pero su depredador, el gastrópodo *Urosalpinx cinérea*, no lo hace.

La presencia de metales pesados tiene como consecuencia efectos en el metabolismo, como el aumento en la permeabilidad de la membrana celular y la inducción de proteínas afines a los metales, modificando la naturaleza y contenido de

proteínas en los tejidos (Lewis, 1990; Knigge *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2003), modificando parámetros fisiológicos y bioquímicos, los cuales entregan información fidedigna de lo que está ocurriendo en un sitio específico (Halliwell & Gutteridge, 1984, 1990; Lane, 2002, Halliwell, 2006). A esta respuesta se denomina biomarcador de exposición, herramienta útil para identificar el nivel de deterioro fisiológico de un organismo, o biomonitor, frente a la contaminación, siendo primordial para dar una alerta temprana y para la evaluación de la salud del medio ambiente acuático (Viarengo *et al.*, 2000).

La determinación de los contaminantes en tejidos, utilizando como biomonitor a los moluscos, corresponde a una herramienta indiscutible que asegura su presencia en el medio, en particular cuando sus concentraciones no son constantes o muy elevadas y su detección en agua o sedimentos se dificulta.

La tolerancia y adaptabilidad de los moluscos, han situado a estos organismos como preferidos en el monitoreo de la presencia de contaminantes e indicadores de la calidad de los ecosistemas. Los bivalvos como filtradores y algunos gasterópodos como herbívoros responden a una fracción particular del cuerpo de agua (Conti & Cecchetti, 2003). En 1985 se inició en los Estados Unidos el programa Mussel Watch que tenía como objetivo el monitoreo de la calidad de los cuerpos de agua interiores y costeros a través del estado y presencia de contaminantes en diferentes Moluscos: *Mytilus edulis*, *Crassostrea virginica*, *C. virginica*, *C. rhizophorae*, *M. edulis*, *M. californianus* y *Dreissena polymorpha*. El proyecto original se diseñó para monitorear el estado y cambios temporales en metales y contaminantes orgánicos, incluidos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's) bifeniles policlorinados (PCB's), pesticidas y metales traza, además de la evaluación del estado de salud de las poblaciones de moluscos (NOAA, 2012).

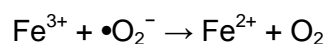
Por otro lado, los moluscos al ser consumidos por los seres humanos pueden convertirse en un riesgo para la salud, dada su capacidad de bioacumulación, no sólo de los contaminantes mencionados sino también de bacterias y patógenos, así como de ficotoxinas producto de las FAN (Richards, 2003). La exposición a metales resulta en efectos tóxicos y carcinogénicos en el ser humano, debido a los cambios genéticos y epigénicos tales como modificaciones en las bases nucleotídicas, ruptura de una o ambas hebras del ADN y entrecruzamiento proteína/ADN, promoviendo el desarrollo de tumores (Salnikow & Zhitkovich, 2008).

El níquel (Ni) fue clasificado oficialmente como carcinogénico para el ser humano el año 1990, por la International Agency for Research on Cancer (IARC). La exposición a este metal se considera riesgosa y puede provocar cáncer nasal y al pulmón. El cobalto (Co) es un metal traza y se encuentra en cantidades pequeñas en suelos, aguas, plantas, animales y en el ser humano juega un rol fundamental formando parte de la vitamina B<sub>12</sub>, importante en la formación de glóbulos rojos y el mantenimiento del sistema nervioso central. La IARC lo cataloga como posible carcinogénico debido a que inhibe los mecanismos de reparación del ADN y que genera cambios entre cromátidas hermanas y aneuploidias (cambio en el número de cromosomas). El vanadio (V) es uno de los mayores metales trazas en el ambiente, liberado por la quema de combustibles fósiles como el petróleo, carbón, alquitrán, betún y asfalto. Fue clasificado por la IARC en el 2003 como posible cancerígeno debido a que produce daño al ADN (efectos en la estabilidad e integridad del ADN), apoptosis y necrosis de células T en humanos y es más tóxico que el Co, Cr, Cu y Mo. El arsénico (As) está ampliamente distribuido en el ambiente y se puede encontrar en el aire, suelo, agua y alimentos. Fue clasificado por la IARC como carcinogénico el año 1987 y está vinculado con el riesgo a generar cáncer a la piel, hígado, vejiga y riñón, debido a que aumenta la proliferación celular, genera estrés oxidativo y afecta la modulación de la expresión de genes. El cromo (Cr) es ampliamente usado en la industria y fue clasificado por la IARC como carcinogénico en 1990 (Galanis *et al.*, 2009).

Los metales traza pueden generar estrés oxidativo y esta condición no solo genera cáncer, también está vinculado con enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y diabetes (Valko *et al.*, 2007).

Con respecto a la selección de un biomarcador adecuado, es necesario determinar cómo los distintos contaminantes, presentes en el medio acuático, pueden influir sobre el organismo biomonitor seleccionado provocando una respuesta única (Gil *et al.*, 2006). Los metales pesados, por ejemplo, alteran el metabolismo de los organismos a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), producidas por la reacción de Fenton, donde se cataliza el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), presente de forma natural en los organismos, con metales de transición como el cobre y hierro, dando como resultado la generación del radical más reactivo y oxidante de todos, el radical Hidroxilo (OH•). Otra reacción en la que participan los metales pesados generando OH•, es la de Haber-Weiss una reacción muy lenta que es catalizada por el hierro en estado de oxidación (III) (Halliwell & Gutteridge, 1984, 1990, 2006; Rodríguez *et al.*, 2001; Halliwell, 2006). El primer paso del ciclo catalítico se produce por la

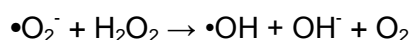
reducción del catión férrico a catión ferroso en presencia de anión radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ):



El segundo paso es una reacción de Fenton:



La reacción neta es:



El estar sometido a la producción de ERO, le exige a los organismos contar con una batería múltiple de defensa contra las diversas especies oxidantes, que por un lado tiendan a impedir su formación y por otro las neutralicen. Dentro de estas defensas están los antioxidantes, definidos como toda sustancia que hallándose presente en bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula: lípidos, proteínas y ADN), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato (Halliwell & Gutteridge, 1989). Los antioxidantes se pueden clasificar como exógenos, antioxidantes que ingresan a través de la alimentación, o como endógenos que son aquellos sintetizados por la célula, como las enzimas antioxidantes.

En la primera línea defensiva se encuentran las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD) que elimina al anión radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) catalizando su dismutación, en donde se genera como producto  $H_2O_2$  y  $O_2$ . Para evitar que el  $H_2O_2$  generado reaccione con un metal de transición, la enzima catalasa lo cataliza dando como producto dos moléculas de  $H_2O$  más una de  $O_2$  (Rodríguez *et al.*, 2001; Halliwell, 2006).

En un escenario desfavorable para un organismo, la exposición a agentes químicos potencialmente tóxicos, eleva la producción de ERO, provocando un desbalance en la homeostasis antioxidantes/ERO, conocido como estrés oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 1989, 2006; Halliwell, 2006). Esta condición provoca alteraciones en la relación estructura/función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado, provocado por el daño a lípidos, proteínas y ADN.

Los cambios en la actividad de las enzimas antioxidante en respuesta a otros factores diferentes a la exposición a metales trazas, han sido estudiado en varias especies

animales, incluidos aquellos producidos por anoxia (Hermes-Lima, 2004), estivación (Nowakowska *et al.*, 2009), por prolongado tiempo de exposición al calor (Lushchak & Bagnyukova, 2006), congelación (Joanisse & Storey, 1996) y debido a la variación estacional (Verlecar *et al.*, 2008).

A nivel mundial, son escasos los estudios que relacionan la contaminación por metales traza con estrés oxidativo, así como los que consideran a los biomarcadores de estrés oxidativo como una herramienta útil para dar una alerta temprana de daño oxidativo. Existen estudios que evalúan el efecto de la contaminación de los suelos y sedimentos sobre los parámetros oxidativos, utilizando como biomonitores anfibios, oligoquetos y algunos gastrópodos terrestres. Por ejemplo, Gaete *et al.* (2010) evaluaron la contaminación por metales pesados en suelos agrícolas a través del uso de biomarcadores de estrés oxidativo, utilizando como biomonitor la especie *Eisenia foetida*. Encontraron que el uso de parámetros oxidativos es más sensible que la pérdida de peso y bioacumulación de cobre frente a la variación de las concentraciones de este metal en los suelos, sugiriendo el uso de éstos para evaluar la toxicidad del Cu en los suelos. En la misma especie, Cataldo *et al.* (2011), encontraron que el Cu junto con el pH estaban correlacionados con los parámetros oxidativos y proponen la evaluación de la enzima glutatión s-transferasa (GST), junto con las proteínas quelantes metalotioneinas, como biomarcadores del efecto del Cu sobre los suelos.

En anfibios, en específico en *Rana esculenta*, Fenoglio *et al.* (2006) indican dos cambios adaptativos principales en la epidermis de la rana en respuesta a la contaminación del medio ambiente: (1) el aumento en la actividad de algunas enzimas antioxidantes y (2) la disminución de la queratinización, evidenciando que esta especie está equipada con mecanismos de defensa eficientes que se comportan más como una barrera química activa, que como un escudo físico pasivo, cuando se expone a contaminantes.

En un estudio realizado en el caracol de tierra *Theba pisana*, como organismo centinela frente a la contaminación por metales pesados, encontraron que las defensas antioxidantes son parámetros sensibles y darían una alerta temprana de lo que está ocurriendo en el entorno (Radwan *et al.*, 2010).

En organismos marinos, los estudios se concentran en el análisis de daño oxidativo y defensas antioxidantes en microalgas, algas y peces. Por ejemplo, ha sido demostrado

que los metales como el Cu y Fe, asociados a la descarga del efluente de la industria minera, generan efectos tóxicos en la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, provocando Lipoperoxidación y a su vez la activación de las defensas antioxidantes, convirtiéndose en biomarcadores de la exposición en ecosistemas acuáticos afectados por descargas de metales (Aránguiz *et al.*, 2009).

En otro estudio con la microalga *Chattonella marina* se analiza la relación entre la densidad celular y los cambios en la tasa de producción celular de  $O_2^{\bullet-}$ , e investigar el papel ecológico que el  $O_2^{\bullet-}$  puede jugar en el medio marino. Encontraron que puede ser un mecanismo de defensa alelopática para evitar el asentamiento bacteriano, contra peces o utilizarlo en la competencia con otras algas (Marshall *et al.*, 2005).

En macroalgas, *Scytosiphon lomentaria* muestra poseer un sistema antioxidante involucrado en la resistencia a niveles anormalmente altos de Cu en el alga pardas, además, esta resistencia involucra el consumo y la síntesis de compuestos antioxidantes solubles en el agua y la activación de la mayoría de las enzimas antioxidantes, explicando la existencia de esta especie en un entorno costero que recibe desechos de las minas de cobre en el norte de Chile (Contreras *et al.*, 2005). Además, el Cu podría afectar directamente la viabilidad de esporas y gametos de algas (Contreras *et al.*, 2009). La resistencia a concentraciones altas de metales en el ambiente, en *Ulva compressa*, es explicada por 18 genes que activan las defensas antioxidantes luego de someterlas a una concentración de  $10\mu M$  de Cu, durante 7 días, siendo éstos muy importantes durante la aclimatación y tolerancia a este metal traza (Contreras *et al.*, 2011).

Andrade *et al.* (2006) demuestran, en *L. nigrescens*, que antes que se desarrolle el estallido oxidativo el cobre debe llegar a un umbral intracelular, el cual se detecta por el aumento de las ERO, además, esta especie posee una capacidad antioxidante limitada para amortiguar el exceso de ERO, generada por los altos niveles de cobre presentes en la columna de agua.

En peces, las larvas del pez plano *Paralichthys olivaceus*, expuestos a Cd, reducen su crecimiento y se inhibe la actividad de las enzimas GST, CAT y SOD, se eleva la lipoperoxidación y GSH, producto del estrés oxidativo (Cao *et al.*, 2010). En otro estudio, el bagre *Sciades herzbergii* en estuarios contaminados, muestra que las enzimas GST y CAT están correlacionadas con el índice gonadosomático (Carvalho-Neta & Abreu-Silva, 2010).

En peces de aguadulce, los estudios de Almeida *et al.* (2002, 2009) en *Oreochromis niloticus*, demuestran que estos peces desarrollan resistencia debido al aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes, importantes en la protección contra el daño generado por Cd e inhibiendo la lipoperoxidación y que influye en su condición social, ya que del total de los peces expuestos al metal, los subordinados presentan una actividad enzimática antioxidante menor, comparada con los peces dominantes.

Blaha *et al.* (2004) comprobaron que el estrés oxidativo prolongado puede resultar en el deterioro sustancial del estado de salud, en la carpa *Hypophthalmichthys molitrix*.

En moluscos marinos, destaca el trabajo de Ivankovic *et al.* (2009) donde utilizaron al bivalvo *Dreissena polymorpha*, como biomonitor y se midió la biosíntesis de la proteína quelante metalotioneína (MT) en respuestas a la exposición a Cd, Cu y pentaclorofenoles (PCPs), confirmando la especificidad de las MT en respuesta al Cd.

Mientras que en Chile, destaca el trabajo de Hidalgo *et al.* (2006) quienes evaluaron parámetros oxidativos en hembras y machos de la especie *Chiton granosus* frente a contaminantes oxidativos, encontrando relación entre las variables analizadas en respuesta a la contaminación ambiental.

En *Perna viridis* el GSH hepático y la enzima CAT hepática muestran ser potenciales biomarcadores de la exposición a mezclas de contaminantes orgánicos y plaguicidas organoclorados (Richardson *et al.*, 2008).

Box *et al.* (2007) mencionan que el uso de biomarcadores de estrés oxidativo es una buena metodología para establecer el impacto antropogénico en las aguas costeras y que el bivalvo *Mytilus galloprovincialis* posee una alta sensibilidad a la contaminación orgánica e inorgánica.

En *Chlamys farreri*, Pan *et al.* (2009) explican que de las enzimas antioxidantes que componen el sistema de desintoxicación, la más importante frente a los PAH's fue GST, debido a la función de la desintoxicación de larga duración, además sugieren que las actividades de las enzimas GST, SOD, CAT y GPx, en conjunto con los niveles de Lipoperoxidación, podrían ser considerados como herramientas sensibles en estudios de toxicidad para organismos marinos (Pan *et al.*, 2009).

Se sabe que las algas marinas, debido a su capacidad de acumulación, pueden alcanzar un contenido de elementos trazas en varios órdenes de magnitud mayores con respecto al medio acuático en el que habitan, hasta un 95% mayor en algunas especies de agua dulce y un 60% en algunas especies de algas rojas, por esta razón se espera que los organismos que se alimentan de algas biomagnifiquen y sean considerados excelentes biomonitores (Barreiro *et al.* 2002; Brown *et al.* 1999; Lee *et al.* 2005; Jakimska *et al.*, 2011; Sawidis *et al.* 2001; Vasconcelos & Leal 2001).

El gastrópodo *Echinolittorina peruviana* (Lamarck, 1822), posee una amplia distribución geográfica, desde Panamá (8°58' N 79°32' O) hasta Chiloé (42°12' S 73°48' O), ubicándose en la zona intermareal alta, formando agrupaciones, sometidas a los ciclos de mareas (Guzmán *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 2000). Es una especie “herbívora” que se alimenta de las comunidades de microflora epilítica, como diatomeas, algas azul-verdosas, esporas de algas, algas filamentosas microscópicas y plántulas de macroalgas (Nicotri, 1977; Morriconi, 1999; Conti *et al.*, 2006). Esta especie es ramoneadora, utiliza su rádula para “raspar” lo que está en la superficie y su dieta, como se mencionó antes, se basa principalmente en algas depositadas en las rocas adquiriendo xenobióticos, como metales, de los alimentos (Ahn *et al.*, 2002), haciendo presumible una alta capacidad de bioacumulación.

Las características que posee *E. peruviana*, hacen de esta especie una herramienta particularmente única para realizar estudios relacionados con la contaminación por metales traza y su efecto sobre biomarcadores de estrés oxidativo.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Los individuos de *E. peruviana* presentes en las zonas con actividad minera, evidencian un mayor daño en biomoléculas y variación de la actividad antioxidante, correlacionándose con la concentración de metales bioacumulados, en comparación con aquellos presentes en zonas sin actividad.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

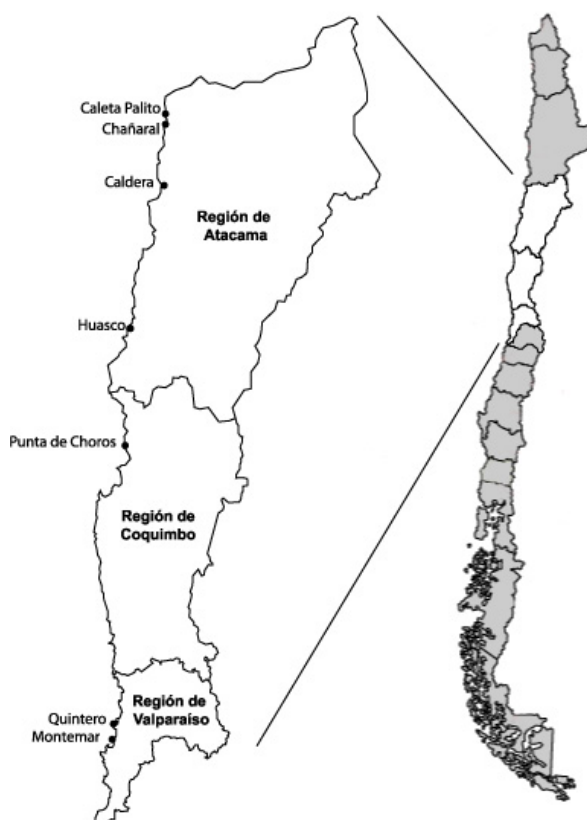
Evaluar el estrés oxidativo en *E. peruviana*, presente en sectores costeros con y sin actividad minera, Caleta Palito (26°17'S), Chañaral (26°21'S), Caldera (27°03'S) y Huasco (28°27'S), además de Punta Choros (29°15'S), Quintero (32°47'S) y Montemar (32°58'S), respectivamente.

### **Objetivo específicos:**

- Determinar la concentración de metales traza en aguas y tejido en *E. peruviana* colectadas de los diferentes sitios de muestreo con y sin actividad minera.
- Determinar la capacidad antioxidante total (TRAP) y enzimática (SOD y CAT) en *E. peruviana* colectadas en sitios con y sin actividad minera.
- Determinar el daño a biomoléculas, daño en la membrana celular utilizando el análisis TBARS, y daño a proteínas, a través del análisis de carbonilos, en *E. peruviana* encontrada en sitios con y sin actividad minera.
- Comparar la actividad antioxidante y daño oxidativo en *E. peruviana* entre los sitios de muestreo.
- Correlacionar los parámetros oxidativos con los metales bioacumulados.

## METODOLOGÍA

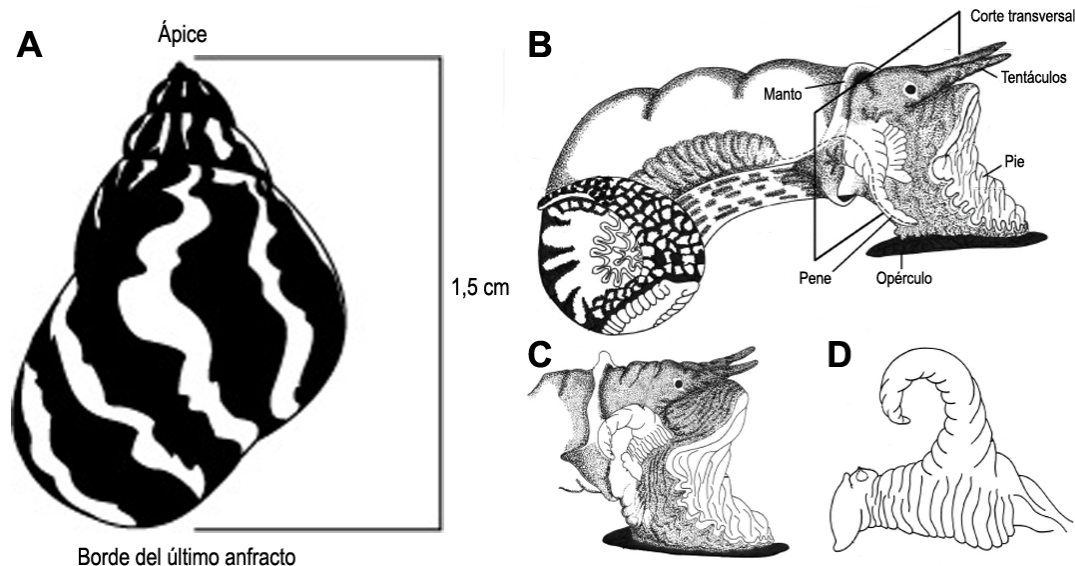
**Obtención de muestras:** Los organismos fueron obtenidos durante el período de bajamar, en el mes de Septiembre del año 2011, desde localidades de la región de Atacama (Caleta Palito, Chañaral, Caldera y Huasco), la región de Coquimbo (Punta de Choros) y de la región de Valparaíso (Montemar y Quintero) (figura 1), para luego trasladarlos en un contenedor herméticos, que contenía icepack, al Laboratorio de Radicales Libres.



**Figura 1:** Sitios de Muestreo, Caleta Palito (26°17'S), Chañaral (26°21'S), Caldera (27°03'S) y Huasco (28°27'S), Punta Choros (29°15'S), Quintero (32°47'S) y Montemar (32°58'S).

Una vez en el laboratorio, se procedió a seleccionar los individuos de acuerdo a tamaño (1,5 cm desde el ápice hasta el borde del último anfracto) y sexo (machos). Posteriormente se seleccionaron 6 individuos de cada localidad para realizar las pruebas de parámetros oxidativos y el resto fue almacenado a -20°C para procesarlos y determinar metales bioacumulados.

Para las pruebas de estrés oxidativo, se separó el tejido de la concha y se utilizó la musculatura correspondiente a la porción del pie hasta el borde del manto, como muestra la figura 2 basado en el esquema modificado y extraído del trabajo de Castillo & Brown (2008).



**Figura 2:** Morfología de *E. peruviana*. A) Morfología de la concha, B) Morfología externa y corte realizado para los experimentos, C) fracción utilizada para los análisis y D) órgano reproductor masculino (esquema modificado y extraído del trabajo de Castillo & Brown, 2008).

Luego, la musculatura fue macerada con PBS (pH: 7,0) para generar un homogenizado, el cual posteriormente se sometió a centrifugación por 15 min a 3.000 rpm en temperatura ambiente, para lograr obtener un sobrenadante y un pellet.

#### **Determinación de metales en agua y tejido (Bruger *et al.*, 2007):**

Los análisis de metales en agua fueron realizados directamente a través de ICP óptico.

Para determinar los metales bioacumulados, los individuos fueron separados de su concha y puestos sobre placas petri, las cuales se colocaron en una estufa a 40 °C durante cuatro días, para secar por completo el tejido. Transcurrido el tiempo, se maceraron todas las muestras, separadas por localidad, obteniendo un polvo fino, el que se sometió a digestión. Ésta consistió en agregar 10 mL de ácido nítrico y 5 mL de

peróxido de hidrógeno a cada muestra, dejándolos por una noche. A la mañana siguiente se procedió a calentar a 180 °C durante dos horas evitando quemar la muestra. Luego se lava cada muestra con agua desionizada y se agrega 1 mL de ácido perclórico, colocándola nuevamente a calentar a 180 °C hasta que se evaporen los ácidos. Finalmente se afora cada muestra y se evalúa cada metal a través de un ICP óptico.

El factor de bioacumulación (FBA) en el tejido se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula (Boese & Lee, 1992):

$$FBA_x = C_t/C_x$$

**Donde:**

**FBA<sub>x</sub>:** Factor de Bioacumulación (g/L de peso seco de tejido).

**C<sub>t</sub>:** Concentración del contaminante en el tejido del organismo (µg/g de peso seco de tejido).

**C<sub>x</sub>:** Concentración del contaminante en el agua (µg/L).

#### **Determinación de capacidad antioxidante total (TRAP) (Romay *et al.*, 1996):**

Para este análisis se utiliza el sobrenadante obtenido luego de centrifugar el macerado del pie. Se mezcla 10 µL del sobrenadante con 1 mL de la mezcla 1:1 de ABTS (2,2'-azinobi(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) 150 µM con ABAP (2,2'-azobis(2-amidinopropano)) 10 mM, previamente incubada a 45 °C por 30 minutos. La adición de la muestra permite que los antioxidantes presentes en ésta atrapen a los radicales producidos por la mezcla, con lo que la lectura disminuye en el tiempo. Por esto, se mide la cinética a 10, 30 y 50 segundos, tras la adición de la muestra, a 734 nm. La capacidad antioxidante así medida es comparada con la capacidad antioxidante de Trolox y expresada como unidades de concentración (µM) de Trolox.

#### **Determinación de proteínas totales (Lowry *et al.*, 1951):**

La concentración total de proteínas se determina por medio de la reacción entre los residuos de tirosina presentes en la muestra y el reactivo de Folin-Ciocalteu usando albúmina (BSA) como patrón. El análisis consta de la reacción del reactivo de cobre alcalino (RCA) (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,94 M, KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> 3,5 mM, CuSO<sub>4</sub> 2 mM y NaOH 0,5 M), el reactivo Folin-Ciocalteu mezclado con agua destilada (1:20) y 10 µL de macerado. Luego se incubaba a 55°C por 5 minutos y se lee a 650 nm.

**Determinación de SOD (Fridovich, 1994):**

Se utiliza en esta técnica, una alícuota de sobrenadante del pie. Se mide espectrofotométricamente la reducción de la formación de radical superóxido en el sistema xantina/xantina oxidasa. Se prepara una solución A, compuesta por xantina 0,5 mM y citocromo c 20  $\mu$ M disueltas en PBS pH 7,8 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50mM disueltos en EDTA 0,1 Mm) y una solución B compuesta por xantina oxidasa y EDTA 0,1 mM en una proporción 1:40. Se detecta la actividad enzimática a 550 nm, mezclando 2,9 mL de la solución A, 50  $\mu$ L de la solución B y 50  $\mu$ L de la muestra, expresándola como unidades de enzima/mg de proteína con los datos obtenidos en la determinación de proteínas totales de Lowry *et al*, 1951.

**Determinación de Catalasa (Aebi, 1984):**

La actividad de esta enzima será determinada a partir de las mismas muestras utilizadas para SOD. Esta determinación se realiza por medio de espectrofotometría detectando la pérdida de absorbancia a 240nm de una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3 M al agregar 100  $\mu$ L de la muestra y 2,9 mL de PBS pH 7,8 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50mM). La lectura se realiza a 240 nm y los valores se expresan como unidades de enzima/mg de proteína con los datos obtenidos en la determinación de proteínas totales de Lowry *et al*, 1951.

**Determinación de lipoperoxidación (T-BARS) (Esterbauer *et al.*, 1982):**

Para esta prueba se utilizaron los pellet del pie del caracol. Éstos fueron tratados con ácido tricloroacético al 10% (concentración final) y centrifugados por 15 minutos a 3.000 r.p.m. con el fin de hacer decantar las proteínas y eliminarlas. A continuación, 1 ml del sobrenadante de la muestra se mezcló con 0,33% p/v (concentración final) de ácido tiobarbitúrico, el que reacciona con los aldehidos presente en la muestra. Luego, las muestras fueron sometidas a ebullición por 30 minutos y su espectro de emisión fue registrado en un espectrofotómetro UV-visible entre 400-600nm, para determinar la absorbancia obtenida a los 535 nm y extrapolar en una curva de calibrado de MDA.

**Determinación de carbonilos (Palamanda and Kehrer, 1992):**

Para este análisis se utiliza el macerado del pie de caracol. Este método se basa en la reacción de los grupos carbonilos, generados por la oxidación de proteínas, con la 2-4-dinitrofenilhidrazina. El análisis consiste en mezclar 100  $\mu$ L del macerado con 300 $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA 50% p/v), se deja 5 minutos en hielo y se centrifuga a 8.000 g por 5 minutos a 15 °C, dejando el pellet y eliminando el sobrenadante. Esto se hace por duplicado. A continuación a uno de los tubos se agrega 1mL de 2-4-

dinitrofenilhidrazina (0,3% en HCL 2 N) y al otro 1 mL de ácido clorhídrico 2 N, se agitan y se dejan por 1 hora en oscuridad agitando periódicamente. Transcurrido el tiempo se agrega, a cada tubo, 0,5mL de TCA 50%, se agitan y conservan en hielo por 5 minutos para luego centrifugar a 8.000 g, por 5 minutos a 15 °C. Posteriormente se elimina cuidadosamente el sobrenadante y se procede a lavar 3 veces con 1mL de mezcla etanol:acetato de etilo (1:1), se agita durante 10 minutos y se centrifuga a 8000 g, durante 5 minutos a 15°C, eliminando el sobrenadante en cada oportunidad. Luego se evapora lo que queda del solvente utilizando nitrógeno gaseoso. Finalmente se agregan, en cada tubo, 2 mL de urea al 6 M y se incuban a 37 °C por 30 minutos. La reacción es detectada espectrofotométricamente a 370 nm.

#### **Análisis de datos:**

Previo a la elección del análisis estadístico, se realizaron análisis de normalidad y homocedasticidad. Posterior a esto, se realizaron pruebas de ANOVA, para datos paramétricos, o Kruskal-Wallis en el caso que los datos se comporten como no paramétricos, con un nivel de confianza del 95%. Al encontrar diferencias significativas se realizaron pruebas a *posteriori*. Además, se realizaron pruebas de correlación entre los parámetros oxidativos y los niveles de metales bioacumulados y prueba de componentes principales. Todas las pruebas se realizaron utilizando el programa Statistica 7.

## RESULTADOS

Las tablas 1 y 2 muestran la concentración de metales en el agua y en el tejido correspondiente al pie de *E. peruviana*, respectivamente, obtenidos de los diferentes sitios de muestreo. Como muestra la tabla 1, el Cu y Fe en el agua, fueron mayores en la localidad de Caleta Palito comparado con las otras localidades ( $26,21 \pm 0,05 \mu\text{g/L}$ ,  $9 \pm 2 \mu\text{g/L}$  respectivamente), donde se producen descargas directas de desechos mineros en la costa, mientras que en las localidades de Caldera, Huasco y Punta Choro no se detectó Cu. Con respecto al Cr, las localidades de Caldera, Quintero y Montemar son las que muestran mayor concentración ( $1,1 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$ ,  $1,8 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$  y  $1,78 \pm 0,005 \mu\text{g/L}$  respectivamente). En el caso del Mo y el Cd, se observa algo singular dado que las concentraciones mayores se detectaron en las localidades de Quintero y Montemar, localidades consideradas con poca actividad humana relacionada con minería ( $8,5 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$  y  $6,8 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$ ;  $2,13 \pm 0,04 \mu\text{g/L}$  y  $1,8 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$  respectivamente) mientras que el Zn en estas dos localidades fue el menor detectado entre todos los sitios ( $2,6 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$  y  $2,2 \pm 0,3 \mu\text{g/L}$ ). Con respecto al As no se observan grandes diferencias entre las localidades muestreadas.

**Tabla 1:** Concentración de metales ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) presentes en el agua de cada sitio de muestreo (n = 2, promedio  $\pm$  d.e.).

	Cu	Fe	Cr	Mo	Zn	As	Cd
<b>Caleta Palito</b>	$26,21 \pm 0,06$	$9,00 \pm 2,00$	$0,60 \pm 0,09$	$0,72 \pm 0,01$	$5,30 \pm 0,70$	$1,68 \pm 0,01$	$0,36 \pm 0,02$
<b>Chañaral</b>	$12,54 \pm 0,04$	$4,10 \pm 0,20$	$0,60 \pm 0,20$	$1,13 \pm 0,01$	$6,90 \pm 0,20$	$1,52 \pm 0,07$	$0,27 \pm 0,06$
<b>Caldera</b>	0,00	$7,00 \pm 2,00$	$1,10 \pm 0,40$	$0,76 \pm 0,09$	$6,40 \pm 0,20$	$1,40 \pm 0,06$	$0,70 \pm 0,05$
<b>Huasco</b>	0,00	$5,80 \pm 0,40$	$0,38 \pm 0,06$	$0,77 \pm 0,02$	$6,60 \pm 0,30$	$1,47 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,05$
<b>Punta Choro</b>	0,00	$4,10 \pm 0,70$	$0,30 \pm 0,10$	$0,55 \pm 0,01$	$5,60 \pm 0,40$	$1,45 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,05$
<b>Quintero</b>	$4,30 \pm 0,50$	$1,23 \pm 0,03$	$1,80 \pm 0,20$	$8,50 \pm 0,10$	$2,60 \pm 0,40$	$1,73 \pm 0,00$	$2,13 \pm 0,04$
<b>Montemar</b>	$2,10 \pm 0,50$	$1,24 \pm 0,04$	$1,78 \pm 0,01$	$6,80 \pm 0,10$	$2,20 \pm 0,30$	$1,62 \pm 0,00$	$1,80 \pm 0,10$

**Tabla 2:** Concentración de metales ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) en el pie del caracol *E. peruviana* en los diferentes sitios de muestreo (n =2, promedio  $\pm$  d.e.).

	Cu	Fe	Cr	Mo	Zn	As	Cd
<b>Caleta Palito</b>	$856,20 \pm 80,56$	$602,72 \pm 0,52$	$1,05 \pm 0,12$	$0,48 \pm 0,23$	$55,85 \pm 3,09$	$0,60 \pm 0,04$	$7,70 \pm 2,64$
<b>Chañaral</b>	$885,15 \pm 1,70$	$167,63 \pm 2,25$	$0,99 \pm 0,18$	$0,46 \pm 0,13$	$53,22 \pm 1,14$	$0,36 \pm 0,12$	$3,09 \pm 0,06$
<b>Caldera</b>	$145,76 \pm 4,53$	$200,87 \pm 34,66$	$1,26 \pm 0,54$	$0,37 \pm 0,14$	$55,62 \pm 1,64$	$0,44 \pm 0,14$	$3,48 \pm 0,03$
<b>Huasco</b>	$92,67 \pm 1,17$	$189,25 \pm 10,29$	$0,77 \pm 0,12$	$0,22 \pm 0,12$	$51,35 \pm 0,45$	$0,43 \pm 0,02$	$3,22 \pm 0,01$
<b>Punta Choro</b>	$52,53 \pm 0,44$	$126,41 \pm 20,41$	$0,44 \pm 0,04$	$0,21 \pm 0,03$	$37,69 \pm 0,10$	$0,36 \pm 0,04$	$11,13 \pm 0,01$
<b>Quintero</b>	$396,88 \pm 3,38$	$95,36 \pm 2,17$	$0,32 \pm 0,03$	$0,44 \pm 0,05$	$62,92 \pm 0,48$	$0,36 \pm 0,03$	$1,87 \pm 0,01$
<b>Montemar</b>	$578,58 \pm 32,64$	$485,81 \pm 81,73$	$0,72 \pm 0,09$	$0,40 \pm 0,01$	$59,99 \pm 3,94$	$0,48 \pm 0,02$	$2,81 \pm 0,22$

Con respecto a la concentración de metales en el tejido, los organismos obtenidos desde Chañaral y Caleta Palito mostraron altos niveles de Cu bioacumulados ( $885,15$

$\pm 1,7 \mu\text{g/g}$  y  $856,2 \pm 80,56 \mu\text{g/g}$  respectivamente) en comparación con los tejidos provenientes de los otros sitios, en los de Montemar se observa algo inusual considerando que es una localidad sin actividad minera, la concentración de Cu fue alta ( $578,58 \pm 32,64 \mu\text{g/g}$ ). Con respecto al Fe bioacumulado, los organismos obtenidos desde Caleta Palito y Montemar muestran los valores mayores en relación a las otras localidades ( $602,72 \pm 0,52 \mu\text{g/g}$  y  $485,81 \pm 81,73 \mu\text{g/g}$  respectivamente). Los altos valores encontrados en los organismos de Montemar podrían estar relacionados con la refinería de petróleo ENAP presente en la Bahía de Concón, cuyas corrientes van en dirección al sur donde se encuentra Montemar (Anexo 16). Las refinerías tiene como finalidad obtener a partir del petróleo la mayor cantidad de productos, que van desde los gases ligeros, como el propano y el butano, hasta las fracciones más pesadas, fuel óleo y asfaltos, pasando por otros productos intermedios como las gasolinas, el gasoil y los aceites lubricantes. Muchos de estos productos o los que resultan del tratamiento de los residuos del refinamiento, residuos que son eliminados al medio, poseen metales pesados, como es el caso del asfalto cuyo principal componente es el betún, el que posee metales pesados como níquel, vanadio, plomo, cromo, cobre, mercurio, arsénico, selenio, entre otros. Además, en Los Andes se encuentra la empresa CODELCO división andina, quienes producen cobre y molibdeno, cuyos residuos son arrojados al Rio Aconcagua que desemboca en la Bahía de Concón.

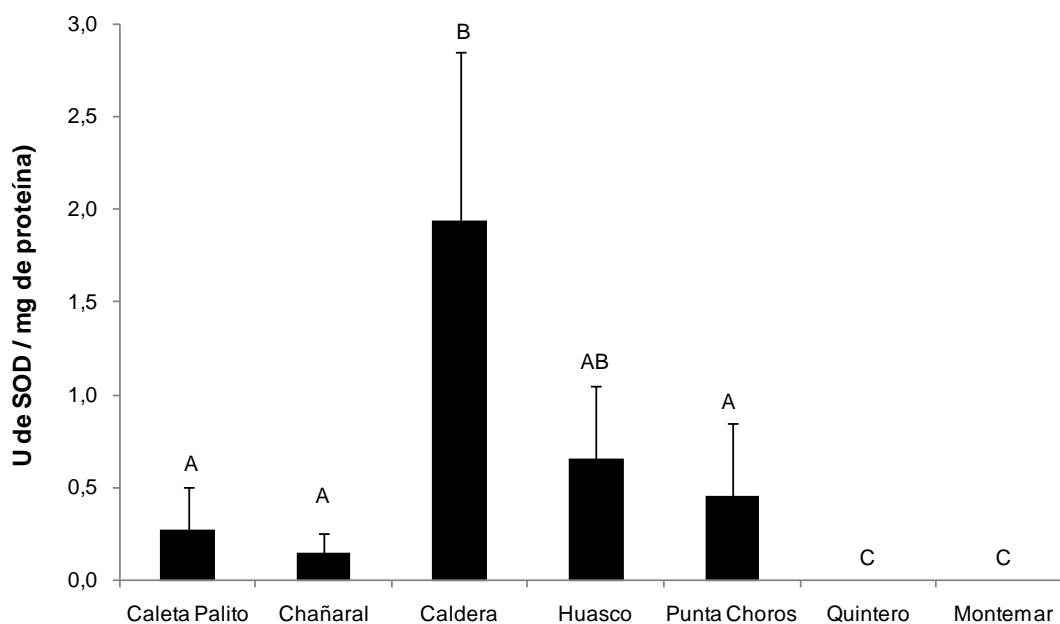
El Cr bioacumulado, entre las localidades el mayor valor se encontró en los tejidos de Caldera ( $1,26 \pm 0,54 \mu\text{g/g}$ ) y el menor fue en Quintero ( $0,32 \pm 0,03 \mu\text{g/g}$ ). Los metales Mo, Zn y As bioacumulados en *E. peruviana* no variaron mucho entre las localidades. Mientras que el Cd fue alto en los organismos presentes en Punta Choro y Caleta Palito ( $11,13 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$  y  $7,7 \pm 2,64 \mu\text{g/g}$  respectivamente).

Al calcular el factor de bioacumulación considerando la concentración de metales en el agua y tejidos (Tabla 3), se puede observar un resultado no esperado, los altos valor del factor de bioacumulación encontrados en los organismos originarios de Montemar y Quintero para Cu-Fe-Zn, consideradas localidades con bajo impacto humano en comparación con el resto de las localidades, debido a la gran cantidad de estos metales presentes en el tejido comparado con lo disponible en el medio. Con respecto al factor de bioacumulación en el pie de *E. peruviana*, también se puede agregar que los metales analizados se bioacumulan en el siguiente orden de magnitud Fe>Cu>Cd>Zn>Cr>Mo>As.

**Tabla 3:** Factor de bioacumulación ( $\text{g L}^{-1}$ ) en el pie del caracol *E. peruviana* obtenido desde los diferentes sitios de muestreo.

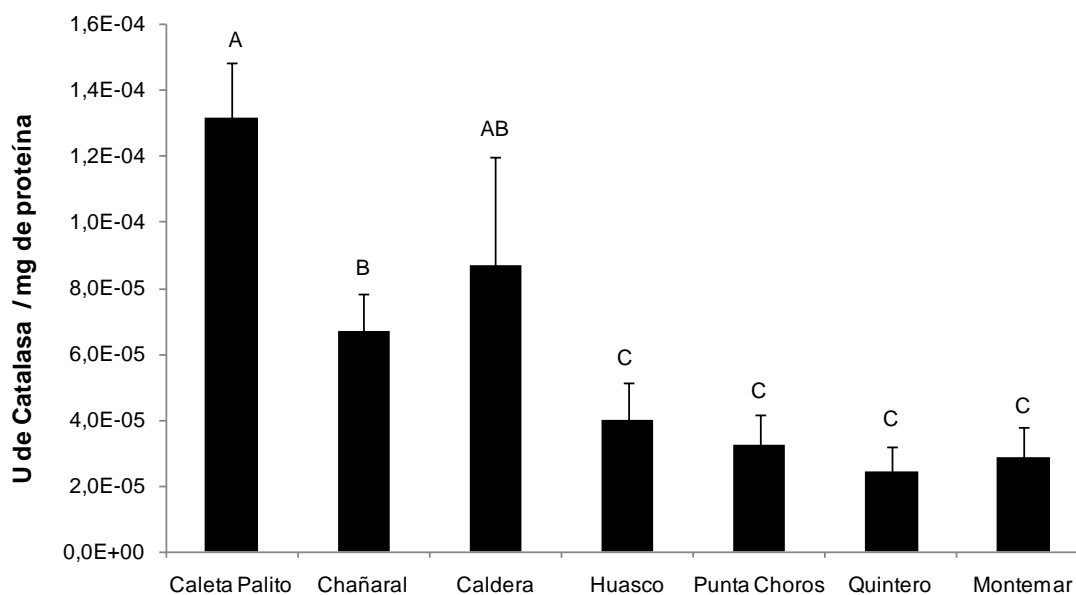
	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Cr</b>	<b>Mo</b>	<b>Zn</b>	<b>As</b>	<b>Cd</b>
<b>Caleta Palito</b>	32,67	66,97	1,76	0,68	10,54	0,36	21,41
<b>Chañaral</b>	70,59	40,89	1,66	0,41	7,71	0,24	11,46
<b>Caldera</b>	0,00	28,70	1,15	0,50	8,69	0,32	4,97
<b>Huasco</b>	0,00	32,63	2,03	0,30	7,78	0,29	16,14
<b>Punta Choro</b>	0,00	30,83	1,49	0,40	6,73	0,25	55,67
<b>Quintero</b>	92,30	77,53	0,18	0,05	24,20	0,21	0,88
<b>Montemar</b>	275,51	391,78	0,41	0,06	27,27	0,30	1,56

La actividad de SOD, en el pie de *E. peruviana*, presentó diferencias significativas ( $p=0,0000$  Anexo 1) entre las localidades (Figura 3). Las muestras obtenidas desde Montemar y Quintero al no detectarse actividad enzimática, resultaron ser diferentes significativamente a las otras localidades ( $p>0,05$ ). Con respecto a las muestras que presentaron mayor actividad de SOD, fueron las correspondientes a las obtenidas desde Caldera, diferente a todas las demás localidades ( $p>0,05$ ) con excepción de Huasco ( $p=0,595$ ). Estas diferencias podrían explicarse al comparar los metales bioacumulados en el tejido en estudio entre las localidades (Tabla 2). Si bien los organismos provenientes de Caleta Palito presentan las mayores concentraciones de los metales evaluados casi en todos los casos, se puede observar que los individuos presentes en Caldera, muestran valores elevados de Fe, Cr, Zn y Cd en el pie, sin embargo no hubo correlación entre este parámetro oxidativo y los metales mencionados ( $p>0,05$ , Anexo 2). Sin considerar las localidades en donde no se detectó actividad, las muestras obtenidas desde Chañaral y Caleta Palito mostraron la actividad enzimática mas baja en comparación con las colectadas en los otros sitios ( $0,15 \pm 0,09$  y  $0,27 \pm 0,22$  unidades de enzima / mg de proteína, respectivamente).



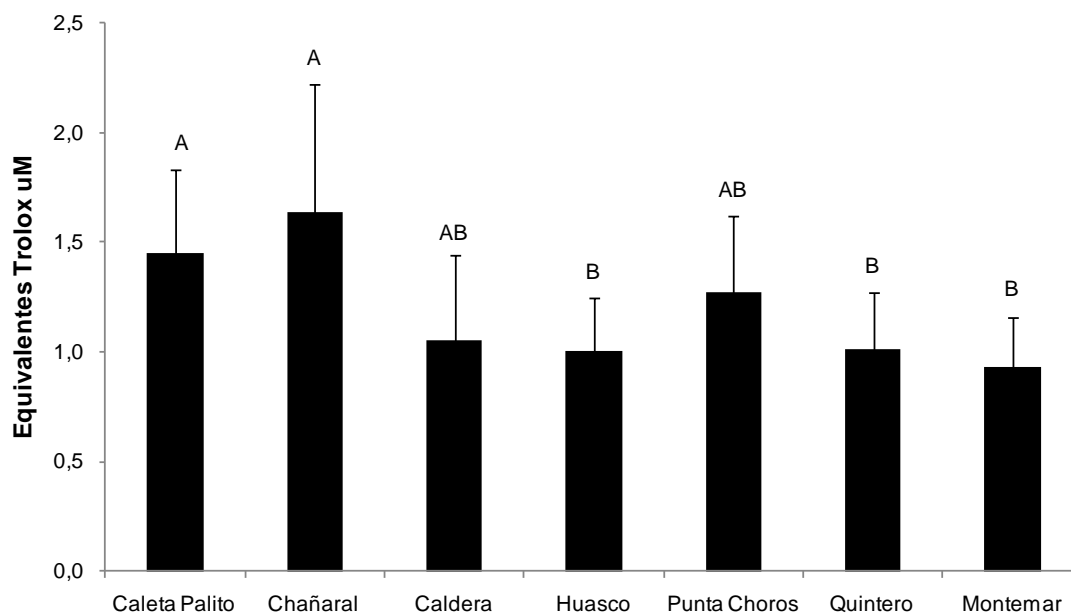
**Figura 3:** Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) en el músculo del caracol *E. peruviana*, para cada sitio de muestreo (n = 6, promedio  $\pm$  d.e.).

La actividad de CAT, en el pie de *E. peruviana*, presentó diferencias significativas entre las localidades ( $p= 0,0000$ , Figura 4, Anexo 3). Las muestras que presentaron mayor actividad enzimática fueron las correspondientes a las obtenidas desde Caleta Palito, diferente a todas las demás localidades ( $p= 0,00$ ) con excepción de Caldera ( $p=0,396$ ). Caleta Palito es la localidad que presenta mayores valores de metales bioacumulados, Cu, Fe, Cr, Zn y Cd en el pie, y podría explicar la alta actividad de esta enzima en comparación con las otras localidades (Tabla 2) sin embargo solo hubo correlación entre este parámetro oxidativo y el Cr ( $p= 0,002519$ ,  $R= 0,9285$ , Anexo 4). Las muestras obtenidas desde Quintero y Montemar mostraron la actividad enzimática mas baja en comparación con las colectadas en los otros sitios ( $2,4 \times 10^{-5} \pm 3,9 \times 10^{-5}$  y  $2,4 \times 10^{-5} \pm 3,3 \times 10^{-5}$  unidades de enzima / mg de proteína, respectivamente), sin embargo no fueron estadísticamente diferentes a las muestras de Huasco y Punta Choros ( $p>0,05$ , Anexo 3).



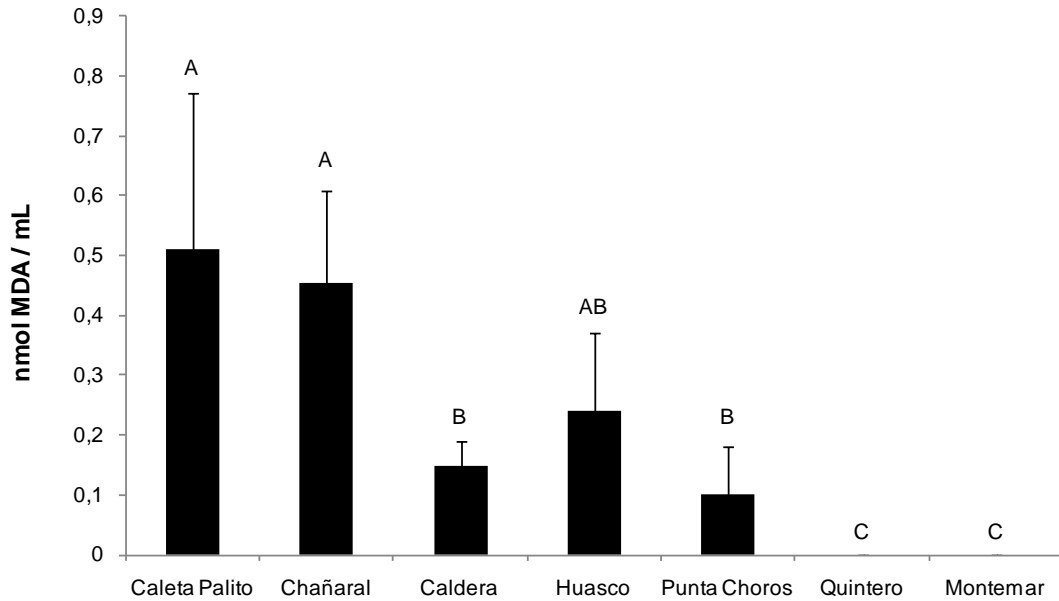
**Figura 4:** Actividad enzimática de catalasa (CAT) en el músculo del caracol *E. peruviana*, para cada sitio de muestreo (n = 6, promedio  $\pm$  d.e.).

La capacidad antioxidante total (TRAP), en el tejido de *E. peruviana*, presentó diferencias significativas entre las localidades ( $p= 0,0000$ , Figura 5, Anexo 5). Las muestras correspondientes a Chañaral fueron las que mostraron mayor capacidad antioxidante total, sin embargo no son diferente a las obtenidas desde Caleta Palito, Caldera y Punta Choros ( $p>0,05$ ). Ninguno de los metales bioacumulados analizados mostro correlación con este parámetro oxidativo (Anexo 6). Las muestras obtenidas desde Montemar mostraron la capacidad antioxidante total mas baja en comparación con las colectadas en los otros sitios ( $0,932 \pm 0,228$  equivalentes Trolox  $\mu\text{M}$ ), sin embargo estos valores no fueron estadísticamente diferentes a los encontrados en las muestras provenientes desde las localidades de Caldera, Huasco, Punta Choros y Quintero ( $p>0,05$ , Anexo 5).



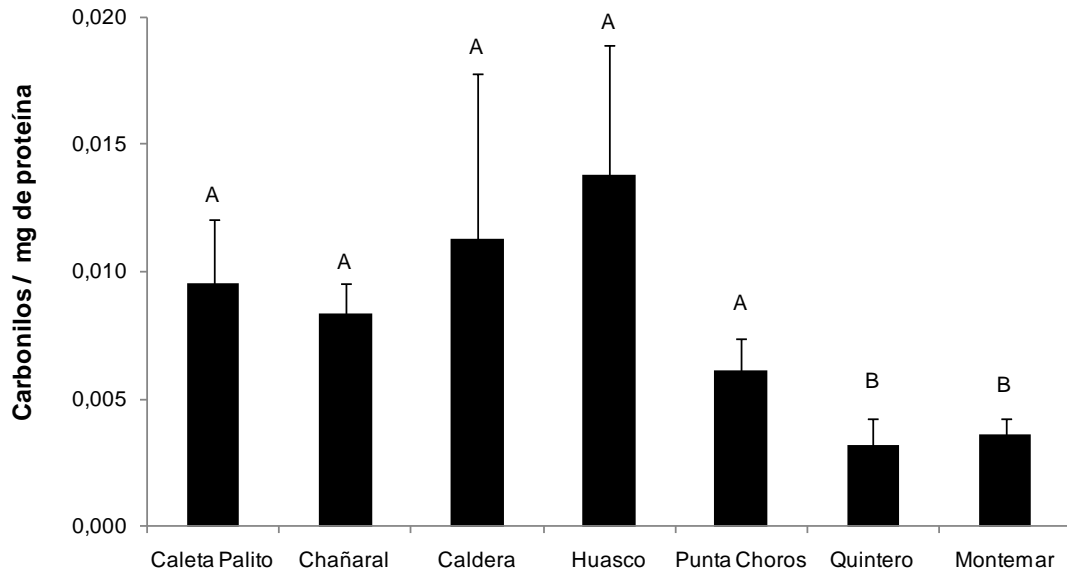
**Figura 5:** Capacidad antioxidante total (TRAP) en el musculo del caracol *E. peruviana*, para cada sitio de muestreo (n = 6, promedio ± d.e.).

Con respecto al daño oxidativo, en específico la lipoperoxidación en las células del pie de *E. peruviana*, la prueba TBARS muestra que entre las muestras obtenidas desde los diferentes sitios de muestreo, existen diferencias significativas ( $p= 0,0000$ , Figura 6, Anexo 7). Las muestras obtenidas desde Caleta Palito fueron las que evidenciaron mayor daño a lípidos ( $0,510 \pm 0,260$  nM de MDA), sin embargo no fueron significativamente distintas a las de Chañaral y Huasco ( $p>0,05$ , Anexo 7). En las muestras obtenidas desde Montemar y Quintero no se detectó lipoperoxidación, resultando diferentes significativamente a las otras localidades ( $p>0,002$ , Anexo 6). No se observó correlación entre los metales bioacumulados analizados y este tipo de daño oxidativo ( $p> 0,05$ , Anexo 8). Sin considerar las localidades en donde no se detectó actividad, las muestras obtenidas desde Punta Choros y Caldera mostraron la lipoperoxidación más baja en comparación con las muestras obtenidas desde los otros sitios ( $0,100 \pm 0,078$  y  $0,148 \pm 0,042$  nM MDA, respectivamente).



**Figura 6:** Oxidación de lípidos en el músculo del caracol *E. peruviana*, para cada sitio de muestreo (n = 6, promedio ± d.e.).

Continuando con los resultados de daño oxidativo, el daño a proteínas en las células del pie de *E. peruviana*, muestra que entre las muestras obtenidas desde los diferentes sitios de muestreo, existen diferencias significativas ( $p= 0,0187$ , Figura 7, Anexo 9). Las muestras obtenidas desde Huasco fueron las que mostraron mayores valores de carbonilos ( $0,013 \pm 0,005$  carbonilos \* mg de proteína<sup>-1</sup>), sin embargo estos no muestran diferencias significativas con los valores obtenidos desde Caleta Palito, Chañaral, Caldera y Punta Choros ( $p>0,05$ , Anexo 9). Las muestras obtenidas desde Quintero y Montemar resultaron tener los valores mas bajos de daño a proteínas entre todos los sitios ( $0,0032 \pm 0,001$ ,  $0,0036 \pm 0,0005$  carbonilos \* mg de proteína<sup>-1</sup>, respectivamente), siendo diferentes significativamente ( $p>0,01$ , Anexo 9). No se observó correlación entre los metales bioacumulados analizados y el daño a proteínas ( $p> 0,05$ , Anexo 10).



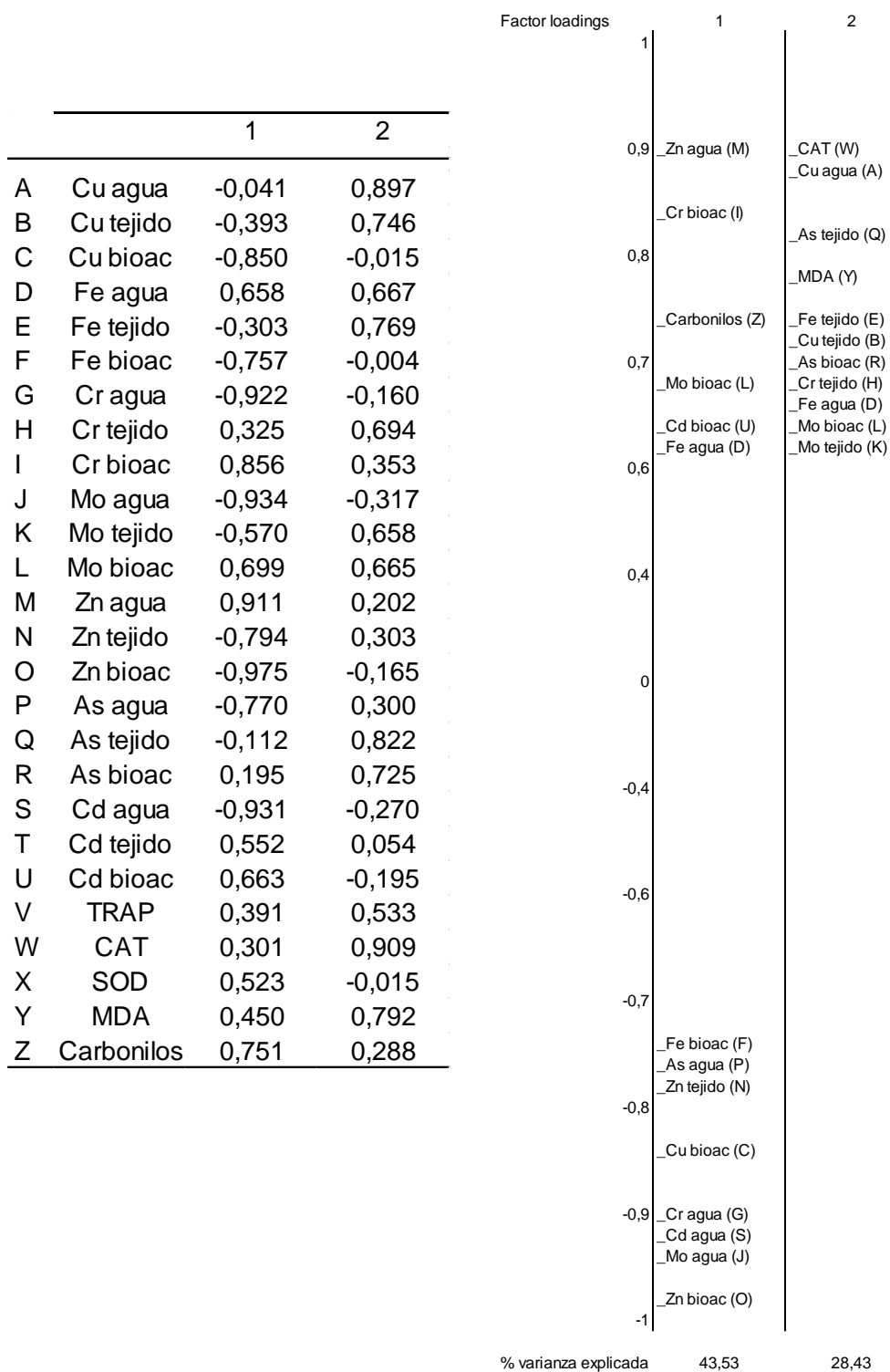
**Figura 7:** Oxidación de proteínas en el musculo del caracol *E. peruviana*, para cada sitio de muestreo (n = 6, promedio ± d.e.).

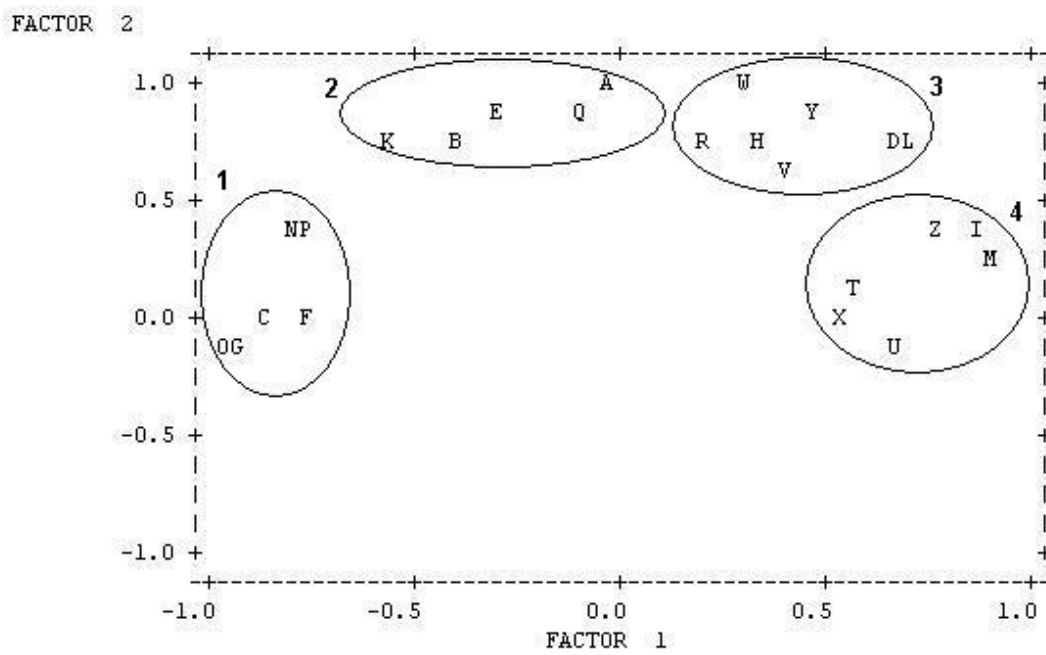
Al comparar la actividad antioxidante y daño oxidativo en *E. peruviana*, no se encontró correlación entre la capacidad antioxidante total y el daño oxidativo, contrario a lo que se encontró entre la actividad de la enzima catalasa y el daño a lípidos ( $p= 0,0084$ ,  $R= 0,882$ , Anexo 11) y entre la actividad de la enzima superóxido dismutasa y el daño a proteínas ( $p= 0,016$ ,  $R=0,846$ , Anexo 11). Además no se encontró correlación entre la actividad de la enzima SOD y la actividad de la enzima CAT ( $p= 0,159$ ,  $R= 0,594$ , Anexo 11)

El resultado de la prueba de componentes principales indica que los dos componentes presentes en la tabla 4, explican el 71.96% de la varianza, tomando mayor relevancia el componente 1, compuesto por metales en el agua y bioacumulados, explicando un 43.53% de la varianza. La figura 8 muestra la distribución de las variables en el plano definido por las 2 componentes, se pueden definir 4 grupos en el plano, uno en posición centro/izquierda compuesto principalmente por metales bioacumulados, el segundo en posición superior/izquierda compuesto principalmente por metales en el tejido estudiado, un tercero y cuarto muy similares pero asociados de forma distinta a cada componente, en posiciones superior/derecha e izquierda, compuesto por parámetros oxidativos y metales en el agua, tejido y factor de bioacumulación. Así el grupo 3 compuesto por CAT, MDA, TRAP, As bioacumulado, Mo bioacumulado, Cr en tejido y Fe en agua se correlacionan de igual forma con los componentes 1 y 2, del

mismo modo lo hace el grupo 4 compuesto por SOD, Carbonilos, Cd en tejido, Cd bioacumulado, Cr bioacumulado y Zn en agua. De este modo, si bien la variación de los datos de parámetros oxidativos esta fuertemente influenciado por los metales no hay claras diferencias entre los presente en el agua, tejido y el factor de bioacumulación.

**Tabla 4:** Datos obtenidos del análisis de componentes principales, los datos con un  $r < 0,6$  de correlación fueron omitidos.





**Figura 8:** Distribución de las variables en el plano definido por el análisis de componentes principales.

## DISCUSIÓN

El factor de bioacumulación, en este estudio, muestra la influencia de la actividad antrópica sobre las concentraciones de metales en tejidos, ya que comparando con el trabajo de Conti *et al.* (2011) realizado en el Canal Beagle, un lugar más bien prístino, donde se evaluó el contenido de los metales (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn) en el agua y en el tejido blando de *Mytilus chilensis*, para posteriormente calcular el factor de bioacumulación, se puede observar que en el agua del Canal de Beagle la concentración de Cd, Cr, Cu, y Zn son menores o no se detectaron, en comparación a los valores encontrados en todas las localidades estudiadas. En el Canal Beagle no se detectó Cd y Cr a diferencia de los sitios muestreados. En este trabajo se encontró hasta 84 veces más Cu en Caleta Palito y 6 en Montemar, mientras que el Zn es 2 veces mayor en todas las localidades. Estos resultados evidencian el nivel de impacto que existe en las zonas costeras asociadas a emplazamientos humanos, aumentado en las localidades donde se efectúan actividades mineras.

Es importante hacer notar que en las regiones estudiadas se concentra el 45,9% de la minería del Cu y el 41,6% de otros metales. En detalle, la región de Atacama posee 18 minas de Cu y 11 minas de otros metales, la región de Coquimbo 8 minas de Cu y 15 minas de otros metales, mientras que la región de Valparaíso posee 8 minas de Cu y 4 de otros metales (Ministerio de Minería, 2012). Como ya fue mencionado, esta actividad genera residuos que son eliminados directamente en la costa. No hay trabajos publicados en donde se evaluara la concentración de metales en el agua en las regiones de Coquimbo y Valparaíso, sin embargo en la región de Atacama, Lee *et al.* (2002, 2005) encontraron en el agua de las localidades de Palito y Chañaral concentraciones de Cu y Cr similares a las encontradas en este estudio, pero mayores de Zn y As superando la norma. Aún cuando las concentraciones de los metales analizados fueron altas en todas las localidades, no superan las concentraciones máximas permisibles de acuerdo a la norma de emisión establecida para residuos líquidos descargados por las fuentes emisoras a los cuerpos de agua marinos y continentales superficiales de la República de Chile.

En el caso de las concentraciones encontradas en el tejido muscular seco, podemos mencionar que *E. peruviana* presentó mayor cantidad de Cu, Cr y Cd que *M. chilensis*, pero menor concentración de Zn. Esto puede ser resultado, en primer lugar, de las altas concentraciones de algunos metales en el agua de las localidades estudiadas y en segundo lugar, de la porción del tejido utilizada. La alta concentración de Zn encontrada en el estudio de Conti *et al.* (2011), se explicaría por que se utilizó la totalidad del tejido blando (músculo, tejido conectivo e intestino), mientras que en este estudio se tomó solo la porción del músculo, con la finalidad de evitar cualquier tipo de interferencia en el análisis TRAP. En otro trabajo realizado por el mismo autor el año 2012, determinaron metales acumulados en músculo e intestino del gastrópodo *Nacella (Patinigera) magellanica* en el Canal Beagle, encontrando mayor concentración de metales

en el intestino en comparación con el músculo, al igual que en el caso de los bivalvos (Conti *et al.*, 2012). En dicho estudio se encontraron en las muestras de músculo, valores de Cd similares a los encontrados en *E. peruviana*, provenientes de las localidades de Chañaral, Caldera y Huasco, valores de Cr similares a la localidad de Quintero y valores similares de Zn en Punta Choros, curioso considerando la lejanía y la menor actividad entrópica realizada en el Canal Beagle. Así, la porción del organismo que se utilice es muy importante, en moluscos la concentración de metales en el músculo es menor que en el intestino, ya que es en este último donde se concentran las actividades metabólicas y metales como el Zn son útiles en la formación de enzimas y proteínas, como las metalotioneinas (Hidalgo *et al.* 2006; Jakimska *et al.*, 2011). En suma, la forma de alimentación es otro factor importante a considerar cuando se comparan resultados. El estudio de Conti *et al.* (2011) utiliza a *M. chilensis* como biomonitor, un bivalvo filtrador suspensívoro, mientras que en este estudio se utilizó *E. peruviana*, un gastrópodo ramoneador. En este contexto Jakimska *et al.*, (2011) realizaron una revisión, haciendo notar la importancia del modo de alimentación en la concentración de metales en distintos tejidos, así moluscos suspensívoros y herbívoros concentran menos metales que aquellos carnívoros y omnívoros, organismos superiores en la trama trófica.

Con respecto al factor de Bioacumulación obtenido, podemos ordenar en forma descendente los metales de acuerdo a su magnitud, en este estudio se encontró que *E. peruviana* acumula  $Fe > Cu > Cd > Zn > Cr > Mo > As$ , mientras que Conti *et al.* (2011) encontró que el bivalvo *M. chilensis* acumulaba  $Zn > Cu > Ni > Cd > Cr > Pb$ , y en Conti *et al.* (2012) encontró que el gastrópodo *Nacella (P.) magellanica* acumulaba  $Zn > Cu > Cd > Ni > Cr > Pb$ , reforzando la idea de especificidad en la acumulación de los metales.

Por otra parte, sorprenden los valores del factor de bioacumulación en Quintero y Montemar, explicándose por las corrientes existentes en las bahías de Quintero y Concón, las que tendrían efectos sobre la dirección que tomarían los residuos provenientes desde Ventanas, la refinería ENAP y CODELCO. Las refinerías tiene como finalidad obtener a partir del petróleo la mayor cantidad de productos, que van desde los gases ligeros, como el propano y el butano, hasta las fracciones más pesadas, fuel óleo y asfaltos, pasando por otros productos intermedios como las gasolinas, el gasoil y los aceites lubricantes. Muchos de estos productos o los que resultan del tratamiento de los residuos del refinamiento, residuos que son eliminados al medio, poseen metales pesados, como es el caso del asfalto cuyo principal componente es el betún, el que posee metales pesados como níquel, vanadio, plomo, cromo, cobre, mercurio, arsénico, selenio, entre otros. Además, en Los Andes se encuentra la empresa CODELCO división andina, quienes producen cobre y molibdeno, cuyos residuos son arrojados al Rio Aconcagua que desemboca en la Bahía de

Concón. Por otra parte y como fue mencionado anteriormente, los datos obtenidos desde estas dos localidades podrían afirmar lo indicado por Frazier y George (1983) en *Ostrea edulis*, que la tolerancia se genera por aclimatación y además se crearía cierta impermeabilidad que restringe el ingreso de algunos metales al organismo, de este modo cuando los especímenes provienen de ambientes limpios, acumulan mas metales que aquellos provenientes de ambientes contaminados.

Las enzimas antioxidantes pueden presentar tres situaciones, la primera es alta actividad en respuesta a un mecanismo estresor que este generando ERO evitando el daño oxidativo a biomoléculas, la segunda es que la actividad es menor por que la concentración del xenobiótico es baja manteniendo la homeostasis del sistema, o la tercera donde la actividad es menor al verse sobrepasada por la alta producción de ERO, dañándose las enzimas, perdiéndose la homeostasis y generando daño oxidativo (Halliwell, 2006). En este contexto la actividad de SOD en este estudio refleja lo mencionado, las muestras de *E. peruviana* obtenidas desde Caldera y Huasco muestran alta actividad respondiendo a la producción de ERO. Esta respuesta de SOD ha sido evidenciada en otros organismos y tejidos, frente a una variedad de contaminantes. Se ha encontrado actividad elevada de SOD en hígado y branquias de peces expuestos a paraquat (Vig & Nemcsok, 1989), en hepatopáncreas, tejido hepático y branquias de bivalvos expuestos a hidrocarburos aromáticos policíclico (PAHs), pesticidas organoclorados (OCs) y a sedimentos de lugares contaminados por contaminantes petroquímicos (Sole *et al.*, 1994; Box *et al.*, 2007; Richardson *et al.*, 2008). Las muestras provenientes desde Punta Choros, Quintero y Montemar mostraron una actividad menor o no fue detectada producto de que en estos lugares, en general, la concentración de metales, en el agua y en el músculo, es menor que en el resto de las localidades y podría mantenerse el equilibrio evitando el daño a biomoléculas. Finalmente en las muestras provenientes desde Caleta Palito y Chañaral, podría darse el tercer caso debido a la alta concentración de metales biodisponibles y bioacumulados, produciendo gran cantidad de ERO, superando la actividad o dañando a SOD y desequilibrando el sistema. En el trabajo de Pan *et al.* (2009), donde evaluaron la actividad de algunas enzimas antioxidantes en respuesta a diferentes concentraciones de un hidrocarburo aromático policíclico (benzo ( $\alpha$ ) pireno) en el tiempo, producidos por la combustión de carbón, petróleo, etc., encontraron que la actividad de SOD en branquias y glándula digestiva del bivalvo *Chlamys farreri* mostraba un incremento inicial el que disminuyo en el tiempo, acentuado por la concentración de este contaminante, el cual aumentaría la producción de  $O_2^-$  colapsando el sistema y por ende disminuyendo la actividad de esta enzima.

La actividad de CAT en el musculo de *E. peruviana* tendió a disminuir a medida que nos alejábamos de las localidades con actividad minera y se correlacionó

con la concentración de Cd. Las muestras que presentaron mayor actividad enzimática fueron las correspondientes a las obtenidas desde Caleta Palito, lugar en donde se eliminan residuos directamente en la rompiente a través de un canal.

La enzima CAT mostró ser un biomarcador efectivo frente a la contaminación, entregando información de forma temprana, al igual que lo propuesto por varios autores. En el estudio de Box *et al.* (2007) se encontró, en glándulas digestivas y branquias de bivalvos, que esta enzima mostraba un aumento en su actividad en los organismos presentes en regiones contaminadas por componentes petroquímicos, entregando información exacta y precisa del efecto de la polución en los organismos presentes en los sitio de estudio. Al igual que en el estudio mencionado anteriormente Radwan *et al.* (2010) encontró, en la glándula digestiva del gastrópodo terrestre *Theba pisana*, alta actividad de CAT, dos a tres veces mayor en lugares contaminados por metales en comparación con sitios de referencia, proponiendo a esta especie como un excelente biomonitor medioambiental.

Si bien, se hubiera esperado en el caso de las muestras provenientes de Caleta Palito y Chañaral, que si SOD estaba disminuida lo mismo ocurriera con CAT, debido a que el  $H_2O_2$  generado por la acción de SOD ante  $O_2^-$ , es degradado por CAT, esta no es la única fuente de  $H_2O_2$ , de hecho en un organismo normal cumple funciones importantes como segundo mensajero y en exceso es perjudicial. Además, algunos contaminantes, como el nonil fenol, un potente desengrasante, puede reducir la actividad de SOD al dañar las proteínas que componen esta enzima, sin embargo no tiene el mismo efecto en la enzima CAT en bivalvos (Matozzo *et al.*, 2004), podría ser el caso de algunos metales.

Si bien los valores de TRAP no fueron tan desiguales entre las localidades, se puede observar una pequeña tendencia, similar a lo que ocurre con CAT, a disminuir a medida que nos alejamos de las localidades con actividad minera. La capacidad antioxidante total tiene relación con todos aquellos compuestos no enzimáticos de características antioxidantes que están en el organismo y que ingresan a través de la dieta, como flavonoides,  $\beta$ -caroteno, vitaminas, etc. Estas defensas antioxidantes apoyan a las defensas enzimáticas con las que cuenta cada organismo y corresponden a una barrera secundaria contra las ERO. Debido a que TRAP depende del consumo vía dieta, también depende de lo "saludable" del hábitat, debido a que un hábitat "saludable" asegura mayor biodiversidad y riqueza de especies que formen parte de la zona inferior de la trama trófica. No hay muchas referencias de estudios en que se utilice la capacidad antioxidante total (TRAP) como biomarcador de estrés oxidativo producto de contaminación por metales pesados. Destaca el trabajo Hidalgo *et al.* (2006) en *Chiton granosus*, donde encontraron diferencias en la capacidad antioxidante entre machos/hembras asociados al grado de contaminación.

Con respecto al daño producto del estrés oxidativo, los lípidos son el primer blanco de las ERO y su oxidación puede ser un análisis bastante útil para evaluar el efecto de xenobióticos sobre el balance redox (Halliwell, 2006). Las muestras obtenidas desde Caleta Palito, Chañaral y Huasco fueron las que evidenciaron mayor lipoperoxidación en el músculo de *E. peruviana*. Estas localidades presentan una alta actividad minera, las dos primeras relacionadas con el Cu y la tercera con el Fe, lo que concuerda con los datos obtenidos para metales en el agua, Caleta Palito y Chañaral mostraron las mayores concentraciones de Cu en el agua y Huasco las mayores concentraciones de Fe. Sin embargo, no se encontró esta relación con el análisis de metales en el tejido analizado, ni con el factor de bioacumulación. Es importante mencionar que al igual que en el caso de CAT, las concentraciones de MDA disminuyeron en las localidades con menor actividad minera, proponiéndose este análisis, en conjunto al análisis de CAT, como complementarios para estudios similares. Esta propuesta se repite en otros trabajos realizados con moluscos, es el caso del estudio de Radwan *et al.* (2010), donde encontraron un aumento en los niveles de lipoperoxidación en un gastrópodo expuesto a contaminación por metales en comparación con un sitio de referencia, concluyendo que los parámetros de estrés oxidativo, son biomarcadores sensibles para evaluar el efecto de este tipo de contaminantes sobre el biomonitor usado. Lo mismo sucede en el trabajo de Pan *et al.* (2009), donde la concentración de MDA aumenta cuando se eleva la concentración de PAHs, proponiendo que este parámetro sea utilizado como herramienta sensible en el estudio de estrés oxidativo y toxicidad en organismos marinos. Wang (2006) al igual que Damásio *et al.* (2010) proponen que los parámetros oxidativos pueden ser usados para evaluar contaminación en ríos, lagos y aguas costeras utilizando biomonitores.

Una reacción de lipoperoxidación consta de tres etapas, iniciación, propagación y termino (Halliwell, 2006). Un solo evento de iniciación tiene el potencial de generar múltiples moléculas de peróxido debido a esta reacción en cadena (Halliwell, 2006; Halliwell and Gutteridge, 2006). Los efectos de la peroxidación de lípidos, acentuada por metales como el Cu y Fe, se traducen en la disminución de la fluidez de membrana, lo que genera que sustancias que normalmente no cruzan al interior de la célula, lo hagan. Además esta reacción daña proteínas de membrana, inactivando receptores específicos, enzimas, y canales de iónicos (Halliwell, 2006).

En un sistema no solo ocurren reacciones de lipoperoxidación producto de un agente oxidante, sino además se oxidan proteínas que cumplen un importante rol en el transporte de sustancias al interior y exterior de la célula. Tanto el daño a lípidos, como el daño a proteínas pudo notarse en el presente estudio, al observarse que las muestras provenientes desde Caleta Palito, Chañaral, Caldera, Huasco y Punta Choros, sin embargo el daño a proteínas no mostró

diferencias significativas entre los sitios mencionados. Las muestras obtenidas desde las localidades de Quintero y Montemar, no presentaron lipoperoxidación pero sí daño a proteínas, esto puede ser explicado por el conjunto de factores presentes en un estudio en terreno, en organismos que habitan el intermareal y que no pueden ser controlados como la temperatura, la exposición a RUV, el cambio de pH, el cambio en la salinidad, la concentración de O<sub>2</sub>, entre otros, que pueden provocar un aumento en la producción de ERO con sus posteriores consecuencias (Joanisse & Storey, 1996; Hermes-Lima, 2004; Lushchak & Bagnyukova, 2006; Verlecar *et al.* 2008; Nowakowska *et al.* 2009; Dahms *et al.* 2011). Así por ejemplo Lushchak & Bagnyukova (2006) encontraron que al exponer un pez a alta temperatura por un tiempo prolongado aumentaba el estrés oxidativo y por ende generaba daño oxidativo.

## CONCLUSIONES

En conclusión, este estudio es el primero en utilizar al gastrópodo marino *E. peruviana* como biomonitor de contaminación en terreno usando parámetros oxidativos como biomarcadores. Esta especie presenta características únicas que hacen de él un excelente biomonitor ambiental, además de ser una potente herramienta predictiva de lo que ocurre en un sitio específico. Otra característica de este estudio es que por primera vez se relacionan enzimas antioxidantes con la capacidad antioxidante total y daño a proteínas / lípidos con contaminación por metales pesados, entre otros agentes oxidantes.

Las enzimas antioxidantes y el daño oxidativo, en especial los niveles de lipoperoxidación, pueden ser usados como respuesta rápida y específica, para identificar el efecto tóxico provocado por componentes contaminantes presentes en el hábitat.

Si bien, con el n muestral utilizado se obtuvieron resultados satisfactorios, se sugiere aumentarlo para disminuir cualquier error asociado al diseño experimental utilizado y obtener datos con menor desviación estándar.

El presente estudio, en conjunto al soporte que dan estudios relacionados, sienta las bases para futuros trabajos que relacionen a los biomarcadores con la contaminación por metales pesados y/u otras fuentes generadoras de estrés oxidativo en Chile.

## BIBLIOGRAFÍA:

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzimol.*, 105: 121-126.
- Ahn I, Kim K, Choi H. 2002. A baseline study on metal concentrations in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Gastropoda: Patellidae) on King George Island: variations with sex and body parts. *Mar. Pollut. Bull.*, 44: 421-431.
- Alamo V, Valdivieso V. 1987. Lista sistemática de moluscos marinos del Perú. Boletín extraordinario Instituto del Mar del Perú. 205 p.
- Almeida J, Diniz Y, Marques S, Faine L, Ribas B, Burneiko R, Novelli E. 2002. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environ. Int.*, 27: 673–679.
- Almeida E, Bainy A, Medeiros M, Mascio P. 2003. Effects of trace metal and exposure to air on serotonin and dopamine levels in tissues of the mussel *Perna perna*. *Mar. Pollut Bull.*, 46: 1485-1490.
- Almeida J, Barreto R, Novelli E, Castro F, Moron S. 2009. Oxidative stress biomarkers and aggressive behavior in fish exposed to aquatic cadmium contamination. *Neotrop. Ichthyol.*, 7(1):103-108.
- Andrade S, Contreras L, Moffett J, Correa J. 2006. Kinetics of copper accumulation in *Lessonia nigrescens* (Phaeophyceae) under conditions of environmental oxidative stress. *Aquat. Toxicol.*, 78: 398–401.
- Appeltans W, Bouchet P, Boxshall G, De Broyer C, de Voogd N, Gordon D, Hoeksema B, Horton T, Kennedy M, Mees J, Poore G, Read G, Stöhr S, Walter T, Costello M. 2012. World Register of Marine Species. Accessed at <http://www.marinespecies.org> on 2012-04-13.
- Aránguiz F, Gaete H, Hidalgo M, Lobos G. 2009. Daño oxidativo en la microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* expuesta a aguas receptoras de un efluente minero en del Río Blanco (V Región, Chile). *Quim. Nova*, 32(9): 2417-2422.
- Baqueiro-Cárdenas E, Borabe L, Goldaracena-Islas C, Rodríguez-Navarro J. 2007. Mollusks and pollution. A review. *Rev. Mex. Biodivers.*, 78: 1S- 7S.
- Barreiro R, Picado L, Real C. 2002. Biomonitoring heavy metals in estuarios: a field comparison of two brown algae species inhabiting upper estuarine reaches. *Monitoring Assess* 75: 121-134.
- Baumann H, Morrison L, Stengel D. 2009. Metal accumulation and toxicity measured by PAM-Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. *Ecotox. Environ. Safe.*, 72: 1063-1075.

- Binelli A, Bacchetta R, Vailati G, Galassi S, Provini A. 2001. DDT contamination in Lake Maggiore (N. Italy) and effects on zebra mussel spawning. *Chemosphere*, 45: 409-415.
- Blaha L, Kopp R, Imkova K, Mare K. 2004. Oxidative Stress Biomarkers are Modulated in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) Exposed to Microcystin-Producing Cyanobacterial Water Bloom. *Acta Vet. Brno.*, 73: 477–482.
- Boese B & Lee H. 1992. Synthesis of methods to predict bioaccumulation of sediment pollutants. Environmental Protection Agency. Environmental Research Laboratory. Narragansett RI. ERL-N No. N232. U.S.
- Box A, Sureda A, Galgani F, Pons A, Deudero S. 2007. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 146 (C): 531–539.
- Brown M, Hodgkinson W, Hurt C. 1999. Spatial and temporal variations in the copper and zinc concentrations of two green seaweeds from Otago Harbour, New Zealand. *Mar. Environ. Res.*, 47: 175-184.
- Carvalho-Neta R & Abreu-Silva A. 2010. *Sciades herzbergii* oxidative stress biomarkers: an *in situ* study of an estuarine ecosystem (São Marcos' Bay, Maranhão, Brazil). *Braz. J. Oceanogr.*, 58:11-17.
- Cataldo D, Colombo J, Boltovskoy D, Bilos C, Landoni P. 2001. Environmental toxicity assessment in the Parana river delta (Argentina): simultaneous evaluation of selected pollutants and mortality rates of *Corbicula fl uminea* (Bivalvia) early juveniles. *Environ. Pollut.*, 112: 379-389.
- Cataldo J, Hidalgo M, Neaman A, Gaete H. 2011. Use of molecular biomarkers in *Eisenia foetida* to assess copper toxicity in agricultural soils affected by mining activities. *J. Soil Sci. Plant Nut.*, 11(3): 57-70.
- Castilla JC & Nealler E. 1978. Marine environmental impact due to mining activities of El Salvador copper mine, Chile. *Marine Pollution Bulletin*, 9: 67-70.
- Castillo V & Brown D. 2008. Microscopic Anatomy of the Male Reproductive System in *Echinolittorina peruviana* (Mollusca: Caenogastropoda). *Int. J. Morphol.*, 26(2): 423-432.
- Cao L, Huang W, Liu J, Yin X, Dou S. 2010. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physc. C.*, 151: 386–392.
- Comín F, Menéndez M, Romero J, Hernández O, Martínez M, Chacón A. 1999. Indicadores ecológicos y herramientas para la gestión de ecosistemas acuáticos en la zona costera. *Limnetica*. 16: 61-68.

- Conti M, Tudino M, Muse J, Cecchetti G. 2002. Biomonitoring of heavy metals and their species in the marine environment: the contribution of atomic absorption spectroscopy and inductively coupled plasma spectroscopy. *Res. Trends. Appl. Spectrosc.*, 4: 295-324
- Conti M & Cecchetti G. 2003. A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas. *Environ. Res.*, 93: 99-112.
- Conti M, Iacobucci M, Cecchetti G. 2005. A statistical approach applied to trace metal data from biomonitoring studies. *Int. J. Environ. Pollut.*, 23: 29-41
- Conti M, Stripeikis J, Iacobucci M, Cucina D, Cecchetti G, Tudino M. 2006. Trace metals in molluscs from the Beagle Channel (Argentina): a preliminary study. *WIT Trans. Ecol. Environ.*, 99: 473-483
- Conti M, Stripeikis J, Finoia M, Tudino M. 2011. Baseline trace metals in bivalve molluscs from the Beagle Channel, Patagonia (Argentina). *Ecotoxicology*, 20: 1341-1353.
- Conti M, Stripeikis J, Finoia M, Tudino M. 2012. Baseline trace metals in gastropod mollusks from the Beagle Channel, Tierra del Fuego (Patagonia, Argentina). *Ecotoxicology*, 21:1112-1125.
- Contreras L, Moenne A, Correa J. 2005. Antioxidant responses in *Scytosiphon lomentaria* (PHAEOPHYCEAE) inhabiting copper-enriched coastal environments. *J. Phycol.*, 41: 1184-1195.
- Contreras L, Mella D, Moenne A, Correa J. 2009. Differential responses to copper-induced oxidative stress in the marine macroalgae *Lessonia nigrescens* and *Scytosiphon lomentaria* (Phaeophyceae). *Aquat. Toxicol.*, 94: 94-102.
- Contreras L, Dennett G, González A, Vergara E, Medina C, Correa J, Moenne A. 2011. Identification of copper-induced genes in the marine alga *Ulva compressa* (Chlorophyta). *Mar. Biotechnol.*, 13: 544-556.
- Damásio J, Navarro-Ortega A, Tauler R, Lacorte S, Barceló D, Soares A, López M, Riva M, Barata C. 2010. Identifying major pesticides affecting bivalve species exposed to agricultural pollution using multi-biomarker and multivariate methods. *Ecotoxicology*, 19: 1084-1094.
- Dahms H, Dobretsov S, Lee J. 2011. Effects of UV radiation on marine ectotherms in polar regions. *Comp. Biochem. Physiol.*, 153 (C): 363-371.
- Duffus J. 2002. Heavy metals – a meaningless term *Pre. Appl. Chem.*, 74: 763.
- Esterbauer K, Cheeseman H, Dianzani M, Poli G, Slater T. 1982. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes. *Biochem J.*, 208(1): 129–140.

- Fang T, Hwang J, Hsiao S. 2006. Trace metals in seawater and copepods in the ocean outfall area off northern Taiwan coast, Mar. Environ. Res., 61: 224.
- Fenoglio C, Grosso A, Boncompagni E, Milanesi G, Gandini C, Barni S. 2006. Morphofunctional Evidence of Changes in Principal and Mitochondria-Rich Cells in the Epidermis of the Frog *Rana kl. esculenta* Living in a Polluted Habitat. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 690–702.
- Franco J, Borja A, Solaun O, Pérez V. 2002. Heavy metals in molluscs from the Basque Coast (Northern Spain): results from an 11-year monitoring program. Mar. Pollut. Bull., 44: 956-976.
- Frazier J & George S. 1983. Cadmium kinetics in oysters- A comparative study of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Mar. Biol., 76: 55-61.
- Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem., 64: 97-112.
- Gaete H, Hidalgo M, Neaman A, Ávila G. 2010. Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *Eisenia foetida*. Quim. Nova, 33(3): 566-570.
- Galanis A, Karapetsas A, Sandaltzopoulos R. 2009. Metal-induced carcinogénesis, oxidative stress and hipoxia signalling. Mutation Research., 674: 31-35.
- Gil M, Torres A, Harvey M, Esteves J. 2006. Metales pesados en organismos marinos de la zona costera de la Patagonia argentina continental. Rev. Biol. Mar. Oceanog., 41(2): 167-176.
- Gillies R, Brim-Box J, Symanzik J, Rodemaker E. 2002. Effects of urbanization on the aquatic fauna of the Line Creek Watershed, Atlanta - A satellite perspective. Int. J. Remote Sens., 23: 3145-3166.
- Gundacker C. 1994. Tissue-specific heavy metal (Cd, Pb, Cu, Zn) deposition in a natural population of the Zebra mussel *Dreissena polymorpha* Pallas. Chemosphere, 38: 3339-3356.
- Guzmán N, Saá S, Ortlieb L. 1998. Catálogo descriptivo de los moluscos litorales (gastropoda y pelecypoda) de la zona de Antofagasta, 23°s (Chile). Estud. Oceanol., 17: 17-86.
- Halliwell B, Gutteridge J. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem., 219: 1–14.
- Halliwell B, Gutteridge J. 1989. Free radical in biology and medicine. Oxford: Clarendon, 1:142.
- Halliwell B, Gutteridge J. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. Arch. Biochem. Biophys., 280: 1–8.

- Halliwell B. 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.*, 141: 312–322.
- Halliwell B, Gutteridge J. 2006. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Clarendon Press, Oxford.
- Hermes-Lima M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*.
- Hidalgo M, Fernández E, Cabello A, Rivas C, Fontecilla F, Morales L, Aguirre A, Cabrera E. 2006. Evaluation of the antioxidant response of *Chiton granosus* Fremby, 1928 (Mollusca: Polyplacophora) to oxidative pollutants. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.*, 41(2): 155-165.
- Horiguchi T, Li Z, Uno S, Shimizu M, Shiriashi H, Morita M, Thompson J, Levings C. 2004. Contamination of organotin compounds and imposex in molluscs from Vancouver, Canada. *Mar. Environ. Res.*, 57:75-88.
- Ivanković D, Pavčić J, Beatović V, Klobucar R, Vinko G. 2009. Inducibility of Metallothionein Biosynthesis in the Whole Soft Tissue of Zebra Mussels *Dreissena polymorpha* Exposed to Cadmium, Copper, and Pentachlorophenol. *Environ. Toxicol.*, 198-211.
- Jakimska A, Konieczka P, Skóra K, Namieśnik J. 2011. Bioaccumulation of Metals in Tissues of Marine Animals, Part II: Metal Concentrations in Animal Tissues. *Pol. J. Environ. Stud.*, 20(5): 1127-1146.
- Je J, Belan T, Levings C, Koo B. 2004. Changes in benthic communities along a presumed pollution gradient in Vancouver Harbour. *Mar. Environ. Res.*, 57:121–135.
- Joannis D & Storey K. 1996. Oxidative damage and antioxidants in *Rana sylvatica*, the freeze-tolerant wood frog. *Am. J. Physiol.*, 271: R545-R553.
- Kawakami S, Gledhill M, Achterberg E. 2006. Production of phytochelatins and glutathione by marine phytoplankton in response to metal stress. *J. Phycol.* 42: 975–989.
- Keen A. 1971. *Sea shells of tropical West America*. Stanford University Press., Stanford, California, 1064 p.
- Klerks P & Weis J. 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environ. Pollut.*, 45: 173-205.
- Knigge T, Mann N, Parveen Z, Perry C, Gernhofer M, Triebkorn R, Kohler H, Connock M. 2002. Mannosomes: a molluscan intracellular tubular membrane system related to heavy metal stress?. *Comp. Biochem. Physiol.*, 131(c): 259-269.
- Lane N. 2002. *Oxygen, the Molecule That Made the World*. Oxford University Press, Oxford.

- Lee M, Correa J, Zhang H. 2002. Effective metal concentrations in porewater and seawater labile metal concentrations associated with copper mine tailings disposal into the coastal waters of the Atacama region of northern Chile. *Mar. Pollut. Bull.*, 44: 956-976.
- Lee M, Correa J. 2005. Effects of copper mine tailings disposal on littoral meiofaunal assemblages in the Atacama region of northern Chile. *Mar. Environ. Res.*, 59: 1-18.
- Lee T, Huang Y, Chen M. 2005. Copper induction of phosphorus deficiency in *Ulva fasciata* (Ulvales, Chlorophyta). *Phycologia* 44: 620-628.
- Lewis A. 1990. The biological importance of copper. A literature review. Final report INC Aproject No. 223.  
<http://scirus.landingzone.nl/other/?q=Type%20your%20own%20search%20here>
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A & Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Lushchak V & Bagnyukova T. 2006. Temperature increase results in oxidative stress in gold fish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 143(c): 36-41.
- Marincovich L. 1973. Intertidal mollusks of Iquique, Chile. *Natural History Museum Los Angeles County Science Bulletin*, 16:1-49.
- Marshall J, Ross T, Pyecroft S, Hallegraef G. 2005. Superoxide production by marine microalgae. *Mar. Biol.*, 147: 541-549.
- Matozzo V, Ballarin L, Marin M. 2004. Exposure of the clam *Tapes philippinarum* to 4 nonylphenol: changes in anti-oxidant enzyme activities and re-burrowing capability. *Mar. Pollut. Bull.*, 48: 563-571
- Ministerio de Minería de Chile. 2011. Obtenido de <http://www.minmineria.gob.cl/574/w3-propertyvalue-1982.html>.
- Morriconi E. 1999. Reproductive biology of the limpet *Nacella (P.) deaurata* (Gmelin, 1791) in Bahía Lapataia (Beagle Channel). *Sci. Mar.*, 63: 417- 426.
- Nicotri, M. 1977. Grazing effects of four marine intertidal herbivores on the microflora. *Ecology*, 58: 1020-1032.
- NOAA. 2012. National Status and Trends Program, Mussel Watch. <http://vertigo.hsrl.rutgers.edu/NST.html>
- Nowakowska A, Swiderska-Kolacz G, Rogalska J, Caputa M. 2009. Antioxidants and oxidative stress in *Helix pomatia* snails during estivation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 150(c): 481-486.
- Palamanda J, Kehrer J. 1992. Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 293: 103-109.

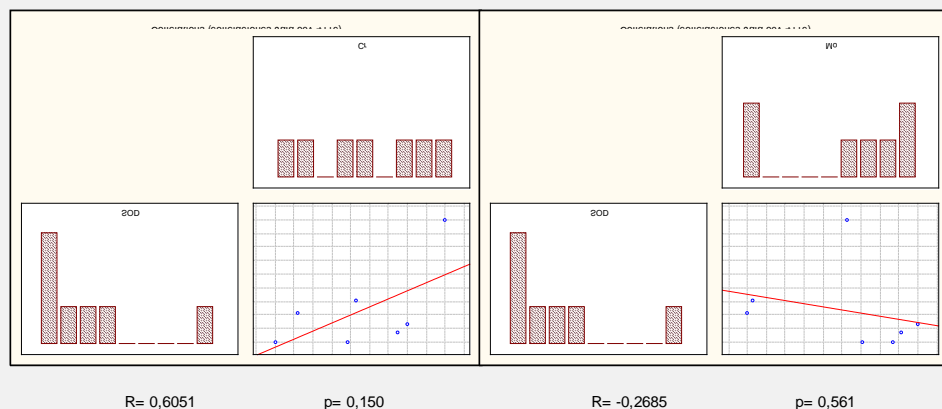
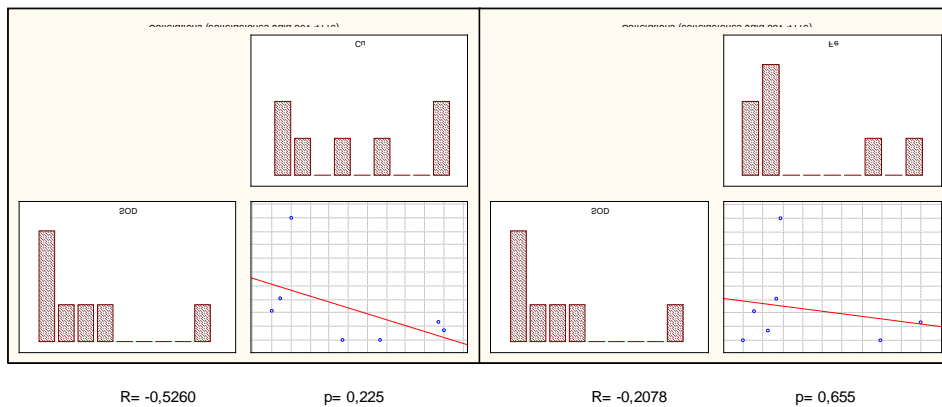
- Pan L, Ren J, Zheng D. 2009. Effects of benzo(α)pyrene exposure on the antioxidant enzyme activity of scallop *Chlamys farreri*. Chin. J. Oceanol. Lim., 27 (1): 43-53.
- Radwan M, El-Gendy K, Gad A. 2010. Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. Chemosphere, 79: 40–46.
- Richards G. 2003. The evolution of molluscan shellfish safety. In: Molluscan shellfish safety. Proceedings 4<sup>th</sup> International Conference Molluscan Shellfish Safety, A. Villalba, B. Regueras, J. L. Romalde y R. Beiras (eds.) IOC, UNESCO. p. 221-256.
- Richardson B, Mak E, De Luca-Abbott S, Martin M, McClellan K, Lam P. 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses?. Mar. Pollut. Bull., 57: 503–514.
- Rodríguez J, Menéndez J, Trujillo Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev. Cubana Med. Milit., 30(1):36-44.
- Rojas J, Fariña J, Soto R, Bozinovic F. 2000. Geographic variability in thermal tolerance and water economy of the intertidal gastropod *Nodilittorina peruviana*. (Gastropoda: Littorinidae, Lamarck, 1822). Rev. Chil. Hist. Nat., 73: 543-552.
- Romay C, Pascual C, Lissi E. 1996. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. Braz. J. Med. Biol., 29: 175-183.
- Ruppert E & Barnes R. 1996. Zoología de los invertebrados. Sexta edición, McGraw Hill Interamericana, 361-496.
- Salnikow K & Zhitkovich A. 2008. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. Chem. Res. Toxicol. 21: 28-44.
- Sawidis T, Brown M, Zachariadis G, Srtis L. 2001. Trace metal concentrations in marine macroalgae from different biotopes in the Aegean Sea. Environ. Int., 27: 43-47.
- Schäfer S, Hamer B, Treursic´ B, Möhlenkamp C, Spira D, Korlevic´ M, Reifferscheid G, Claus E. 2012. Comparison of Bioaccumulation and Biomarker Responses in *Dreissena polymorpha* and *D. bugensis* After Exposure to Resuspended Sediments. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 62: 614-627.
- Sole M, Porte C, Albaiges J. 1994. Mixed-function oxygenase system components and antioxidant enzymes in different marine bivalves: Its relation with contaminant body burdens. Aquat. Toxicol., 30(3): 271-283.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. 39: 44- 84.

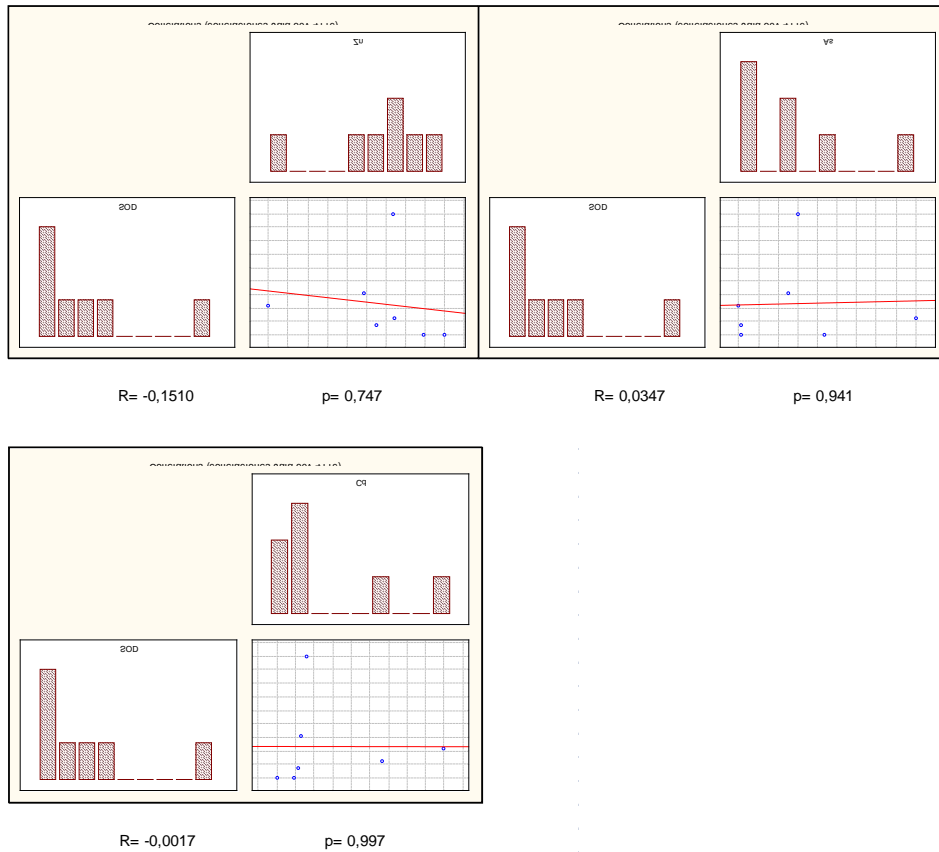
- Vasconcelos M, Leal M. 2001. Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae. *Mar. Chem.*, 74: 65-85.
- Verlecar X, Jena K, Chainy G. 2008. Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 76: 745–752.
- Viarengo A, Burlando B, Giordana A, Bolognesi C, Gabrielides GP. 2000. Networking and expert system analysis: Next frontier in biomonitoring. *Mar. Environ. Res.*, 49:483-486.
- Vig E, Nemcsok J. 1989. The effects of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.*, 35: 23-25.
- Villarreal G y Lozada E. 2004. Algunos aspectos de la ecología de *Nodilittorina peruviana* (Lamark, 1822) y *N. araucana* (D'Orbigny, 1841) en la costa central de Chile. Resumen. VIII International Congress on Medical and Applied Malacology. Mexico, D.F. 35 p.
- Wang C, Zhao Y, Zheng R. 2006. Effects of tributyltin, benzo[a]pyrene, and their mixture on antioxidant defense systems in *Sebastiscus marmoratus*. *Ecot. and Enviro. Saf.*, 65(3): 381-387.

## ANEXOS

**Anexo 1:** Resultado de la prueba a *posteriori*, hecha para el análisis Kruskal-Wallis ( $p= 0,0000$ ) donde se uso como variable de respuesta la actividad de SOD en los diferentes sitios de muestreo (statistica 7.0).

	Caleta Palito	Chañaral	Caldera	Huasco	Punta Choros	Quintero	Montemar
Caleta Palito		1,000000	0,025232	1,000000	1,000000	0,044779	0,044779
Chañaral	1,000000		0,003153	1,000000	1,000000	0,047786	0,047786
Caldera	0,025232	0,003153		0,595230	0,017136	0,000000	0,000000
Huasco	1,000000	1,000000	0,595230		1,000000	0,000805	0,000805
Punta Choros	1,000000	1,000000	0,017136	1,000000		0,041091	0,041091
Quintero	0,044779	0,047786	0,000000	0,000805	0,041091		1,000000
Montemar	0,044779	0,047786	0,000000	0,000805	0,041091	1,000000	

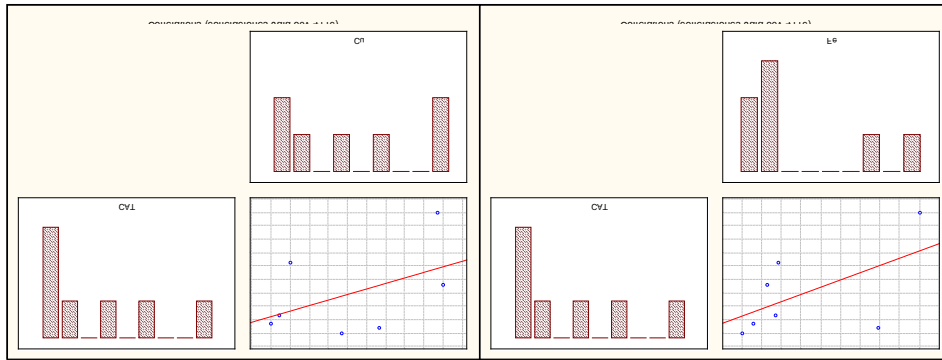




**Anexo 2:** Resultados de la prueba de correlación entre la actividad de SOD y metales bioacumulados analizados.

**Anexo 3:** Resultado de la prueba a *posteriori*, hecha para el análisis Kruskal-Wallis ( $p = 0,0000$ ) donde se uso como variable de respuesta la actividad de CAT en los diferentes sitios de muestreo (statística 7.0).

	Caleta Palito	Chañaral	Caldera	Huasco	Punta Choros	Quintero	Montemar
Caleta Palito		0,003961	0,396138	0,004880	0,000982	0,000115	0,000731
Chañaral	0,003961		1,000000	0,017136	0,007136	0,005875	0,006002
Caldera	0,396138	1,000000		0,036002	0,005310	0,003096	0,004023
Huasco	0,004880	0,017136	0,036002		1,000000	1,000000	1,000000
Punta Choros	0,000982	0,007136	0,005310	1,000000		1,000000	1,000000
Quintero	0,000115	0,005875	0,003096	1,000000	1,000000		1,000000
Montemar	0,000731	0,006002	0,004023	1,000000	1,000000	1,000000	

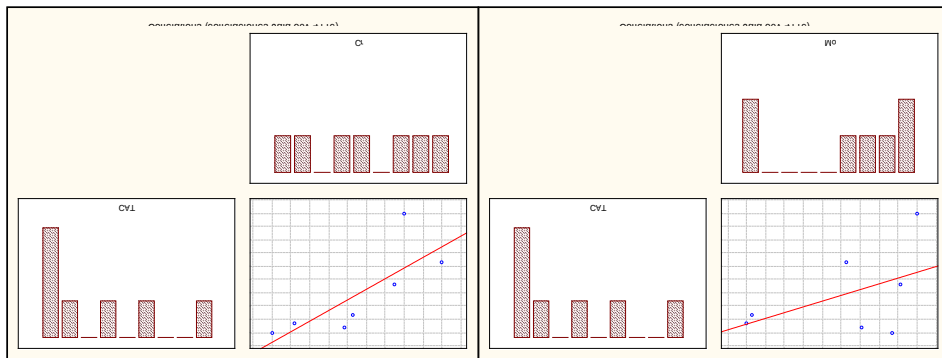


R= 0,4772

p= 0,279

R= 0,5682

p= 0,183

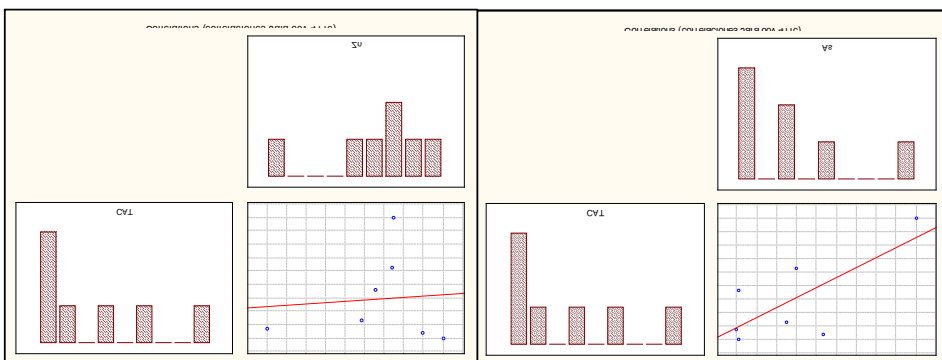


R= 0,928571

p= 0,002519

R= 0,4833

p= 0,272

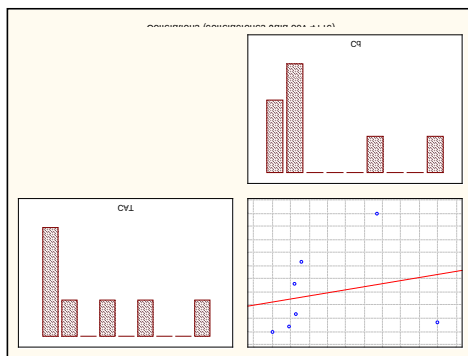


R= 0,0862

p= 0,854

R= 0,7307

p= 0,062



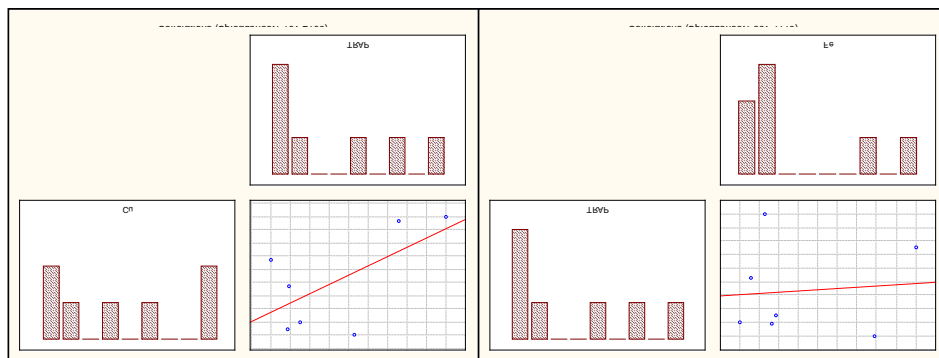
R= 0,2313

p= 0,618

**Anexo 4:** Resultados de la prueba de correlación entre la actividad de Catalasa y metales bioacumulados analizados.

**Anexo 5:** Resultado de la prueba a *posteriori*, hecha para el análisis Kruskal-Wallis ( $p= 0,0000$ ) donde se uso como variable de respuesta a la capacidad antioxidante total (TRAP) en los diferentes sitios de muestreo (estadística 7.0).

	Caleta Palito	Chañaral	Caldera	Huasco	Punta Choros	Quintero	Montemar
Caleta Palito		1,000000	0,184774	<b>0,024268</b>	1,000000	<b>0,022032</b>	<b>0,021674</b>
Chañaral	1,000000		0,052044	<b>0,038359</b>	1,000000	<b>0,036734</b>	<b>0,032770</b>
Caldera	0,184774	0,052044		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Huasco	<b>0,024268</b>	<b>0,038359</b>	1,000000		0,781324	1,000000	1,000000
Punta Choros	1,000000	1,000000	1,000000	0,781324		0,730431	0,161475
Quintero	<b>0,022032</b>	<b>0,036734</b>	1,000000	1,000000	0,730431		1,000000
Montemar	<b>0,021674</b>	<b>0,032770</b>	1,000000	1,000000	0,161475	1,000000	

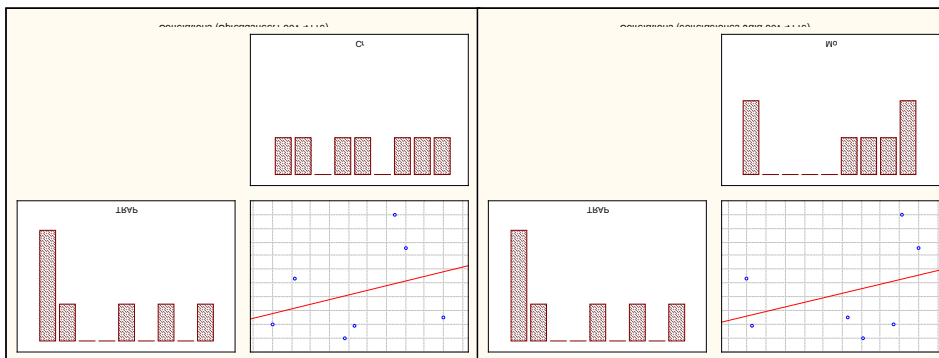


R= 0,6276

p= 0,131

R= 0,0932

p= 0,842

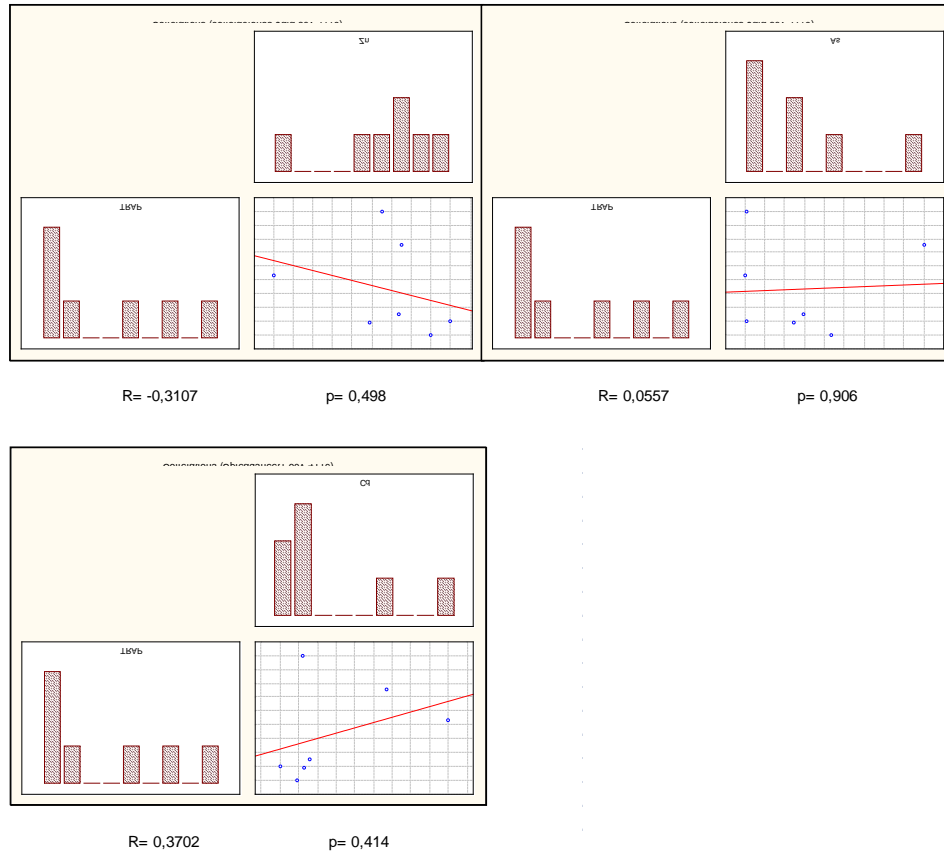


R= 0,3217

p= 0,482

R= 0,3596

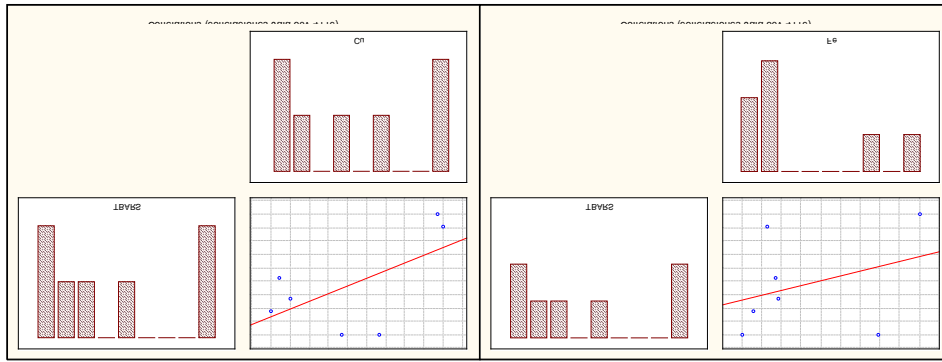
p= 0,428



**Anexo 6:** Resultados de la prueba de correlación entre la capacidad antioxidante total (TRAP) y metales bioacumulados analizados.

**Anexo 7:** Resultado de la prueba a *posteriori*, hecha para el análisis Kruskal-Wallis ( $p = 0,0000$ ) donde se uso como variable de respuesta la Lipoperoxidación (TBARS) en los diferentes sitios de muestreo (statística 7.0).

	Caleta Palito	Chañaral	Caldera	Huasco	Punta Choros	Quintero	Montemar
Caleta Palito	1,000000	0,000799	0,179405	0,000019	0,000000	0,000000	
Chañaral	1,000000	0,001148	0,226562	0,000029	0,000000	0,000000	
Caldera	0,000799	0,001148	1,000000	1,000000	0,002126	0,002126	
Huasco	0,179405	0,226562	1,000000	0,165722	0,001217	0,001217	
Punta Choros	0,000019	0,000029	1,000000	0,165722	1,000000	0,001721	
Quintero	0,000000	0,000000	0,002126	0,001217	0,001721	1,000000	
Montemar	0,000000	0,000000	0,002126	0,001217	0,001721	1,000000	

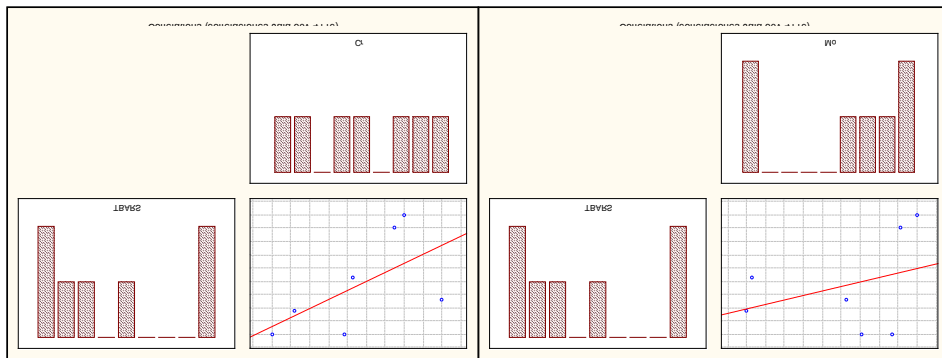


R= 0,6023

p= 0,152

R= 0,3444

p= 0,449

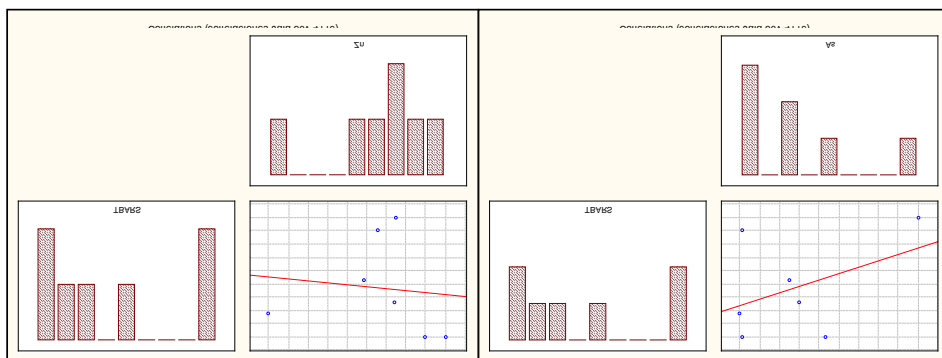


R= 0,6031

p= 0,152

R= 0,3425

p= 0,452

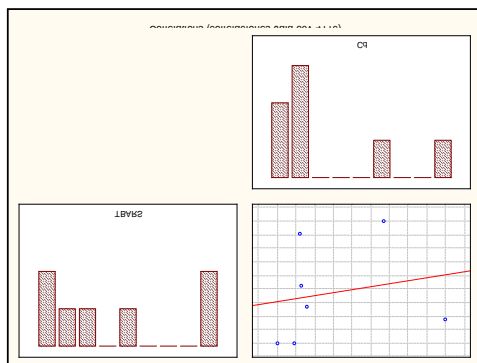


R= -0,1170

p= 0,803

R= 0,4294

p= 0,336



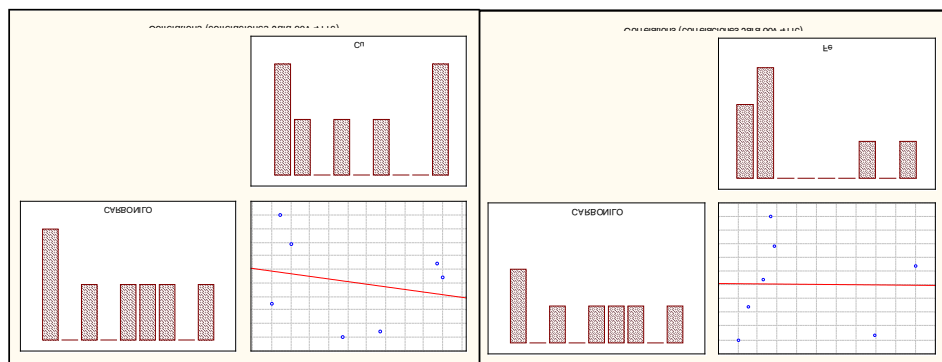
R= 0,1983

p= 0,670

**Anexo 8:** Resultados de la prueba de correlación entre la lipoperoxidación (TBARS) y metales bioacumulados analizados.

**Anexo 9:** Resultado de la prueba a *posteriori*, hecha para el análisis Kruskal-Wallis ( $p= 0,0187$ ) donde se uso como variable de respuesta la oxidación de proteínas (Carbonilos) en los diferentes sitios de muestreo (statistica 7.0).

	Caleta Palito	Chañaral	Caldera	Huasco	Punta Choros	Quintero	Montemar
Caleta Palito		1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	0,004706	0,005310
Chañaral	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000	0,007403	0,008691
Caldera	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000	0,005310	0,006282
Huasco	1,000000	1,000000	1,000000		1,000000	0,001201	0,001467
Punta Choros	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000		0,010127	0,016666
Quintero	0,004706	0,007403	0,005310	0,001201	0,010127		1,000000
Montemar	0,005310	0,008691	0,006282	0,001467	0,016666	1,000000	

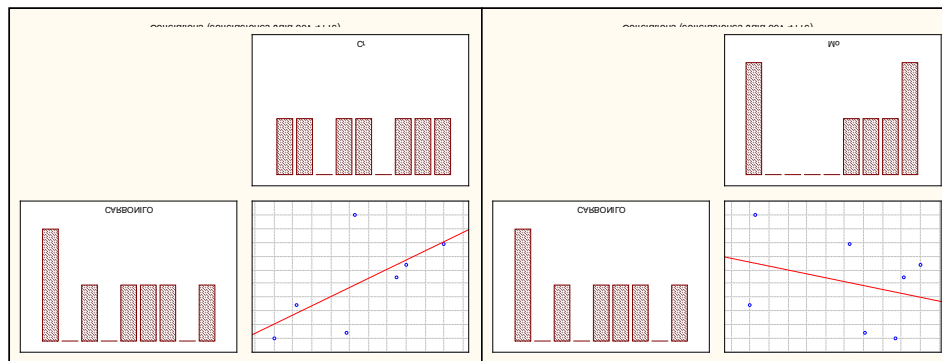


R= -0,2208

p= 0,634

R= -0,0132

p= 0,978

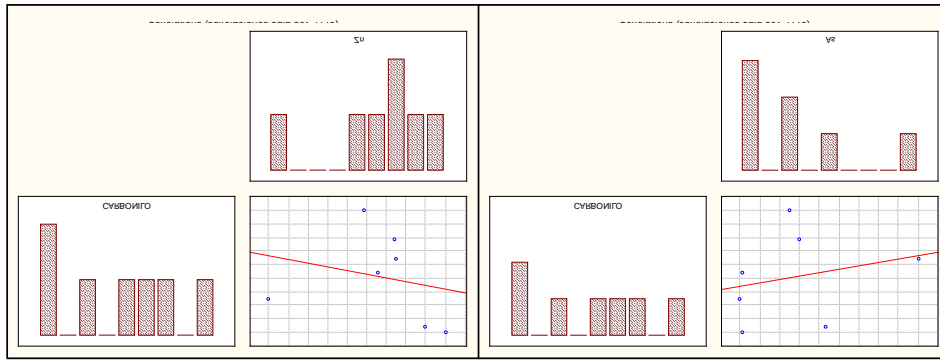


R= 0,6462

p= 0,117

R= -0,3143

p= 0,492

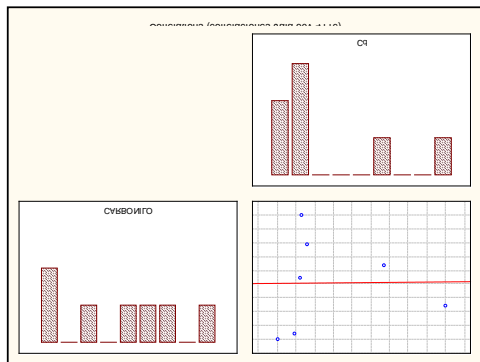


R= -0,2365

p= 0,610

R= 0,2441

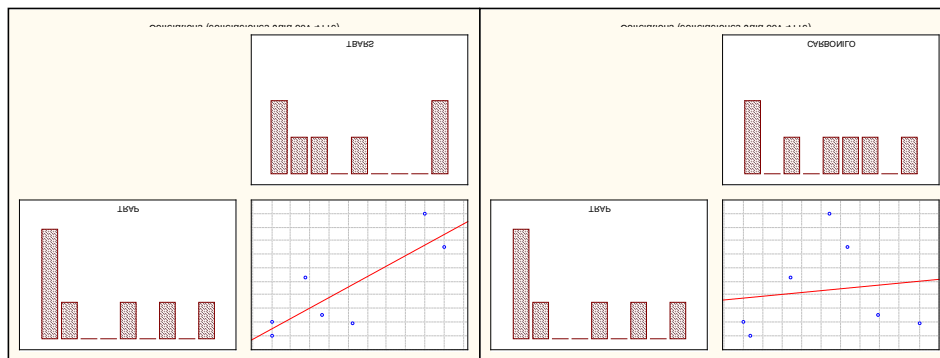
p= 0,598



R= 0,0118

p= 0,980

**Anexo 10:** Resultados de la prueba de correlación entre el daño a proteínas (Carbonilos) y metales bioacumulados analizados.

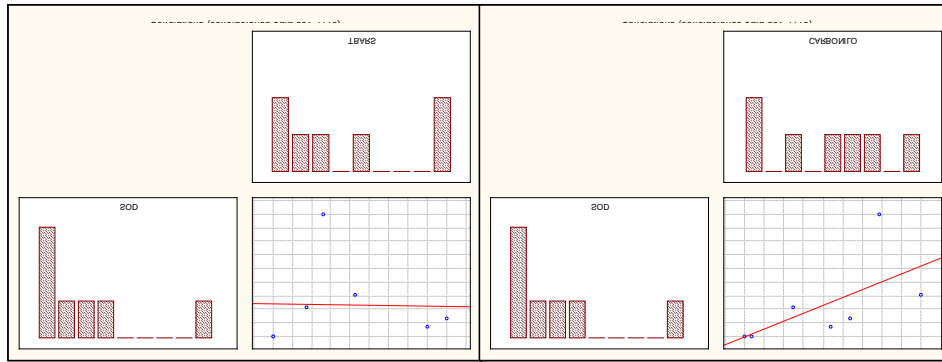


R= 0,684

p= 0,089

R= 0,142

p= 0,759

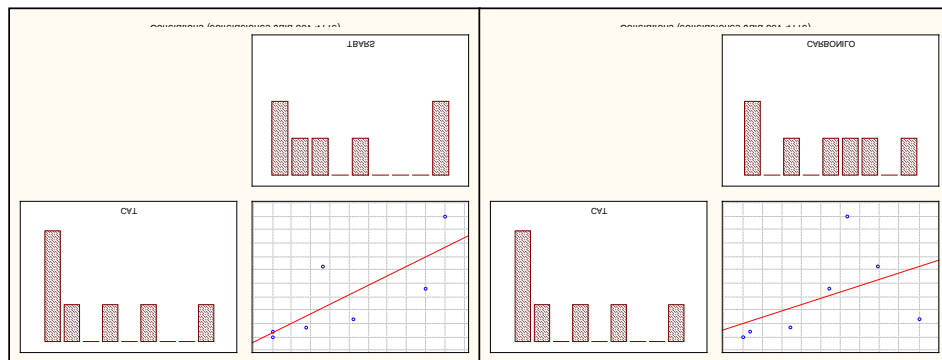


R= 0,418

p= 0,350

R= 0,846

p= 0,016

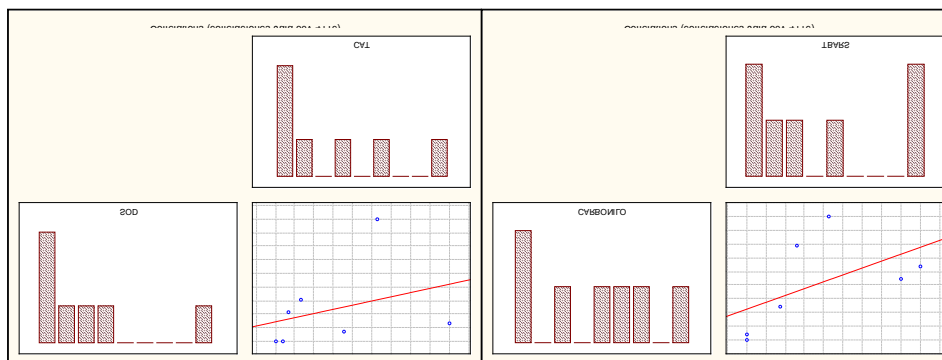


R= 0,882

p= 0,008

R= 0,75

p= 0,052



R= 0,594

p= 0,159

R= 0,5478

p= 0,203

**Anexo 11:** Resultados de las pruebas de correlación entre los parámetros oxidativos analizados.

**Anexo 12:** Límites máximos permitidos para la descarga de residuos líquidos a cuerpos de agua marinos dentro de la zona de protección litoral, contenidos en la Tabla N° 4 de la norma de emisión de contaminantes permitida para residuos líquidos descargados por las fuentes emisoras, a los cuerpos de agua marinos y continentales superficiales de la República de Chile.

CONTAMINANTE	UNIDAD	EXPRESION	LIMITE MÁXIMO PERMISIBLE
Aceites y Grasas	mg/L	A y G	20
Aluminio	mg/L	Al	1
Arsénico	mg/L	As	0,2
Cadmio	mg/L	Cd	0,02
Cianuro	mg/L	CN <sup>-</sup>	0,5
Cobre	mg/L	Cu	1
Coliformes Fecales o Termotolerantes	NMP/100 ml	Coli/100 ml	1000-70*
Índice de Fenol	mg/L	Fenoles	0,5
Cromo Hexavalente	mg/L	Cr <sup>6+</sup>	0,2
Cromo Total	mg/L	Cr Total	2,5
DBO <sub>5</sub>	mg O <sub>2</sub> /L	DBO <sub>5</sub>	60
Estaño	mg/L	Sn	0,5
Fluoruro	mg/L	F <sup>-</sup>	1,5
Fósforo	mg/L	P	5
Hidrocarburos Totales	mg/L	HCT	10
Hidrocarburos Volátiles	mg/L	HCV	1
Hierro Disuelto	mg/L	Fe	10
Manganeso	mg/L	Mn	2
Mercurio	mg/L	Hg	0,005
Molibdeno	mg/L	Mo	0,1
Níquel	mg/L	Ni	2
Nitrógeno Total Kjeldahl	mg/L	NKT	50
PH	Unidad	pH	6,0 - 9,0
Plomo	mg/L	Pb	0,2
SAAM	mg/L	SAAM	10
Selenio	mg/L	Se	0,01
Sólidos Sedimentables	ml/1/h	S SED	5
Sólidos Suspendidos Totales	mg/L	SS	100
Sulfuros	mg/L	S <sup>2-</sup>	1
Zinc	mg/L	Zn	5
Temperatura	°C	T°	30

\* =En áreas aptas para la acuicultura y áreas de manejo y explotación de recursos bentónicos, no se deben sobrepasar los 70 NMP/100 ml.

**Anexo 13:** Tabla numero uno del trabajo realizado por Conti *et al.* 2011.

**Table 1** Mean metal concentrations ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight) in the soft tissues of *Mytilus chilensis* (mean  $\pm$  SD), mean metal concentrations in the two sampling campaigns (A + B) ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry weight), mean metal concentrations in coastal seawater samples, ( $\text{ng l}^{-1}$ ) (mean  $\pm$  SD) ( $n = 7$  stations) and  $\text{CFs}^a \times 10^3$

	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
A <sup>b</sup>	0.72 $\pm$ 0.47	0.40 $\pm$ 0.15	6.35 $\pm$ 2.43	0.92 $\pm$ 0.35	0.43 $\pm$ 0.38	80.6 $\pm$ 82.1
B <sup>b</sup>	0.85 $\pm$ 0.49	0.59 $\pm$ 0.11	5.27 $\pm$ 2.04	0.93 $\pm$ 0.31	0.39 $\pm$ 0.07	90.7 $\pm$ 34.6
Mean (A + B)	0.75 $\pm$ 0.48	0.45 $\pm$ 0.29	6.14 $\pm$ 2.04	0.92 $\pm$ 0.350	0.42 $\pm$ 0.36	83.2 $\pm$ 50.8
Seawater <sup>c</sup> (soluble)	<18	–	311 $\pm$ 233	<100	1176 $\pm$ 1243	768 $\pm$ 369
$\text{CFs}^a \times 10^3$	43.0 <sup>c</sup>	–	20.4	9.5 <sup>c</sup>	0.37	112

<sup>a</sup>  $\text{CF} = \text{Co}/\text{Csw}$ , where Co mean concentration in the organism ( $\mu\text{g g}^{-1}$  d.w.) and Csw mean concentration in seawater ( $\text{ng l}^{-1}$ ). CFs are referred to the soluble fraction of seawater. Mean salinity recorded during sampling:  $33 \pm 1$  g NaCl/liter

<sup>b</sup> (A) First sampling campaign—2005 ( $n = 210$  individuals); (B) Second sampling campaign—2007 ( $n = 70$  individuals). Wet weight/dry ratio ( $n = 70$ ):  $3.54 \pm 0.25$

<sup>c</sup> CFs are here intended as a minimum possible CF value obtained for *Mytilus* samples

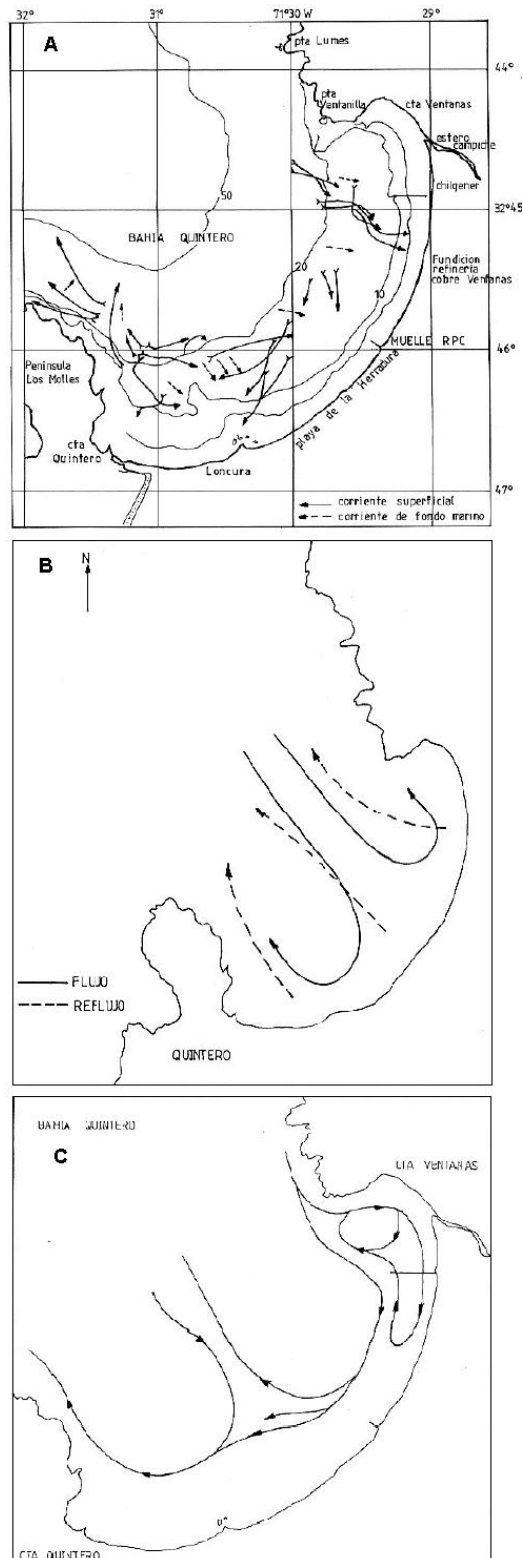
**Anexo 14:** Tabla numero uno del trabajo realizado por Conti *et al.* 2012.

**Table 1** Mean metal concentrations in the two sampling campaigns (2005 and 2007) ( $\mu\text{g g}^{-1}$  d.w.) in muscle and viscera samples of *Nacella (Patinigera)magellanica* (mean  $\pm$  SD), mean metal concentrations in coastal seawater samples ( $\text{ng L}^{-1}$ ) (mean  $\pm$  SD) ( $n = 7$  stations) and  $\text{CFs}^a \times 10^3$  in muscle and viscera

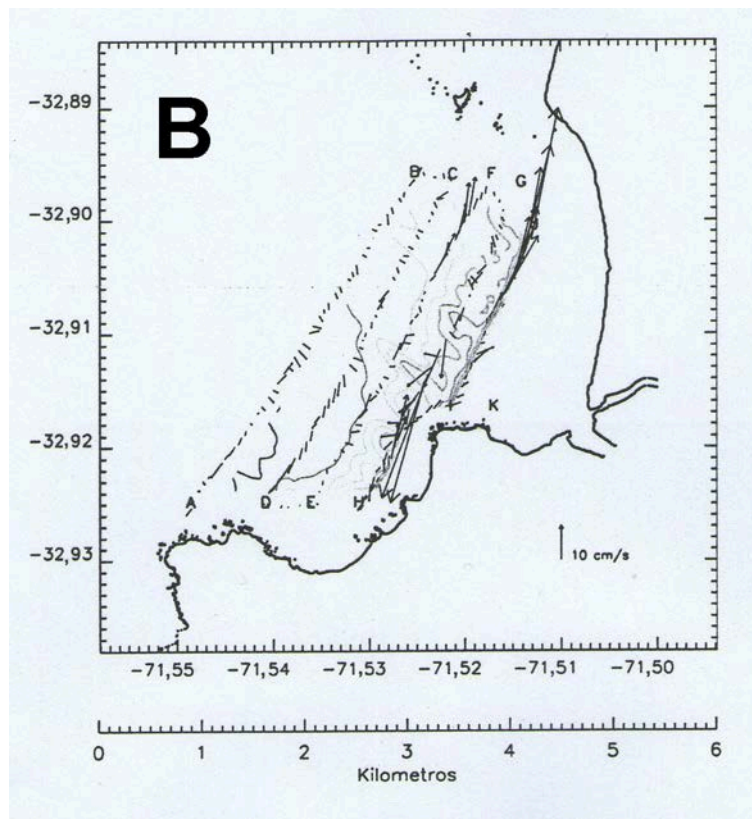
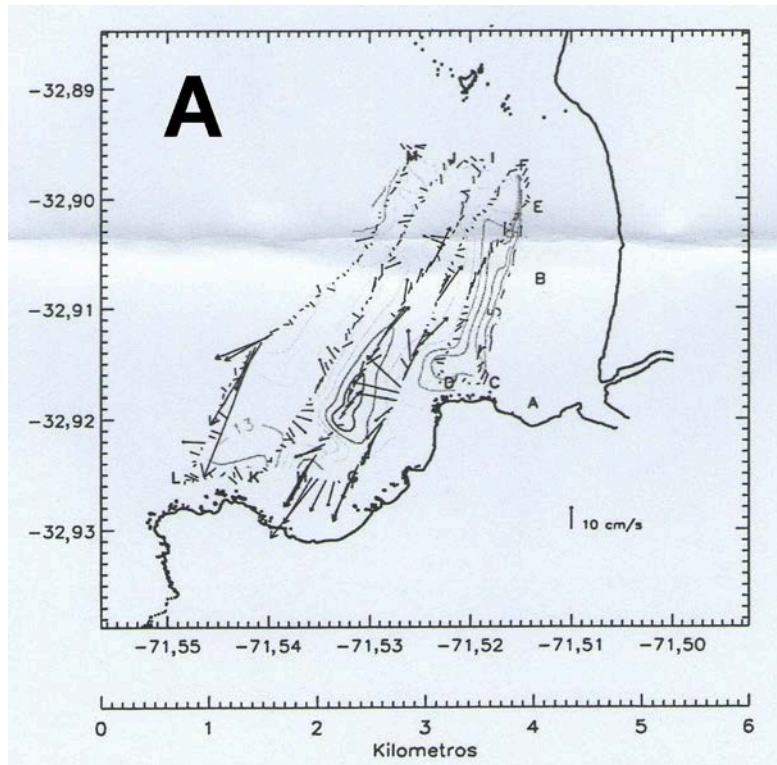
	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Muscle ( $n = 175$ )	3.97 $\pm$ 2.45	0.20 $\pm$ 0.28	<4.00	<0.30	0.13 $\pm$ 0.16	30.7 $\pm$ 5.9
Viscera ( $n = 175$ )	8.22 $\pm$ 4.01	3.16 $\pm$ 2.29	15.16 $\pm$ 8.45	7.63 $\pm$ 4.07	1.23 $\pm$ 1.57	96.2 $\pm$ 25.4
Seawater ( $n = 28$ ) (soluble)	<18	–	311 $\pm$ 233	<100	1,176 $\pm$ 1,243	768 $\pm$ 369
$\text{CFs}^a \times 10^3$ (muscle)	227.8 <sup>b</sup>	–	–	–	0.114	41.3
$\text{CFs}^a \times 10^3$ (viscera)	471.7 <sup>b</sup>	–	50.3	78.8 <sup>b</sup>	1.08	129.4

<sup>a</sup>  $\text{CF} = \text{Co}/\text{Csw}$ , where Co = mean concentration in the organism ( $\mu\text{g g}^{-1}$  d.w.) and Csw = mean concentration in seawater ( $\text{ng L}^{-1}$ ). CFs are referred to the soluble fraction of seawater. Mean salinity recorded during sampling:  $33 \pm 1$  NaCl/liter

<sup>b</sup> CFs are here intended as a minimum possible CF value obtained for *Nacella* samples



**Anexo 15:** Corrientes marinas de la Bahía de Quintero, A) Circulación de corrientes marinas superficiales y profundas de la bahía de Quintero (Escobar *et al.* 1971), B) Patrón de circulación de corrientes marinas superficiales en llenante y vaciante de la bahía Quintero (Bakovic & Balic, 1984), C) Modelo de circulación superficial de las aguas de la bahía de Quintero (Malet & Andrade, 1991).



**Anexo 16:** Circulación de corrientes marinas superficiales y profundas de la bahía de Concón año 2008 (A) y 2009 (B) (Tesis de grado Kroeger, 2011. Microfitoplancton en la Bahía de Concón, Chile ( $71^{\circ} 32' W$   $32^{\circ} 55' S$ ): Variabilidad asociada al caudal del río Aconcagua y a las condiciones de surgencia durante el periodo 2008-2009. Universidad de Valparaíso).