



**UNIVERSIDAD DE VALPARAISO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

Departamento de Biología y Ciencias Ambientales

**EVALUACION DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN  
ALGAS DE SECTORES COSTEROS CON  
ACTIVIDAD MINERA**

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN  
CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA

**Romina Carrasco Kittelsen**

PROFESORES GUIA

**HERNAN GAETE Ph. D  
MARIA ELIANA HIDALGO Ph. D**

**Valparaíso, Chile**

**2012**

*Dedicada a mis Padres y hermanos  
todo lo que soy es gracias al  
esfuerzo y dedicación que pusieron a diario  
para cumplir esta meta.*

# AGRADECIMIENTOS

*Al profesor Hernán Gaete, el cual me invito a participar de este proyecto, confiando en mí y en mis conocimientos.*

*A la profesora María Eliana Hidalgo, la cual sin conocerme me brindó su apoyo incondicional, permitiéndome trabajar en su laboratorio y apoyándome en cada momento que lo necesité.*

*A Carlos Jara, quien desde el primer día me ayudó y colaboró con todos sus conocimientos, experiencia y tiempo. A Natalia Moyano, mi compañera de proyecto, con quien compartí salidas a terrenos y momentos de laboratorio. Y al proyecto DIUV 28/2009.*

*Además a mis amigos que estuvieron apoyándome en todo este proceso, Diana y Daniela las cuales desde el primer día me brindaron su cariño y su apoyo, que hicieron que todo este proceso sea más entretenido con experiencias y momentos inolvidables. A Raquel, quien a pesar de la distancia siempre hizo latente su cariño y compañía. Que difícil hubieran sido estos años sin ustedes.*

*A un amigo, compañero incondicional y pololo, Sebastián, gracias por el apoyo, el cariño y el amor, sin ti estos últimos meses hubieran sido muy difíciles.*

*Y finalmente, las personas que siempre me acompañaron, que nunca me dejaron, y quienes incondicionalmente estuvieron para brindarme una mano, un abrazo o unas palabras cuando lo necesité, mi Familia de quienes estoy completamente orgullosa. Mi padre, mi madre, mis hermanos, mis abuelos, mis tíos y primos, juntos como familia nuestros esfuerzos y sacrificios han tenido recompensa. Y tu mi Aly quien desde el cielo me ha acompañado y cuidado. LOS QUIERO MUCHO.*

*El esfuerzo ha valido la pena, muchas gracias a todos ustedes.*

# INDICE

<b>I. RESUMEN</b> .....	8
ABSTRACT .....	9
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	10
1. Estrés oxidativo y Radicales libres .....	10
1.1 Especies reactivas de oxígeno (EROs) .....	11
1.1.1 Producción de EROs.....	12
1.1.1.1 NAD(P)H Oxidasa .....	12
1.1.1.2 Xantina Oxidasa .....	13
1.1.1.3. Cicloxigenasas (COX) .....	13
1.1.1.4. Mitocondria.....	14
1.1.1.5 Reacción de Fenton.....	14
1.1.1.6 Reacción de Haber – Weiss .....	15
1.1.2 Daños producidos por los EROs.....	16
1.2 Mecanismo de defensa contra el daño oxidativo .....	17
1.2.1 Antioxidantes enzimáticos.....	18
1.2.1.1 Superóxido dismutasa (SOD).....	18
1.2.1.2 Catalasa (CAT) .....	19
1.2.1.3 Glutation Peroxidasa (GPx) .....	20
1.2.2 Antioxidantes no enzimáticos .....	21
1.3 Lipoperoxidación.....	22
1.4 Métodos analíticos para el estudio del estrés oxidativo .....	24

1.4.1	Biomarcadores de daño a lípidos.....	25
1.4.2	Biomarcadores del balance redox: enzimas antioxidantes.....	26
2.	Alternativas de monitoreo de calidad de agua.....	27
2.1	Algas como bioindicadores .....	28
3.	Actividad minera en Chile.....	29
3.1	Historia de la minería del cobre en Chile .....	30
4.	Contaminación en las costas de Chile .....	31
4.1	Descarga de contaminantes a las cuencas hidrográficas vinculadas con áreas costeras.....	34
4.2	Metales pesados liberados al ambiente producto de actividad minera.....	37
<b>II.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>39</b>
5.	Contaminación producto de la minería en la Tercera región.... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
6.	Contaminación por descarga de efluentes industriales y portuarias en la Quinta región.....	46
<b>III.</b>	<b>OBJETIVOS E HIPOTESIS .....</b>	<b>40</b>
7.	Objetivo General.....	40
7.1.	Objetivos Específicos.....	40
8.	Hipótesis .....	40
<b>IV.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
9.	Área de muestro .....	41
10.	Organismo de prueba .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
10.1.	<i>Scytosiphon lomentaria</i> .....	49
10.2.	<i>Ulva rígida</i> .....	50
11.	Diseño experimental. ....	51
11.1.	Preparación de la muestra .....	52

11.2.	Determinación de la actividad de catalasa .....	52
11.3.	Determinación de peroxidación lipídica (TBARS) .....	53
12.	Análisis estadísticos .....	53
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	<b>54</b>
13.	Biomarcadores de estrés oxidativo en la macroalga <i>Scytosiphon lomentaria</i> .....	57
14.	Biomarcadores de estrés oxidativo en la macroalga <i>Ulva rígida</i> .....	60
15.	Comparación en los resultado del análisis de los parámetros oxidativos en las macroalgas <i>Scytosiphon lomentaria</i> y <i>Ulva rígida</i> .....	63
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>65</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>66</b>

# I. RESUMEN

El aumento de la contaminación de los ecosistemas acuáticos costeros, por metales pesados, ha llevado a un creciente interés en la determinación de sus efectos sobre los organismos que viven en estos ambientes. Las algas marinas son conocidas por su capacidad de biorremediar, por esta razón es posible que los metales biodisponibles en el medio ambiente, pueden ser absorbidos y por lo tanto generar estrés oxidativo.

Se utilizaron algas de la especie *Scytosiphon lomentaria* y *Ulva rígida* colectadas desde distintos sitios y se analizó la actividad de la enzima catalasa y el daño a lípidos (TBARS). Las muestras fueron colectadas en sitios de la región de Atacama con importante actividad minera, como lo son, Caleta palito, Chañaral, Huasco y Caldera; en la región de Valparaíso Ventana y Quintero; comparados con sitios de esta misma región como lo son Quintay y Montemar; y un sitio de la región de Coquimbo como lo es Punta de choro, con menor actividad antropogénica.

Las concentraciones de metales de cobre analizados indican que Caleta palito y Chañaral presentan valores superiores a Huasco y Quintay lo que en el caso de la macroalga *Scytosiphon lomentaria* se evidencia por un aumento en la actividad de la enzima catalasa y en el daño a lípidos.

En el caso de la macroalga *Ulva rígida* los resultados obtenidos muestran como en las zonas de mayor contaminación antrópica (Caldera y Ventana) hay una mayor actividad de la enzima catalasa y un mayor grado de peroxidación lipídica. Ésto también se relaciona con la alta concentración de Cadmio presente en Caldera, donde sus cationes  $Cd^{+2}$  actúan como prooxidantes generando daño oxidativo.

Los resultados demostraron que ambas especies de macroalgas pueden ser consideradas como biomonitores de daño oxidativo.

**Palabras claves:** Estrés oxidativo, minería, metales traza, *Scytosiphon lomentaria*, *Ulva rígida*



# ABSTRACT

There has been a growing interest on the effects on organisms living in contaminated coastal aquatic ecosystems caused by heavy metals. Seaweeds are known for their capacity to bioremediate, so it is for this reason that the metals biologically available in the environment could be absorbed, and therefore generate oxidative stress.

Two different species of algae, *Scytosiphon Lomentaria* and *Ulva Rígida*, were used in this investigation. They were taken from different locations, and the enzyme catalase was analyzed, together with the lipid peroxidation (TBARS).

Samples were collected, due to the important mining activity, from places such as Caleta Palito, Chañaral, Huasco and Caldera, all of them in the Atacama Region; Ventana and Quintero located in the Valparaiso Region; and Punta de Choros with less anthropogenic activity in the Coquimbo Region. There were also collects, from places without mining activities such as Quintay and Montemar in the Valparaiso region which were compared to the samples taken from Ventana and Quintero.

The copper metal concentration analyzed indicates that Caleta Palito and Chañaral have higher values, than Huasco and Quintay, producing in the case of the macroalga *Scytosiphon Lomentaria* an increase in the catalase enzyme activity and in the lipid peroxidation.

In the case of the macro alga *Ulva Rígida*, the results from the analysis show that there is a higher activity of the catalase enzyme and a higher degree of lipid peroxidation on samples taken from places with higher anthropogenic contamination levels such as Caldera and Ventana. This is also related to a high concentration of cadmium in Caldera, where its cations  $Cd^{+2}$  act as pro-oxidant generating oxidative damage.

The results proved that both macro algae species can be considered as bio-monitors of oxidative damage.

**Key words:** Oxidative Stress, Mining, Heavy Metals, *Scytosiphon Lomentaria*, and *Ulva Rígida*

## II. MARCO TEÓRICO

### 1. Estrés oxidativo y Radicales libres

En los anales de la historia, pocos eventos han tenido un impacto tan profundo y matizado con respuestas polifacéticas como el ocurrido a consecuencia del conocimiento de los radicales libres y de su influencia variable en los seres vivos.

El proceso de oxidación por el cual un ión o átomo pierde uno o varios electrones genera como resultado moléculas muy inestables conocidas como especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno capaces de reaccionar inespecíficamente con sustratos orgánicos, tales como lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN) (Lozada & García, 2009).

Dentro de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se reconocen las de tipo radical libre y las de tipo no radical.

Los radicales libres son aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital más externo, dándole una configuración espacial que genera una alta reactividad, una alta inestabilidad y una vida efímera; con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente con la diversidad de moléculas integrantes de la estructura celular (Rodríguez, Menéndez & Trujillo, 2001).

Son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos. La mitocondria constituye la fuente principal de radicales libres, a nivel de la cadena transportadora de electrones. Una consecuencia directa en este proceso de fosforilación oxidativa es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar 1 o 2 electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos formando así radicales libres como el radical hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ) o el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (Turrens, 1997).

Entre las moléculas de tipo no radical son mucho más estables y pueden generar un efecto tóxico a largo plazo. Dentro de éstos encontramos al peroxinitrito (ONOO-) (Beckman & Koppenol, 1996) y al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que es el oxidante más estable de todos y reacciona a distancia de su lugar de producción.

Entonces, aunque estas reacciones de oxidación son necesarias para obtener energía para un adecuado funcionamiento celular, un desequilibrio entre la producción de especies reactivas y los mecanismos antioxidantes, genera estrés oxidativo y conlleva a disfunción y muerte celular (Lozada & García, 2009).

**Cuadro 1:** Especies reactivas radicalarias y no radicalarias. Modificado de: Haliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology 2006; 141:312–22

<b>RADICALES LIBRES</b>	<b>NO RADICALES</b>
Especies reactivas de oxígeno	Especies reactivas de oxígeno
Superóxido O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> Hidroxilo OH· Hidroperoxilo HO <sub>2</sub> ·	Peróxido de hidrógeno H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Ozono O <sub>3</sub> Peroxinitrito ONOO <sup>-</sup>
Especies reactivas de nitrógeno	Especies reactivas de nitrógeno
Óxido nítrico Radical nitrato Dióxido de nitrógeno	Ácido nitroso Peroxiacetil nitrato Anión nitroxi

### 1.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

La mayor parte del oxígeno celular es reducido a agua a través de reacciones enzimáticas, pero del 2 al 5 % escapa a esta reducción bivalente y experimenta la monovalente, y de ello resulta la formación de especies de oxígeno parcialmente

reducidas, denominadas también especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas especies reactivas de oxígeno se pueden producir además por procesos patológicos como la inflamación y la isquemia, e incluso, producto de la relación con elementos ambientales, como la radiación por la luz, la polución y el humo del cigarrillo (Lozada & Garcia, 2009). Los más importantes son el anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ).

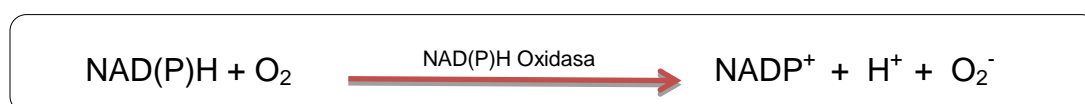
### 1.1.1 Producción de ERO

Existen diversos mecanismos intracelulares que generan electrones libres, que desencadenan en la síntesis de especies reactivas de oxígeno.

#### 1.1.1.1 NAD(P)H Oxidasa

La nucleotinamidadifosfato (NAD(P)H) oxidasa es una enzima asociada a membrana que cataliza la reducción del oxígeno molecular utilizando NADH o NADPH como donador de electrones (Figura 1).

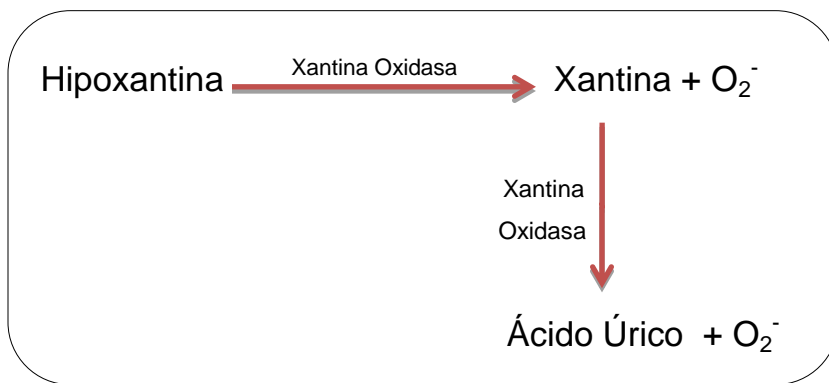
Existen diversos tipos de NAD(P)H oxidasa, la mejor caracterizada es la que está presente en los fagocitos donde juega un papel fundamental en la actividad bactericida (Babior et al., 2002) a través de la producción de anión superóxido. En la células vasculares, la NAD(P)H es la principal fuente de producción de ERO (Rajagopalan et al., 1996) de manera enzimática.



**Figura 1:** Producción del radical anión superóxido

### 1.1.1.2 Xantina Oxidasa

La xantina oxidasa es una molibdoflavoenzima capaz de catalizar la degradación de la hipoxantina a xantina, y ésta a ácido úrico y anión superóxido. Es durante el proceso de degradación de la xantina o de la hipoxantina, por la Xantina Oxidasa, cuando se genera el anión superóxido. (Granger DN., 1999). Se localiza principalmente en el hígado y en el plasma circulante.



**Figura 2:** Actividad de la Xantina Oxidasa

### 1.1.1.3. Cicloxigenasas (COX)

Las cicloxigenasas son enzimas que metabolizan el ácido araquidónico, dando lugar a la formación de prostanoides. Es durante esta síntesis cuando se generan las ERO, debido al componente peroxidasa de las COX que llevan a cabo la oxidación de la NAD(P)H generando el superóxido (Kukreja et al., 1986).

La generación de ERO por parte de la COX, es especialmente importante en la vasculatura cerebral

#### 1.1.1.4. Mitocondria

La mitocondria es la mayor fuente de producción de ERO en condiciones fisiológicas (Chance y et al., 1979). La mitocondria es un organelo que está presente en el citoplasma, cuya principal función en la mayoría de los tejidos es la de proveer energía en forma de adenosintrifosfato (ATP), a partir de sustratos energéticos por parte de la cadena de transportes de electrones. Es en dos puntos, fundamentalmente, de esta cadena de transportes donde se generan las ERO, en concreto el anión superóxido. El primer punto es por autooxidación de la semiquinona del complejo III. El segundo punto, se encuentra en el complejo I aunque su localización exacta todavía es desconocida, debido al gran número de proteínas que forman parte de este complejo (Rodríguez, Menéndez & Trujillo, 2001).

La cantidad del anión superóxido generada por la mitocondria se incrementa cuando la concentración de oxígeno aumenta (Turrens y et al., 1982).

#### 1.1.1.5 Reacción de Fenton

El estudio de la toxicidad, y en general del comportamiento oxidativo de los metales pesados en el interior de la célula de un organismo viene determinado en gran medida por dos tipos de reacciones químicas causante de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot -}$ . La primera, la reacción de Fenton que consiste en la descomposición del peróxido de hidrógeno mediante la adición de sales de hierro para formar un radical  $OH^{\cdot}$



**Figura 3:** Formación del radical hidroxilo mediante la reacción de Fenton.

Este radical es tremendamente reactivo y puede producir procesos de oxidación en cascada. En general lo que se produce en la célula son interacciones que causan una fuerte descompensación electrónica, principalmente por la acción de los radicales formados por el radical OH, bien generando otros radicales, bien oxidando o reduciendo especies químicas presentes en el medio.

#### 1.1.1.6 Reacción de Haber – Weiss

La reacción de Haber-Weiss, es en realidad un ciclo de dos reacciones. La primera reacción aprovecha el radical OH· producido por la reacción de Fenton para reaccionar con más peróxido y originar un elemento crucial en las reacciones redox elaboradas en la célula, el radical superóxido.



**Figura 4:** Primera reacción del ciclo de reacciones de Haber – Weiss.

El radical superóxido recién producido va a reaccionar entonces con más peróxido de hidrógeno, para volver a dar los productos no metálicos de la reacción de Fenton.



**Figura 5:** Segunda reacción del ciclo de reacciones de Haber – Weiss

### 1.1.2 Daños producidos por los ERO

Las Especies Reactivas de Oxígeno participan en los mecanismos de fagocitosis y en algunas reacciones enzimáticas, constituyendo un elemento básico en la defensa antimicrobiana y antitumoral. Sin embargo, los efectos nocivos son mayores (Gil del Valle, Reyes, Sánchez & Fernández, 2002).

Debido a la alta inestabilidad atómica de los radicales libres, éstos colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. Son numerosas las consecuencias vinculadas al daño producido por los radicales libres, incluso la hipótesis del proceso de envejecimiento se fortalece al focalizarla en las mitocondrias, por la acción continua de los radicales libres y la acumulación selectiva de daños oxidativos en las moléculas especialmente sensibles (Boberis, Costa & Junqueira, 2000). Las proteínas, los lípidos insaturados, los ácidos nucleicos y los carbohidratos son los blancos fundamentales de las acciones de los radicales libres.

Las proteínas son modificadas de diferente manera por las ERO. Debido a la reactividad con moléculas insaturadas o que contienen azufre, las proteínas con proporciones elevadas de triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína pueden sufrir modificaciones aminoacídicas mediadas por radicales libres. En este sentido, se ha observado una inhibición de las enzimas que dependen de estos aminoácidos para presentar actividad. Las reacciones de los radicales libres con estos aminoácidos dan lugar también a alteraciones estructurales en las proteínas provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación, que se ven favorecidos por la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares (Martínez, 1998).

En relación con los lípidos, por las características de la oxidación lipídica por los radicales libres, se trata de una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse, se convierte en un radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina (Rodríguez, Menéndez & Trujillo, 2001). Los productos finales del proceso de peroxidación lipídica, entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos, pueden difundir lejos del lugar donde se originaron y causar edema celular e influir en la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis (Prior & Burdon, 1991). El Malondialdehído, que es un producto final de la peroxidación de ácidos grasos, puede



causar entrecruzamientos y polimerización de distintos componentes de la membrana. Así pues, las propiedades de las membranas resultan aún más alteradas (Martínez, 1998).

Los ácidos nucleicos también pueden ser afectados por los radicales libres. Realmente la citotoxicidad de estas especies químicas, en gran parte, es una consecuencia de las aberraciones cromosómicas producidas por las modificaciones químicas que sufren las bases y los azúcares del ADN al reaccionar con los radicales libres, especialmente con el  $\text{OH}^\cdot$ . Las modificaciones químicas de los nucleótidos provocan, en muchos casos, la ruptura de las hebras del ADN. Si el daño que se origina es tan grande que no puede ser reparado, se produce una mutación, o bien, la muerte celular (Martínez, 1998).

Los carbohidratos son dañados por los radicales libres en menor proporción que otras moléculas. Azúcares tales como la glucosa, el manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) para producir sustancias reactivas. Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose a unidades más sencillas. Se ha demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radicales hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones (Martínez, 1998).

## 1.2 Mecanismo de defensa contra el daño oxidativo

En la célula existen diversos sistemas que contrarrestan a los radicales libres y que la protegen en contra de su acción deletérea. En general, un antioxidante se puede definir como toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato (Rodríguez, Menéndez & Trujillo, 2001).

Los sistemas antioxidantes, trabajan mediante dos tipos de mecanismos que permiten eliminar los excesos de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, la protección estequiométrica y la catalítica. La protección estequiométrica consiste en que el antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un radical libre débil, no tóxico y que en algunos casos puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. La protección

catalítica, se produce con enzimas que inhiben las reacciones de oxidación y evitan la formación de grandes cantidades de especies reactivas (Lozada & García, 2009). Existe gran cantidad de compuestos antioxidantes, como enzimas, iones metálicos, uratos y otras moléculas endógenas y exógenas, como los son las vitaminas y los carotenoides. Los sistemas enzimáticos, son del tipo inhibitorio, neutralizador o reductor y reparador (Mates, Pérez-Gómez & De Castro, 1999).

### 1.2.1 Antioxidantes enzimáticos

Las células son protegidas contra el estrés oxidativo por una red de enzimas antioxidantes (Davies, 1995). El superóxido liberado por procesos tales como la fosforilación oxidativa, primero se convierte en peróxido de hidrógeno e inmediatamente se reduce para dar agua. Esta ruta de detoxificación es el resultado de múltiples enzimas con la superóxido dismutasa catalizando el primer paso y luego las catalasas y varias peroxidasas que eliminan el peróxido de hidrógeno (Ho, Magnenat, Gargano & Cao, 1998).

#### 1.2.1.1 Superóxido dismutasa (SOD)

Son un grupo de metaloenzimas presentes frecuentemente en organismos aerobios, aerotolerantes y algunos anaerobios obligados (García et al. 1997). Catalizan la dismutación del anión superóxido originando peróxido de hidrógeno (Mayes. 1999; Casado et al. 1998; Janssen et al. 1998).



**Figura 6:** Dismutación del anión superóxido.

En eucariontes existen tres formas de SOD, dependiendo del metal del centro catalítico (Montero, 1996):

- Cu-Zn-SOD: Contiene grupos prostéticos Cobre y Zinc; se encuentra en el citosol de las células eucarióticas. Está constituida por dos subunidades similares que contienen cada uno un equivalente de  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$  (Mayes, 1999).
- Mn-SOD: Contiene el grupo prostético Manganeseo; se encuentra en la mitocondria y protege las proteínas de membrana y ADN del anión superóxido generado como resultado de la cadena respiratoria (García et al. 1997).
- EC-SOD: Contiene  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$  al igual que Cu-Zn-SOD citosólica; se ubica en el medio extracelular, la cual es necesaria para la defensa contra numerosas fuentes extracelulares de  $\text{O}_2$ .

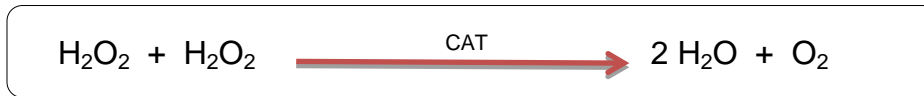
#### 1.2.1.2 Catalasa (CAT)

Es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano, aunque su actividad varía en dependencia del tejido, ésta resulta más alta en el hígado y los riñones, más baja en el tejido conectivo y los epitelios, y prácticamente nula en el tejido nervioso. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol. Esta enzima es una metaloproteína tetramérica: consta de cuatro subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX (Tosaki et al. 1993).

La catalasa está involucrada en la destrucción del peróxido de hidrógeno generado durante el metabolismo celular. Presenta dos funciones: la catalítica y la peroxidativa.

La reacción general tiene la reducción del sustrato tomando los átomos de hidrógeno aportados por un donador, y los productos finales serían el sustrato reducido y el donador oxidado.

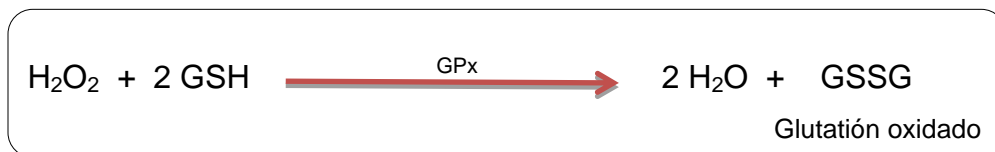
En la reacción catalítica el donador es otra molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esta reacción solo puede ser realizada por la enzima en su forma tetramérica.



**Figura 7:** Catálisis del Peróxido de hidrógeno.

### 1.2.1.3 Glutación Peroxidasa (GPx)

Es una enzima selenio dependiente que cataliza la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando el glutatión reducido (GSH). (Mayes, 1999; Cisneros, Pupo & Céspedes, 1997)



**Figura 8:** Reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalizada por el glutatión peroxidasa.

El glutatión oxidado es reducido por la glutatión reductasa (GRd) que utiliza NADPH (proveniente de la vía pentosa fosfato en el eritrocito) como dador de electrones, manteniendo así la proporción GSH/GSSG (Montero, 1996; Mayes, 1999).

Existen al menos tres formas de glutatión peroxidasa selenio dependiente: una forma intracelular o celular, una extracelular o plasmática y otra con actividad específica para los fosfolipoperoxidos, que por lo general está asociada a la membrana y aunque su actividad es la misma, posee diferencias estructurales. La glutatión peroxidasa celular y la plasmática son enzimas tetraméricas: están compuestas por cuatro subunidades idénticas

entre sí, y cada una de éstas contiene un átomo de selenio unido covalentemente a una molécula de cisteína. En cambio la glutatión peroxidasa específica para fosfolipoperóxidos es una enzima monomérica que también posee un átomo de selenio y presenta actividad catalítica (Avisar, Slemmon & Palmer, 1992; Stepanik & Ewing, 1993).

### 1.2.2 Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos están presentes en la dieta ingerida por los seres vivos, sobre todo en las frutas y verduras. Tienen como principales características que son sustancias capaces de neutralizar un único radical libre por molécula, solo actúan a concentraciones elevadas y tienen un papel despreciable frente a los antioxidantes enzimáticos (Montero, 1996).

- Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol): Impide reacciones en cadena producida por radicales peróxido durante la etapa de propagación en la peroxidación lipídica. El  $\alpha$ -tocoferol dona un átomo de hidrógeno al radical, produciéndose el radical  $\alpha$ -tocoferoxil ( $\alpha$ -TO $^{\cdot}$ ), el cual es lo suficientemente estable como para no continuar las reacciones en cadena de la peroxidación lipídica, siendo removido del ciclo al reaccionar con otro radical peroxil formando productos inactivos (Montero, 1996, Mayes, 1999).
- Vitamina C (ácido ascórbico): Es una molécula de pequeño tamaño e hidrosoluble, por lo que no es efectiva frente a la peroxidación lipídica. Puede actuar como pro o antioxidante. Así, puede autooxidarse, especialmente en presencia de metales, para producir ERO (Montero, 1996). Bajo la forma de ascorbato presenta una actividad dual sobre la peroxidación lipídica, ya que dependiendo de su concentración puede inhibirla o incrementarla.  
La vitamina C, por su carácter reductor también es capaz de reaccionar rápidamente con el O $_2^{\cdot}$  y con el radical hidroxilo, en ambos casos se oxida a dihidroascorbato (Pérez P & Pérez J, 1999).

- $\beta$  caroteno (Pro vitamina A): Además de su actividad antioxidante, es muy eficiente eliminando el oxígeno singlete, debido a que posee un alto sistema dobles enlaces conjugados, aunque sólo tiene importancia en regiones con baja tensión de oxígeno.
- Transferrina: Son proteínas circulantes transportadoras de hierro. Se encargan de enlazar al hierro detenido o retardando su participación en la reacción de Haber – Weiss y en la peroxidación lipídica.

### 1.3 Lipoperoxidación

Los lípidos son un grupo heterogéneo de componentes que tienen varias funciones importantes en el cuerpo tales como: fuente eficiente de energía, constituyente de membranas celulares y tejido nervioso y también actúan como hormonas locales (Mayes, 1999).

El mecanismo de peroxidación lipídica inducida por radicales libres fue establecido en la década del 40 por Farmer y sus colaboradores trabajando en los laboratorios de investigación en el British Rubber Producers Association. Después, en los años 50 la relevancia de la peroxidación lipídica en sistemas biológicos y medicina empezó a ser explorada (Halliwell B & Gutteridge, 1990).

Se denomina peroxidación lipídica o lipoperoxidación al proceso de oxidación de los ácidos grasos. Los ácidos grasos poliinsaturados son particularmente susceptibles a la peroxidación porque poseen tres o más uniones carbono – carbono con doble enlace, que le confiere una zona de enlace lábil que permite que una molécula activa como el  $\text{OH}^\cdot$  le sustraiga un átomo de hidrógeno. Se trata de una reacción en cadena, que una vez comenzada continua desarrollándose por si misma (Södergren, 2000). Así, el proceso consta de tres etapas:

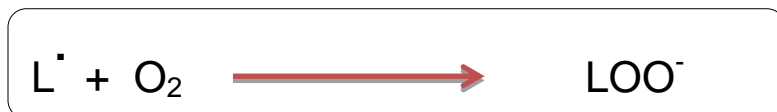
- **Iniciación:** cuando la unión del enlace Carbono – Hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados sufre la abstracción del hidrógeno del doble enlace (hidrógeno alílico), lo que genera un radical lipídico. Teniendo el átomo de hidrógeno un solo electrón, la sustracción de hidrógeno del grupo metileno produce un radical ácido graso (L<sup>•</sup>) al dejar un electrón desapareado en el carbono (Halliwell B & Gutteridge, 1999).



**Figura 9:** Reacción de la etapa de Iniciación en la peroxidación lipídica

Donde LH es un ácido graso poliinsaturado y R<sup>•</sup> es un radical libre.

El radical carbonilo resultante (L<sup>•</sup>) sufre un reordenamiento molecular originando un dieno conjugado, y en presencia de oxígeno molecular da lugar al radical peroxilo (LOO<sup>•</sup>)



**Figura 10:** Generación del radical peroxilo

El radical peroxilo puede sustraer un átomo de hidrogeno de otra molécula vecina (LH), la cual puede ser otro ácido graso insaturado, formándose así un hidroperóxido (LOOH) y un nuevo radical lipídico (L<sup>•</sup>), entrando la peroxidación en fase de propagación (Tiskow, 1996).

- **Propagación:** El grado de propagación de la cadena depende de varios factores, entre ellos la concentración de oxígeno, composición de ácidos grasos, relación lípido – proteína y presencia de antioxidantes.



**Figura 11:** Etapa de propagación de la peroxidación lipídica

Los hidroperóxidos son los productos primarios de la lipoperoxidación y en condiciones fisiológicas son relativamente estables, pero su descomposición puede estar estimulada por exposición a metales de transición como sales de cobre o de hierro (Halliwell B & Gutteridge, 1989). Los grupos OOH de los hidroperóxidos (LOOH), localizados en medio de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares, llevan a una distorsión del espacio hidrofóbico y a una pérdida de la función de las membranas biológicas (Södergren, 2000).

La lipoperoxidación sigue propagándose de esta manera y llega a la fase de:

- **Término:** Cuando dos hidroperóxidos reaccionan entre sí dando un tetróxido o cuando son neutralizados por los antioxidantes. Los tetróxidos son inestables, que al romperse generan aldehídos como el Malondialdehído (MDA), que es un indicador de la lipoperoxidación (Tiskow, 1996).

#### 1.4 Métodos analíticos para el estudio del estrés oxidativo

El desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la defensa antioxidante provoca un daño orgánico que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y



bioquímicos los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular. Identificar las especies reactivas de oxígeno individuales que participan en la patogénesis de las enfermedades es extremadamente difícil debido al corto tiempo de vida media de éstas, su elevada reactividad y la carencia de una tecnología lo suficientemente sensible para detectar su presencia directamente en los sistemas biológicos. Por lo tanto, para el estudio de los daños que originan estas especies reactivas de oxígeno, se hace necesario contar con biomarcadores que permitan monitorear entre otros la toxicidad de un xenobiótico (Lam & Gray, 2003).

Un biomarcador debe reflejar modificaciones en un sistema biológico relacionado con la exposición o el efecto de un xenobiótico u otro tipo de agente o factor tóxico.

El biomarcador ideal debe tener alta especificidad para el efecto de interés; ser reflejo de un efecto temprano; su análisis debe ser fácil y de bajo costo; tener bajo nivel de interferencia con el fluido biológico de interés y correlación entre la magnitud del daño y la respuesta del biomarcador; por lo tanto éstos son considerados como señales de alerta temprana que pueden ser usados en la evaluación de riesgo ambiental de contaminación (Gastaldi et al. 2007).

#### 1.4.1 Biomarcadores de daño a lípidos

La presencia de una elevada concentración de fosfolípidos en las membranas y otros sitios donde se forman las especies reactivas de oxígeno, los hacen blancos fácilmente accesibles al ataque de éstos. En general, los ácidos grasos poliinsaturados son altamente susceptibles a la peroxidación (Halliwell B & Gutteridge, 1989).

El proceso de peroxidación transcurre en forma de reacciones en cadena. Como resultado de estas reacciones se forma una gran cantidad de productos de degradación, algunos de los cuales tienen efectos biológicos.

Según la magnitud del daño que origina el proceso de lipoperoxidación será la respuesta observada a escala celular, se puede producir la atenuación del daño oxidativo por los mecanismos antioxidantes celulares, o a niveles más elevados de peroxidación lipídica puede producirse muerte celular (Gastaldi et al. 2007).

Los grupos principales de productos derivados de los procesos de lipoperoxidación que tienen utilidad como biomarcadores son: Hidrocarburos volátiles, derivados de la oxidación del ácido araquidónico, hidroperóxidos, dienos conjugados y aldehídos.

En este último, las reacciones de propagación asociadas a peroxidación lipídica están acompañadas de la producción de numerosos compuestos carbonílicos, que se forman tras numerosas reacciones de escisión, reordenamiento y oxidación (Södergren, 2000).

El indicador de lipoperoxidación más extensamente utilizado es el malonildialdehído (MDA), especialmente la determinación practicada mediante el ensayo del ácido tiobarbitúrico (ATB), un ensayo espectrofotométrico simple, que consiste básicamente en la reacción del MDA más ATB para formar un agente cromogénico (Tiskow, 1996).

#### 1.4.2 Biomarcadores del balance redox: enzimas antioxidantes

La constante exposición de los organismos a las especies reactivas de oxígeno constituye un gran desafío para los diversos sistemas con los que cuentan las células para hacerles frente.

Entre los sistemas enzimáticos más importantes encargados de estas funciones están la superóxido dismutasa que se puede encontrar asociada a cobre, manganeso o zinc. La catalasa y la glutatión peroxidasa que se puede encontrar en tres formas fundamentales que se localizan en el núcleo, citoplasma y mitocondria (Masella et al. 2005).

En el caso de la superóxido dismutasa, el método más empleada para la determinación de su actividad es el basado en la generación del radical anión superóxido por el sistema xantina/xantina oxidasa y el empleo de indicadores como el citocromo c.

En el caso de la catalasa, la determinación su actividad se realiza midiendo la disminución de la densidad óptica a 240 nm que se produce por la acción del peróxido de hidrógeno (Mosleh et al. 2007).

Las modificaciones que tiene lugar en la actividad de estas enzimas en diferentes situaciones hace difícil y compleja la interpretación de los datos experimentales. No obstante esta desventaja y la asociada a que su determinación tiene que ser necesariamente por métodos invasivos, las modificaciones de su actividad son herramientas de gran utilidad en la investigación de especies reactivas de oxígeno.

## 2. Alternativas de monitoreo de calidad de agua

En los ecosistemas acuáticos, la contaminación por fuentes orgánicas o inorgánicas provoca una serie de modificaciones fisicoquímicas en el agua, que repercuten en la composición y distribución de las comunidades. En los organismos acuáticos los efectos del constante sometimiento a las descargas tóxicas, transcurren desde respuestas individuales ya sean fisiológicas o bioquímicas hasta respuestas poblacionales, comunitarias y ecosistémicas; y la magnitud de los cambios que se registran dependen tanto del tiempo que dure la perturbación de las condiciones iniciales, su intensidad y naturaleza (Güven et al., 1992).

Los organismos vivos son utilizados para monitorear la calidad de agua, principalmente por el bajo costo y la facilidad de implementar los estudios. Además las poblaciones de animales y plantas acumulan información que los análisis fisicoquímicos no develan.

Los bioindicadores son organismos o comunidades de organismos cuya presencia indica alguna condición medioambiental más o menos definida, y responden fisiológica o conductualmente a un amplio espectro de sustancias o concentraciones tóxicas sean estas de origen orgánico o inorgánico, natural o de influencia humana. Así por lo tanto, se considera a un indicador biológico acuático como aquel cuya presencia o abundancia señala algún proceso o estado del sistema en el cual habita (Foster, 1976).

El principal uso que se le ha dado a los indicadores biológicos ha sido la detección de sustancias contaminantes, ya sean estos metales pesados, materia orgánica, nutrientes (eutrofización), o elementos tóxicos como hidrocarburos, pesticidas, ácidos, bases y gases con miras a establecer la calidad de agua (Vásquez & Guerra, 1996).

Al seleccionar un bioindicador, estos deben:

- Ser fácilmente identificados.
- Ser fácilmente muestreados.
- Deben fácilmente acumular poluentes.
- Ser fácilmente cultivables en el laboratorio.

## 2.1 Algas como bioindicadores

Las comunidades de algas responden por lo general a los impactos antropogénicos, como exceso de sustancias tóxicas y nutrientes, convirtiéndose por ende, en buenos indicadores de cambios en la calidad del agua.

Además tienen una gran capacidad para acumular metales pesados del medio circundante (Munda & Hudnik, 1991; Güven et al., 1992; Drude de Lacerda et al., 1985; Foster, 1976).

Los atributos que catalogan a estas plantas como indicadores ecológicos son (Alvarez & Peña, 2004):

- Sus ciclos de vida cortos la hace indicadoras adecuadas para impactos a corto plazo.
- Los hábitos de fijación de la mayoría de las especies hacen que sean afectadas directamente por los cambios físicos y químicos en la columna de agua.
- Por ser productores primarios son sensibles a contaminantes que no tienen efecto sobre organismos heterotróficos
- Son fácilmente muestrables.

Algunos estudios realizados han demostrado que la concentración de metales en las algas refleja la concentración de estos en el ambiente (Vásquez & Guerra, 1996; Leonardi & Vásquez, 1999).

En su ambiente natural los organismos están normalmente sujetos a una variedad de factores productores de estrés, por ello son necesarias algunas medidas para ayudar a identificar y a separar los efectos introducidos por la acción antropogénica (como la contaminación) de otros efectos causados por los factores naturales (como la disponibilidad de alimento). De este modo, midiendo algunas respuestas fisiológicas a diferentes niveles de organización biológica, sensibilidad y especificidad a los factores, se pueden establecer aquellas causas de estrés que son o no producto de la contaminación (Hagerhall, 1973).

Las algas, a pesar de presentar ventajas comparativas como indicadores naturales, han sido escasamente utilizadas como indicadores de contaminación.

El grupo de las algas pardas no presenta mecanismos reguladores en la concentración de metales, lo cual las hace aptas para ser utilizadas como biosensores de metales pesados (Bryan, 1969; Fuge & Janes, 1974; Leonardi & Vásquez, 1999; Alvarez & Peña, 2004).

La tendencia general en el análisis de los efectos de los relaves de la minería en las comunidades marinas litorales del norte de Chile, se refiere casi en su totalidad a la evaluación cuantitativa de metales pesados en invertebrados (Hernández & Landaeta 1998), vertebrados (Boré et al. 1989), algas (Leonardi & Vásquez, 1995), agua de mar (Ahumada et al. 1989) y sedimentos (Salamanca & Caamaño, 1994).

Sin embargo, a pesar del impacto que los desechos de la minería han generado en las comunidades litorales, existe escasa información relacionada con el efecto de estas perturbaciones sobre la estructura y la organización de las comunidades intermareales, y más aún, sobre las comunidades submareales someras aledañas.

La taxa de algas marinas bentónicas representadas mayoritariamente en Chile son las Rhodophyceae o algas rojas, las Chlorophyceae o algas verdes y las Phaeophyceae o algas pardas.

La costa de Chile continental incluida en la región del pacífico temperado de sudamérica, más los territorios insulares y el territorio antártico, comprende una extensión costera de aproximadamente 9000 kilómetros, donde crece y se desarrolla una abundante y variada flora marina.

Dentro de las especies que se encuentran en el norte de nuestro país están, *Chondrus carnaliculatus*, *Colpomenia sinuosa*, *Enteromorpha sp.*, *Lessonia nigrescens*, *Porphyra columbina*, *Ulva sp.*, *Scytociphon lomentaria*, *Gelidium sp.* (Vasquez & Guerra, 1996)

### 3. Actividad minera en Chile

La minería en Chile es una actividad de montaña que tiene una influencia enorme en el desarrollo económico nacional. Los productos mineros representan más del 70% del valor de todas las exportaciones efectuadas por el país (Centro de estudios del cobre y la minería Gana, J, 1988), pero el mineral que sin duda juega un papel fundamental en este tema es el cobre. Los principales yacimientos cupríferos se encuentran en la Cordillera de

los Andes (Chuchicamata, El Salvador, Río Blanco, Disputadas de las Condes, El Teniente). Yacimientos menores se encuentran en la localidad de La Cordillera de la Costa (Mantos Blancos) (Camus, 1980).

Desde 1990 Chile ha triplicado su producción de cobre, llegando a aproximadamente 4,6 millones de toneladas métricas (TM) anuales. Esto ha significado que en estos últimos 12 años Chile aumente desde aproximadamente un 16% de su participación en la producción mundial de cobre a un 30% el año 2002 (Fuente: Ministerio de minería).

El hierro en orden de importancia es el segundo producto de la minería nacional. Los yacimientos se encuentran en la montaña media del norte chico a poca distancia de la costa.

Entre los productos no metálicos se puede mencionar al salitre, más por su significación pesada que por su importancia presente. El nitrato se encuentra sólo en la región del desierto en una faja que se extiende entre Pisagua y Chañaral. En la actualidad el salitre ha perdido mercado por la competencia de los nitratos sintéticos (Fuente: Ministerio de minería).

### 3.1 Historia de la minería del cobre en Chile

Como se sabe la industria minera en Chile ha sido muy importante en la historia económica, social y política de nuestro país y lo sigue siendo en la actualidad. En el ámbito de la economía mundial, el cobre chileno ha sido particularmente relevante en el mercado mundial y en la industria mundial del cobre.

En la segunda mitad del siglo XIX el cobre era ya uno de los principales productos chilenos de exportación (Fuente: Ministerio de minería). El verdadero boom de la industria cuprera estuvo determinado por un brusco aumento de la demanda mundial, debido a la aparición de la industria eléctrica, la expansión del sector de la construcción y una importante innovación tecnológica en Estados Unidos, que hizo rentable la explotación en gran escala de minerales con bajo contenido de cobre (1%-2%). En este contexto, para 1904 se iniciaron las faenas en El Teniente y para 1911 en Chuquicamata las cuales llegaron a producir en 1924 185 mil TM y representar, por sí solas, el 80% de la producción chilena. Había nacido un nuevo actor que se relacionará

sustantivamente con la historia económica y política del país del siglo XX: la Gran Minería del Cobre (Meller, 2003).

Otro fenómeno que marca la discusión de esos años y que adquiere un carácter fundamental al inicio del siglo XXI dice relación con los efectos que un ambiente de inestabilidad puede crear sobre una industria como la minería. En este sentido, pese a que las tasas de retorno de las multinacionales del cobre fueron de por lo menos 19% al año en Chile (en otras regiones obtenían menos de 10%), la participación chilena en la producción mundial de cobre declinó desde el 21% (1945-49) al 15% (1950-59) y 14% (1960-70) (Fuente: Ministerio de minería).

#### 4. Contaminación en las costas de Chile

A lo largo de la historia, las actividades antropogénicas han generado una gran variedad de contaminantes, los cuales han ocasionado el deterioro de los distintos compartimentos ambientales, incluyendo el agua, el aire, el suelo y el sedimento, así como de la biota asociada y por ende de los ecosistemas.

Según la definición dada por el Grupo de Expertos sobre los Aspectos Científicos de la Protección del Medio Marino (GESAMP), y adoptada por la comunidad internacional en la convección de las naciones unidas sobre el derecho del mar (art. 1.4) por *“contaminación del medio marino se entiende la introducción por el hombre directa o indirectamente, de sustancia o de energía en el medio marino incluido los estuarios, que produzca o pueda producir efectos nocivos tales como daños a los recursos vivos y a la vida marina, peligros para la salud humana, obstaculización de las actividades marítimas, incluidas la pesca y otros usos legítimos del mar, deterioro de la calidad del agua del mar para su utilización y menoscabo de los lugares de esparcimiento.”* (Naciones unidas, 1984).

Los efectos de éstos dependen de la concentración en la que se encuentren las sustancias, de su persistencia y de su biodisponibilidad, pudiendo ocasionar desde efectos no letales, como el desplazamiento temporal de algunas especies, hasta la muerte de poblaciones enteras.

Los océanos eran considerados grandes reservas de vida y se suponía que poseían una gran capacidad para asimilar todo tipo de desechos.

En Chile, cada cierto tiempo se hace evidente la desprotección de nuestras aguas ante los intereses económicos. La muerte de aves o peces causadas por un derrame de petróleo o las consecuencias de la poca sustentabilidad ambiental de una planta de celulosa o minera hacen patente el poco interés que existe por proteger un recurso que no debiera ser visto, tal como hasta ahora, como un lugar barato para tirar la basura.

Una de las actividades productivas de mayor repercusión en las comunidades biológicas terrestres y marinas ha sido la actividad minera, generando perturbaciones significativas y emblemáticas, principalmente en el norte del país. Entre Tocopilla y Coquimbo, se concentra la mayor actividad minera relacionada con la elaboración, tratamiento, transformación y embarque del producto de la actividad industrial minera.

Entre la Primera y la Cuarta Región, existen extraordinarios yacimientos que concentran más del 25% de las reservas mundiales de cobre, el 40% de las reservas mundiales de molibdeno y el 30 % de las reservas mundiales de litio. Además, en esta zona se encuentran importantes yacimientos de oro, hierro, plata, manganeso, cobalto, mercurio, plomo y zinc. (Corvalán 1985).

La extracción de estos recursos no-renovables produce severas modificaciones en los ecosistemas terrestres y marinos por la remoción de materiales, el uso de aguas superficiales y subterráneas, la ocupación de terrenos y la descarga de residuos sólidos líquidos. Cuando estos últimos no son depositados en tranques, se vierten directamente a cursos de aguas o al mar, produciendo perturbaciones catastróficas en la biota marina (Boré 1992).

En la costa norte de Chile los valores de cobre, níquel, arsénico, plata en el agua de mar y organismos marinos son inusualmente altos, en comparación con otros lugares del mundo y comparativamente mayores que en el resto del país (Vásquez & Guerra 1996)



**Cuadro 2:** Contaminantes, procesos y fuentes que afectan la calidad del agua

<b>Contaminantes y proceso</b>	<b>Descripción</b>	<b>Fuentes</b>
Contaminantes orgánicos	Se descomponen en el agua y disminuyen el oxígeno disuelto, induciendo la eutrofización.	Fuentes industriales, domésticas, asentamientos humanos.
Metales pesados	Se originan principalmente alrededor de centros industriales y mineros. También pueden provenir de actividades militares o a través de lixiviados.	Fuentes industriales, mineras, asentamientos Humanos, actividades militares.
Compuestos tóxicos orgánicos	Químicos industriales, dioxinas, plásticos, pesticidas agrícolas, hidrocarburos de petróleo, hidrocarburos poli cíclicos generados de la combustión del petróleo.	Fuentes industriales, asentamientos humanos, escorrentía agrícola

<p>Químicos traza y compuestos farmacéuticos</p>	<p>Desechos hospitalarios, son sustancias peligrosas no removidos necesariamente por los tratamientos convencionales y han sido reconocidos con disruptores endocrinos y carcinogénicos.</p>	<p>Industria química y farmacia.</p>
<p>Nutrientes</p>	<p>Incluyen principalmente fosfatos y nitratos, su incremento en el agua induce a una eutrofización. Se originan de desechos humanos y animales, detergentes y escorrentía de fertilizantes agrícolas.</p>	<p>Fuentes domésticas, industriales, escorrentía agrícola</p>

Fuente: Kraemer, Choudhury y Kampa (2001)

#### 4.1 Descarga de contaminantes a las cuencas hidrográficas vinculadas con áreas costeras.

No existen actualmente estimativos, ni catastros regionales consolidados que informen sobre las descargas de contaminantes a los cuerpos de agua que drenan al mar, pero se conoce que la principal fuente de contaminación corresponde a las descargas municipales que ingresan al mar a través de los ríos. Contribuyen con esta fuente los drenajes pluviales, que son transportados por los sistemas de alcantarillado en conjunto con las aguas servidas domésticas e industriales.

En el cuadro 3 se observa una comparación en la contaminación con descargas municipales a cuencas hidrográficas vinculadas con las áreas costeras en América Latina.

**Cuadro 3:** Contaminación con descargas municipales a cuencas hidrográficas vinculadas con las áreas costeras en América Latina.

País	Vertimientos municipales a cuencas fluviales
Chile	<p>En Chile, el 82% del total de las aguas residuales municipales generadas llegan al mar a través de veintisiete cuencas hidrográficas, en las que los ríos Elqui, Aconcagua, Maipo, Mapocho, Rapel, Bío-bío y Valdivia tienen un lugar destacado. En especial son afectadas áreas costeras de Valparaíso (esteros Marga-Marga y Reñaca) y Concepción (Talcahuano, San Vicente). En la desembocadura del río Aconcagua, se captan desechos domésticos e industriales de sectores de Quintero y Concón. El río Elqui recibe desechos domésticos de Coquimbo. Los ríos Calle Calle y Valdivia captan desechos de la ciudad de Valdivia.</p>
Perú	<p>Se reportan cerca de 52 cuencas hidrográficas comprometidas con la contaminación debido a desechos municipales y otros contaminantes industriales en las áreas costeras. Se resalta la contaminación del río Rimac. Los ríos Tumbes, Lacramarca, Pisco, Moche y Tambo captan desechos domésticos, industriales. Los ríos Ilo, Locumba y Sama, captan desechos domésticos, mineros y agrícolas, todos ellos afectan sectores de la costa y bahías como Bahía Ferrol y Chimbote, Bahía de Paracas y Pisco y bahía de Ilo.</p>

Brasil	La cuenca del Paraíba do Sul, recibe las descargas de contaminantes provenientes de 158 ciudades y 38 pueblos del Estado de Río de Janeiro y de 35 ciudades y pueblos del Estado de São Paulo. En este país, los ríos de Porto Alegre, reciben efluentes industriales y municipales que son trasladados a los sistemas estuarinos, los que muestran un enriquecimiento de nutrientes y que han determinado la ocurrencia de mareas rojas en Lago dos Patos, así como en varios sitios de la costa de Río Grande do Sul.
Ecuador	El río Guayas (Daule-Babahoyo), constituye la principal fuente de introducción de contaminantes en el Golfo de Guayaquil, introduce una cantidad equivalente al 75% de todas las descargas domésticas e industriales que se realizan en el litoral. Igualmente el río Teatone recibe cerca de 3 millones m <sup>3</sup> /año de efluentes de la actividad petroquímica, ubicada cerca de la ciudad de Esmeraldas, también el río Esmeraldas, capta desechos domésticos e industriales y del cultivo del camarón.
Colombia	Las fuentes municipales descargan 4.5 millones de m <sup>3</sup> /día de aguas residuales, de las cuales el 90% corresponde a fuentes municipales y un 10% a industriales, además se descargan 142 000 m <sup>3</sup> /día de desechos sin carne, 102 600 m <sup>3</sup> /día de minerales, 76 000 m <sup>3</sup> /día de desechos de la fabricación del vidrio, 60 000 m <sup>3</sup> /día de derivados de la fabricación de cerveza, 59.640 m <sup>3</sup> /día de desechos de la industria del papel. La principal cuenca contaminada corresponde al Cauca- Magdalena que cubre aproximadamente el 22% del territorio del país y recibe aproximadamente el 60% del total de la contaminación de las aguas superficiales del país. Introduce al Caribe una carga contaminante estimada en 2.8 x 10 <sup>5</sup> t/año de DBO (DISSOLVED BIOLOGICAL OXIGEN) y de 1.3 x 10 <sup>5</sup> t/año de nitrógeno.

**Fuente:** La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar. División de recursos naturales e infraestructura

## 4.2 Metales pesados liberados al ambiente producto de actividad minera

Los metales son componentes naturales del agua de mar y muchos de ellos como el cobre, hierro, manganeso, níquel, selenio, vanadio y zinc participan en procesos esenciales de los organismos marinos. Son requeridos como micronutrientes en muchas enzimas y en sistemas de transporte de electrones en sistemas vivientes (Coale 1991).

Los organismos han desarrollado mecanismos evolutivos para la captación, transporte, utilización y tolerancia de estos iones metálicos. Una vez que la capacidad de asimilación es excedida, ya sea por un exceso del ión o por presencia inusual de altos niveles de metales no esenciales como plata, cadmio, mercurio y plomo, pueden ocurrir numerosos y nocivos efectos en los organismos expuestos.

La mayoría de los metales anteriormente mencionados son componentes frecuentes de los desechos mineros en el norte de Chile. Recientemente, 17 elementos químicos derivados de los procesos de reducción de cobre y hierro han sido reportados en catorce especies de macroalgas en el norte de Chile (Vásquez & Guerra 1996).

## 4.3 Otros contaminantes

Los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs), conocidos internacionalmente por sus siglas en inglés, POPs (Persistent Organic Pollutants) son sustancias químicas muy tóxicas, y duraderas, y presentan un grave peligro para el medio ambiente y la salud humana (Janiot *et al*, 2001). Hacen parte de los contaminantes orgánicos persistentes, los pesticidas, insecticidas organoclorados, herbicidas, bifenilos policlorados PCB, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), entre otros (Herkovits, 2000).

Según el marco normativo del medio ambiente acuático de la dirección de territorio marítimo (DIRECTEMAR), la emisión de diversos de estos contaminantes está permitida en nuestro país. En Chile se han realizado una serie de trabajos que han demostrado la presencia de estos compuestos orgánicos persistentes en aguas costeras y sedimentos (Montory, 2008; Barral, 2001).

Estos compuestos, son altamente tóxicos para el medio ambiente, ya que son bioacumulativos y de esta forma pueden pasar de organismos tróficos inferiores a superiores y pueden además desplazarse a largas distancia a través del aire y el agua

(Orta, 2002). Dentro de los efectos tóxicos que pueden generar se encuentra la generación de especies reactivas de oxígeno o inducción enzimática (Domenech, 2004). La producción de radicales libres de oxígeno se genera durante el metabolismo de muchos solventes como haluros de alquilo, lo cual resulta en peroxidación de lípidos (Domenech, 2004).

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La contaminación de los ecosistemas acuáticos costeros por metales traza, ha conducido a un aumento del interés en determinar los efectos que éstos tienen sobre los organismos que viven en estos ambientes.

En Chile, se ha evidenciado que los principales metales pesados son el Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Cromo (Cr), Plomo (Pb) y Mercurio (Mg). La escasa información que existe sobre la concentración de estos metales, da cuenta que existen localidades de sectores costeros que tienen concentraciones excesivamente altas. (Buschmann & Fortt, 2005).

La contaminación nacional por fuentes terrestres se caracteriza por presentar un número importante de empresas cuyos efluentes descargan en el mar, generando una realidad nacional en la cual nuestro litoral no se encuentra libre de contaminación (Castilla & Nealler, 1978; Kraemer, Choudhury y Kampa, 2001; Torres & Caille, 2009).

Entre los efectos que puede provocar la exposición de organismos acuáticos y terrestres a metales, está el estrés oxidativo, aunque existen igualmente otras sustancias químicas que inducen este desbalance oxidativo, tales como hidrocarburos totales, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos entre otros. Frente a ello, los organismos han desarrollado mecanismos antioxidantes como protección.

En la actualidad existe un creciente interés en utilizar biomarcadores de estrés oxidativo como herramientas de alerta temprana de potenciales efectos tóxicos. La actividad minera en sectores costeros contribuye a incrementar las concentraciones de metales en el agua, las cuales, al estar biodisponibles, podrían ser potencialmente tóxicas. Entre los organismos que pueden ser afectados por estos metales, están las algas, las cuales al ser productores primarios tienen un rol fundamental en los ecosistemas acuáticos ya que cualquier efecto sobre ellas afectará los niveles tróficos superiores. En la actualidad se desconoce el efecto tóxico que pueden tener estos metales traza en los productores primarios en las zonas de la tercera, cuarta y quinta región mencionadas anteriormente.

# III. OBJETIVOS E HIPOTESIS

## 5. Objetivo General

- Evaluar parámetros de estrés oxidativo en las macroalgas *Scytosiphon lomentaria* y *Ulva rígida* presentes en zonas de aguas costeras cercanas a centros de actividad minera.

### 5.1. Objetivos Específicos

- Determinar actividad de la catalasa en las especies *S. lomentaria* y *U. rígida*.
- Determinar el daño de lípidos en las especies *S. lomentaria* y *U. rígida*.
- Determinar la concentración de metales en las aguas de las distintas zonas seleccionadas para el estudio.
- Comparar la actividad antioxidante y daño oxidativo entre los sectores estudiados en ambas especies.
- Correlacionar la respuesta de ambos organismos con las concentraciones de metales en aguas de las zonas estudiadas

## 6. Hipótesis

La actividad antioxidante y el daño oxidativo en la especie *S. lomentaria* y *U. rígida* es mayor en las zonas que presentan actividad minera comparado con las zonas sin esta actividad.



# IV. MATERIALES Y MÉTODOS

## 7. Áreas de muestreo

Se tomaron muestras en localidades cercanas a actividad minera del cobre; y en zonas sin influencia de esta actividad en la tercera, cuarta y quinta región.

Como se observa en la figura 11, las zonas de muestreo con actividad minera en la tercera región serán Chañaral, Palito, Caldera y Huasco

La zona de muestreo en la cuarta región (figura 12), utilizada como zona no impactada fue Punta de choros.

En la quinta región (figura 13) las zonas de muestreo con actividad minera fueron Quintero y Ventana; y las utilizadas sin esta actividad fueron Quintay y Montemar.

### 7.1 Contaminación en la tercera región

En la región de Atacama se concentra la mayor parte de las actividades mineras del país, siendo este sector uno de los principales factores de deterioro ambiental en la región. Es la principal causante de la contaminación del mar, de los ríos y del agua potable; contaminación del aire (por polvillo de minerales en suspensión), y contaminación de los suelos (Vásquez et al, 1999).

Localidades como la bahía de Chañaral (26° 21' Latitud sur, 70° 42' Longitud oeste) en la tercera región, tienen un grave e irreversible daño ambiental que se inició cuando se colmataron los tranques de relaves de la mina Potrerillos, y la empresa norteamericana Andes Cooper Mining Company procedió a vaciar estos tóxicos al mar a través del río Salado. La descarga de contaminantes continuó con la explotación de la mina El Salvador

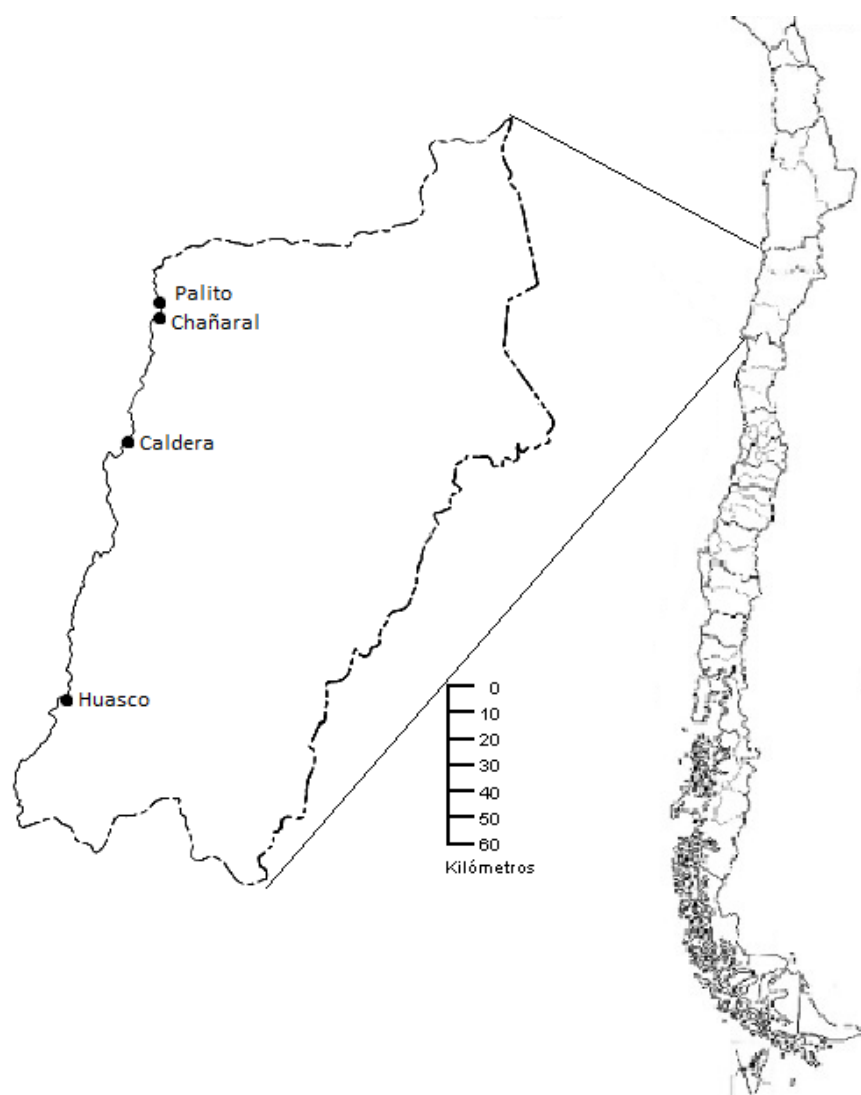
(26° 15´ Latitud sur, 69° 34´ Longitud oeste), por la misma empresa a partir de 1959 y se perpetuó bajo la administración de Corporación del cobre (CODELCO). A pesar de que se obligó a construir un tranque de relave, nada se realizó para reparar los daños causados (Castilla, 1983).

En estudios realizados por Castilla & Nealler revelaron que ya en el año 1978 las millones de toneladas descargadas en la bahía de Chañaral han causado severos efectos en los ecosistemas marinos. El impacto de la contaminación producida por sedimentos sólidos y acción química, han alterado sustancialmente el ecosistema litoral. En esta época (Febrero 1975) ya habían reportado una masiva mortalidad de peces y moluscos y un año más tarde fue detectada una masiva mortalidad de organismos en el área intermareal y submareal.

Además un análisis en sedimentos de la bahía de Chañaral, demostraron la presencia de Molibdeno y Calcopirita, lo que confirma que los sedimentos de esta playa están fuertemente relacionados con relaves de cobre (Castilla, 1983).

Palito (26° 15´ Latitud sur, 70° 39´ Longitud oeste) también en la tercera región, sufre los efectos de la dura herencia que deja ser una zona hija de la actividad minera. En este sector a partir del 1975 comenzó la disposición de relaves provenientes de la mina El Salvador, también contaminación por material particulado; por emisiones de plantas lixivadoras; por emisiones gaseosas de las plantas de tratamiento, y últimamente por contaminación de la planta de aguas servidas de la ciudad.

Los análisis de la concentración de metales pesados, y particularmente cobre, dan cuenta de que Palito es un sitio afectado por contaminantes derivados de la minería del cobre con niveles que superan hasta 3 mil veces las concentraciones de este metal en agua de mar (Vásquez et al, 1999).



**Figura 12:** Zonas de muestro en la tercera región



**Figura 13:** Zonas de muestreo en la tercera región. A) Caleta Palito; B) Chañaral; C) Caldera; D) Huasco



**Figura 14:** Zona de muestreo en la cuarta región

## 7.2 Contaminación por descarga de efluentes industriales y portuarias en la Quinta región

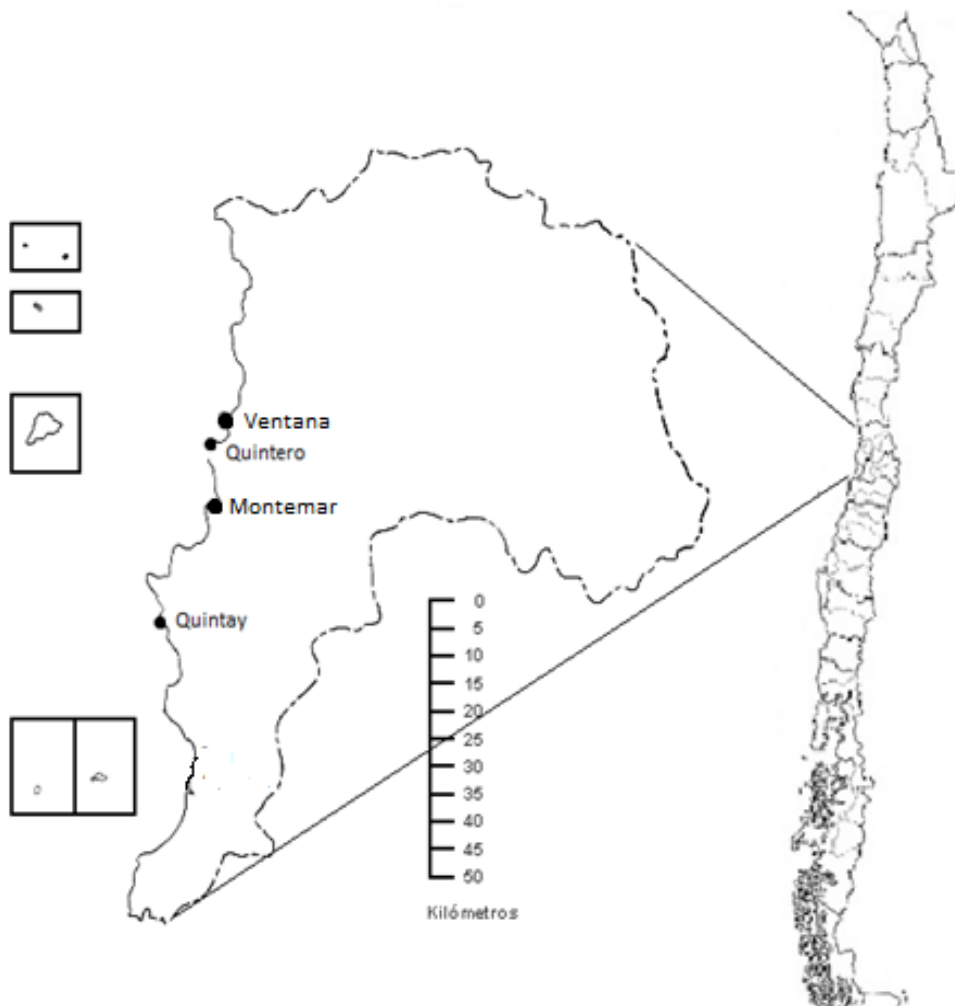
La zona costera de la Región de Valparaíso, se caracteriza por el desarrollo de actividades portuarias y descarga de efluentes industriales, las que aportan metales traza que alteran las características naturales de las aguas de las zonas de intermareal.

La central termoeléctrica de Ventanas (32°47'16" latitud Sur y 71°29'10" longitud oeste) cuenta con dos unidades generadoras de energía a carbón. Es una fuente emisora importante en cantidad y calidad de contaminantes a gran escala. Los principales contaminantes emitidos en el proceso de combustión de esta termoeléctrica corresponden a material particulado, dióxido de nitrógeno, dióxido de azufre, dióxido de carbono, y metales pesados como el mercurio.

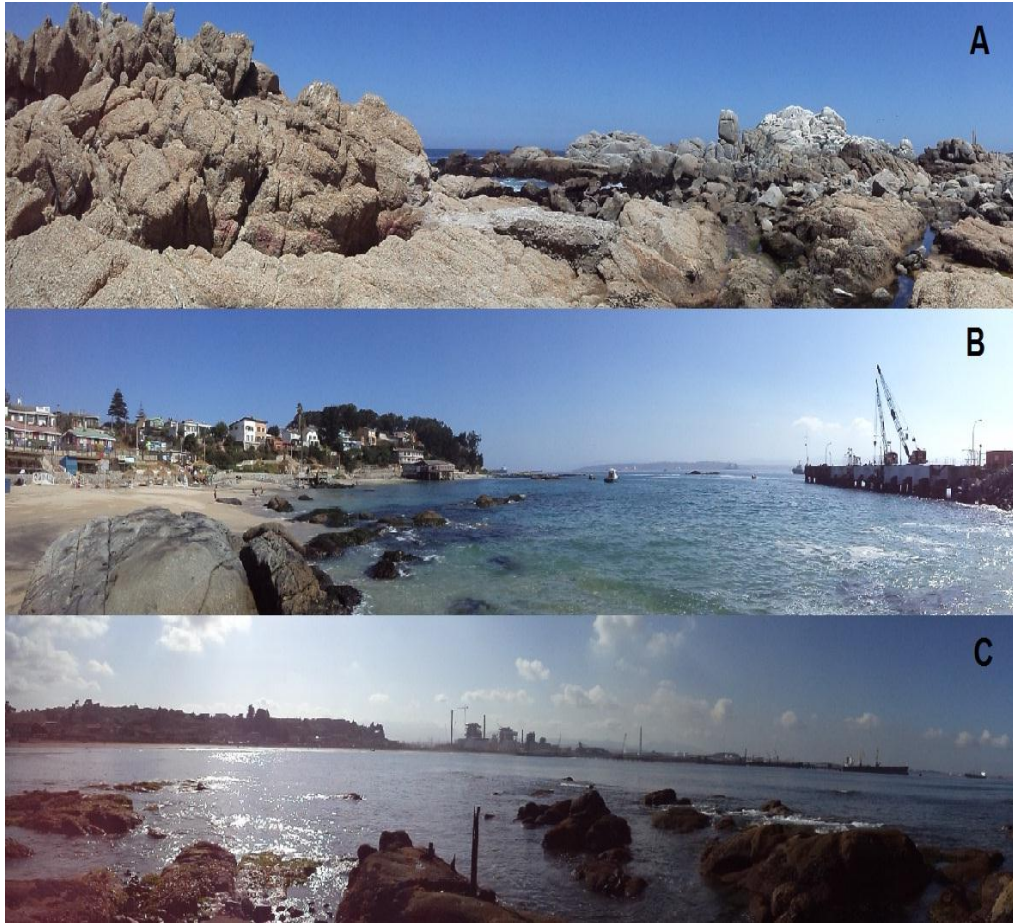
CODELCO división ventana, es una fundición y refinería de cobre que produce cátodos de cobre, lingotes de oro y granalla de plata. Por esto mismo tiene emisión de cobre, ácido sulfúrico y SO<sub>2</sub> al ambiente.

La bahía de quintero se ve afectada por la contaminación causada principalmente por termoeléctrica, planta de fundición de cobre y actividades portuarias.

Esto provocó un deterioro de los ecosistemas naturales provocando cambio comunitario a especies oportunistas, propio de contaminación orgánica y microbiológica.



**Figura 15:** Zonas de muestreo en la quinta región



**Figura 16:** Zonas de muestreo en la cuarta región. A) Montemar; B) Quintero; C) Ventana



## 8. Especies estudiadas

El estudio se realizó en las macroalgas *S. lomentaria* y *U. rígida*, obtenidas del intermareal en las zonas nombradas anteriormente.

### 8.1. *Scytosiphon lomentaria*

Se encuentra dentro de la categoría de Alga parda de sección hueca con forma de tubos irregulares



**Figura 17:** *Scytosiphon lomentaria*

Es una planta cilíndrica, hueca o algo aplanada. Usualmente constricta a intervalos, de hasta 40 centímetros de largo y 1 cm de diámetro, de color pardo claro a mediano. Los talos erectos surgen, en general, en mechones desde una base común. Las células interiores del talo son alargadas y la corteza muestra células progresivamente más pequeñas hacia la superficie (Etcheverry, 1986).

Los gametangios pluriloculares están ubicados en áreas extensas del talo erecto. Los esporangios uniloculares se encuentran en estados costrosos semejantes a Ralfsia. Habitan en rocas, piedras, conchas o epifita, en el intermareal y sublitoral (Alveal, 1970).

La elección de esta especie se realizó, ya que, algas pertenecientes al género *Scytosiphon* (Phaeophyceae) incluyen especies distribuidas en las regiones costeras frías y templadas en todo el mundo. Además de su presencia estacional en la zona intermareal rocosa media inferior a lo largo de las costas chilenas (Hoffman & Santelices, 1997), monopolizando las áreas contaminadas por cobre (Camus et al., 2005; Contreras et al., 2005). La tolerancia al cobre fue demostrada experimentalmente en *Scytosiphon lomentaria* y *Scytosiphon gracilis* expuestas a exceso de cobre en laboratorio y se observó que se activan enzimas antioxidantes tales como la catalasa, glutatión peroxidasa y peroxidasa ascorbato (Contreras et al., 2005, 2007).

## 8.2. *Ulva rígida*

Se encuentra dentro de la categoría de Alga verde foliácea.



**Figura 18:** *Ulva rígida*

Dentro de su descripción se encuentra que posee talo verde laminar, foliáceo, lobulado, formado por 2 capas células y fijado al sustrato por rizoides que crecen como expansiones de las células basales del talo. Puede llegar a medir 15 centímetros o más de longitud, estrechado basalmente y puede presentar unas costillas más oscuras debido al agrupamiento de rizoides. En el margen de la lámina aparecen proyecciones microscópicas a modo de dientes. Su color es verde oscuro. Para una correcta determinación es necesaria su observación al microscopio; en este se puede observar como sus células se disponen de forma irregular, todas con 2 pirenoides generalmente, y que las células más superiores que emiten rizoides son más grandes que las que no las emiten (Etcheverry, 1960).

Su hábitat es rocas, piedras construcciones portuarias, en otras algas o sobre conchas de moluscos. Su distribución es en la mayoría de los mares (Etcheverry, 1986).

Se seleccionó esta especie, debido a que, algas pertenecientes al género *Ulva* incluyen especies distribuidas en las regiones costeras frías y templadas en todo el mundo. A su vez, presencia estacional en la zona intermareal a lo largo de las costas de nuestro país (Hoffman & Santelices, 1997). Además, la tolerancia al cobre de esta especie fue estudiada por González *et al.* 2010, el cual demostró que con concentraciones de cobre hasta 50  $\mu\text{M}$  *Ulva compressa* sobrevivió después de 7 días de exposición y su normalidad de crecimiento fue demostrada por crecimiento de algas en agua de mar control por 7 días adicionales.

## 9. Diseño experimental.

Fueron recolectadas desde la zona intermareal tanto en las localidades control como en las localidades afectadas por descargas mineras del cobre, 6 frondas de distintos discos de adhesión. Las frondas de cada localidad fueron transportadas hasta el laboratorio. Una vez en el laboratorio las frondas fueron lavadas con agua de mar filtrada, para eliminar cualquier tipo de basura y epifitos presentes en las frondas. De esta forma las algas estuvieron en condiciones para efectuar la preparación de la muestra.

## 9.1. Preparación de la muestra

Se extrajo un corte *in toto* de 1 g de la zona media de cada fronda (6 algas de cada sitio). Luego las algas fueron congeladas en nitrógeno líquido por 5 minutos y posteriormente molidas en un mortero agregando 9 ml de buffer fosfato salino (PBS, pH 7).

Las muestras homogenizadas con PBS, pH 7 se agregaron a tubos cónicos y se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos. Del centrifugado, el sobrenadante fue destinado para la determinación de la actividad enzimática de la catalasa, mientras que para la determinación de lipoperoxidación se utilizó directamente la muestra sin centrifugar.

## 9.2. Determinación de la actividad de catalasa

La actividad de la enzima catalasa fue determinada de acuerdo a Aebi, H. (Catalase *in vitro*. *Methods Enzimol* 105: 121-126, 1984). Este método se basa en la determinación de la cinética de degradación del peróxido de hidrógeno, la cual fue seguida espectrofotométricamente por lecturas de absorbancia a 240 nm.

Para esto se preparó un buffer PBS catalasa pH 7 y una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3 M.

Posteriormente se mezcló en una celda de cuarzo de 3 ml, 2.7 ml de PBS catalasa pH 7, 100 µl de la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 M y 200 µl de muestra.

Los valores de catalasa se informaron como unidades de enzima/mg de proteínas totales. Para la determinación de la concentración de proteínas totales, la metodología usada fue la descrita por Lowry et al. (1951), un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas.

### 9.3. Determinación de peroxidación lipídica (TBARS)

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico provienen de la peroxidación lipídica. El ensayo consiste en primero mezclar 2 ml de la muestra (sin centrifugar) con 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 30% y centrifugarlo a 3000 rpm por 15 minutos. Posteriormente se hacen reaccionar 1.5 ml del sobrenadante obtenido con 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.67% y se calentara a baño maría hirviendo por 20 minutos. Transcurrido el tiempo, se mantuvieron en hielo, dando origen a un compuesto que absorbe a 540 nm.

### 10. Determinación de la concentración de metales

Se realizó mediante medición directa por Espectroscopia de Emisión atómica con plasma acoplado Inductivamente ICP-AES

### 11. Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Estadística 7. La interpretación de los resultados de los parámetros biológicos obtenidos de los diferentes sitios, se realizó mediante el análisis de varianza (ANOVA). Como el ANOVA detectó diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó el análisis de comparaciones múltiples denominada de turkey a 5% de significancia, pero solo se tomó en cuenta los resultados del grupo control con los sitios restantes

# V. RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se observa el resultado del análisis de metales a las aguas obtenidas en las distintas zonas de muestreo en el norte del país. Los resultados están expresados como el promedio y el intervalo de confianza es la desviación estándar (n=2). La unidad es  $\mu\text{g/L}$  (ppb).

En el caso del cadmio y el cromo, los valores son relativamente similares a excepción de Caldera que presenta la concentración más alta de estos dos metales. El cobre se encuentra en altas concentraciones en Caleta palito y Chañaral que son zonas fuertemente impactadas por la minería, comparadas con zonas como Caldera, Huasco y Punta de choro donde su concentración está bajo el límite de detección. Los valores de hierro y manganeso son relativamente similares, siendo Caleta palito y Chañaral los valores más altos para cada metal respectivamente. Finalmente, las concentraciones de zinc y arsénico no presentan grandes diferencias entre los distintos sitios de muestreo.

**Tabla 1:** Resultado del análisis de metales en agua. < LD = menor al límite de detección.

SITIO DE MUESTREO	Al ( $\mu\text{g/L}$ )	Cd ( $\mu\text{g/L}$ )	Cr ( $\mu\text{g/L}$ )	Cu ( $\mu\text{g/L}$ )
Caleta Palito	< LD	$0,20 \pm 0,05$	$0,5 \pm 0,1$	$16,6 \pm 0,4$
Chañaral	< LD	$0,27 \pm 0,06$	$0,6 \pm 0,2$	$12,54 \pm 0,04$
Caldera	< LD	$0,70 \pm 0,05$	$1,1 \pm 0,4$	< LD
Huasco	< LD	$0,2 \pm 0,05$	$0,38 \pm 0,06$	< LD
Punta Choro	< LD	$0,2 \pm 0,05$	$0,3 \pm 0,1$	< LD

SITIO DE MUESTREO	Fe ( $\mu\text{g/L}$ )	Mn ( $\mu\text{g/L}$ )	Pb ( $\mu\text{g/L}$ )	Zn ( $\mu\text{g/L}$ )	As ( $\mu\text{g/L}$ )
Caleta Palito	$9,0 \pm 0,6$	$0,88 \pm 0,05$	< LD	$5,5 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,1$
Chañaral	$4,1 \pm 0,2$	$1,13 \pm 0,01$	< LD	$6,9 \pm 0,2$	$1,52 \pm 0,07$
Caldera	$7 \pm 2$	$0,76 \pm 0,09$	< LD	$6,4 \pm 0,2$	$1,40 \pm 0,06$
Huasco	$5,8 \pm 0,4$	$0,77 \pm 0,02$	< LD	$6,6 \pm 0,3$	$1,47 \pm 0,01$
Punta Choro	$4,1 \pm 0,7$	$0,55 \pm 0,01$	< LD	$5,6 \pm 0,4$	$1,45 \pm 0,01$

Debido a que los metales se generan de forma natural tienen un rango normal de concentraciones que encontramos en sedimentos, suelos, agua y organismos vivos, y es por esto que sólo tendremos un caso de polución cuando sus concentraciones sobrepasen estos rangos naturales. En consecuencia, la presencia de metales pesados no es evidencia de polución, ya que ésta dependerá tanto de las concentraciones de los metales como de las características ambientales del lugar (Levinton, 2001).

En Chile se han dictado una serie de normas de calidad y de emisión, sin embargo, en cuanto a aguas no existen normas de calidad primaria que resguardan la salud de las personas. Norma de calidad primaria, hace referencia a los valores de las concentraciones y períodos, máximos o mínimos permisibles de elementos, compuestos, sustancias, derivados químicos o biológicos, energías, radiaciones, vibraciones, ruidos o combinación de ellos, cuya presencia o carencia en el ambiente pueda constituir un riesgo para la vida o la salud de la población.

El rango de la concentración normal de cobre en el agua de mar es entre 0.002 y 0.6 µg/L (Leonardi & Vasquez, 1999). Estos valores se han incrementado considerablemente en las zonas de Caleta palito y Chañaral, zonas afectadas por la minería de este metal (Tabla 1)

El contenido de cadmio del agua de mar oscila entre 0,05 y 0,2 µg/L (Chuecas, 1989). Este valor es normal en la mayoría de las zonas estudiadas a excepción de Caldera, donde se sobrepasa considerablemente (Tabla 1).

En la tabla 2 y 3, se observan las correlaciones de la respuesta a actividad de la enzima catalasa y peroxidación lipídica de ambos organismos con las concentraciones de metales en aguas de las zonas estudiadas (\* Regresión significativa  $p < 0,05$ ). No se realizó la correlación con cobre, ya que solo existieron 2 localidades donde se encontró este metal, en las otras estuvo bajo el límite de detección.

En el caso de la especie *S. lomentaria*, en la actividad de la catalasa ningún metal presenta una correlación significativa y en la prueba de TBARS el cromo es el metal que se correlaciona significativamente.

Para *U. rígida*, el cadmio y cromo son los metales que tiene una significativa correlación con la actividad de la enzima catalasa y con la peroxidación lipídica obtenida por el ensayo TBARS.

**Tabla 2:** Correlación de la respuesta a actividad de la enzima catalasa (a) y peroxidación lipídica (b) de *S. lomentaria* con las concentraciones de metales.

a)

<i>Scytosiphon lomentaria</i> Catalasa			
Metales	r	r <sup>2</sup>	Ecuación
Cd	0,56	0,32	y = 817,01x + 0,0456
Cr	0,70	0,50	y = 2306,9x + 0,0258
Fe	0,71	0,51	y = 31466x + 0,1445
Mn	0,58	0,33	y = 3456,4x + 0,1592
Zn	0,30	0,09	y = 5768,8x + 4,7641
As	0,67	0,46	y = 6823,7x + 0,1796

b)

<i>Scytosiphon lomentaria</i> TBARS			
Metales	r	r <sup>2</sup>	Ecuación
Cd	0,72	0,52	y = 0,0293x - 0,1506
Cr	0,80	0,64*	y = 0,0731x - 0,4234
Fe	0,31	0,09	y = 0,3849x + 0,6605
Mn	0,76	0,58	y = 0,1272x - 0,7063
Zn	0,55	0,30	y = 0,2965x + 2,4056
As	0,56	0,32	y = 0,1601x - 0,5408



**Tabla 3:** Correlación de la respuesta a actividad de la enzima catalasa (a) y peroxidación lipídica (b) de *U. rígida* con las concentraciones de metales.

a)

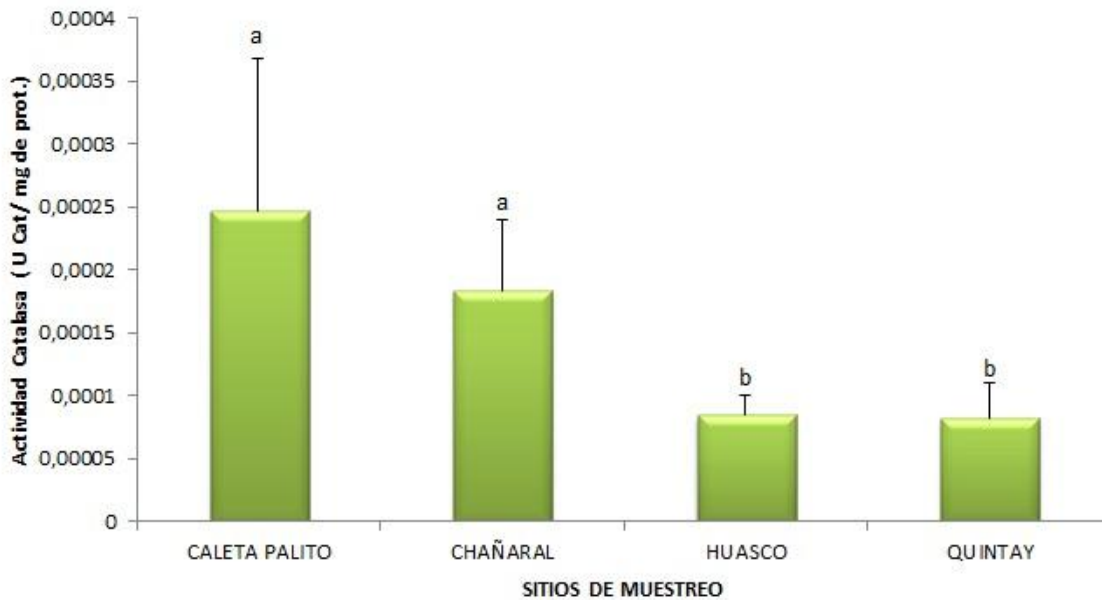
<i>Ulva rígida</i> Catalasa			
Metales	r	r <sup>2</sup>	Ecuación
Cd	0,96	0,93*	y = 371,31x - 0,1007
Cr	0,96	0,93*	y = 581,23x - 0,1431
Fe	0,733	0,53	y = 2688,8x + 1,6194
Mn	0,57	0,32	y = 265,6x + 0,2513
Zn	0,54	0,29	y = 998,35x + 4,5149
As	0,39	0,15	y = 369,83x + 0,7062

b)

<i>Ulva rígida</i> TBARS			
Metales	r	r <sup>2</sup>	Ecuación
Cd	0,85	0,72*	y = 0,1343x - 0,4995
Cr	0,86	0,74*	y = 0,2121x - 0,7785
Fe	0,59	0,34	y = 0,8864x - 0,773
Mn	0,41	0,17	y = 0,0786x + 0,0667
Zn	0,39	0,15	y = 0,2965x + 3,8149
As	0,18	0,03	y = 0,0699x + 0,6773

## 12. Biomarcadores de estrés oxidativo en la macroalga *Scytosiphon lomentaria*

En las figuras 21 y 22, se observa que las zonas con actividad minera presentan una mayor actividad de la enzima catalasa y una mayor peroxidación lipídica respectivamente, lo que se condice con los resultados obtenidos por Contreras et al, (2005, 2009).



**Figura 21:** Variación de la actividad de Catalasa en *S. lomentaria* entre los sitios estudiados ( $n = 6 \pm$  d.e.). Las letras corresponden a diferencias estadísticamente no significativas ( $p > 0,05$ ).

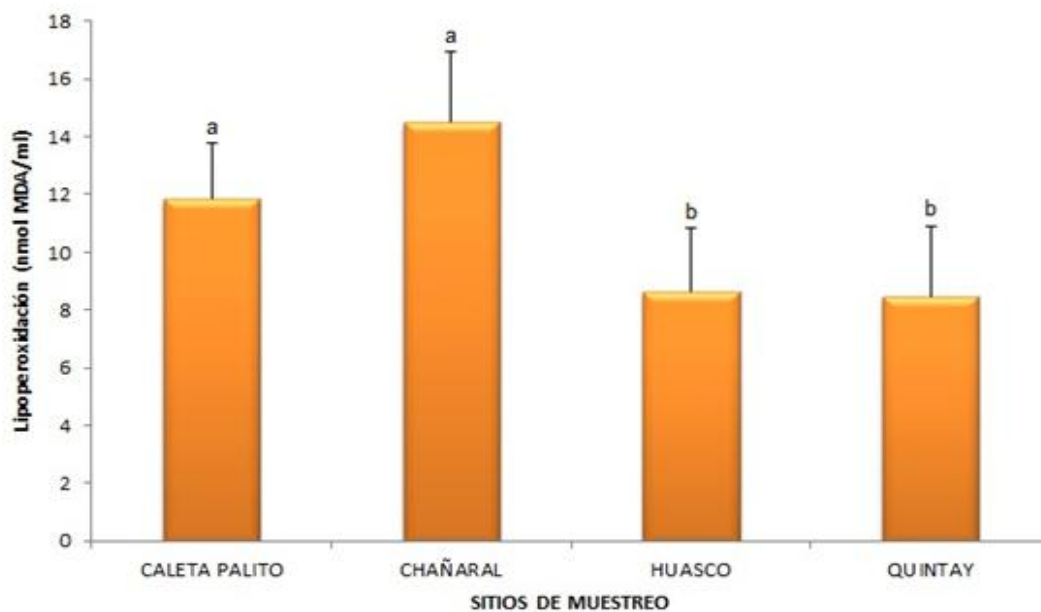
El aumento de la actividad de catalasa (Figura 19) y una mayor lipoperoxidación (figura 20) en Caleta Palito y Chañaral podrían estar asociada a la influencia que ejercen las actividades mineras, a través de la descarga de agentes químicos al río Salado, al respecto, Castilla & Nealler (1978), señalan que la minera El Salvador vierte parte de sus residuos al río antes mencionado. Esto, podría explicar las altas concentraciones de cobre en las dos zonas antes mencionadas,  $16,6 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$  y  $12,54 \pm 0,04 \mu\text{g/L}$  respectivamente (Tabla 1).

Si bien, se sabe que este metal es un micronutriente esencial para plantas y algas siendo componente de varias proteínas y enzimas involucradas en una variedad de vías metabólicas (Elisabetta & Gioacchino, 2004), son contaminantes metálicos importantes y potencialmente tóxicos cuando están en exceso (Chang & Sibley, 1993) que pueden interferir con numerosos procesos fisiológicos y se consideran generador de daño oxidativo (Fernández & Henrigues, 1991). Esto se observa en los resultados obtenidos, donde las altas concentraciones de este metal sugieren la activación de la enzima antioxidante catalasa para contrarrestar el estrés oxidativo que se podría estar generando. Este aumento en las especies reactivas de oxígeno, que induce como mecanismo de

protección la activación de la enzima catalasa, también podría ser el responsable del daño a nivel de lípidos que se origina (Figura 22).

J.C. Castilla & E. Nealler (1978) mostraron el impacto en el ambiente producido por la minera El Salvador. Como el vertimiento de relaves desde esta mina de cobre habían obstaculizado las actividades del puerto, habían causado modificaciones geomorfológicas en las costas y habían afectado seriamente las comunidades marinas. Además las evaluaciones biológicas de organismos y ecosistemas marinos habían revelado alteraciones ecológicas, fisiológicas y bioquímicas en especies y comunidades afectadas por componentes orgánicos e inorgánicos presentes en las aguas marinas de Chañaral.

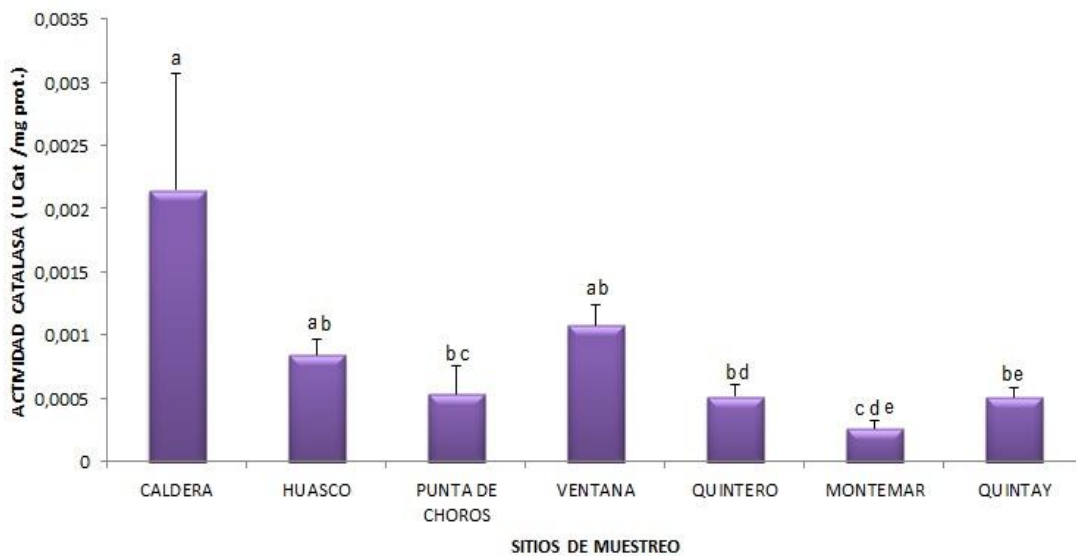
Mei Li *et al.* mostró como el cobre y el zinc inducen la actividad de la catalasa con un aumento de 285,74% más que el control, en las concentraciones mal altas usadas de este metal, lo que nuevamente sugiere que aunque ciertos metales pueden ser micronutrientes utilizados por las plantas, también pueden ser elementos tóxicos cuando se encuentran en cantidades por encima de su nivel óptimo.



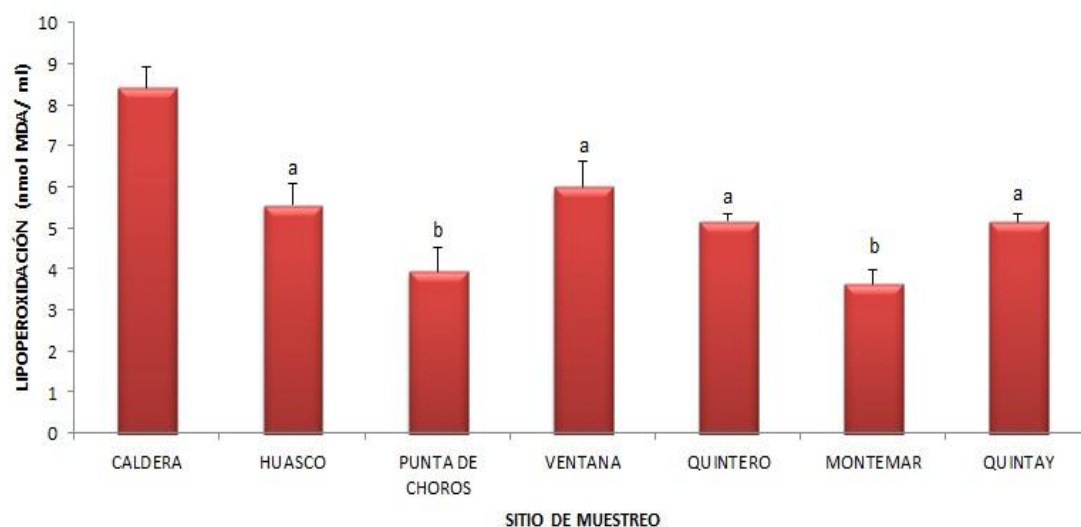
**Figura 22:** Variación de la Peroxidación lipídica en *S. lomentaria* entre los sitios estudiado (n =6 ± d.e.). Las letras corresponden a diferencias estadísticamente no significativas (p > 0,05).

### 13. Biomarcadores de estrés oxidativo en la macroalga *Ulva rígida*

En la figura 23 y 24, se observa la variación de la actividad de la catalasa y de peroxidación lipídica respectivamente, entre los sitios estudiados, los cuales incluyen zonas de la tercera cuarta y quinta región del país. Éstas reflejan como en las zonas de mayor actividad minera, Caldera y Ventana, hay una mayor actividad de la enzima catalasa y un mayor grado de peroxidación lipídica.



**Figura 23:** Variación de la Actividad de la Catalasa en *S. lomentaria* entre los sitios estudiados ( $n = 6 \pm$  d.e.). Las letras corresponden a diferencias estadísticamente no significativas ( $p > 0,05$ ).



**Figura 24:** Variación de la Actividad de la Catalasa en *S. lomentaria* entre los sitios estudiados ( $n = 6 \pm$  d.e.). Las letras corresponden a diferencias estadísticamente no significativas ( $p > 0,05$ ).

Nuevamente, la elevada concentración de metales como el cadmio y el cromo en Caldera (Tabla 1), podría estar generando el daño oxidativo en esta especie a través de la producción de especies reactivas de oxígeno y por ende la activación de enzimas antioxidantes.

El cadmio es un metal pesado no esencial y poco abundante en la corteza terrestre, sin embargo en las últimas décadas ha aumentado considerablemente su acumulación como consecuencia de la actividad industrial (Rodríguez-Serrano *et al.* 2008).

Los efectos tóxicos del cadmio sobre las plantas, han sido ampliamente estudiados (Sanità di Toppi y Gabrielli 1999; Benavides *et al.* 2005), sin embargo los mecanismos de su toxicidad aún no se conocen completamente.

Los cationes metálicos  $Cd^{2+}$  y  $Pb^{2+}$  no experimentan cambios redox y por lo tanto, a diferencia del  $Fe^{2+}$  o  $Cu^{2+}$ , no actúan directamente en la generación de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, pueden actuar como prooxidantes a través de la reducción del contenido de glutatión reducido (GSH), necesario para la síntesis de fitoquelatinas, disminuyendo así su disponibilidad para la defensa antioxidante (Pinto *et al.* 2003). El

estrés oxidativo producido por el cadmio se manifiesta por daños oxidativos a membranas tales como peroxidación lipídica (Lozano-Rodríguez et al. 1997; Wua et al. 2003;), que es lo que se observa en la figura 24, donde Caldera zona con la mayor concentración de este metal es la que presenta el mayor daño a lípidos.

Las actividades de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), glutathione reductasa (GR), peroxidasas (POD) y la catalasa (CAT), encargadas de la defensa celular frente a las especies reactivas de oxígeno, experimentan reducciones o incremento de su actividad en función de la concentración de cadmio incluida en el medio de crecimiento, la duración de la exposición, el tipo de tejido y la especie vegetal de que se trate (Sandalo et al. 2001; Benavides et al. 2005). En este caso, la actividad de la catalasa en las muestras provenientes de Caldera, se ve altamente mayor con respecto a las demás zonas de muestreo, lo que podría deberse a que el cadmio genera un aumento en la actividad de esta enzima.

Si bien en las zonas estudiadas se concentran gran parte de las actividades mineras del país, siendo esto uno de los principales factores de deterioro ambiental, no se descarta la influencia de otros contaminantes que puedan estar generando el daño oxidativo observado en las dos especies de macroalgas utilizadas. Es así como fuentes industriales pueden generar compuestos tóxicos orgánicos como pesticidas, compuestos orgánicos halogenados, hidrocarburos policíclicos o químicos industriales (Kraemer, Choudhury y Kampa 2001). Está demostrado que este tipo de sustancias inducen estrés oxidativo (Domenech, 2004) y la normativa chilena autoriza niveles de estos contaminantes en aguas territoriales, los que son determinados por el Programa de Observación del Ambiente Litoral (POAL) es así que Montory *et al.* 2008 han medido niveles de estas sustancias químicas encontrando que las mayores concentraciones de bifenilos policlorados totales se encuentran asociadas a las áreas más pobladas y con más actividad industrial. A su vez, Barral *et al.* 2001 evaluaron la presencia de compuestos orgánicos persistentes en sedimentos del sur del país, identificando plaguicidas organoclorados nuevamente en zonas con actividad industrial.

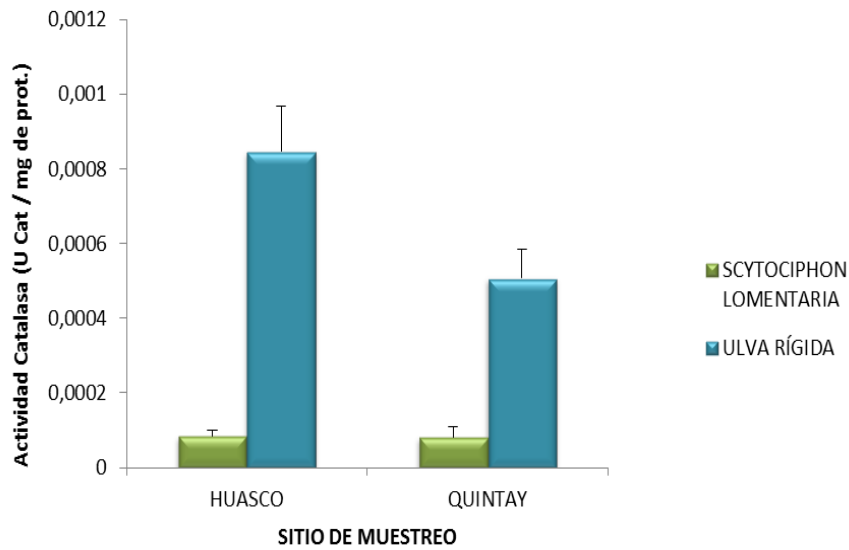
#### 14. Comparación en los resultado del análisis de los parámetros oxidativos en las macroalgas *Scytosiphon lomentaria* y *Ulva rígida*

Se ha determinado resultados distintos en las dos especies de macroalgas utilizadas en este trabajo, lo que sugiere distintos tipos de resistencia frente a la contaminación (Figura 25 y 26).

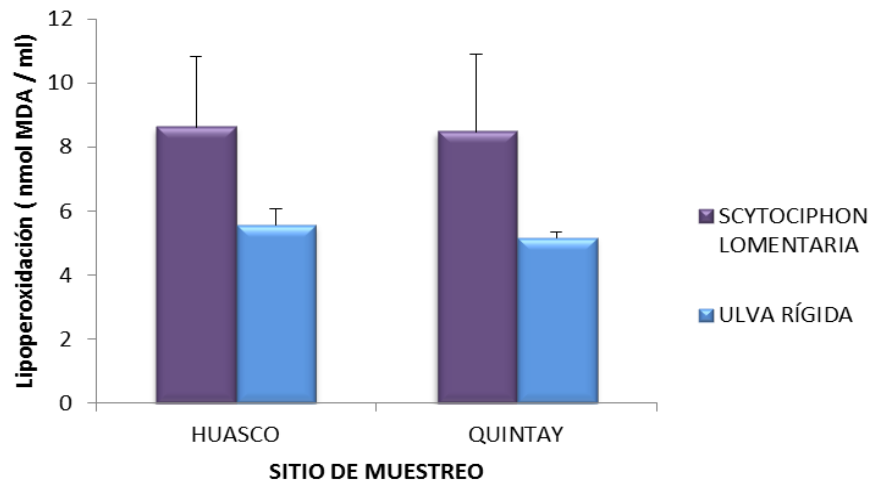
Si bien, Huasco no presenta altas concentraciones de cobre, si lo presenta de hierro con  $5,8 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$ . Esto se debe a que en esta zona, se encuentran las principales minas de hierro que constituyen en la minería, la segunda actividad en importancia en el país. Entre las minas más importantes se nombran: La planta de pellets de Huasco, Huantemé, Bandurrias y el Mirado.

El  $\text{Fe}^{2+}$  al igual que el  $\text{Cu}^{2+}$ , actúa directamente en la generación de especies reactivas de oxígeno (Pinto *et al.* 2003), participando en la reacción de Fenton, una de las principales generadoras de estas especies. En ésta se forma el radical hidroxilo, el cual después mediante la reacción de Haber – Weiss produce el radical superóxido, ambas reacciones con la participación del peróxido de hidrógeno (Navarro-Aviñó *et al.* 2007).

Se observa como *U. rígida* presenta una mayor actividad de la catalasa y por ende, más bajo daño a lípidos comparado con *S. lomentaria*, la cual presenta más baja actividad de la enzima catalasa y por lo tanto más alta peroxidación lipídica (Figura 25 y 26). Esto sugiere que algas verdes podrían poseer mayor adaptación a ciertos contaminantes lo que podría involucrar una activación más rápida de la maquinaria enzimática antioxidante, que ayuda a proteger a estas macroalgas del daño oxidativo.



**Figura 25:** Comparación en los resultado del análisis de los parámetros oxidativos en *Scytosiphon lomentaria* y *Ulva rígida* por sitio de muestreo (n =6 ± d.e.). Actividad de la catalasa.



**Figura 26:** Comparación en los resultado del análisis de los parámetros oxidativos en *Scytosiphon lomentaria* y *Ulva rígida* por sitio de muestreo (n =6 ± d.e.). Peroxidación lipídica.



## VI. CONCLUSIÓN

Se encontró estrés oxidativo en ambas especies a través, del aumento de la actividad antioxidante de catalasa y daño oxidativo a lípidos en zonas de aguas costeras cercanas a centros de actividad minera.

El nivel de estrés oxidativo varió entre los sitios de estudio, siendo mayor en Caleta palito y Chañaral y menor en Quintay en *S. lomentaria*; y mayor en Caldera y Ventana y menor en Punta de choro y Montemar en *U. rígida*.

Las concentraciones de los metales variaron entre los diferentes sitios de muestreo, siendo Caldera la zona que presenta las mayores concentraciones de cadmio y cromo; y Caleta palito y Chañaral, los que presentan mayores concentraciones de cobre.

Las concentraciones de algunos metales se correlacionaron con el estrés oxidativo determinado, a través de la actividad de la enzima antioxidante catalasa y la lipoperoxidación. En el caso de la primera, solo hubo una correlación significativa en *U. rígida*, en cambio en la peroxidación lipídica el cromo fue el metal cuya concentración se correlacionó significativamente en ambas especies.

No se descarta la influencia de otros contaminantes oxidativos generados por fuentes industriales tales como pesticidas, compuestos orgánicos halogenados, hidrocarburos policíclicos o químicos industriales presentes en las aguas de las zonas muestreadas.

## VII. REFERENCIAS

Ahumada R, Rudolph A, Madariaga S & Carrasco F. (1989). Descripción de las condiciones oceanográficas de la bahía de San Vicente y antecedentes sobre los efectos de la contaminación. *Biológica pesquera (Chile)*, 18: 37 – 52.

Avissar N, Slemmon J & Palmer I. (1992). Partial sequence of human plasma GPx and immunologic identification of milk GPx the plasma enzyme. *J. Nutr*, 12 (6): 1243 – 1249.

Babior BM. (2002). The leukocyte NADPH oxidase. *Isr. Med Assoc J. Nov*, 4(11):1023-1024.

Barral R, Pozo K, Urrutia R, Cisternas M, Pacheco P & Focardi S. (2001). Plaguicidas organoclorados persistentes en sedimentos de 3 lagos costeros y un lago andino de Chile central. *Bol. Soc. Chil. Quím*, Vol.49, n.2: 149 – 159.

Beckman J.S. & Koppenol, W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol*, 271, C1424–C1437.

Boberis A, Costa L & Junqueira V. (2000). Envejecimiento Mitocondrial. *Revista Ciencia e Investigación*, 3 (1): 350-356.

Bohn A. (1975). Arsenic in marine organisms from West Greenland. *Mar. Pollut. Bull.*, 6, 87-89.

Boré D, Henríquez N & Espinosa G. (1988). Chile y sus recursos pesqueros, CORFO-IFOP, Santiago: pp.69.

Bryan G.W (1969). The absorption of zinc and other metals by the brown seaweed. *Laminaria digitata*. *J. mar. Biol. Ass*, 49: 225-243.

Buschmann AH & Fortt A. (2005). Efectos ambientales de la acuicultura intensiva y las alternativas para un desarrollo sustentable. *Ambiente y Desarrollo*, 21(3): 58-64.

Casado A, De la Torre R, López E, Carrascosa D & Venarucci D. (1998). Niveles de Superóxido dismutasa y Catalasa en enfermedades del anciano. *Gaceta Médica Mexicana*, 134 (5): 539 – 544.

Castilla J.f. (1983). Environmental impact in sandy beaches of copper mine tailing at Chañaral, Chile. *Mar. Pollut. Bull.* 14: 459 - 464.

Castilla J.C. & Nealler E. (1978). Marine environmental impact due to mining activities of El Salvador copper mine, Chile. *Mar. Pollut. Bull.* 9, 67 – 70.

Cisneros E, Pupo J & Céspedes E. (1997). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los Radicales Libres: III. Glutación Peroxidasa. *Rev. Cubana Invest Bioméd.* 16 (1): 10 – 15.

Coale, K.H. (1991). Effects of iron, manganese, copper and zinc enrichments on productivity and biomass in the subarctic Pacific. *Limnology & Oceanography* 36: 1851-1864

Connor, P. M. (1972). Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 3: 190-192.

DeCoursey T.E & Ligeti E. (2005). Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell mol life Sci*, 62: 2173 – 2193.

Drude de Lacerda I, Laneuville V & Davée J (1985). Seasonal variation of heavy metals in seaweeds from Conceicao de Jacarei (R. J). *Botánica marina* XXVIII: 339 – 343.

Escobar J. (2002). La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar. División de recursos naturales e infraestructura, CEPAL.

Etchevery H. (1960). Algas marinas de las islas oceánicas chilenas. Rev. Biol. Mar: 83 – 101.

Evans M.D, Dizdaroglu M & Cooke M.S. (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutat res, 567 (1): 1 – 61.

Evans P. & Halliwell B. (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. Br J Nutr, 85(Suppl.2): S67 - 74.

Fuge, R. & James, K. H. (1974). Trace metal concentrations in *Fucus* from the Bristol Channel. Mar. Pollut. Bull. 5: 9 – 12.

García B, García O, Clapes S, Rodes L & García J. (1997). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los Radicales Libres: I. Superóxido Dismutasas. Rev. Cubana Invest Bioméd, 16(1):10 - 15.

Gastaldi L, Ranzato E, Capri F, Hankard P, Péres G, Canesi L, Viarengo A & Pons G. (2007). Application of a biomarker battery for the evaluation of the sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia Andrei*. Comp. Biochem. Physiol, Parte C: Toxicol. Pharmacol, 146: 398 – 405.

Gil del Valle L, Reyes A, Sánchez G & Fernández O. (2002). Terapia Antioxidante en la Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Acta Farmacéutica Bonaerense, 21 (4): 301 - 308.

Hagerhall B. (1973). Marine botanical – hydrographical trace element studies in the Oresund area. Botanical Marine, 16: 53 – 64.

Haliwell B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology, 141: 312 – 322.

Halliwell B & Gutteridge J. (1989). Lipid Peroxidation: A radical chain reaction. Biol. Los radicales libres. Med, 188 – 266.

Halliwell B & Gutteridge J. (1990). The Measurement and Mechanism of Lipid Peroxidation in Biological Systems. Trends Biochem. Ciencia, 15: 129 – 135.

Halliwell B, Rafter J & Jenner A. (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidants or not?. Am. J. Clin. Nutr, 81 (suppl): 2685 – 2693.

Haug, A., Larsen, B. & Smidsrød, O. (1974). Uronic acid sequence in alginate from different sources. Carbohydr. Res, 32: 217 – 225.

Hernández A & Landaeta M. (1998). Concentración de cobre en tejidos blandos de *Perumytilus purpuratus* y *Pyura praeputialis* en Punta Coloso, Antofagasta, Chile. Minería del cobre, ecología y ambiente costero: 333 - 348.

Janssen A, Bosman C, Sier C, Griffioen G, Kubben F & Lamers C. (1998). SODs in relation to the overall survival of colorectal cancer patients". Br. J. Cancer, 78 (8): 1051 – 1057.

Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML & Ellis E. (1986). PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. Circ Res. Dec, 59(6): 612 - 619.

Kraemer RA, Choudhury K & Kampa E. (2001). Protecting Water Resources: Pollution Prevention. In: International Conference on Freshwater, Bonn, p. 18.

Hoffmann A & Santelices B. (1997). Flora marina de Chile central. Ediciones Universidad Católica de Chile, Chile, pp. 434: 271 – 274.

Lam P & Gray J. (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Mar. Pollut. Bull, 46: 182 – 186.

Leonardi P.I. & Vasquez J.A. (1999). Effects of mining pollution on the ultrastructure of *Lessonia* spp. Hydrobiología 398/399: 375-383.

Lozada S & Garcia L. (2009). Estrés oxidativo y antioxidantes: Como mantener el equilibrio. *Asoc Colomb dermatol*, 17: 172 – 179.

Martínez M. (1998). Toxicidad de Xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars. Pharmaceutica*; 39 (1): 5 – 18.

Mates J.M, Pérez-Gómez C & De Castro I. (1999). Antioxidant Enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.*, 32 (8): 595 – 603.

Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C & Giovannini C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione – related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, 16: 577 – 586.

Mayes P. (1999). Estructura y Función de las Vitaminas Liposolubles. *Bioquímica del Harper*. Ed by A.L Gamboa: 723 - 734.

Mayes P. (1999). Vía de la Pentosa Fosfato y otras vías del metabolismo de hexosas. *Bioquímica del Harper*. Ed by A.L Gamboa: 235 - 246.

Mayes P. (1999). Oxidación Biológica. *Bioquímica del Harper*. Ed by A.L Gamboa: 135 - 142.

Montero M. (1996). Los Radicales Libres y las Defensas Antioxidantes. *Anales de la Facultad de Medicina*, 57 (4): 278 – 281.

Morris A.W & Bale A.J, (1975). The accumulation of cadmium, cooper, manganese, and zinc by *Fucus vesiculosus* in the British Channel. *Estuarine coastal marine science*, 3: 153–161.

Munda IM & Hudnik V. (1991). Trace metal content in some seaweeds from the Northern Adriatic. *Bot. Mar*, 34: 241–249.

Pérez P & Pérez J. (1999). Métodos para medir el daño oxidativo. *Rev. Cubana Med Milit*, 29 (3): 192 – 198.

Prior W & Burdon R. (1991). Aldehydes, Hydrogen Peroxide, and Organic radical as mediators of oxygen toxicity. *Free Rad. Biol. Chem*, 11: 41 – 46.

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK & Harrison DG. (1996). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J. Clin. Invest*, 97(8): 1916 - 1923.

Reish, D. J., Piltz, F. & Martin, J. M. (1974). Induction of abnormal polychaete larvae by heavy metals. *Mar. Pollut. Bull.*, 5: 125 - 126.

Rodríguez J, Menéndez J & Trujillo Y. (2001). Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev. Cubana Med Milit*, 30 (1): 36 – 44.

Salamanca, M. & Camaño A. (1994). Historia de la contaminación por metales en traza en dos áreas costeras del norte y centro-sur de Chile. *Gayana Oceanológica*, 2: 31 - 48.

Södergren E. (2000). Lipid Peroxidation in vivo: Evaluation and application of methods for measurement. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine*, 78: pp.949.

Stepanik T & Ewing D. (1993). Isolation of Glutathione peroxidasa, Catalase and Superoxide dismutasa of human erythrocytes. *J. Biochem. BioPh*, 20: 157 – 169.

Tiskow G. (1996). Radicales Libres en Biología y Medicina: Una breve revisión. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*; 2 (1): 44 – 57.

Tosaki A, Droy-Lefaix M, Pali L & Das D. (1993). Effects of SOD, Catalase and a novel antiarrhythmic drug; EGB 761, on reperfusion induced arrhythmias in isolated rat hearts. *Free Radic Biol. Med*, 14: 361 – 370.

Turrens J. (1997). Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain. *Biosci. Rep.*, 17 (1): 3 – 8.

Turrens JF, Freeman BA, Levitt JG & Crapo JD. (1982). The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys.* Sep, 217(2): 401 - 410.

Vasquez, J.A. & Guerra N. (1996). The use of seaweeds as bioindicators of natural and anthropogenic contaminants in northern Chile. *Hydrobiologia* 326/327: 327-333.

Vertuani S, Angusti A & Manfredini S (2004) The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des* 2004, 10 (14): 1677 – 1694.