

Revisión

El coprostanol como biomarcador de la contaminación fecal. Una revisión de sus aplicaciones en el medio marino

José Antonio González Oreja*

Departamento de Química y Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de las Américas-Puebla. 72820 Puebla. México.

E-mail: jgonzorj@mail.udlap.mx, jgonzorj@hotmail.com. Tel: (01)(222)2292-416. Fax: (01)(222)2292-419

Recibido el 21 de mayo del 2002; aceptado el 12 de noviembre del 2002

Resumen. El coprostanol como biomarcador de la contaminación fecal. Una revisión de sus aplicaciones en el medio marino. Generalmente, la contaminación fecal de las aguas se ha evaluado por medio del conteo de microorganismos, como *Escherichia coli*. Sin embargo, estos métodos presentan problemas que comprometen su aplicabilidad. Por ello se han propuesto otros indicadores, como compuestos derivados de las moléculas esteroideas. El biomarcador químico de aportes fecales más utilizado en la actualidad es el coprostanol (5 β -cholestan-3 β -ol), un metabolito de su precursor biológico, el colesterol, producido por microorganismos intestinales simbioses de los seres humanos. En condiciones aerobias el coprostanol se degrada rápidamente, por lo que su detección en ambientes oxigenados se considera como un indicador de una contaminación reciente por aguas residuales domésticas. Ahora bien, en condiciones anóxicas su degradación ocurre muy lentamente, lo que permite el análisis de sus concentraciones como un biomarcador del curso de la contaminación fecal generada por el vertido de aguas residuales domésticas. Los métodos de análisis del coprostanol se desarrollan en un proceso de múltiples etapas que se inician con una extracción lipídica seguida de un aislamiento de los esteroides mediante cromatografía en capa fina o en columna, para finalmente identificar y cuantificar las moléculas de interés mediante cromatografía de gases o espectroscopía de masas. Métodos más recientes simplifican este protocolo mediante un sólo ciclo que sincroniza varios pasos. El enfoque principal de los trabajos que aplican el coprostanol como un biomarcador de la contaminación fecal en el medio marino es informar sobre variaciones espaciales de aportes recientes de materia orgánica, cuyo origen fecal se trata de evaluar mediante el análisis de muestras de agua y/o de sedimento. Un menor número de estudios han considerado a la vez las variaciones temporales del curso de la contaminación, reveladas por el estudio de perfiles verticales de los sedimentos. Finalmente, el estudio del coprostanol permite también profundizar en el conocimiento de la geoquímica de los sedimentos.

Palabras clave: Contaminación fecal, biomarcadores químicos, coprostanol, 5 β -cholestan-3 β -ol, aguas residuales domésticas, medio ambiente marino, aguas costeras, estuarios, variaciones espaciales y temporales en la contaminación fecal, geoquímica de los sedimentos.

Abstract. Coprostanol as a biomarker of fecal pollution. A review of its applications to the marine environment. Fecal pollution in waters has been classically evaluated by means of microorganisms counting, such as *Escherichia coli*. However, these methods exhibit several difficulties regarding their applicability. Therefore, other indicators have been proposed, such as several compounds derived from steroid molecules. Currently, coprostanol (5 β -cholestan-3 β -ol) is the most widely applied chemical biomarker of fecal pollution. Coprostanol, a metabolite of its biological precursor, cholesterol, is produced by human symbiotic intestinal microorganisms. As coprostanol is easily degraded under aerobic conditions, its detection in well oxygenated environments is considered as an indication of a recent sewage pollution. Under anoxic environments, on the other hand, its degradation happens really slowly, which facilitates the analysis of its concentrations as a biomarker of fecal pollution due to sewage spillage. Methods of coprostanol analysis involve a multi-step process which imply first a lipidic extraction, then the fractionation of the sterol component by means of thin layer or column chromatography, and finally, the identification and quantification of the interest molecules by gas chromatography or mass spectroscopy. More recent methods simplify this protocol in just one cycle which match various previous steps. The main focus of the investigations which consider coprostanol as a biomarker of fecal pollution in marine, coastal and estuarine environments is to report about spatial variations in fresh inputs of organic matter, which fecal origin is to be assessed by analyzing sediments and/or water samples. A lesser number of papers have simultaneously taken into account temporal variations in sewage pollution, revealed by studying vertical sediment cores. Finally, coprostanol study also allows to enhance knowledge of sediment geochemistry.

Key words: Fecal pollution, chemical biomarkers, coprostanol, 5 β -cholestan-3 β -ol, sewage spillage, marine environment, coastal waters, estuaries, spatial and temporal variations in fecal pollution, sediment geochemistry.

Introducción

La contaminación de los sistemas acuáticos naturales por el vertido de las aguas residuales domésticas y urbanas es una de las principales causas de pérdida de calidad ambiental de los ríos, los estuarios y las aguas costeras en general [1, 2]. La gestión correcta de éste y otros problemas sólo puede abordarse tras conocer cuál es la identidad y la importancia de las fuentes de los contaminantes descargados en el sistema recep-

tor. En este sentido, el uso de biomarcadores representa una aproximación nueva y ventajosa para distinguir entre los diferentes orígenes de la contaminación fecal [3-6]. Así, puede entenderse que los biomarcadores son compuestos orgánicos que, una vez liberados al medio, mantienen una integridad suficiente como para reconocer su fuente originaria [4]. Igualmente, los biomarcadores se han considerado como compuestos fáciles de determinar que informan de la historia pasada (y futura) de una muestra [7].

Las aguas residuales domésticas pueden contener una gran diversidad de agentes contaminantes de naturaleza química, capaces de provocar cambios importantes en los ecosistemas locales, así como numerosos microorganismos patógenos (bacterias, virus), de efectos indeseables sobre la salud. Por lo tanto, evaluar la calidad de las aguas y su grado de contaminación por materia fecal es una labor de importancia por razones de tipo ecológico, sanitario y estético [8-12].

Desde principios del siglo XX, el control de la calidad sanitaria de las aguas se ha determinado por medio de métodos microbiológicos, como el estudio y la enumeración de microorganismos intestinales, particularmente bacterias coliformes como *Escherichia coli* [13]. Sin embargo, se ha cuestionado seriamente el uso de estos organismos como indicadores de la contaminación fecal y como predictores del riesgo de transmisión de enfermedades ligadas al agua, pues dichos métodos sufren de problemas como (a) la falta de reproducibilidad debido a la inherente variabilidad de la respuesta bacteriana en medios variables, (b) la muerte de las bacterias indicadoras por estrés fisiológico, y (c) la incapacidad de ofrecer información acumulativa sobre la historia de los aportes de contaminación [14]. Además, dichos ensayos son lentos y consumen gran cantidad de tiempo, por lo que las posibles recomendaciones que de ellos emanen pueden llegar demasiado tarde para evitar efectos nocivos a la salud [3, 10].

Debido a éstas y otras limitaciones, se han propuesto una gran colección de indicadores y trazadores de la contaminación fecal complementarios y/o suplementarios a los contajes bacterianos. Según Vivian [13], dichos marcadores pueden dividirse en dos grandes grupos: (a) marcadores activos, sustancias añadidas artificialmente a las aguas residuales, como indicadores activables, magnéticos y/o radioactivos, y (b) marcadores pasivos, sustancias encontradas naturalmente en las aguas residuales, como compuestos orgánicos e inorgánicos naturales y sintéticos, isótopos estables y trazadores microbiológicos. En concreto, los compuestos orgánicos naturales que pueden utilizarse como trazadores de la contaminación fecal deben encontrarse en altas concentraciones en las aguas residuales y en bajas concentraciones en el medio receptor, así como ser resistentes a los procesos de degradación, o por lo menos degradarse lentamente. En este sentido, se han utilizado como trazadores orgánicos naturales (a) las semillas de ciertas plantas exóticas, como el tomate (*Lycopersicon esculentum*), el melón (*Cucumis melo*) o el kiwi (*Actinidia deliciosa*), (b) la proporción entre el carbono orgánico total y los hidratos de carbono totales, y (c) los esteroides fecales [13]. Otros indicadores no microbiológicos que han sido propuestos como marcadores de la contaminación humana son moléculas como la cafeína y la urobilina, subproductos de la actividad humana que se hallan en la orina y/o las heces de nuestra especie [12, 15]. El empleo generalizado de otros biomarcadores esteroidales, como los ácidos biliares, necesita de un mayor trabajo para comprender los procesos que gobiernan su distribución y abundancia en el medio ambiente como trazadores pasivos de la contaminación fecal [11]. Sin embargo, véanse las recientes investigaciones al respecto de Elhmmali *et al.* [16] y Chaler *et al.* [17].

La importancia de la fracción lipídica en las aguas residuales domésticas es considerable, pues llega a suponer entre el 20 % y el 30 % de la materia orgánica que contiene. Debido a su naturaleza química, los lípidos hallados en las aguas residuales tienen una composición específica rica en ácidos grasos y esteroides. De hecho, en las aguas residuales provenientes de actividades domésticas se encuentran grandes cantidades de esteroides, moléculas no iónicas y no polares, poco o muy poco solubles en agua, que tienden a asociarse con la materia particulada y depositarse en los sedimentos. Entre los indicadores químicos de naturaleza esteroidea propuestos como marcadores de la contaminación por aportes fecales se encuentran diferentes esteroides, como el colesterol (cholest-5-en-3 β -ol), cuya concentración en las aguas residuales permitiría su uso como un trazador [13]. Sin embargo, también se halla en condiciones naturales en muchos otros materiales biológicos de muy diversa procedencia, por lo que no puede considerarse como un marcador específico de origen fecal único [18].

Una característica del perfil esteroideo de las aguas residuales es su elevada concentración en 5 β -estanoles, compuestos derivados de la hidrogenación intestinal de los esteroides y, por tanto, con un carácter específico de los residuos fecales. En conjunto, los 5 β -estanoles suponen entre el 50 % y el 60 % de los esteroides totales presentes en las aguas residuales domésticas sin tratar [19]. El esteroide más utilizado como marcador de aportes de origen fecal es, de hecho, un 5 β -estanol: el coprostanol (5 β -cholestan-3 β -ol), un compuesto producido en el tracto intestinal de los animales superiores por reducción microbiana del colesterol, que satisface la mayoría de los requisitos de un buen indicador de la contaminación fecal [13, 14, 20]. En efecto, su concentración en las aguas residuales domésticas está aproximadamente entre 700 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 7000 $\mu\text{g g}^{-1}$ (valores sobre peso seco del fango eliminado [14]), pues es el principal componente de los esteroides fecales neutros, llegando a constituir aproximadamente el 35 % de la concentración total de esteroides [13], y cerca del 50 % de la carga de esteroides asociados a las partículas en suspensión [19]. Por otro lado, al menos en teoría, el coprostanol está ausente de los medios no contaminados, aunque en realidad su concentración puede estar por debajo de los límites de detección de la técnica analítica empleada [14]. Finalmente, el coprostanol no resulta alterado por procesos como la cloración [21], por lo que puede ser utilizado como un biomarcador ideal de la contaminación fecal en aquellas circunstancias en las que los indicadores biológicos resultarían eliminados como consecuencia de diferentes factores, como la toxicidad [22].

Estructura química y propiedades de los esteroides fecales

Los esteroides son compuestos lipídicos de estructura molecular compleja, derivada de los 4 anillos carboxílicos del isopreno (ciclopenta[*a*]fenantreno). En general, la estructura del isopreno está total o parcialmente reducida en los esteroides,

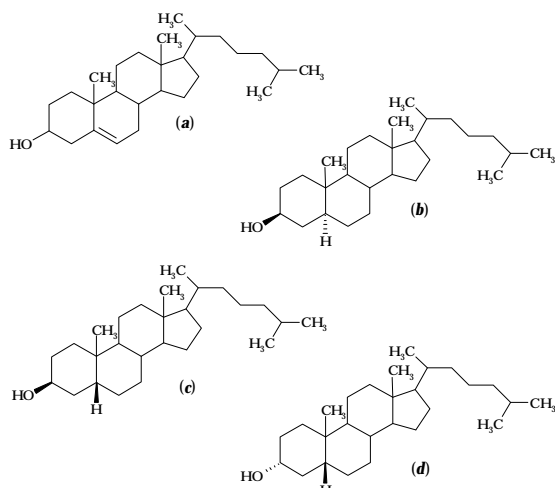


Fig. 1. Estructuras moleculares de (a) colesterol [cholest-5-en-3 β -ol], (b) colestanol [5 α -cholestan-3 β -ol], (c) coprostanol [5 β -cholestan-3 β -ol], y (d) epicoprostanol [5 β -cholestan-3 α -ol].

por lo que su grado de insaturación es mínimo. La gran mayoría de los esteroides poseen uno o dos grupos metilo (CH_3) en los átomos de carbono C-10 y C-13 [23]. Los esteroides son uno de los principales grupos de esteroides, en los que existe un grupo hidroxilo (OH) en la posición C-3 (normalmente con configuración β), y cadenas laterales adicionales en C-17. Su distribución en la naturaleza es muy amplia. En general, los esteroides son lípidos insaponificables, pues no reaccionan a la hidrólisis alcalina. Son poco o nada solubles en agua (por lo que tienden a adsorberse a la materia orgánica particulada), y solubles en disolventes orgánicos como la acetona (2-propanona, H_3CCOCH_3), el cloroformo (clorometano, H_3CCl), o el metanol ($\text{CH}_3\text{-OH}$). A su vez, los colestanos (C_{27}) forman parte de una de las divisiones de los esteroides. Se caracterizan por ser, al menos estructuralmente, derivados del colestano (cholestan). El compuesto más familiar y conocido entre los colestanos es el colesterol (cholest-5-en-3 β -ol), un esteroide característico de las lipoproteínas del plasma sanguíneo y las membranas celulares de los animales superiores [23].

El coprostanol (5 β -cholestan-3 β -ol) es estructuralmente muy similar a su precursor biológico el colesterol, del que se diferencia tan sólo por la ausencia de un doble enlace entre los átomos de carbono C5 y C6 [23]. Al hidrogenarse dicho doble enlace se obtienen 2 isómeros espaciales: (a) el propio coprostanol (3 β -hidroxycoprostano), el único esteroide que en condiciones naturales se presenta en configuración *cis* [24], y (b) el colestanol o dihidrocolesterol (3 β -hidroxicolestano, 5 α -cholestan-3 β -ol), en configuración *trans*. El coprostanol, el colesterol y el colestanol (Fig. 1) son los principales esteroides fecales en el ser humano. Un epímero diferente del coprostanol es el epicoprostanol (5 β -cholestan-3 α -ol; Fig. 1), que es un componente minoritario en las heces humanas [4, 5].

Biosíntesis y degradación del coprostanol

Clásicamente, se han propuesto dos rutas metabólicas para la formación enzimática del coprostanol a partir del colesterol. La primera (Fig. 2; Vía I), sugiere la reducción enzimática por hidrogenación estereoespecífica del doble enlace del colesterol en C-5 y C-6, que produce directamente coprostanol. La segunda (Fig. 2; Vía II), implica la oxidación e isomerización del colesterol, con formación de una serie de metabolitos transitorios: cholest-5-en-3-ona, que se isomerizará a colesteno-4-en-3-ona, para reducirse posteriormente a coprostanona (5 β -cholestan-3-ona), y ésta finalmente a coprostanol [20].

Estudios de incorporación de colesterol marcado radioactivamente con tritio (^3H) y carbono 14 (^{14}C) fueron incapaces de precisar la ruta exacta de formación del coprostanol. Sin embargo, sí quedó clara la necesaria implicación en dicho proceso de microorganismos simbiotes intestinales [20]. Freier *et al.* [25] aislaron un cultivo puro de una pequeña bacteria anaerobia y Gram positiva (*Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222), capaz de reducir a coprostanol aproximadamente el 90 % del colesterol inicialmente presente en el medio de cultivo. El estudio de Ren *et al.* [26] con dicho microorganismo concluyó definitivamente que la vía principal para la reducción del colesterol a coprostanol por *E. coprostanoligenes* implica la formación intermedia de colesteno-4-en-3-ona y coprostanona (Fig. 2; Vía II).

Estudios sobre la degradación de la materia orgánica presente en las aguas residuales urbanas han demostrado que una estación depuradora (planta de tratamiento) de aguas residuales con tratamiento secundario por fangos (lodos) activados puede producir un efluente en el que el coprostanol esté ausente, o al menos en muy bajas concentraciones [18, 20, 21,

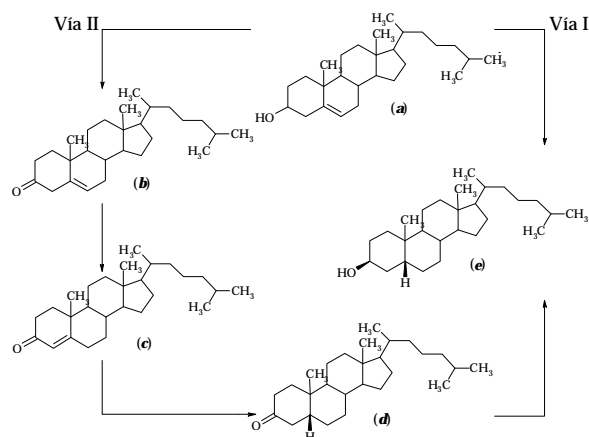


Fig. 2. Rutas metabólicas propuestas para la conversión enzimática del colesterol [cholest-5-en-3 β -ol, (a)] en coprostanol [5 β -cholestan-3 β -ol, (e)]. Vía I, directa tras reducción por hidrogenación estereoespecífica. Vía II, indirecta con formación de metabolitos transitorios: cholest-5-en-3-ona (b), colesteno-4-en-3-ona (c), y coprostanona [5 β -cholestan-3-ona, (d)]. Véanse las referencias [20] y [26].

27]. Es probable que esta desaparición sea el resultado de complejos procesos físicos y biológicos [28], incluyendo la degradación de los compuestos orgánicos por la acción de exoenzimas bacterianos y el desarrollo de otros microorganismos de tamaño inferior, como hongos, levaduras o protozoos microflagelados bacteriófagos [29]. En cualquier caso, una vez liberado al medio ambiente, el coprostanol se degrada aerobiamente por medio de una variedad de microorganismos presentes en condiciones naturales en las aguas y los suelos [13, 20, 30]. Sin embargo, durante los procesos de degradación aerobia que tienen lugar en el medio marino, a pesar de los cambios existentes en la composición de la fracción esteroidea asociada a las partículas en suspensión [19, 28, 30], la importancia relativa de los 5 β -estanoles permanece constante. Por ello, pueden considerarse como la "huella dactilar" característica de la contaminación fecal en aguas costeras [19, 28, 30]. De hecho, Bartlett [9] concluyó que la presencia de coprostanol en un entorno aerobio es, *per se*, una clara indicación de contaminación reciente por aguas residuales domésticas. Ahora bien, en condiciones anóxicas, como las que se registran bajo la superficie de la mayoría de los sedimentos de grano fino, la degradación del coprostanol ocurre muy lentamente, por lo que tiende a sobrevivir en sedimentos inalterados [31] y cualquier descenso en su concentración se debe principalmente a procesos físicos de transporte [9].

Métodos de análisis del coprostanol

Según Walker *et al.* [20], las técnicas rutinarias de análisis del coprostanol (y, por extensión, de otros esteroides fecales) desarrollan los siguientes puntos: (1) Extracción de la fracción lipídica con un disolvente orgánico. Se trata de eliminar del proceso analítico posterior todos aquellos componentes que no tengan un carácter lipídico, y que no se disuelvan en disolventes orgánicos. El proceso "clásico" de extracción utiliza un aparato tipo Soxhlet. (2) Separación de los compuestos grasos extraídos, aislando específicamente la fracción de esteroides, bien por medio de cromatografía en capa fina, bien por medio de separación en columna. (3) Análisis instrumental (identificación y cuantificación) de los esteroides en general, y del coprostanol en particular, por medio de cromatografía de gases (GC) bajo condiciones estrictamente controladas. Véase Horning [32] para una revisión de las aplicaciones de las técnicas GC al estudio de las hormonas esteroideas y sus metabolitos derivados. Véase también, Readman *et al.* [14], quienes desarrollaron un protocolo analítico completo para evaluar el grado de contaminación por las principales fuentes de contaminantes orgánicos de los medios acuáticos: aguas residuales; hidrocarburos aromáticos policíclicos, y derivados del petróleo; y MacCarthy *et al.* [33], y referencias allí dadas, para una revisión de las técnicas de análisis de contaminantes orgánicos en el agua. Las principales diferencias entre los protocolos analíticos concretos estriban en la inclusión o no de una etapa de saponificación alcalina de la fracción extraída, y una derivación (silanización) de la fracción de esteroides a

estudiar, previa al análisis GC, con formación de trimetil-silil (TMS) éteres [20].

Más recientemente, se han desarrollado nuevos métodos para simplificar el análisis del coprostanol. El protocolo analítico convencional de múltiples etapas de extracción y derivación brevemente expuesto puede ser más eficiente si se reemplaza por un proceso que se realice en un solo ciclo, lo que reduce el tiempo de extracción desde aproximadamente 24 h hasta unos 25 ± 5 min [5]. Esto se logra sincronizando la formación de los derivados TMS con el proceso de extracción en fluido de dióxido de carbono (CO₂) mantenido en condiciones supercríticas [5, 34, 35, 36]. En conclusión, la determinación de las concentraciones de éste y otros esteroides fecales en muestras medioambientales puede ser una labor mucho más rápida, sencilla y eficiente. Véase también la novedosa aportación de Börgeßon *et al.* [37].

El coprostanol ha sido considerado como un compuesto difícil de analizar por medio de cromatografías que impliquen lecturas de color, ya que carece de un cromóforo en su estructura química. Sin embargo, Picos de la Cruz [12] consiguieron formar un derivado mediante la adición de *p*-nitrobenzoato, que se acopló mediante una acilación sencilla en una atmósfera de N₂, con lo que la molécula resultante, benzoato de coprostanol, pudo ser analizada mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Cromatografía de gases y resolución correcta del par coprostanol / epicoprostanol

Debido a las notables similitudes estructurales que existen entre los principales esteroides fecales humanos (*i.e.*, coprostanol, colesterol, colestanol), puede haber problemas en su correcta identificación y cuantificación, pues tienen igualmente propiedades cromatográficas comunes. Afortunadamente, el coprostanol puede separarse adecuadamente del colesterol y el colestanol bajo condiciones cromatográficas estrictamente controladas [38]. No obstante, la bibliografía recoge distintas opiniones sobre la resolución correcta del par isomérico coprostanol / epicoprostanol [28, 39].

Así, por un lado, Matusik *et al.* [40] describieron una aproximación por medio de cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas, aplicada sobre extractos animales no derivados, capaz de eliminar las posibles interferencias entre el coprostanol y el epicoprostanol. Por otro lado, Nguyen *et al.* [34], Choi *et al.* [38] y Writer [41], reconocieron la importancia de la formación previa de los trimetil-silil derivados (TMS) para separar sin ambigüedades al par de isómeros, pues una vez silanizados sus propiedades cromatográficas son diferentes, lo que permite su correcta resolución. De hecho, Choi *et al.* [38] concluyeron que puede determinarse el contenido en esteroides fecales de una muestra medioambiental por medio de cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama, tras haber eliminado las interferencias entre el par coprostanol / epicoprostanol por medio de la conversión previa a sus derivados TMS.

¿Un origen no fecal del coprostanol?

El origen fecal del coprostanol, como un producto más del metabolismo de su precursor, el colesterol, está generalmente aceptado por la comunidad científica. Sin embargo, algunos autores aducen en ocasiones un origen diferente. Así, tras un estudio sobre los cambios temporales que tienen lugar en la abundancia relativa de los esteroides asociados a la materia orgánica particulada presente en la columna de agua de la Bahía de Bedford, Nueva Escocia (Canadá), Pocklington *et al.* [42] observaron una correlación positiva y estadísticamente significativa entre las variaciones del coprostanol y las de un conjunto de fitosteroides (esteroides derivados únicamente de las algas presentes en el área de estudio). Este patrón de covariación no tiene una explicación razonable suponiendo un origen único -fecal- para el coprostanol. Es más, según los autores:

Ces résultats offrent une autre explication de la présence des stanols dans ces sédiments (...), [y] suggèrent que l'origine du coprostanol n'est pas uniquement anthropique.

Por lo tanto, Pocklington *et al.* [42] cuestionaron la validez de la simple presencia del coprostanol en el medio marino como una indicación de la existencia de aportes de contaminación fecal. Sin embargo, tal y como reconocieron Venkatesan & Santiago [43], la contribución de ésta y otras posibles fuentes alternativas a la abundancia de coprostanol en áreas costeras densamente pobladas, en donde los aportes fecales son muy importantes, es rotundamente despreciable. Véase, en el mismo sentido, Takada *et al.* [44].

El coprostanol como trazador de la contaminación fecal

I. Animales inferiores

Algunos animales acuáticos que viven en áreas afectadas por la contaminación fecal, especialmente aquéllos de hábitos alimentarios filtradores, pueden mostrar en ocasiones evidencias de la presencia de coprostanol [40, 45-50].

O'Rourke [22] estudió la capacidad para producir coprostanol por animales inferiores de entornos acuáticos marinos y terrestres, con diferentes hábitos de alimentación. Los organismos seleccionados fueron las siguientes 13 especies: *Mya arenaria* y *Mytilus edulis* (Mollusca), *Nereis virens* (Annelida), *Homarus americanus* y *Procambarus clarkii* (Arthropoda), y *Pseudopleuronectes americanus*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Catostomas commersoni*, *Perca flavescens*, *Lepomis macrochirus*, *Salmo salar*, *Notophthalmus viridescens* y *Rana clamitans* (Chordata). En los análisis realizados sobre todos los animales de aguas no contaminadas no se encontraron cantidades detectables de coprostanol. Esto sugiere que dichas especies no poseen la flora intestinal necesaria para reducir el colesterol a coprostanol. Sin embargo, en los análisis

realizados sobre algunas de las especies de animales (*M. arenaria*, *H. americanus*) localizadas en hábitats acuáticos afectados por la contaminación fecal, sí se encontraron cantidades apreciables de coprostanol.

En términos generales, los análisis de esteroides realizados sobre extractos de animales inferiores han concluido que la posible presencia de coprostanol se debe a contaminación fecal previa del medio ambiente local. La razón lógica expresada en tales casos es la ingestión de materia orgánica particulada, a la que el coprostanol se adsorbe en condiciones normales [20].

El coprostanol como trazador de la contaminación fecal

II. Animales superiores

El coprostanol es el componente principal de los esteroides neutros presentes en las heces de los animales superiores. Como valor medio, el ser humano excreta cada día de 0.2 a 1.0 g de coprostanol [20]. Además de encontrarse en los restos fecales del ser humano (*Homo sapiens*), se ha encontrado en los de animales domésticos como la gallina (*Gallus gallus*), la oveja (*Ovis aries*), el cerdo (*Sus domesticus*) y la vaca (*Bos taurus*), y en distintas especies silvestres de los órdenes Rodentia (Gen. *Rattus*) y Primates (Gen. *Papio*) (*Mammalia*). Análisis detallados sobre el perfil esteroideo de la composición de la materia fecal del ser humano y de otros animales, posibles fuentes de coprostanol, han demostrado que la concentración de coprostanol en las heces humanas es de 1 a 3 órdenes de magnitud superior que en las de los otros animales investigados [4, 5, 6]. De hecho, la “huella dactilar” de los esteroides fecales de cada especie animal, formada por las proporciones relativas en que se presenta cada uno de ellos, exhibe suficientes diferencias como para poder distinguir adecuadamente las posibles fuentes de contaminación fecal en los entornos acuáticos estudiados [4, 5, 6]. Un ejemplo de la aplicación del coprostanol como trazador de la contaminación fecal producida por animales domésticos es el trabajo de Simpson *et al.* [51], quienes analizan el perfil lipídico de muestras de suelos de los siglos XII a XIX sometidos a determinadas prácticas de enriquecimiento por adición de estiércol de cerdo. Estos análisis enriquecen así los resultados obtenidos con técnicas convencionales de análisis de suelos.

Por otro lado, se ha postulado que la única fuente capaz de explicar las elevadas concentraciones de coprostanol registradas ocasionalmente en mares abiertos, no contaminados por aguas residuales domésticas, está relacionada con las heces de los grandes mamíferos marinos [13]. En efecto, Venkatesan *et al.* [52] encontraron altos niveles de coprostanol en muestras de sedimento de la Península Antártica, un área en donde la escasa contaminación fecal humana no puede explicar las elevadas concentraciones halladas. Sin embargo, la presencia del epicoprostanol, un isómero del coprostanol presente en las heces humanas en niveles traza, confiere una huella caracterís-

tica a esta contaminación, atribuida a la presencia continuada de grandes mamíferos marinos como la foca de Weddell (*Lep-
tonychotes weddellii*), el elefante marino (*Mirounga leonina*) y el rorcual jorobado (*Megaptera novaeangliae*). En conclusión, Venkatesan *et al.* [52] cuestionaron el uso del coprostanol como único trazador de aportes fecales en aquellas zonas en las que la abundancia de grandes mamíferos marinos pueda ofrecer resultados discordantes. Sin embargo, la contribución de ésta y otras fuentes a la abundancia de coprostanol en otras áreas es claramente despreciable [43].

El coprostanol como trazador de la contaminación fecal

III. Medio ambiente marino

Desde que Murtaugh & Bunch [18] y Kirchmer [21] propusieron el uso del coprostanol como un biomarcador de la contaminación fecal generada por el vertido final de aguas residuales domésticas y urbanas, se ha realizado un considerable número de estudios en el medio ambiente acuático marino, costero y estuarino propiamente dicho.

(a) Estudio de las variaciones espaciales

El enfoque de la mayor parte de los trabajos realizados en ambientes marinos, costeros y estuarinos, que han analizado la concentración de esteroides fecales en general y de coprostanol en particular es informar sobre las posibles variaciones espaciales de la contaminación doméstica y urbana actual. Por ejemplo, Jones *et al.* [53] utilizaron los valores de las concentraciones de coprostanol para clasificar puntos de muestreo en contaminados y no contaminados. Véase también el ambicioso trabajo de Kolpin *et al.* [54], quienes evaluaron en un amplio estudio sobre la contaminación de los ríos en Estados Unidos un total de 95 contaminantes orgánicos presentes en las aguas residuales, entre ellos el coprostanol. Con dicho propósito, se estudian generalmente muestras de la columna de agua y/o de la matriz de sedimento superficial, tanto intermareal como submareal. Los resultados obtenidos en ambos medios reflejan aportes recientes de materia orgánica, cuyo origen fecal se trata de valorar [3- 7, 10, 14, 15, 38, 41, 42, 45, 55-85]. Véanse, también, las revisiones de Vivian [13] y Walker *et al.* [20], para estudios anteriores a 1985.

(b) Estudio de las variaciones espacio-temporales

Desde que Hatcher & McGillivray [8] y Hatcher *et al.* [86] sugirieran que el coprostanol puede tener una clara aplicación en el estudio de la historia de la contaminación fecal de los sedimentos de un medio receptor, un número de estudios han combinado el análisis espacial de la contaminación fecal con el de muestras de sedimentos tomadas con cilindros tomamuestras (*corers*, en inglés) a una cierta profundidad. La supervivencia del coprostanol en condiciones anóxicas, como las que se registran en profundidad en la mayoría de los sedimentos de grano fino, queda de manifiesto al considerar que

se han registrado concentraciones detectables en muestras de suelo y sedimentos asociados con el depósito de aguas residuales de notable antigüedad: el sistema de alcantarillado y cloacas de la Antigua Roma [11]. El estudio seriado de las correspondientes secciones horizontales ofrece información integrada en el tiempo sobre el curso de la contaminación. En ocasiones, se incluyen análisis paralelos sobre la cronología sedimentaria local, pues se ofrece información sobre la datación temporal de las correspondientes secciones analizadas [8, 43, 44, 52, 87-98].

(c) Geoquímica de los sedimentos

Finalmente, algunos estudios combinan la información obtenida por medio de la cuantificación de esteroides fecales en el agua y los sedimentos con otros parámetros sobre los orígenes y tasas de deposición de la materia orgánica disuelta y, en especial, asociada a las partículas en suspensión. Pues, en efecto, las descargas de aguas residuales domésticas y urbanas pueden suponer una importante fuente de materia orgánica particulada para los sistemas costeros y estuarinos que, en ocasiones, es de una magnitud comparable al aporte natural debido a los ríos tributarios [30, 44, 60, 63, 67, 91, 99-105].

Agradecimientos

Una parte de los contenidos de este artículo está incluida en la tesis doctoral del autor, *Ecología de la Recuperación de la Ría de Bilbao*, dirigida por el Dr. José Ignacio Saiz Salinas, de la Universidad del País Vasco, y financiada gracias a una Beca para Formación de Investigadores del Gobierno Vasco (Departamento de Educación, Universidades e Investigación; B. O. P. V. de 28 de Febrero de 1995). Durante la redacción del artículo el autor contó con la ayuda de Marcela Iniestra Rocha y Jorge Villoria Crespo. Finalmente, dos revisores anónimos de la *Revista de la Sociedad Química de México* aportaron sugerencias para su mejora. A todos ellos, gracias.

Referencias

1. Clark, R. B. *Marine Pollution*. Oxford Science Publications., Ed., Clarendon Press, Oxford, **1992**.
2. Goldberg, E. D. *Coastal Zone Space. Prelude to Conflict?* IOC Ocean Forum I. Environment and Development, UNESCO Publishing, Paris, **1994**.
3. Leeming, R.; Nichols, P. D. An integrated scheme to analyse naturally occurring and pollutant organic constituents in urban sewage. En *Proceedings of a Bioaccumulation Workshop: Assessment of the Distribution, Impacts and Bioaccumulation of Contaminants in Aquatic Environments*. Miskiewicz, A. G., Ed., Water Board and Australian Marine Sciences Association, Inc. Sydney, **1992**, 153-161.
4. Leeming, R.; Ball, A.; Ashbolt, N.; Nichols, P. *Wat. Res.* **1996**, 30, 2893-2900.
5. Nichols, P.; Leeming R.; Latham, V.; Rayner, M.; En *Preprints of Papers Presented at 212th American Chemical Society National Meeting*, Orlando, Florida, **1996**, 36, 175-179.

6. Nichols, P. D.; Leeming, R.; Rayner, M. S.; Latham, V. J. *Chrom. A*. **1996**, 733, 497-509.
7. Parrish, C. C.; Abrajano, T. A.; Budge, S. M.; Helleur, R. J.; Hudson, E. D.; Pulchan, C.; Ramos, K. Lipid and phenolic biomarkers in marine ecosystems: analysis and applications. en Wangersky, P., Ed., *The Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 5, Part D. Marine Chemistry. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, **2000**, 193-223.
8. Hatcher, P. G.; McGillivray, P. A. *Environ. Sci. Technol.* **1979**, 13, 1225-1229.
9. Bartlett, P. D. *Mar. Pollut. Bull.* **1987**, 18, 27-29.
10. Nichols, P. D.; Leeming, R. *Chemistry in Australia*. **1991**, 274-276.
11. Elhmmali, M. M.; Roberts, D. J.; Evershed, R. P. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, 31, 3663-3668.
12. Piocos, E. A.; de la Cruz, A. J. *Liquid Chrom. and Related Technologies*. **2000**, 23, 1281-1291.
13. Vivian, C. M. G. *Sci. Tot. Environ.* **1986**, 53, 5-40.
14. Readman, J. W.; Preston, M. R.; Mantoura R. F. C. *Mar. Pollut. Bull.* **1986**, 17, 298-308.
15. Leeming, R.; Nichols, P. D. *Wat. Res.* **1996**, 30, 2997-3006.
16. Elhmmali, M. M.; Roberts, D. J.; Evershed, R. P. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 39-46.
17. Chaler, R.; Simoneit, B. R. T.; Grimalt, J. O. *J. Chrom.* **2001**, 927, 155-160.
18. Murtaugh, J. J.; Bunch, R. L. *J. Water Pollution Control Federation*. **1967**, 39, 404-409.
19. Quéméneur, M.; Marty, Y. *Wat. Res.* **1994**, 28, 1217-1226.
20. Walker, R. W.; Wun C. K.; Litsky, W. *CRC Critical Reviews in Environmental Control*. **1982**, 12, 91-112.
21. Kirchmer, C. J. *5 β -cholestan-3 β -ol: An indicator of fecal pollution*. Philosophical Doctor Thesis, University of Florida, Gainesville, **1971**.
22. O'Rourke, J. C. *A Survey of Lower Animals for the Presence of Coprostanol*. Master of Science Thesis, University of Massachusetts, Amherst, **1980**.
23. Hill, R. A.; Kirk D. N.; Makin, H. L. J.; Murphy, G. M., Ed., *Dictionary of Steroids. Chemical Data, Structures and Bibliographies*, Chapman and Hall, London, **1991**.
24. Kanazawa, A.; Teshima, S. *Oceanol. Acta*, **1978**, 1, 39-44.
25. Freier, T. A.; Beitz, D. C.; Li, L.; Hartman, P. A. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **1994**, 44, 137-142.
26. Ren, D.; Li, L.; Schwabacher, A.W.; Young, J. W.; Beitz, D. C. *Steroids*. **1996**, 61, 33-40.
27. Dutka, B. J.; Chau, A. S. Y.; Copurn, J. *Wat. Res.* **1974**, 8, 1047-1055.
28. McCalley, D. V.; Cooke, M.; Nickless, G. *Wat. Res.* **1981**, 15, 1019-1025.
29. Thoumelin, G.; Marty, Y., Le Corre, P.; Aminot, A. *Oceanol. Acta*. **1990**, 13, 53-60.
30. Marty, Y.; Quéméneur, M.; Aminot, A.; Le Corre, P. *Wat. Res.* **1996**, 30, 1127-1136.
31. Nishimura, M.; Koyama, T. *Geochim. Cosmochim. Acta*. **1977**, 41, 379-385.
32. Horning, E. C. Gas phase analytical methods for the study of steroid hormones and their metabolites. En *Gas Phase Chromatography of Steroids*. Eik-Nes K. B.; Horning E. C., Ed., Springer, Berlin, **1968**, 1-71.
33. MacCarthy, P.; Klusman, R. W.; Cowling, S. W.; Rice, J. A. *Anal. Chem.* **1993**, 65, 244-292.
34. Nguyen, D. K.; Bruchet, A.; Arpino, P. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, 29, 1686-1690.
35. Jayasinghe, L. Y.; Marriott, P. J.; Carpenter, P. D.; Nichols, P. D. *J. Chrom. A*. **1998**, 809, 109-120.
36. Jayasinghe, L. Y.; Marriott, P. J.; Carpenter, P. D.; Nichols, P. D. *Analytical Communications*. **1998**, 35 (8), 265- 268.
37. Börgesson, E.; Sundin, A.; Leeming, R.; Testessen, L. *J. Chrom. B*. **1998**, 713, 438-442.
38. Choi, S. M.; Kwan, S. Y.; Wong, C. M. *Microchemical Journal*. **1996**, 53, 54-64.
39. Eganhouse, R. P.; Olaguer, D. O.; Gould, B. R.; Phinney, C. P. *Mar. Environ. Res.* **1988**, 25, 1-22.
40. Matusik, J. E.; Hoskin, G. P.; Sphon, J. A. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. **1988**, 71, 994-999.
41. Writer J. H. *Sewage Contamination in the Upper Mississippi River as measured by the Fecal Sterol Coprostanol*. Master of Science Thesis, University of Colorado, Boulder, **1992**.
42. Pocklington, R.; Leonard, J. D.; Crewe, N. F. *Oceanol. Acta*. **1987**, 10, 83-89.
43. Venkatesan, M. I.; Santiago, C. A. *Mar. Biol.* **1989**, 102, 431-437.
44. Takada, H.; Farrington, J. W.; Bothner, M. H.; Johnson, C. G.; Tripp, B. W. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, 28, 1062-1072.
45. Sherwin, M. R.; Van Vleet, E. S.; Fossato, V. U.; Dolci, F. *Mar. Pollut. Bull.* **1993**, 26, 501-507.
46. Risk, M. J.; Dunn, J. J.; Allison, W. P.; Horrill, C. in: Ginsburg R. N., Ed., *Proc. of Colloquium on Global Aspects of Coral Reefs*. Univ of Miami, **1994**, 66-72.
47. De Rosa, S.; Milone, A.; Popov, S.; Andreev, S. T. *Comp. Biochem. Phys.* **1999**, 123, 229-233.
48. Catham, S.; Sabik, H. *Chromatographia Supplement*. **2001**, 53, 394-399.
49. CSIRO Huon Estuary Study Team. *Huon Estuary Study: environmental research for integrated catchment management and aquaculture*. Final report to Fisheries Research and Development Corporation, 96/284. CSIRO Division of Marine Research, Marine Laboratories, Hobart, **2000**.
50. Kanazawa, A. *Fish. Sci.* **2001**, 67, 997-1007.
51. Simpson, I. A., van Bergen, P. F.; Perret, V.; Elhmmali, M. M.; Roberts, D. J.; Evershed, R. P. *The Holocene*. **1999**, 9, 223-229.
52. Venkatesan, M. I.; Ruth, E.; Kaplan, I. R. *Mar. Pollut. Bull.* **1986**, 17, 554-557.
53. Jones, J.; Rowlatt, H.; Rees, L.; Portmann, J. E. *Science Series Aquatic Environment Monitoring Report*. **1997**, 50, 44pp.
54. Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton H. T. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 1202-1211.
55. Dürer, S.; Herrmann, R.; Pecher, K. *Water, Air and Soil Pollution* **1986**, 28, 131-149.
56. Florida Department of Environmental Regulation. *Florida Keys Monitoring Study: Water quality assessment of five selected pollutant sources in Marathon, Florida*. FDER, Marathon Office, **1987**, 187.
57. Van Vleet, E. S.; Fossato, V. U.; Sherwin, M. R.; Lovett, H. B.; Dolci, F. *Org. Geochem.* **1987**, 13, 757-763.
58. Shigenaka, G.; Price, J. E. *Wat. Res. Bull.* **1988**, 24, 989-998.
59. Grimalt, J. O.; Fernández, P.; Bayona, J. M.; Albaigés, J. *Environ. Sci. Technol.* **1990**, 24, 357-363.
60. Nichols, P. D.; Espey, Q. I. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* **1991**, 42, 327-348.
61. Green, G.; Skerrat, J. H.; Leeming, R.; Nichols, P. D. *Mar. Pollut. Bull.* **1992**, 25, 293-302.
62. Quemeneur, M.; Marty, Y. *Est. Coast. Shelf Sci.* **1992**, 34, 347-363.
63. LeBlanc, L. A.; Latimer, J. S.; Ellis, J. T.; Quinn, J. G. *Est. Coast. Shelf Sci.* **1992**, 34, 439-458.
64. Sherblom, P.; Kelly, D. *Mote Marine Laboratory* **1993**, 338, 15.
65. Nichols, P. D.; Leeming, R.; Rayner, M. S.; Latham, V.; Ashbolt, N. J. *J. Chrom.* **1993**, 643, 189-195.
66. Jeng, W-L.; Han, B-C. *Mar. Pollut. Bull.* **1994**, 28, 494-499.
67. Chalaux, N.; Takada, H.; Bayona, J. M. *Mar. Environ. Res.* **1995**, 40, 77-92.
68. Green, G.; Nichols, P. D. *Antarctic Science*. **1995**, 7, 137-144.
69. Writer, J.H.; Leenheer, J. A.; Barber, L. B.; Amy, G. L.; Chapra, S. C. *Wat. Res.* **1995**, 29, 1427-1436.
70. Bachtar, T.; Coakley, J. P.; Risk, M. J. *Sci. Tot. Environ.* **1996**, 179, 3-16.

71. Fattore, E.; Benfenati, E.; Marelli, R.; Cools, E.; Fanelli, R. *Chemosphere*. **1996**, *33*, 2383-2393.
72. Fattore, E.; Benfenati, E.; Mariani, G.; Cools, E.; Vezzoli, G.; Fanelli, R. *Water, Air and Soil Pollution*. **1997**, *99*, 237-244.
73. Al-Omram L. A. G. *International Journal of Environmental Studies, A & B*. **1998**, *55*, 87-101.
74. Chan, K.; Lam, M. H. W.; Poon, K.; Yeun, H.; Chiu, T. K. T. *Wat. Res.* **1998**, *32*, 225-235.
75. González Oreja, J. A.; Saiz Salinas, J. I. *Mar. Pollut. Bull.* **1998**, *36*, 868-875.
76. Leeming, R.; Nichols, P. D. *Mar. Freshwater Res.* **1998**, *49*, 7-17.
77. Saiz Salinas, J. I.; González Oreja, J. A. *Oceanol. Acta*. **1998**, *21*, 319-324.
78. Fernández, M. B.; Sicre, M.A.; Cardoso, J. N.; Macedo, S. J. *Sci. Tot. Environ.* **1999**, *231*, 1-16.
79. Mudge, S. M.; Bebianno, M. J.; East, J. A.; Barreira L. A. *Wat. Res.* **1999**, *30* (4), 1038-1048.
80. Mudge, S. M.; Lintern, D. G. *Est. Coast. Shelf Sci.* **1999**, *48*, 27-38.
81. Mudge, S. M.; Seguel, G. C. *Mar. Pollut. Bull.* **1999**, *38*, 1011-1021.
82. Maldonado, C.; Venkatesan, M. I.; Phillips, C. R.; Bayona, J. M. *Mar. Pollut. Bull.* **2000**, *40*, 680-687.
83. Poon K. F.; Wong, W. H.; Lam, R. H. W.; Yeung, H. Y.; Chiu, T. K. T. *Wat. Res.* **2000**, *34* (1), 99-108.
84. Seguel, C. G.; Mudge, S. M.; Salgado, C.; Toledo, M. *Wat. Res.* **2001**, *35*, 4166-4174.
85. Serdar, D.; Norton, D.; Davis, D. Concentrations of selected chemicals in sediments from harbors in the San Juan Islands. *Environmental Assessment Program. Olympia, Washington* 98504-7710. Publication Number 01-03-007, **2001**.
86. Hatcher, P.G.; Keister, L. E.; McGillivray, P. A. *Bull. Environ. Contamination and Toxicology*. **1977**, *17*, 491-498.
87. Müller, G.; Kanazawa, A.; Teshima, I. *Naturwissenschaften*. **1979**, *66*, 520-522.
88. Nishimura, M. *Geochim. Cosmochim. Acta*. **1982**, *46*, 423-432.
89. Venkatesan, M. I.; Kaplan, I. R. *Environ. Sci. Technol.* **1990**, *24*, 208-214.
90. Bothner, M. H.; Takada, H.; Knight, I. T.; Hill, R. T.; Butman, B.; Farrington, J. W.; Colwell, R. R.; Grasle, J. F. *Mar. Environ. Res.* **1994**, *38*, 43-59.
91. Kelly, A. G. *Environ. Pollut.* **1995**, *88*, 207-217.
92. Kelly, A. G.; Campbell, L. A. *Mar. Environ. Res.* **1995**, *41*, 99-132.
93. Jeng, W-L.; Han, B-C. *Est. Coast. Shelf Sci.* **1996**, *42*, 727-735.
94. Jeng, W-L.; Wang, J.; Han, B-C. *Environ. Pollut.* **1996**, *94*, 47-52.
95. Mudge, S. M.; Bebianno, M. J. *Mar. Pollut. Bull.* **1997**, *34*, 163-170.
96. Dachs, E. J.; Bayona, J. M.; Fillaux, J.; Saliot, A.; Albaiges, J. *Mar. Chem.* **1999**, *65*, 195-210.
97. McCain B. B.; Brown, D. W.; Chan, S. L.; Landahl, J. T.; MacLeod, D. W.; Krahn, M. M.; Sloan, C. A.; Tilbury, K. L.; Pierce, S. M.; Burrows, D. G.; Varanasi, U. U.S. *Dept. Commer. NOAA Tech. Memo.* **2000**, *40*, 121 pp.
98. Eganhouse, R. P.; Sherblom, P. M. *Mar. Environ. Res.* **2001**, *51*, 51-74.
99. Li, W.; Dagaut, J.; Saliot, A. *Biogeochem.* **1995**, *31*, 139-154.
100. Colombo, J. C.; Silverberg, N.; Gearing, J. N. *Org. Geochem.* **1996**, *25*, 211-225.
101. Latimer, J. S.; Quinn, J. G. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 623-633.
102. Colombo, J. C.; Silverberg, N.; Gearing, J. N. *Org. Geochem.* **1997**, *26*, 257-274.
103. Thoumelin, G.; Bodineau, L.; Wartel, M. *Mar. Chem.* **1997**, *58*, 59-71.
104. Bull, I. D.; Van Bergen, P. F.; Poulton, P. R.; Evershed, R. P. *Org. Geochem.* **1998**, *28*, 11-26.
105. Bull, I. D.; Betancourt, P. P.; Evershed, R. P. *Geoarchaeology: An International Journal* **2001**, *16*, 223-242.