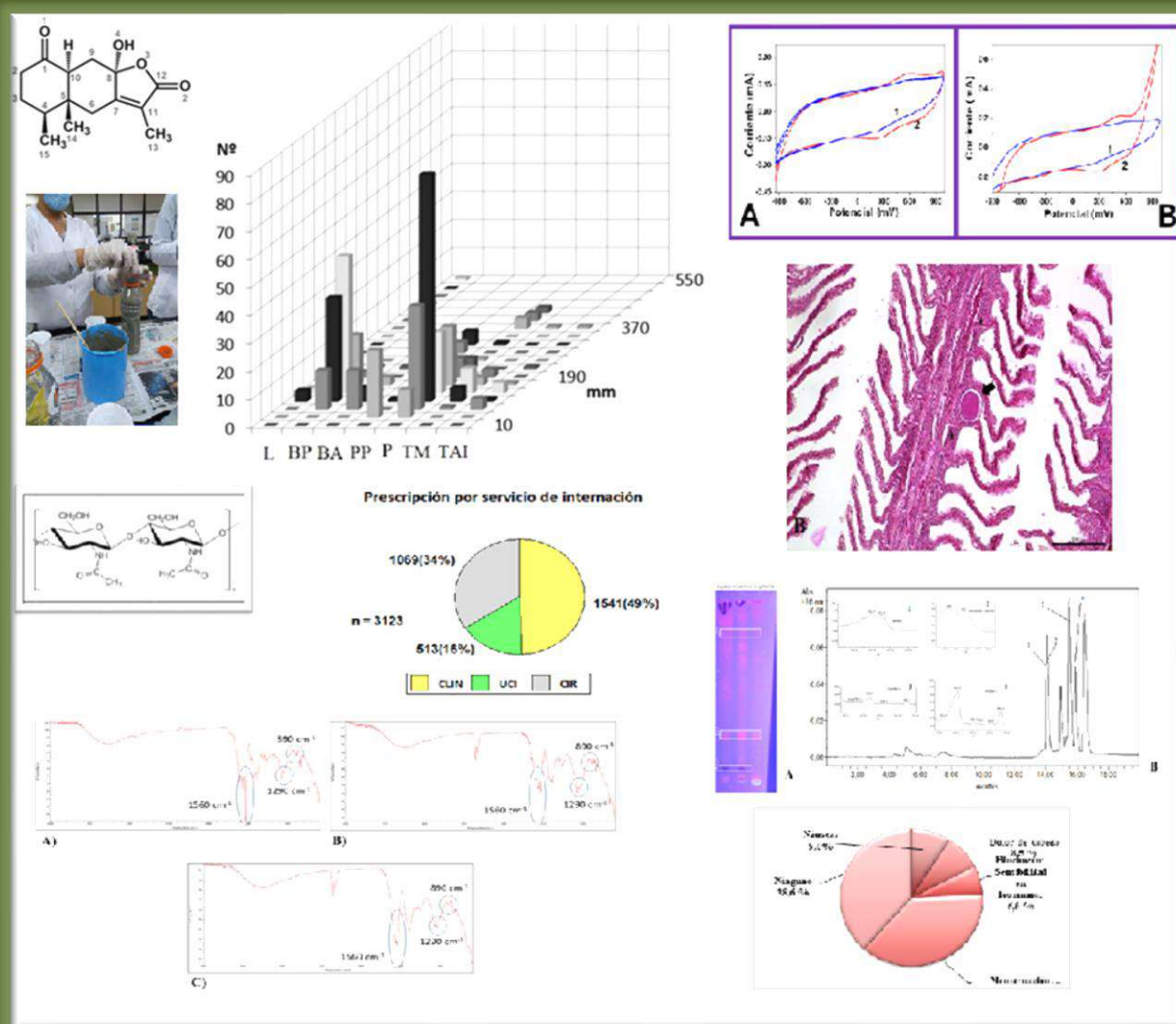


Naturalia

Patagónica

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO

VOLUMEN 16 (2020)



NATURALIA PATAGONICA

Volumen 16 – 2020

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud
Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Director

Dr. Osvaldo León Córdoba

Secretaria de Redacción

Dra. María Luján Flores

Tesorera

Dra. Mabel Sandra Feijóo

Editor

Dr. Osvaldo León Córdoba

Comité Editor

Dra. Graciela Pinto Vitorino
Dra. Nerina Iantanos
Dra. Mónica Casarosa
Dra. Ofelia Iris María Katusich
Lic. Judith Garrido

Evaluadores

Dra. Estela Lopretto
Dra. Marta Collantes
Dr. Gabriel Oliva
Dr. Juan Manuel Sayago
Ing. Agr. Antonio D. Dalmasso
Dra. Mirta E. Valencia

Dra. Martha Gattuso
Dr. Carlos Arturo Stortz
Dr. Diego Pol
Dra. Susana Gorzalczany
Dra. María Luján Flores
Dra. Nora M. Andrea Ponce
Dra. María Elena Arce

Dra. Nadia Arias
Dr. Osvaldo León Córdoba
Dra. Alicia Boraso
Dra. María Cristina Matulewicz
Dra. Isabel Moreno Castillo
Dra. Adriana Broussalis

EDITORIAL

Estimados lectores

Con esta publicación se realiza la entrega del Volumen 16 de nuestra revista *Naturalia Patagónica*, desde su relanzamiento en el año 2002. Este número incluye una nota corta, doce artículos originales y cinco resúmenes de tesis doctorales realizados por docentes e investigadores de nuestra Facultad.

Este número se destaca por ser el que más artículos originales incluye desde el relanzamiento de la revista. Agradecemos desde ya el trabajo y la decisión de los investigadores de nuestra institución y de otras instituciones, incluso del extranjero, de optar por nuestra revista para la publicación de sus investigaciones.

Es de esperar que los siguientes números contengan cada vez más trabajos, lo cual resulta muy importante para dar a conocer al mundo científico, la experiencia y el conocimiento alcanzado a través de los años sobre temas de la Patagonia Argentina y del país en su conjunto.

Claramente es un año atípico. La pandemia ha modificado todas las actividades previstas, tanto de investigación como de enseñanza, además de las personales. Y aunque tomó por sorpresa a la sociedad en general y a la clase política en particular, es claro que en la comunidad científica se hablaba sobre esta posibilidad. Al respecto, cabe mencionar al científico Vaclav Smil, quien en su libro *Global Catastrophes and Trends* del año 2008 mencionaba que “la posibilidad de una pandemia de influenza durante los próximos 50 años es virtualmente del 100 %”; al científico David Quammen, quien en su libro *Spillover* (2013) mencionaba que “el siguiente cataclismo provocado por una pandemia similar a las de 1918 sería más probablemente debido a un virus de origen animal”; al exdirector de la Oficina de Asistencia para Desastres Externos de Estados Unidos, Jeremy Konyndyk, quien escribió en un artículo de 2017 “una nueva gran crisis sanitaria global es una cuestión de cuándo, no de si”. También el virólogo Robert Webster quien en su libro *Flu Hunter: Unlocking the secrets of a virus* (2019) mencionó “una pandemia mortal y disruptiva es solo cuestión de tiempo”, y “la naturaleza eventualmente va a desafiar de nuevo a la humanidad con un equivalente al virus de la influenza de 1918”.

Claramente la gripe española o virus de la influenza de 1918 es un punto de referencia; producida por el virus H1N1, fue responsable de una pandemia entre 1918 a 1920 con un número estimado de 25 a 50 millones de muertos. Pero luego hubo otras pandemias. Así, podemos mencionar la gripe asiática de 1957, originaria de China con más de 1 millón de muertos; la gripe de Hong Kong de 1968 con un número similar de muertos; la gripe rusa de 1977; el HIV de 1977; el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) de 2002; la gripe aviaria de 2003, producida por la cepa H5N1; la gripe A o gripe porcina del 2009, producida por el Influenzavirus A (subtipo H1N1); el ébola, que desde su aparición en 1976 ha producido diversos brotes siendo el más importante el de 2014 a 2016. Y, permítanme aclarar, que este breve listado no está completo.

En 2015 en una charla TED, Bill Gates habló sobre la falta de políticas de preparación ante una posible pandemia causada por algún virus altamente infeccioso y bajo circunstancias que alienten su diseminación; y una vez más, presentó un modelo de los contagios que provocaría un virus como el de 1918. En un reportaje del *The Wall Street Journal*, instó a los candidatos presidenciales de las elecciones de Estados Unidos de 2016, a priorizar esfuerzos en preparativos ante una posible pandemia.

Estos mensajes y muchos otros, claramente no fueron escuchados.

Desde el encubrimiento inicial del Gobierno Chino, las dubitativas acciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la negación a la realidad de los diferentes actores políticos (en muchos casos llegando al ridículo), la falta de conocimiento y de búsqueda de información por parte de autoridades, sumado a un deterioro masivo de los sistemas de Salud a nivel mundial (con escasas excepciones), la superpoblación y la globalización como una realidad político social, generaron todos los ingredientes necesarios para el desarrollo incontrolable de esta pandemia. Lamentablemente, esto continúa, no sólo por la falta de capacidad de control y prevención, sino porque además se suman rebrotes en el mundo y la aparición de nuevas cepas debido a las mutaciones del virus.

La pandemia de COVID-19 (enfermedad producida por coronavirus del 2019), es ocasionada por el virus SARS-CoV-2 (coronavirus productor del síndrome respiratorio agudo grave tipo 2). La OMS la reconoció como una pandemia el 11 de marzo de 2020. Como resultado de lo sucedido, a fines de diciembre del 2020 se han informado unos 80 millones de casos en 254 países y territorios en el mundo, con alrededor de 1,8 millones de muertos. El impacto social y económico a nivel mundial ha sido devastador.

Desde la revista queremos expresar en este contexto, nuestro agradecimiento al personal de salud y demás intervinientes en la lucha contra la pandemia. Destacamos además el intenso trabajo de alumnos, exalumnos, docentes, investigadores y exdocentes de nuestra Facultad que participan en la primera línea de batalla contra esta enfermedad.

Como siempre, estamos a disposición de todas las consultas y/o sugerencias que los lectores y autores deseen hacernos llegar, esperando se traduzcan en beneficios para todos en su conjunto.

Agradecemos como con cada número, a la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, por el espacio en la web correspondiente.

Todos los números de nuestra revista se pueden descargar en forma gratuita desde nuestra dirección web <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/naturalia>.

Confiamos en la buena receptividad de *Naturalia Patagónica* entre nuestros lectores habituales y entre los lectores en general, que se interesen por la problemática de las Ciencias Naturales y las Ciencias de la Salud especialmente en el ámbito de la región, invitando además a que se continúen sumando autores regionales y de otras latitudes, enviando su producción científica para nuestro siguiente número.

A todos, Felices Fiestas!!!

Dr. Osvaldo León Córdoba - Director

A la memoria de MAHABIR PRASHAD GUPTA. Q.E.P.D. (1942-2020)

El Dr. Mahabir Prashad Gupta había nacido el 3 de octubre de 1942 en Gajsinghpur, India. En 1963 se licenció en Farmacia en la Universidad de Rajasthan, Pilani, India, y en 1965 obtuvo el título de Máster of Science en la Banaras Hindu University, Varanasi. Posteriormente, durante el período 1967-1971, realizó su tesis doctoral en la Universidad de Washington (Washington State University). Durante esos años además ejerció como Teaching Assistant. De 1971 a 1972 se trasladó a la Universidad de Múnich (Ludwig-Maximilians Unibversität München), desarrollando sus investigaciones postdoctorales en Química de Productos Naturales y Farmacognosia. En dicha universidad fue invitado por el Dr. Ceferino Sánchez Jorquera, español naturalizado panameño, Director en aquel tiempo de la Escuela de Farmacia y Farmacéutico del ámbito Iberoamericano, creador de la Facultad de Farmacia y Rector de la Universidad de Panamá, a incorporarse a la Escuela de Farmacia como Profesor de Farmacognosia. Es así que en 1972 el Dr. Gupta se fue a Panamá, con la condición de que le permitieran impartir sus clases en inglés, iniciando su extensa y fructífera trayectoria que llegó hasta la actualidad. Un año después ya daba sus clases en aceptable español, incorporando esta lengua a otros idiomas que dominaba (hindi, el dialecto local de su lugar de nacimiento, inglés y alemán).

Durante su extensa trayectoria académica, publicó 317 trabajos en revistas indexadas de impacto en sus áreas de investigación. Fue investigador pionero en etnobotánica, bioprospección, química de productos naturales y descubrimiento de fármacos de la biodiversidad tropical hispanoamericana.

En la Universidad de Panamá desarrolló importantes funciones de gestión en investigación y docencia. Fue fundador y al momento de su partida era Director, del Centro de Investigaciones Farmacognósticas de la Flora Panameña (CIFLORPAN), siendo además Investigador Profesor Emérito de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia, Universidad de Panamá.

Participó en el Programa Iberoamericano de Ciencia, Tecnología y Desarrollo (CYTED). Desde 1997 hasta 2004 fue Coordinador del Programa de Química Fina Farmacéutica y posteriormente Gestor del Área de Salud, desde 2011 a 2015. Fue además miembro de sociedades científicas reconocidas (American Association for the Advancement of Science, New York Academy of Sciences, American Society Pharmacognosy, Society for Medical Plants Research, Sigma Xi, Rho Chi). Su vasta trayectoria científica, fue merecedora de numerosos reconocimientos nacionales e internacionales; entre ellos, el International Science Cooperation Award 2003 de la American Association for the Advancement of Science, que le fue otorgado por sus continuos esfuerzos en la promoción de la cooperación

científica internacional, particularmente en Iberoamérica, así como por el estudio y la utilización de la biodiversidad como fuente de nuevos fármacos. Fue también reconocido por la Panamerican Health Organisation.

El Dr. Gupta, naturalizado panameño, partió el pasado 14 de diciembre, víctima de la Covid-19, dejando una huella enmarcada por su disposición constante a formar recursos humanos, su vasta experiencia y sabiduría y su pasión por la Farmacognosia y los Productos Naturales, fundamentalmente por la riqueza de plantas medicinales del exuberante trópico panameño. Llegue a todos sus familiares, colegas, amigos y quienes compartieron momentos de su vida, nuestro sentido homenaje.

Diciembre de 2020.

Dra. María Luján Flores – Dr. Osvaldo León Córdoba

CONTENIDO

NOTA CORTA

Avistaje de un Petrel Gigante Común <i>Macronectes giganteus</i> alimentándose en una laguna de agua dulce. Gabriel Punta y Sandro Sollazzo	01-05
--	-------

ARTICULOS CIENTIFICOS

Análisis de impacto presupuestario del palivizumab en la seguridad social de Costa Rica. Luis Guillermo Jiménez Herrera, Manuel Collazo Herrera, Ana M. Gálvez González	06-16
Cálculo de propiedades moleculares y predicción de bioactividad de un lactoeremofilano aislado de <i>Senecio filaginoides</i> DC. Luz Arancibia, Mariana Naspi	17-23
Características de frutos y semillas de especies nativas patagónicas con potencial para la restauración ecológica e interés multipropósito. Liliana Contardi, María Florencia Urretavizcaya.....	24-42
Aspectos biológicos de la ictiofauna del curso inferior del río Chubut (Patagonia, Argentina). Ana E. Ruiz y Ricardo R. Fondacaro.....	43-56
Alternativas para mejorar la disposición final de residuos domiciliarios de medicamentos. Romina I. Merino Valle, Rita R. Kurdelas, Adriana del Luján Mangani	57-64
Diseño de dispositivos para la determinación simultánea de cromo III y VI en multivitamínicos. Luis Eduardo Ojeda, Marianela Jaquelina Vega, Silvia Alejandra Miscoria	65-76
Primer registro de epiteliocistis en dos especies de peces de arrecifes rocosos en Golfo Nuevo (Chubut, Patagonia Argentina). Gabriela Nayla Novacovsky, Tamara Rubilar, María Cruz Sueiro	77-92
Análisis descriptivo de la utilización de inhibidores de la secreción ácida en pacientes adultos en un hospital público. Fernando Gabriel Olivares, Verónica Mabel Álvarez, María Monserrat Urgel y Oria, Hugo César Sepúlveda	93-110

Obtencion de Quitina y Quitosán por un método sustentable a partir de cáscaras de langostino. Virginia Pasotti, Adelaida Ávila, Marisa Martinelli	111-131
Perfil metabólico y actividad biológica de <i>Undaria pinnatifida</i> (Harvey) Suringar (Alariaceae) colectada en invierno en el Golfo San Jorge, Argentina. Diana Paula Quezada, María Luján Flores, Osvaldo León Córdoba	132-142
Mucílago de <i>Opuntia ficus indica</i> como potencial excipiente natural de productos cosméticos. Lisi Betiana Diez, Cristina Marisel Pérez Zamora, Ariel Germán Michaluk, María Beatriz Nuñez, Carola Analía Torres, Ana María Gonzalez.....	143-157
Evaluación del conocimiento sobre la utilización de la Anticoncepción Hormonal de Emergencia en alumnas de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Claudia Vera, Rosmary Cardozo, Fiamma Corna, Agustina Maza, Antonella D'Angelo, Marianela Robles, Andrea Carrizo, Camila Galarza, Sandra Alcalde Bahamonde, Analía Uhrich.....	158-167

TESIS DE DOCTORADO DE DOCENTES E INVESTIGADORES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO.

Reproducción y ecología trófica del opistobranquio <i>Pleurobranchaea</i> sp. en Golfo Nuevo, Chubut. Verena Diana Bökenhans	168-173
Distribución espacial de elefantes marinos y sus implicancias para el turismo y la recreación en Península Valdés y zonas adyacentes. María Belén González.....	174-179
Efecto del estrés físico y el calentamiento global sobre gasterópodos marinos de costas rocosas patagónicas. Rocío Aimé Nieto Vilela	180-189
Histología de la afección de <i>Phytophthora austrocedri</i> en los tejidos de conducción de <i>Austrocedrus chilensis</i>. Oscar Troncoso	190-194
Búsqueda de metabolitos bioactivos con aplicación farmacéutica en <i>Undaria pinnatifida</i> (Alariaceae), un alga parda invasora de las costas patagónicas argentinas. Miriam Delma Escobar Daza	195-200

CONTENTS

SHORT COMMUNICATIONS

A Southern Giant Petrel <i>Macronectes giganteus</i> feeding on a freshwater lagoon. Gabriel Punta y Sandro Sollazzo	1-5
---	-----

RESEARCH ARTICLES

Analysis of the budgetary impact of palivizumab at social security of Costa Rica. Luis Guillermo Jiménez Herrera, Manuel Collazo Herrera, Ana M. Gálvez González.....	06-16
Calculation of molecular properties and prediction of bioactivity of a lactoeremophilane isolated from <i>Senecio filaginoides</i> DC. Luz Arancibia, Mariana Naspi	17-23
Fruits and seeds characteristics of native Patagonian species with potential for ecological restoration and interest multipurpose. Liliana Contardi, María Florencia Urretavizcaya.....	24-42
Biological aspects of the ichthyofauna from the lower course of the Chubut River (Patagonia, Argentina). Ana E. Ruiz y Ricardo R. Fondacaro	43-56
Alternative options of improving household pharmaceutical waste disposal. Romina I. Merino Valle, Rita R. Kurdelas, Adriana del Luján Mangani.....	57-64
Devices design for the simultaneous determination of chromium III and VI in multivitamins. Luis Eduardo Ojeda, Marianela Jaquelina Vega, Silvia Alejandra Miscoria	65-76
First record of epitheliocystis in two fish species of rocky reefs in Golfo Nuevo (Chubut, Argentine Patagonia). Gabriela Nayla Novacovsky, Tamara Rubilar, María Cruz Sueiro	77-92
Descriptive analysis of the use of acid secretion inhibitors in adult patients in a public hospital. Fernando Gabriel Olivares, Verónica Mabel Álvarez, María Monserrat Urgel y Oria, Hugo César Sepúlveda	93-110
Obtaining of Chitin and Chitosan by a sustainable method from prawn shrimps. Virginia Pasotti, Adelaida Ávila, Marisa Martinelli.....	111-131

Metabolic profile and biological activity of <i>Undaria pinnatifida</i> (Harvey) Suringar (Alariaceae) collected at winter in the golfo San Jorge, Argentina. Diana P. Quezada, María L. Flores, Osvaldo L. Córdoba.....	132-142
Mucilage of <i>Opuntia ficus indica</i> as natural excipient potential of cosmetic products. Lisi Betiana Diez, Cristina Marisel Pérez Zamora, Ariel Germán Michaluk, María Beatriz Nuñez, Carola Analía Torres, Ana María Gonzalez.....	143-157
Assessment of the knowledge on the use of the Hormonal Emergency Anticonception in students of the Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Claudia Vera, Rosmary Cardozo, Fiamma Corna, Agustina Maza, Antonella D'Angelo, Marianela Robles, Andrea Carrizo, Camila Galarza, Sandra Alcalde Bahamonde, Analía Uhrich.....	158-167

**THESIS PHILOSOFICAL DOCTOR DEGREE OF RESEARCH OF THE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y CIENCIAS DE LA SALUD
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN
BOSCO.**

Reproduction and trophic ecology of <i>Pleurobranchaea</i> sp. (Opisthobranchia) in Golfo Nuevo gulf, Patagonia, Argentina. Verena Diana Bökenhans	168-173
Spatial distribution of southern elephant seal and its implications for tourism and recreation in Península Valdés and adjacent areas. María Belén González.....	174-179
Physical stress and global warming effects in Patagonian rocky intertidal gastropods. Rocío Aimé Nieto Vilela.....	180-189
Histology of <i>Austrocedrus chilensis</i> conduction tissues affected by <i>Phytophthora austrocedri</i>. Oscar Troncoso	190-194
Search for bioactive metabolites with pharmaceutical application in <i>Undaria pinnatifida</i> (Alariaceae), an invasive brown algae from the patagonian coast of Argentina. Miriam Delma Escobar Daza	195-200

Nota corta

Avistaje de un Petrel Gigante Común *Macronectes giganteus* alimentándose en una laguna de agua dulce

A Southern Giant Petrel *Macronectes giganteus* feeding on a freshwater lagoon

Gabriel Punta^{1, 2 *} y Sandro Sollazzo¹

¹Secretaría de Pesca de la Provincia del Chubut, Avenida Libertad 279, (U9103HEC) Rawson, Chubut, Argentina.

²Instituto de Investigaciones en Hidrobiología, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Gales 48, (U9100CKN) Trelew, Chubut, Argentina.
gabriel.punta@gmail.com

PALABRAS CLAVE: Petrel Gigante Común, laguna de agua dulce, alimentación.

El orden Procellariiformes constituye uno de los pocos grupos de aves marinas cuyas especies son todas exclusivamente marinas y se hallan muy bien adaptadas a un estilo de vida altamente pelágico (Harper y Kinsky, 1978; Harrison, 1985). De las 70 especies correspondientes a la familia Procellariidae (Carboneras, 1992) la gran mayoría se alimenta solamente mar adentro (Warham, 1990, 1996) y tan sólo cuatro pertenecientes al grupo de los fulmares, las dos de Petreles Gigantes

Macronectes spp., el Petrel de las Nieves *Pagodroma nivea* y el Fulmar Antártico *Fulmarus glacialis* han sido observadas alimentándose en tierra (Genevois y Chastel, 1991). En esta nota reportamos un comportamiento alimentario jamás observado para especie alguna de la familia y del orden, un Petrel Gigante Común *M. giganteus*, alimentándose tierra adentro en una laguna de agua dulce.

Las dos especies de Petrel Gigante son las únicas entre los Procellariidae capaces de caminar vigorosa, aunque torpemente, en tierra y de esta forma explotar en altas proporciones presas terrestres, especialmente carroña de pingüinos y de mamíferos marinos (Johnstone, 1977; Voisin, 1991; Hunter y Brooke, 1992; Ridoux, 1994). En el mar los Petreles Gigantes capturan sus presas mayormente posados en la superficie, pero también zambulléndose y buceando en aguas someras (Harper *et al*, 1985; Punta y Herrera, 1995). En las costas de la Provincia del Chubut, donde existen dos colonias de cría de Petrel Gigante Común (Humphrey y Livezey, 1983; Punta y Saravia, 1991), es muy común observar ejemplares de esta especie recorriendo la línea costera, incluso playas y puertos (Canevari y Narosky, 1995), en busca de alimento.

El día 9 de julio de 2013, siendo aproximadamente los 16,10 h se observó un individuo de Petrel Gigante Común en la Laguna del Ornitólogo (43° 14,6'S y

65° 14,5'O). Esta laguna es un cuerpo de agua permanente, de forma aproximadamente elipsoidal y de alrededor de 114 ha de superficie, que se mantiene por el aporte antrópico proveniente del volcado de aguas de los sistemas pluviales y cloacales de la Ciudad de Trelew. Se encuentra a una distancia mínima de 16 km de la costa marítima más cercana (zona norte de Bahía Engaño) y forma parte de un sistema de cinco lagunas interconectadas que ocupan una superficie total de alrededor de 650 ha. Las aves de estas lagunas se estudiaron durante veinticinco meses entre julio de 1993 y julio de 1995, y en ningún caso se observaron Petreles Gigantes en las proximidades (Punta y Herrera, 2009).

El ejemplar observado se hallaba posado en el agua, próximo a la descarga del caño de aguas residuales, alimentándose mediante la técnica de captura desde la superficie flotando y nadando, donde se lo fotografió (Figura 1).



Figura 1. El Petrel Gigante Común nadando activamente en busca de alimento.
Figure 1. The Southern Giant Petrel swimming actively in search of food.

Esta técnica es la más común dentro del orden y particularmente dentro de la familia (Prince y Morgan, 1987). Su coloración era completamente oscura, lo cual sugiere que se trataba de un ejemplar joven (Narosky e Izurieta, 2010), y en todo momento durante los sesenta minutos que duró nuestra presencia en el sitio su actividad fue la de búsqueda y captura de alimento. En ese mismo lugar se hallaba un grupo de unas treinta Gaviotas Capucho Café *Larus maculipennis* alimentándose a su alrededor mediante las técnicas de tomar la presa mientras vuelan cerca de la superficie o posadas en ella. Grupos de ejemplares de esta especie de

gaviota se hallan en forma casi permanente en ese lugar alimentándose. Considerando que el hábitat alimentario de al menos las tres cuartas partes de los géneros de la familia de los Proceláridos es principalmente pelágico (Ashmole, 1971), resulta muy llamativo observar un petrel tierra adentro y mucho más aún verlo alimentarse en una laguna de agua dulce. Incluso los petreles más frecuentemente avistados en aguas costeras como los Petreles Gigantes parecen evitar adentrarse más allá de la línea de costa (Voisin, 1982). No obstante, si algún Procelariforme fuera más proclive a alimentarse en zonas continentales relativamente cercanas a las costas

marinas, ese sería el Petrel Gigante Común, ya que es la más “terrestre” de las especies de la familia de los Proceláridos y sus colonias de cría en Chubut son las más próximas a una masa continental, exceptuando las antárticas. Además exhibe la más grande plasticidad alimentaria dentro de la familia y el orden en lo que se refiere a la combinación de utilización de diferentes zonas marinas (Hunter, 1983, 1984), distintas técnicas de captura (Harper, 1987) y variados grupos de presas consumidos (Conroy, 1972), llegando inclusive a ingerir desechos como en la presente ocasión.

Sin embargo, es probable que el Petrel Gigante Común avistado fuese un

ejemplar juvenil desorientado, cansado y hambriento que se sintió atraído por el comportamiento alimentario de las gaviotas y trató de obtener alimento en un lugar extremadamente inusual para su especie.

AGRADECIMIENTOS

A la memoria de Vera y Folmer Fauring quienes nos brindaron su colaboración y amistad inalterable durante veinticinco años y nos transmitieron su amor por la naturaleza, el estudio y la conservación de las aves marinas, especialmente los Petreles Gigantes.

BIBLIOGRAFIA

- Ashmole, N. P. 1971. Sea bird ecology and the marine environment. Pp. 223–286 in Farner, D. S., J. K. King & K. C. Parkes (Eds). Avian Biology. Volume 1. Academic Press, New York. USA.
- Canevari, P. & T. Narosky. 1995. Cien aves argentinas. Ed. Albatros, Buenos Aires. Argentina.
- Carboneras, C. 1992. Family Procellariidae (Petrels and Shearwaters). Pp. 216–257 in del Hoyo, J., A. Elliott & J. Sargatal (Eds), Handbook of the birds of the world. Volume 1: Ostrich to ducks. Lynx Edicions, Barcelona, Spain.
- Conroy, J. W. H. 1972. Ecological aspects of the biology of the Giant Petrel, *Macronectes giganteus* (Gmelin), in the maritime Antarctic. Br. Antarct. Surv. Sci. Rep. 75: 1–74.
- Genevois, F. & O. Chastel. 1991. An Antarctic Fulmar *Fulmarus glacialis* feeding on land. Marine Ornithology 19: 136–138.
- Harper, P. C. 1987. Feeding behaviour and other notes on 20 species of Procellariiformes at sea. Notornis 34: 169–192.
- Harper, P. C. & F. C. Kinsky. 1978. Southern Albatrosses and Petrels. Victoria University Press, Victoria. New Zealand.
- Harper, P. C., J. P. Croxall & J. Cooper. 1985. A guide to foraging methods used by marine birds in Antarctic and subantarctic seas. BIOMASS Handbook, N° 24, Sci. Com. Antarc. Res., Cambridge. U.K.
- Harrison, P. 1985. Seabirds: An identification guide. Christopher Helm Ltd., London. U.K.
- Humphrey, P.S. & B.C. Livezey. 1983. Giant Petrels *Macronectes giganteus* nesting in Chubut, Argentina. Gerfaut 73: 3–8.
- Hunter, S. 1983. The food and feeding ecology of the Giant Petrels *Macronectes halli* y *M. giganteus* at South Georgia. J. Zool., Lond. 200: 521–538.

- Hunter, S. 1984. Movements of giant petrels *Macronectes* spp. ringed at South Georgia. *Ringling & Migration* 5: 105–112.
- Hunter, S. & M. de L. Brooke. 1992. The diet of Giant Petrels *Macronectes* spp. at Marion Island, Southern Indian Ocean. *Colonial Waterbirds* 15: 56–65.
- Johnstone, G. W. 1977. Comparative feeding ecology of the giant petrels *Macronectes giganteus* y *Macronectes halli*. Pp. 647–668 in Llano, G. A. (Ed). *Proceedings of the 3rd SCAR Symposium on Antarctic Biology*. Gulf Publications, Houston, Texas. USA.
- Narosky, T. & D. Yzurieta. 2010. *Aves de Argentina y Uruguay. Guía de identificación*. Edición total. Vázquez Mazzini, Buenos Aires. Argentina.
- Prince, P. A. & R. A. Morgan. 1987. Diet and feeding ecology of Procellariiformes. Pp. 135–171 in Croxall, J. P. (Ed) 1987. *Seabirds: feeding ecology and role in marine ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge. U.K.
- Punta, G. & J. Saravia. 1991. A newly discovered colony of Southern Giant Petrels *Macronectes giganteus* on Isla Gran Robredo, Chubut Province, Argentina. *Marine Ornithology* 19: 131–133.
- Punta, G. & G. Herrera. 1995. Predation by Southern Giant Petrels *Macronectes giganteus* on adult Imperial Cormorants *Phalacrocorax atriceps*. *Marine Ornithology* 23: 166–167.
- Punta, G. & G. Herrera. 2009. Avifauna de las lagunas de la Ciudad de Trelew. *Resúmenes I Jornada Patagónica de Biología y III Jornadas Estudiantiles de Ciencias Biológicas*. Trelew.
- Ridoux, V. 1994. The diets and dietary segregation of seabirds at the subantarctic Crozet Islands. *Marine Ornithology* 22: 1–192.
- Voisin, J. -F. 1982. Observations on the Falkland Islands Giant Petrels *Macronectes giganteus solanderi*. *Gerfaut* 72: 367–380.
- Voisin, J. -F. 1991. Sur le régime et l'écologie alimentaires des Pétrels géants *Macronectes halli* y *M. giganteus* de l'archipel Crozet. *Oiseau Revue Française d'Ornithologie* 61: 39–49.
- Warham, J. 1990. The petrels. Their ecology and breeding systems. Academic Press Ltd., London. U.K.
- Warham, J. 1996. The behaviour, population biology and physiology of the petrels. Academic Press Ltd., London. U.K.

Análisis de impacto presupuestario del palivizumab en la seguridad social de Costa Rica

Analysis of the budgetary impact of palivizumab at social security of Costa Rica

¹Luis Guillermo Jiménez Herrera, ²Manuel Collazo Herrera, ³Ana M. Gálvez González

¹Universidad de Costa Rica / Facultad de Farmacia, Instituto de Investigaciones Farmacéuticas INIFAR, San José, Costa Rica, *luis.jimenezherrera@ucr.ac.cr.

²INHEM, La Habana, Cuba, manuel@inhem.sld.cu

³ENSAP, Departamento de Economía, La Habana, Cuba, galveza@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: El palivizumab es un anticuerpo monoclonal de alto costo y uso limitado. Se estima, la generalización de la terapia inmunológica en la Seguridad Social de Costa Rica. **Objetivo:** realizar el análisis de impacto presupuestario del palivizumab en la Seguridad Social en el periodo 2018-2021. **Métodos:** el análisis bajo la perspectiva de la Seguridad Social (2018-2021) y los siguientes supuestos: número de nacimientos estable cada año, tasa de inflación cero, tasa cero de descuento, terapia inmunoprofilaxis gradual (10%, 50%, 75%, 100%), el financiamiento por la Seguridad Social y los costos totales promedio del tratamiento según el nivel de costos propuestos. **Resultados:** los costos propuestos en el modelo generan un aumento en el presupuesto general de la Seguridad Social en el rubro de los medicamentos entre el 1 y 14%, el aumento menor se da tras considerar los costos del periodo 2013-2017: 2.858.744 USD en 2018, 22.987.440 USD en 2021; estos datos guardan relación con el análisis de sensibilidad, en el que se propone una reducción en el precio del palivizumab que produce una variación total en los costos de un 1%. **Conclusiones:** La introducción gradual de palivizumab en Costa Rica aumenta los costos al presupuesto general según el escenario que se seleccione, estos deben ser valorados por los tomadores de decisiones.

PALABRAS CLAVE: análisis, presupuesto, monoclonal, palivizumab, Costa Rica.

ABSTRACT

Introduction: palivizumab is a monoclonal antibody of high cost and limited use. The generalization of immunological therapy at Costa Rican Social Security is estimated. **Objective:**

to carry out the budgetary impact analysis of palivizumab on Social Security in the period 2018-2021. Methods: analysis from the perspective of Social Security (2018-2021) and the following assumptions: stable number of births each year, zero inflation rate, zero discount rate, gradual immunoprophylaxis therapy (10%, 50%, 75%, 100%), financing by Social Security and the average total costs of treatment according to the level of costs proposed. Results: the costs proposed in the model generate an increase in the general budget of Social Security in the field of medicines between 1 and 14%, the lower increase occurs after considering the costs of the period 2013-2017: 2.858.744 USD in 2018, 22.987.440 USD in 2021; these data are related to the sensitivity analysis, which proposes a reduction in the price of palivizumab that produces a total variation in costs of 1%. Conclusions: The gradual introduction of palivizumab in Costa Rica increases the costs to the general budget according to the scenario that is selected, these should be valued by decision makers.

KEY WORDS: analysis, budget, monoclonal, palivizumab, Costa Rica.

INTRODUCCIÓN

El palivizumab es un anticuerpo monoclonal o una tecnología sanitaria de alto costo que se utiliza con carácter profiláctico y de uso limitado, en prematuros con enfermedad de displasia broncopulmonar y cardíaca congénita hemodinámicamente estable, prematuros con bajo peso al nacer y con factores de riesgo; entre los que destacan una condición socioeconómica desfavorable o baja, el hacinamiento, la exposición al humo del fumado y la presencia en el hogar de otros niños en edad escolar (Fernández *et al*, 2016; AAPC, 2014; Broadbent *et al*, 2015).

Con el uso de palivizumab, se pretende prevenir o disminuir las consecuencias que pueden derivar por la infección con el virus sincitial respiratorio, un agente

causal de bronquiolitis y neumonía que puede causar la muerte; por lo que se aplica una dosis cada mes durante la estación de mayor circulación del virus, en un régimen que puede contemplar desde una y hasta cinco dosis por prematuro (Griffiths *et al*, 2017; Capizzi *et al*, 2016; Nolan *et al*, 2015).

Para saber por primera vez, respecto a la eficiencia (Choueiry *et al*, 2016; Pérez *et al*, 2017; Rojas, 2017) en el uso de este tratamiento inmunológico desde su inicio en 2008 en Costa Rica, se realizó un análisis de costo efectividad o evaluación económica completa, en el periodo 2010-2017 tras comparar esta terapia innovadora contra la práctica clínica habitual en la Seguridad Social de Costa Rica (Jiménez *et al*, 2020a; Jiménez *et al*, 2020b).

Asimismo, se hace necesario e imprescindible complementar esa valoración mediante el análisis de este impacto presupuestario, para conocer el posible impacto que podría causar la generalización de esta terapia sobre el presupuesto en la Seguridad Social.

El análisis de impacto presupuestario, no es un análisis económico *persé* y se basa especialmente en principios de contabilidad, por lo que se constituye en un elemento decisorio complementario a la evaluación económica completa que se realizó; de modo que ayudar a priorizar, visualizar y planificar los recursos disponibles de esta intervención sanitaria específica a un grupo mayor de prematuros que la pueden necesitar, con lo que se puede disminuir el uso limitado, se puede favorecer la eficiencia y el uso con equidad (Andino *et al*, 2017).

Debido a la incertidumbre respecto al futuro, es necesario que se recurra al uso de supuestos para prever los recursos financieros suficientes que implica el costo de esa intervención, lo que requiere de la creación de los posibles escenarios que permiten visualizar el comportamiento financiero tras una introducción generalizada de la terapia inmunológica con palivizumab en la Seguridad Social de Costa Rica (Brosa *et al*, 2015).

De modo que, el objetivo de este trabajo fue realizar un análisis de impacto presupuestario por el uso profiláctico de la inmunoterapia con palivizumab en la Seguridad Social en el periodo 2018-2021 tras la introducción gradual del medicamento.

MATERIALES Y MÉTODOS

El punto inicial del análisis de impacto presupuestario (Caballero, 2017), lo constituye el escenario actual; el cual, surge a partir de los datos epidemiológicos de los registros estadísticos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos de Costa Rica. También, se consideraron los costos que se obtuvieron de la evaluación económica completa de costo-efectividad (2010-2017) que se realizó de previo y en la que se comparó la alternativa innovadora (palivizumab) versus la práctica clínica habitual. En esa evaluación completa, se generaron los costos para dos periodos: a) 2010-2017, en este lapso de tiempo, se establecieron costos para tres sub grupos de prematuros acorde con la edad gestacional, a saber (1) < 32 semanas, (2) 32-35 semanas (2) y (3) > 35 semanas, b) (4) 2013-2017, en este periodo se incluyeron todos lo prematuros y el uso de la inmunoterapia se realiza de forma exclusiva en el único hospital especializado en niñez en el país.

El análisis del impacto presupuestario, se realizó desde la perspectiva de la Seguridad Social de Costa Rica, con un horizonte temporal para el periodo 2018-2021. En el escenario actual, se estableció la población meta y a partir de esta, surge la pretensión de generalizar el uso de la terapia con palivizumab. Para ello, se establecieron los siguientes aspectos: la natalidad promedio anual en Costa Rica de aproximadamente 70.000 niños; de ese grupo de niños que nacen, se conoce que en promedio un 10% presentan bajo peso al nacer ($n=7.000$) y de estos, un 3% ($n=250$) pueden ser potenciales candidatos al uso del palivizumab tras el diagnóstico de displasia broncopulmonar y cardíaca congénita hemodinámicamente estable y la presencia de los factores de riesgo de contraer la infección con el virus sincitial respiratorio.

Asimismo, se tomaron en cuenta los siguientes supuestos: a) Por indicación: la población prematura o cantidad de niños prematuros con enfermedad pulmonar o displasia pulmonar y con enfermedad cardíaca congénita hemodinámicamente, se mantiene estable en el tiempo; b) Respecto a la adherencia terapéutica: se supone que todos los niños prematuros, utilizarán la terapia profiláctica tras la aplicación de 1-5 dosis por niño, por estación año, según el peso y la semana gestacional; c) Temporal: Pérdida cero de

volumen de palivizumab, ausencia de reacciones adversas; d) Poblacional: Cero aumento de prematuros debido al crecimiento natural poblacional; e) Probabilidad de requerir otros ajustes por otros motivos inesperados.

Se consideró los costos directos que derivan de la implantación de la terapia inmunológica y para ello, se establecieron las siguientes consideraciones: a) Precio promedio del medicamento según patrón histórico corresponde a 1.100 USD cada bulbo, b) Financiamiento total por parte de la Seguridad Social, c) Los costos, se establecieron en dólares americanos (USD) al tipo de cambio del 2018, d) Efecto de la inflación: 0% anual, d) Costos directos de las hospitalizaciones, consulta médica, aplicación de la terapia inmunológica, prueba diagnóstica del virus sincitial respiratorio e) Se establecieron varios escenarios para la generalización anual gradual de la terapia, con una cobertura del: 10%, 50%, 75% y 100% de la población meta.

Se calculó, el costo promedio para cada año del estudio y de los cuatro años de este análisis (2018-2021), al considerar la introducción gradual de la terapia en los cuatro niveles de costos y también, se calculó la proporción de este con respecto al rubro aproximado de gastos de medicamentos en la Seguridad Social al

año 2017, con un supuesto aproximado de 300.000.000 USD.

El procesamiento de los datos se realizó mediante el uso del programa de Microsoft Excel.

Se realizó un análisis de sensibilidad de una vía, al considerar como único cambio del producto, la reducción del precio del palivizumab en un 77%, esto en concordancia con una propuesta de la Organización Mundial de la Salud para la fabricación de un producto biosimilar con un precio aproximado de 250 USD (Giersing *et al*, 2017). Mientras, se mantuvieron constantes los costos de los otros aspectos, donde destacan en orden de mayor a menor implicancia en los costos: hospitalización, otros medicamentos, consulta médica, aplicación de la terapia. Para la interpretación de los resultados, se consolidó la información y se mantienen

todos los principios bioéticos que rigen la investigación biomédica, en especial, los aspectos de confidencialidad y anonimato de los datos. El Comité de Bioética Central de la Seguridad Social autorizó la realización de este análisis. Se declara que no existen conflictos de intereses.

RESULTADOS

En la tabla I, se muestran los costos totales del tratamiento del uso de la terapia inmunológica con palivizumab, los cuales provienen del análisis costo efectividad que se realizó según el periodo que se estableció y que corresponden con el escenario actual. El costo de la hospitalización, se constituye en el rubro de mayor peso en los costos totales del tratamiento, sigue palivizumab, otros medicamentos y la consulta médica.

Tabla I: Costos totales del tratamiento (USD) con palivizumab según periodo.

Costos	Periodo 2010-2017			Periodo 2013-2017 (4)
	<32 semanas (1)	32-35 semanas (2)	> 35 semanas (3)	
Hospitalización	13.338.278	1.244.330	795.570	6.108.473
Otros medicamentos	32.950	4.449	1.559	12.819
Prueba diagnóstica	5.712	486	234	2.797
Consulta médica	20.991	3.190	628	5.524
Aplicaciones IM	1.869	530	152	1.374
Palivizumab	502.843	74.307	18.192	82.473
Escenario actual	13.902.643	1.327.292	816.335	6.213.460

Fuente: Eficiencia del palivizumab en la Seguridad Social de Costa Rica. 2019.

Como se observan en la tabla II, en el escenario actual y al considerar, dentro de los aspectos epidemiológicos a partir de una natalidad promedio de 70.000 niños, de los cuales unos 7.000 niños pueden nacer con bajo peso y sufrir también, las

condiciones de riesgo que les sitúen en candidatos del uso de la terapia inmunológica, en un rango de una cantidad entre 56 y 560 prematuros por año.

Tabla II: Escenario actual.

Datos epidemiológicos	Costos promedio del tratamiento con palivizumab
Datos de interés	Costo promedio < 32 semanas de edad gestacional
\$70.000 nacimientos por año	Costo total /Número total de prematuros
10 % prematuros = 70.000 nacimientos por año	13.902.643 USD /170 = 81.780 USD
10% bronquiolitis por el VSR = 700	Costo promedio 32-35 semanas de edad gestacional
2-5% hospitalizados = 14-35	1.327.292 USD/26= 51.049 USD
10% en epidemia = 70 60-80% VSR = 420-560	Costo promedio > 35 semanas
15-20% hospitalizados = 105-140	816.325 USD / 4=204.081 USD
Profilaxis anual generalizada 70-560 prematuros	Costo total promedio 2013-2017
10% (56), 50% (280), 75% (420), 100% (560)	6.213.460 USD /38 = 163.512 USD

Fuente: Elaboración propia. Eficiencia del palivizumab en la Seguridad Social de Costa Rica. 2019.

En la tabla III, se tiene que los costos aumentan de forma gradual en cada escenario de costos propuestos (1,2,3,4) según el periodo en estudio (2018-2021); donde el costo menor correspondió al periodo 2013-2017 (nivel de costos 4) y el costo mayor, al de los prematuros de < 32

semanas de edad gestacional (nivel de costos 1). Asimismo, se tiene que la generalización de la terapia inmunológica con palivizumab tiene una implicación de un aumento en el presupuesto institucional entre un 1 y 14%.

Tabla III: Costos totales USD para cada escenario propuesto según año de implementación.

Escenarios por nivel de costos	2018	2019	2020	2021	P	DE
1	11.428.536	57.142.680	85.714.020	114.285.360	67.142.649	43.861.117
2	9.156.672	45.783.360	68.675.040	91.566.720	53.795.448	35.142.022
3	4.579.680	22.898.400	34.347.600	45.796.800	26.905.620	17.576.169
4	2.858.744	14.293.720	21.440.580	22.987.440	15.395.121	9.175.415
Total	28.023.632	140.118.160	210.177.240	274.636.320	163.238.838	105.562.510
P	7.005.908	7.005.908	52.544.310	68.659.080		
DE	3.969.508	19.847.539	29.771.308	41.693.724		
% RPI	1%	7%	10%	14%		

P: Promedio, DE: Desviación estándar, %RPI: respecto al presupuesto supuesto de 300.000.000 USD.

Fuente: Elaboración propia. Eficiencia del palivizumab en la Seguridad Social de Costa Rica. 2019.

Para valorar la robustez del modelo, se realizó un análisis de sensibilidad al suponer una reducción promedio de un 77% en el precio del palivizumab en concordancia con una propuesta de la Organización Mundial de la Salud,

también se consideró constante el resto de los costos. Tal y como se observa en la tabla IV, el porcentaje de menor variación ocurre en el periodo 2013-2017, lo que es consistente con los resultados del modelo.

Tabla IV: análisis de sensibilidad de costos totales (USD) al reducir el precio según periodo.

Costos	Periodo 2010-2017			2013-2017
	<32 semanas	32-35 semanas	> 35 semanas	
Hospitalización	13.338.278	1.244.330	795.570	6.108.473
Otros medicamentos	32.950	4.449	1.559	12.819
Prueba diagnóstica	5.712	486	234	2.797
Consulta médica	20.991	3.190	628	5.524
Aplicaciones IM	1.869	530	152	1.374
Palivizumab (-77%)	115.654	17.091	4.182	18.969
Costo total	13.411.454	1.270.076	802.325	6.148.956
Situación actual	13.902.643	1.327.292	816.335	6.213.460
Diferencia	491.189	57.216	14.010	64.878
Reducción	4%	4%	2%	1%

Fuente: Eficiencia del palivizumab en la Seguridad Social de Costa Rica. 2019.

DISCUSIÓN

No se encontró ningún artículo científico en Costa Rica semejante a este estudio que

permita comparar los resultados que se obtuvieron.

Los resultados de este trabajo concuerdan con la evidencia resultante de la

evaluación económica completa (periodo 2013-2017) en la que se mostró que el palivizumab tiene un uso que es más eficiente en el grupo de los prematuros de < 35 semanas de edad gestacional; no obstante, su generalización depende de la valoración de los beneficios que se obtienen con la inmunoterapia y de los costos asociados que se obtuvieron para este análisis de impacto presupuestario.

Otro aspecto a destacar, se relaciona con el hecho de que, en Costa Rica durante el periodo 2010 al 2017, se identificó a 446 prematuros que recibieron el palivizumab, con un costo total de 1.218.316 USD para la Seguridad Social. Sin embargo, en el estudio de análisis costo efectividad, solo se encontró el expediente clínico como fuente de los datos de un grupo de 200 prematuros y esos datos, se constituyeron en la fuente principal de datos de costos que permitieron la realización de este análisis, de ahí que esa limitación también se extiende a este estudio.

Al ser una muestra no representativa, los resultados de este análisis no se pueden extrapolar, aunque permiten visualizar desde una forma general, la realidad concreta del contexto costarricense y aporta insumos que pueden ser de utilidad para la toma de decisiones en la Seguridad Social de Costa Rica.

El palivizumab es el único anticuerpo monoclonal, una tecnología sanitaria

disponible en el tratamiento profiláctico contra el virus sincitial respiratorio y su uso continua, esto a pesar de que el costo puede representar un desafío para la sostenibilidad de un sistema de salud (Tetteh y Morris, 2014; Caetano *et al*, 2017; Kahveci *et al*, 2017; Nunes *et al*, 2017; Luna *et al*, 2020).

El análisis de impacto presupuestario, se convierte en una herramienta que complementa el análisis costo efectividad (Krilov *et al*, 2011) donde se evidencia que el costo en la inversión de adquisición y aplicación de la terapia inmunológica, se puede ver compensada en la reducción de la severidad del virus sincitial respiratorio y por larga estancia en los servicios de hospitalización (Sruamsiri *et al*, 2018).

El uso de palivizumab en infantes con fibrosis quística bajo un programa hipotético en Canadá para la profilaxis del virus sincitial respiratorio evidencia que el impacto presupuestario anual es de 1.400.000 dolares canadienses, considerado como un impacto presupuestario relativamente pequeño (McGirr *et al*, 2017).

CONCLUSIONES

La posible generalización gradual del uso de la terapia profiláctica contra el virus sincitial respiratorio mediante el uso de la inmunoterapia con palivizumab en prematuros en la Seguridad Social de

Costa Rica, genera un aumento en el presupuesto en el rubro de los medicamentos que deben valorar los tomadores de decisiones y sopesar el costo versus los beneficios que se obtienen.

BIBLIOGRAFÍA

American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. 2014. Updated Guidance for Palivizumab prophylaxis among infants and young children at increased risk of hospitalization for respiratory syncytial virus infection. *PEDIATRICS*, 134 (2): 415-20. <http://pediatrics.aappublications.org/content/pediatrics/134/2/415.full.pdf>

Andino, T., Anchundia, J., Bailón, M. 2017. Observaciones en torno a la economía en salud. *Dominio de las Ciencias*, 3(1): 152-62. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5907386>

Broadbent, L., Groves, H., Shields, M., Power, U. 2015. Respiratory syncytial virus, an ongoing medical dilemma: an expert commentary on respiratory syncytial virus prophylactic and therapeutic pharmaceuticals currently in clinical trials. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 9 (4): 169-78. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/irv.12313>

Brosa, M., Gisbert, R., Rodríguez, M., Soto, J. 2015. Principios, métodos y aplicaciones del análisis presupuestario en el sector sanitario. *Pharmacoeconomics Spanish Research*, 2 (2): 65-78. <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF03320900>

Caballero, S. 2017. Impacto presupuestario de la vacunación universal del Meningococo B en

AGRADECIMIENTOS

Al personal de las instituciones involucradas: Universidad de Costa Rica y Seguridad Social de Costa Rica.

España. España, Universidad Carlos III. https://e-archivo.uc3m.es/bitstream/handle/10016/26012/TFM_MESAM_Silvia_Caballero_2016.pdf?sequence=1

Caetano, R., Silva, R. M. D., Pedro, É. M., Oliveira, I. A. G. D., Biz, A. N., & Santana, P. (2017). Incorporation of new medicines by the National Commission for Incorporation of Technologies, 2012 to June 2016. *Ciencia & saúde coletiva*, 22: 2513-2525. <https://www.scielo.org/article/csc/2017.v22n8/2513-2525/en/>

Capizzi, A., Silvestri, M., Orsi, A., Cutrera, R., Rossi, G.A., Sacco, O. 2017. The impact of the recent AAP changes in palivizumab authorization on RSV-induced bronchiolitis severity and incidence. *Italian journal of pediatrics*, 43 (1): 71-5.

<https://ijponline.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13052-017-0390-8>

Choueiry, E., Gerbaka, B., Hanna, N., Fenianos, 2016. A. Cost effectiveness of palivizumab in prevention against RSV hospitalizations in risk groups. *J. Pediatr. Care*, 2 (3): 19. <http://pediatrics.imedpub.com/costeffectiveness-of-palivizumab-in-prevention-against-rsv-hospitalizations-in-risk-groups.php?aid=17550>

Fernández, S., Albas, D., Satragno, D., Cat-taino, A., Martin, M., Rubio, C., Nieto, R. 2016. Recomendaciones sobre el uso de palivizumab. Actualización 2015. *Arch Argent Pediatr*, 114 (1): 84-8.

- <https://www.sap.org.ar/uploads/consensos/recomendaciones-sobre-el-uso-de-palivizumab-nbsactualizaci-oacuten-2015.pdf>
- Giersing B, Karron R, Vekemans J, Kaslow D, Moorthy V. 2017. Meeting report: WHO consultation on respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development, Geneva, 25–26 april 2016. *Vaccine*, 37(50): 7355-7362. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X17302931>
- Griffiths, C., Drews, S., Marchant, D. 2017. Respiratory syncytial virus: infection, detection, and new options for prevention and treatment. *Clin Microbiol Rev*, 30 (1): 277-319. <https://cmr.asm.org/content/cmr/30/1/277.full.pdf>
- Jiménez, L., Collazo, M., Gálvez, M. 2020a. Costo-efectividad incremental del palivizumab en prematuros en la Seguridad Social de Costa Rica. 2010-2017. *Revista Horizonte sanitario*, 19 (2): 195-207. <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/artcile/view/367/0>
- Jiménez, L., Collazo, M., Gálvez, M. 2020b. Valoración económica del palivizumab en prematuros en la Seguridad Social en Costa Rica 2013-2017. *Revista Cubana de Farmacia*, 53(2): 1-23. DOI: 10.19136/hs.a19n2.3623
- Kahveci, R., Koç, E. M., & Küçük, E. Ö. (2017). Health technology assessment in Tur-key. *International Journal of Technology Assessment in Health Care*, 33(3): 402-10. <https://search.proquest.com/openview/7979f609c2698ab756a5a3fa8fed09fe/1?pq-origsite=gscholar&cbl=36708>
- Krilov, L., Palazzi, D., Fernandes, A. W., Klein, R., & Mahadevia, P. J. (2011). The value of budget impact analyses in evaluating targeted therapies. The case of RSV prophylaxis for preterm infants. *Value in Health*, 14(1): 201-202. [https://www.valueinhealthjournal.com/article/S1098-3015\(10\)00002-1/fulltext](https://www.valueinhealthjournal.com/article/S1098-3015(10)00002-1/fulltext)
- Luna, M. S., Manzoni, P., Paes, B., Baraldi, E., Cossey, V., Kugelman, A., & Carbonell-Estrany, X. (2020). Expert consensus on palivizumab use for respiratory syncytial virus in developed countries. *Paediatric respiratory reviews*, 33: 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2018.12.001>
- McGirr, A. A., Schwartz, K. L., Allen, U., Solomon, M., & Sander, B. (2017). The cost-effectiveness of palivizumab in infants with cystic fibrosis in the Canadian setting: a decision analysis model. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 13(3): 599-606. <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/21645515.2016.1235670>
- Nolan, T., Borja, C., Lopez, P., Weeks, L., Ulloa, R., Lazcano, E., Kerdpanich, A., Rodríguez, M., Mascareñas, A., Tinoco, C., Aurelio, M., Fong, L., Hernández, M., Faingezicht, I., Cruz, A., Feng, Y., Li, P., Durviaux, S., Haars, G., Roy, S., Vaughn, D., Taylor, S. 2015. Prevalence and incidence of respiratory syncytial virus and other respiratory viral infections in children aged 6 months to 10 years with influenza like illness enrolled in randomized trial. *Clin Infect Dis*, 60: 80-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4429758/pdf/civ065.pdf>
- Nunes, L. M. N., Fonteles, M. M. D. F., Passos, A. C. B., & Arrais, P. S. D. (2017). Evaluation of demands of inclusion, exclusion and alteration of technologies in the Brazilian Health System submitted to the National Committee on Technology Incorporation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53(2): 1-12. <https://www.scielo.br/pdf/bjps/v53n2/2175-9790-bjps-53-02-e16073.pdf>
- Pérez, C., Ortega, M., Ocaña, R., Martín, J. 2017. Análisis de la eficiencia técnica en los hospitales

del Sistema Nacional de Salud español. Gac Sanit, 31 (2): 108-15.

<http://www.gacetasanitaria.org/es-pdf-S0213911116302588>

Rojas, F. 2017. Conciliar prioridades entre Salud y Economía. Rev Cubana Salud Pública, 43 (3): 461-62.

<http://scielo.sld.cu/pdf/rcsp/v43n3/spu13317.pdf>

Sruamsiri, R., Kubo, H., & Mahlich, J. (2018). Hospitalization costs and length of stay of Japanese children with respiratory syncytial virus: a structural equation modeling approach. Medicine, 97(29): 1-7. doi: 10.1097/MD.00000000000011491

Tetteh, E. K., & Morris, S. (2014). Evaluating the administration costs of biologic drugs: development of a cost algorithm. Health economics review, 4(1):1-26. <https://link.springer.com/article/10.1186/s13561-014-0026-2>

Cálculo de propiedades moleculares y predicción de bioactividad de un lactoeremofilano aislado de *Senecio filaginoides* DC

Calculation of molecular properties and prediction of bioactivity of a lactoeremophilane isolated from *Senecio filaginoides* DC

Luz Arancibia^{1*}, Mariana Naspi^{1,2}

¹Departamento de Química. Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. km 4, s/n°, Comodoro Rivadavia.9000. Chubut.

²Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. km 4, s/n°, Comodoro Rivadavia.9000. Chubut.

luzalea@hotmail.com; luzarancibia603@gmail.com

RESUMEN

Las lactonas sesquiterpénicas han sido aisladas de numerosos géneros de la familia *Asteraceae*, además, se han encontrado en otras familias de angiospermas. Ellas forman parte de los principios activos de una gran variedad de plantas medicinales que son usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y han mostrado diferentes actividades biológicas tales como antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatoria, antibacteriana, anticancerígena, antiviral, antifúngica, efectos en el sistema nervioso central y cardiovascular así como su potencia alergénica. El presente trabajo muestra la diversidad estructural y la predicción de la actividad biológica de una lactona sesquiterpénica aislada de la especie *Senecio filaginoides* DC.

PALABRAS CLAVE: *Senecio filaginoides* DC, lactoeremofilanos, bioactividad

ABSTRACT

Sesquiterpene lactones have been isolated from numerous genera of the *Asteraceae* family, in addition, they have been found in other families of angiosperms. They are part of the active principles of a great variety of medicinal plants that are used in traditional medicine for the treatment of inflammatory diseases and have shown different biological activities such as antimicrobial, cytotoxic, anti-inflammatory, antibacterial, anticancer, antiviral, antifungal, effects in the central nervous and cardiovascular systems as well as its allergenic

potency. The present work shows the structural diversity and the prediction of biological activity of a sesquiterpene lactone isolated from the species *Senecio filaginoides* DC.

KEY WORDS: *Senecio filaginoides* DC, lactoeremophilanes bioactivity.

INTRODUCCION

Los sesquiterpenos son los terpenos que presentan gran diversidad estructural y han sido aislados de numerosas fuentes naturales. Se conocen más de 200 tipos de sesquiterpenos, que poseen disposiciones diferentes de sus carbonos. En las plantas predominan los sesquiterpenoides con esqueleto de germacrano, eudesmano y guayano, sobre todo, en la familia de las compuestas (Asteraceae), aunque también se encuentran en umbelíferas (Apiaceae), y en menor grado, en escrofulariáceas, aristoloquiáceas y valerianáceas. La relación entre la estructura química y la bioactividad de las lactonas sesquiterpénicas ha sido estudiada en varios sistemas, especialmente relacionándola con su actividad citotóxica (Siedle *et al*, 2003), antiinflamatoria (Dolara *et al*, 2000; Luna-Herrera *et al*, 2007; Bruno *et al*, 2003) y antitumoral (Chappell y Coates, 2013). También se han descrito otros tipos como antibacteriana (Chen *et al*, 2007; Degenhardt *et al*, 2009) fungicida y fitotóxica (Cheng *et al*, 2007; Chaturvedi, 2011). Particularmente significativo resulta su papel determinante en las relaciones de la planta con su entorno, actividad alelopática (Bruno *et al*,

2005). La biosíntesis de sesquiterpenos en las plantas, comienza con la ciclación del pirofosfato de farnesilo (FPP) para dar el catión germacradienilo, a partir del cual surgen otros esqueletos carbonados: guayano, eudesmano, pseudoguayano, eremofilano y elemano. Los cationes germacradienilo por procesos de oxidación/lactonización originan las germacranólidas, compuestos considerados intermediarios para la obtención de otras lactonas sesquiterpénicas. El interés en estas moléculas se justifica por las múltiples actividades biológicas que presentan, entre las que se destacan la actividad antineoplásica y citotóxica, ambas vinculadas a la función del agrupamiento α -metilén- γ -lactona, al parecer por ataque nucleofílico de determinados centros activos de las proteínas al doble enlace a través de una adición de Michael (Wagner, 2004). Así, los grupos tiol de la cisteína parecen ser las dianas primarias de las lactonas sesquiterpénicas, la cual da lugar a la inhibición de diversas funciones celulares que conducen a las células a la apoptosis (Recio, 2000) En esencia, la interacción entre ellas y los grupos tiol de las proteínas dejan una reducción de la

actividad enzimática o causan la interrupción del metabolismo, el cual es de vital importancia en el balance redox intracelular de la célula.

MATERIALES Y METODOS

Las especies fueron colectadas en el departamento Escalante al Sureste de la ciudad de Comodoro Rivadavia, provincia del Chubut, en el camino Roque González cuyas coordenadas son: Latitud Sur 45°50'37.6", Longitud Oeste 67°30'54.0" en febrero del año 2018. Se obtuvieron hojas y tallos que fueron secados a temperatura ambiente y molidos. Se realizó un extracto con etanol a 95°, que fue concentrado y sometido a una cromatografía en columna en fase normal a presión media utilizando Sílica Gel (60-230 mesh) (Merck). El sistema de

solventes utilizado fue n-hexano-acetato de etilo con mezclas de polaridad creciente (Arancibia *et al*, 2013, 2018). Las fracciones fueron testeadas por cromatografía en capa delgada utilizando Sílica Gel 60 F₂₅₄ (Merck) y reveladas con ácido sulfúrico al 25 % y calor. De la fracción 4 (n-hexano-acetato de etilo 50:50) se obtuvo el compuesto 1 al cual se le realizaron estudios espectrales para determinar su estructura química (Figura 1).

RESULTADOS

Se realizaron estudios espectrales de RMN ¹H y RMN¹³C para determinar su estructura química, cuyos resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla I. Datos espectrales de RMN para el compuesto 1: valores de δ , CDCl_3 , RMN^{13}C a 125 MHz, RMN^1H a 500 MHz.

Table I. NMR spectral data for compound 1 values of δ , CDCl_3 , 125 MHz ^{13}C NMR, 500 MHz ^1H NMR.

C	$\delta^{13}\text{C}$	Tipo de C	$\delta^1\text{H}(\text{J})$	HMBC ($^1\text{H} \Rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	210.24	C	-	C-3, C-10
2	41.09	CH_2	2.39(1H, dd, 2, 14) 2.47(1H, m)	C-3, C-4, C-10
3	31.02	CH_2	1.65(1H, ddd, 5, 13, 27) 1.95(1H, m)	C-4, C-15
4	42.02	CH	2.08(1H, m)	C-3, C-10, C-14, C-15
5	44.73	C	-	C-1, C-3, C-4, C-6, C-10, C-14
6	36.89	CH_2	2.62(1H, da, 13) 2.32(1H, da, 13.5)	C-4, C-10, C-11, C-14
7	157.73	C	-	C-6, C-13
8	103.47	C	-	C-6, C-13
9	33.69	CH_2	1.74(1H, dd, 13, 14) 2.37(1H, dd, 3.5, 14)	C-1, C-10
10	54.20	CH	2.82(1H, dd, 3.5, 13)	C-1, C-4, C-6, C-14
11	123.90	C	-	C-6, C-13
12	172.32	C	-	C-13
13	8.08	CH_3	1.80(3H, s)	C-11, C-12
14	11.45	CH_3	0.54(3H, s)	C-6, C-10
15	14.78	CH_3	1.02(3H, d, 7)	C-3, C-4

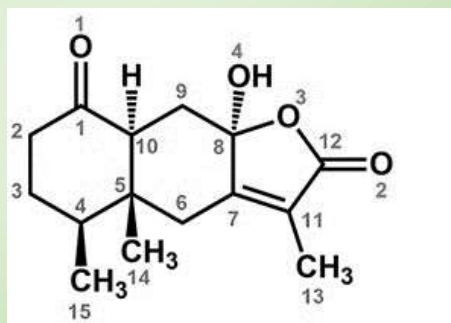


Figura 1. Compuesto 1-oxo-8-hidroxi-10- α H-eremofil-7(11) en-8,12 olida.

Figure 1. Compound 1-oxo-8-hydroxy-10- α H-eremophil-7(11) en-8,12 olide.

DISCUSION

Rabe y cols. aislaron de la *Vernonia colorata* familia de las compuestas, una planta que se encuentra en el Este Central y el Sur de África, la Vernodalina. Estos autores demostraron que esta eudesmanólida presentaba una elevada actividad antibacteriana primaria contra las especies *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Gram-positiva) y una baja actividad hacia las especies *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Gram-negativa (Jalmakhanbetova, 2007)). En el presente trabajo se buscó lograr una relación entre las propiedades moleculares del compuesto y una posible predicción de bioactividad. La similitud con los medicamentos puede definirse como un equilibrio complejo de varias propiedades moleculares y características estructurales que determinan si una molécula particular es similar a los medicamentos conocidos. Estas propiedades, principalmente hidrofobicidad, distribución electrónica, características de enlace de hidrógeno, tamaño y flexibilidad de la molécula y, por supuesto, la presencia de diversas características farmacofóricas influyen en el comportamiento de la molécula en un organismo vivo, incluida la biodisponibilidad, las propiedades de transporte, la afinidad a las proteínas, la reactividad, la toxicidad, el metabolismo.

estabilidad y muchos otros. La diversidad de posibles objetivos farmacológicos (cada uno de los cuales requiere una combinación diferente de características moleculares coincidentes) es tan enorme, que es posible encontrar un denominador común para todos ellos y expresar una molécula similar a un fármaco mediante un solo "número mágico". Los criterios de recuento simples (como los límites de peso molecular, logaritmo del coeficiente de partición entre octanol y agua ($\log P$) o número de donantes o aceptores de enlaces de hidrógeno) también tienen una aplicabilidad relativamente limitada y son útiles solo para descartar aquellos compuestos que no podrán ser considerados como medicamentos.

El sistema experto para el cálculo de la puntuación de similitud con los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), los moduladores de canales iónicos, los inhibidores de quinasas, los ligandos de receptores nucleares, los inhibidores de proteasas y otros objetivos enzimáticos se basan en la tecnología especializada para el cálculo de bioactividad. En el presente trabajo se aplicó el programa <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>. Los valores obtenidos según el programa para el compuesto 1 fueron: ($\log P$) 2,16; el área de la superficie polar topológica (TPSA) 63,60, números de átomos 19; Peso molecular:

264,32, número de oxígenos 4, número de OH presentes 1; no presentó violaciones a la regla de Lipinski, así como tampoco rotaciones y el volumen molar tuvo un valor de 246,05. Se obtuvieron datos significativos como capacidad de interacción con los ligandos de receptores nucleares con un valor de 0,28 y podría llegar a considerarse su acción como inhibidor enzimático con un valor de 0,50.

CONCLUSIONES

La revisión bibliográfica realizada permitió conocer la diversidad estructural y potenciales actividades biológicas que presentan las lactonas sesquiterpénicas,

las cuales han sido de interés y utilidad para los científicos en el descubrimiento de nuevos fármacos. Aunque el mecanismo de acción de las lactonas sesquiterpénicas en algunas ocasiones no ha sido esclarecido, diversos autores (Coll Araoz *et al*, 2007) plantean o afirman que en la actividad biológica de estas, desempeña un papel importante la presencia de los anillos α -metilen- γ -lactonas y ciclopentenonas α,β -insaturadas en su estructura, los cuales influyen en la actividad biológica de estos compuestos. El compuesto descrito en el trabajo corresponde a este grupo químico.

BIBLIOGRAFIA

Arancibia, L.; Marchiaro, A.; Pucci, G.; Arce, M. (2018). 8-hidroxi-9-ceto-10 β H-eremophil-7(11)-en-8,12-olide isolated from the essential oil of *Senecio filaginoides* DC and its antimicrobial activity". *The Nat. Prod. J.*, **8**, 207-212.

Arancibia, L.; Naspi, C. Pucci, G.; Arce, M. (2013) Biological activity of furanoeremophilane isolated from *Senecio filaginoides* var. *filaginoides*. *Bol.Latinoam. Caribe Plant.Med.*, **12**(1), 28-30.

Bruno, M.; Rosselli, S.; Maggio A.; Raccuglia, R.A.; Napolitano, F., Senatore, F. (2003). Antibacterial Evaluation of *Cnicin* and Some Natural and Semisynthetic Analogues. *Plant.Med.*. **69**: 277-281.

Bruno, M.; Rosselli, S; Maggio, A.; Raccuglia, R.A.; Bastow, K.; Chin-Chung. Wu.; Kuo-Hsiung, L. (2005). Cytotoxic activity of some natural and synthetic sesquiterpene lactones, *Plant. Med.*, **71**:1176-1178.

Coll Araoz, M. I; Mercado, M. I; Grau, A y Catalán, C.A. (2007). Lactonas Sesquiterpénicas de *Smallanthus Siegesbeckius* (Heliantheae, Asteraceae). *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med.*, **6**, (5), 187-188.

Chappell, J.; Coates, R.M. (2010). Sesquiterpenes, in *Comprehensive Natural Products II*, vol 1, (Mander L, and Liu HW, Eds.), Elsevier; 609-641.

Chaturvedi, D. (2011). Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. *Opportunity, Challenge and Scope of Nat.Prod. in Med. Chem.*, 313-334.

Cheng, A.X.; Lou, Y.G.; Mao Y.B.; Lu S; Wang, L.J.; Chen, X.Y. (2007). Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *J. Integr. Plant Biol.*; **49**: 179-186.

Chen, W.; Tang,W.; Zhang, R.; Lou, L.; Zhao, W.J.(2007). Cytotoxic germacrane-type sesquiterpenes, pimarane-type diterpenes, and a

naphthalene derivative from *Wollastonia biflora*. *Nat. Prod.*; **70**: 567–570.

Degenhardt, J.; Köllner, T.J.; Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and Sesquiterpene Synthases and the Origin of Terpene Skeletal Diversity in Plants. *Phytochemistry*, **70**: 1621–1637.

Dolara, P.; Corte, B.; Ghelardini, C.; Pugliese, A.; Cerbal, E.; Menichetti, S. (2000) Local Anaesthetic, Antibacterial and Antifungal Properties of Sesquiterpenes from Myrrh. *Plant. Med.*, **66**: 356–358.

Jalmakhanbetova, R.I.; Adekenov, S.M. *Chem. Nat. Compd.* (2007). **43**: 347-348.

Luna-Herrera, J.; Costa, M.C.; González, H.G.; Rodrigues, A.I.; Castilho, P.C. (2007) Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene

lactones from *Laurus spp.* *J. Antimicrob.*; **59**: 548–552.

Recio, M.C.; Giner, R.M.; Uriburu, L.; Mániz, S.; Cerdá, M.; De La Fuente, J.R.; Ríos, J.L. (2000). In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. *Life Sci.*; **66**: 2509–2518.

Siedle, B.; Gustavsson, L.; Johansson, S.; Murillo; R. Castro, V.; Bohlin, L.; Merfort, I. (2003) The effect of sesquiterpene lactones on the release of human neutrophil elastase. *Biochem. Pharmacol.*, **65**: 897–903.

Wagner S. (2004). In vitro behaviour of sesquiterpene lactones and sesquiterpene lactone-containing plant preparations in human blood, plasma and human serum albumin solutions., *Plant. Med.*; **70**: 227–233.

Características de frutos y semillas de especies nativas patagónicas con potencial para la restauración ecológica e interés multipropósito

Fruits and seeds characteristics of native Patagonian species with potential for ecological restoration and interest multipurpose

Liliana Contardi^{1,2 *}, María Florencia Urretavizcaya^{1,3}

¹Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP), Ruta 259 Km 16,24, CC 14, Esquel (9200) Chubut Argentina.

²Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB).

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) - Secretaria de Bosques de Chubut.

*lcontardi@ciefap.org.ar

RESUMEN

En los últimos años ha habido una revalorización e interés social por el conocimiento y modo de uso de las plantas nativas con propiedades medicinales, colorantes, ornamentales, melíferas y / o nutricionales, y para proyectos de restauración ecológica. Sin embargo un problema recurrente para iniciar actividades productivas es la escasa información disponible sobre aspectos de su propagación. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar características de frutos y semillas de especies herbáceas, arbustivas y arbóreas nativas del ecotono estepa-bosque andino patagónico. Se recolectaron frutos y semillas de 20 especies y se definieron indicadores de la madurez de frutos y semillas. Se determinaron atributos morfométricos de frutos (diámetro ecuatorial, peso) y de semillas (forma, color, N° de semillas por kg). Se determinó la germinación en vivero y el porcentaje de daño por insectos. Las especies evaluadas presentan rasgos característicos en sus frutos y semillas que permiten identificarlas y/o diferenciarlas de otras similares. La germinación en vivero superó el 45 % en las especies ensayadas, con los valores más altos para *Berberis microphylla* y *Anemone multifida* con (90 y 77 %, respectivamente). Diez especies exhibieron un óptimo estado sanitario. Los resultados confirman el potencial de estas especies para planes de propagación tanto para restauración como para usos múltiples. La información obtenida podrá ser aplicada en proyectos de restauración, en la planificación de acciones de manejo de las especies en sus ambientes naturales, así como para promover su conservación y uso sustentable.

PALABRAS CLAVE: índice madurez, N° de semillas por kg, estado sanitario, germinación.

ABSTRACT

In recent years there has been a revaluation and social interest for the knowledge and use of native plants with medicinal, dyeing, ornamental, melliferous and nutritional properties, and for ecological restoration projects. However, a recurrent problem to start productive activities is the limited information available about native species propagation. The aim of this work was to evaluate fruits and seeds characteristics of native herbs, shrubs and trees from the Andean Patagonian forest-steppe ecotone. Fruits and seeds of 20 species were collected and indicators of fruit and seed maturity were defined. Morphometric traits of fruits (equatorial diameter, weight) and seeds (shape, color, number of seeds per kg) were recorded. Seed germination under nursery conditions and seed percentage damage by insects was quantified. The evaluated species have specific traits in their fruits and seeds that allow them to be identified or differentiated from other similar species. All the studied species reached germination values greater than 45 %, among them *Berberis microphylla* and *Anemona multifida* presented the highest values (90 and 77 %, respectively). Ten species showed an optimal health status. The results confirm the potential use of these species for propagation plans for both restoration and multiple uses. The information obtained is useful for restoration projects, for planning species management actions in their natural environments, as well as for promoting their conservation and sustainable use.

KEY WORDS: maturity index, number of seeds per kg, health status, germination.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los frutos y semillas de especies vegetales nativas presenta un doble interés, por un lado permite avanzar en la comprensión del funcionamiento de las comunidades del ecosistema, y por otro aporta información relevante para su propagación y/o domesticación, y por lo tanto para su conservación. En los últimos años se reconoce en la sociedad una revalorización e interés por el

conocimiento y el modo de empleo de plantas nativas con propiedades medicinales, tintóreas, ornamentales, melíferas y/o alimenticias. Particularmente sobre la flora de la región patagónica argentina se han llevado a cabo estudios tendientes a rescatar los saberes ancestrales sobre el uso y aprovechamiento por las comunidades rurales (Eyssartier, 2011; Molares y Ladio, 2009; Richeri *et al*, 2013). También

se ha avanzado en el conocimiento científico de las propiedades químicas (Gastaldi *et al*, 2016; Gonzalez *et al*, 2014; Mattenet *et al*, 2015), los usos alimenticios (Damasco, 2011; Rapoport *et al*, 2003) y su importancia melífera (Forcone y Kutschker, 2006).

En los estudios citados se hace referencia a numerosas especies con potencial de usos múltiples, pero son reducidos los reportes sobre aspectos de su biología aplicables a su propagación sexual o asexual. Con frecuencia, un problema recurrente al encarar e iniciar actividades productivas o de restauración ecológica es la dificultad de encontrar en los viveros de la zona plantines de las especies cuyo uso se promueve. Asimismo, el éxito en la restauración de ecosistemas utilizando especies nativas, capaces de adaptarse y evolucionar, requiere prestar atención a la selección y el abastecimiento de semillas. Utilizar material de reproducción producido en vivero que se adapte a las condiciones ambientales del sitio de restauración y represente una base genética amplia, puede ayudar a asegurar la supervivencia en un ecosistema degradado al permitir la selección natural en el sitio (Thomas *et al*, 2014).

Los caracteres morfológicos de frutos y semillas tales como forma, dimensión y color son en general bastante estables para una misma especie vegetal. Profundizar en

su conocimiento permite diferenciar y reconocer a través de claves sistemáticas las especies que crecen en un mismo sitio. Dichos caracteres tienen además, una estrecha relación con diferentes rasgos de la ecología de las plantas tales como su dispersión, germinación, establecimiento de plántulas y características de los micrositios donde se establecen (Miriño Mejía *et al*, 2014). Asimismo, conocer estos caracteres morfológicos es relevante para la recolección de las estructuras reproductivas en el estado de madurez óptimo que permita la obtención de semillas viables (Gold *et al*, 2004). Este es un aspecto fundamental al momento de comenzar con un programa de reproducción de especies vegetales.

Éste estudio tuvo como objetivo general reunir y ampliar la información para aportar al manejo de frutos y semillas de especies herbáceas, arbustivas y arbóreas nativas del ecotono estepa-bosque andino patagónico. Se trabajó con 20 especies que tienen interés actual o potencial en actividades de restauración ecológica y usos múltiples, considerando aquellas especies susceptibles de ser usadas como plantas ornamentales, aromáticas, medicinales, melíferas y/o alimenticias. Los objetivos específicos fueron a) describir aspectos de la cosecha definiendo indicadores físicos de la madurez del fruto, b) evaluar caracteres

físicos y estado sanitario de frutos y semillas, y c) determinar la germinación de las semillas en una muestra de las especies.

METODOLOGÍA

Se trabajó con 20 especies perennes, nativas y endémicas de los ambientes de bosque, ecotono y estepa del Noroeste de la provincia de Chubut (Tabla I). Las especies del área boscosa pertenecen al Distrito del Bosque Andino-Patagónico; las del ecotono al Distrito Subandino y las de la estepa al Distrito Occidental (Oyarzabal *et al*, 2018). Del ambiente boscoso se cosechó *Rhaphithamnus spinosus* (espino azul) en la Reserva Provincial El Turbio (42°15'07"LS y 71°43'12"LO) y *Luma apiculata* (arrayán) en jardines de Esquel (42°54'55"LS y 71°19'12"LO). Del ambiente de estepa se cosechó *Schinus johnstonii* (molle) y *Grindelia chiloensis* (botón de oro) en cercanías de Gualjaina (42°43'50"LS y 70°47'53"LO). Del ambiente de ecotono se recolectaron las restantes especies en el Cañadón La Hoya (42°51'12"LS y 71°17'14"LO) (Tabla I). Estos sitios de

muestreo se seleccionaron por ser ecológicamente representativos de ambientes donde las especies crecen espontáneamente, además de resultar accesibles y contar con los permisos para los muestreos. Con respecto a *Luma apiculata*, la cosecha se realizó en individuos ornamentales debido a que las poblaciones naturales de la especie se encuentran casi exclusivamente en áreas de Parques Nacionales y el permiso para su cosecha fue obtenido con posterioridad a la fecha de la misma.

El clima de la región boscosa y de ecotono corresponde según la clasificación de Köppen a un Csb, templado con verano seco. En cambio en la región de estepa de Gualjaina el tipo de clima es BSk, semiárido con inviernos fríos, (Castillo y Sentis, 2001). La precipitación media anual se caracteriza por un marcado gradiente Oeste-Este, con 1.250 mm anuales en El Turbio, 550 mm en Esquel y Cañadón La Hoya, y 350 mm en Gualjaina, según la plataforma Worldclim (Fick y Hijmans, 2017). Otro rasgo característico del clima es la predominancia de fuertes vientos del sector oeste (Paruelo *et al*, 1998).

Tabla I. Especies estudiadas de la flora nativa patagónica, indicando familia, nombre científico y común, hábito, consistencia del fruto y fecha de cosecha. En hábito: Ar = Árbol; Ab = arbusto; Sub= subarbusto; H = Hierba, según Zuloaga *et al*, 2009; y en Consistencia del fruto Se= Seco; Ca= Carnoso, según Strasburger *et al*, 1994.

Table I. Native species studied from Patagonian flora, indicating family, scientific and common name, habit, consistency of fruit and date of harvest. In habit: Ar = tree; Ab = shrub; Sub = sub-shrub; H = Grass, according to Zuloaga *et al*, 2009; and in Consistency of fruit Se = Dry; Ca = Fleshy, according to Strasburger *et al*, 1994.

Familia	Nombre científico	Nombre común	Hábito	Consistencia del fruto	Fecha de cosecha
<i>Fabaceae</i>	<i>Adesmia boronioides</i> Hook. f.	Paramela	Ar	Se	09/02/17
<i>Fabaceae</i>	<i>Adesmia corymbosa</i> Clos var. <i>corymbosa</i>	sin nombre común	H	Se	30/01/17
<i>Fabaceae</i>	<i>Adesmia volckmanni</i> Philippi (ex <i>Adesmia campestris</i>)	Mamuel choique	Ar	Se	30/01/17
<i>Ranunculaceae</i>	<i>Anemone multifida</i> Poir.	Anemona	H	Se	30/01/17
<i>Apiaceae</i>	<i>Azorella prolifera</i> (Cav.) G.M.Plunkett & A.N.Nicolas, sin. de <i>Mulinum spinosum</i> (Cav.) Pers.	Neneo	Ar	Se	09/02/17
<i>Berberidaceae</i>	<i>Berberis microphylla</i> G.Forst.	Calafate	Ab	Ca	14/02/17
<i>Rhamnaceae</i>	<i>Discaria articulata</i> (Phil.) Miers	Manca caballo	Ab	Se	09/02/17
<i>Rhamnaceae</i>	<i>Discaria chacaye</i> (G. Don) Tortosa	Chacay, Espino blanco	Ab/Ar	Se	09/02/17
<i>Asteraceae</i>	<i>Grindelia anethifolia</i> (Phil.) A. Bartoli & Tortosa var. <i>anethifolia</i>	Peinecillo	Ab	Se	26/03/17
<i>Asteraceae</i>	<i>Grindelia chiloensis</i> (Cornel.) Cabrera	Botón de oro	Sub	Se	01/04/17
<i>Myrtaceae</i>	<i>Luma apiculata</i> (DC.) Burret	Arrayán	Ar/Ab	Ca	28/03/17
<i>Celastraceae</i>	<i>Maytenus boaria</i> Molina	Maitén	Ar	Se	16/03/17
<i>Celastraceae</i>	<i>Maytenus chubutensis</i> (Speg.) Lourteig, O'Donnell & Sleumer	Chaurilla, Maitencillo	Ab/Sub	Se	09/02/17
<i>Asteraceae</i>	<i>Mutisia decurrens</i> Cav. var. <i>decurrens</i>	Mutisia	Sub	Se	16/03/17
<i>Asteraceae</i>	<i>Mutisia spinosa</i> Ruiz & Pav. var. <i>Spinosa</i>	Mutisia, Reina mora,	Sub	Se	09/03/17

<i>Rhamnaceae</i>	<i>Ochetophila trinervis</i> (Gillies ex Hook. & Arn.) Poepp. ex Miers sin.de <i>Chacaya trinervis</i> (Gillies ex Hook. & Arn.) Escal., nom. Superfl	Chacay	Ab/Ar	Se	16/02/17
<i>Verbenaceae</i>	<i>Rhaphithamnus spinosus</i> (Juss.) Moldenke	Espino azul	Ar	Ca	05/04/17
<i>Asteraceae</i>	<i>Senecio filaginoides</i> DC.	Senecio, Charcao	Ab	Se	16/02/17
<i>Anacardiaceae</i>	<i>Schinus johnstonii</i> F.A. Barkley	Molle	Ar	Ca	26/03/17
<i>Anacardiaceae</i>	<i>Schinus patagonicus</i> (Phil) I.M.Johnst.	Laura	Ab/Ar	Ca	30/01/17

Cosecha

Se llevó a cabo durante la fase de dispersión natural de frutos y/o semillas. Desde el inicio de la fenofase de fructificación, se realizó un seguimiento de cada especie, identificando los **indicadores físicos de madurez del fruto** tales como cambio de color, cambio en la consistencia del fruto, apertura del fruto, dehiscencia del fruto y/o caída de semillas (Donoso, 2006; Escobar, 2006). Con la información reunida se elaboró un patrón de referencia para cada especie. La colecta se realizó en un mínimo de 10 individuos por especie, manualmente por ordeño de las ramas, sacudiéndolas suavemente o cortando las ramillas con frutos. El material así desprendido se recogió en bolsas o en baldes (Gold *et al*, 2004; Luna y Wilkinson, 2014).

Secado y almacenamiento provisional del material cosechado

Los frutos secos (Tabla I) se dejaron secar al aire por 4 o 5 días, en el interior de una habitación fresca para favorecer su completa apertura. Posteriormente se conservaron en heladera (4 °C). Los frutos carnosos se mantuvieron en heladera hasta la limpieza y extracción de las semillas.

Limpieza y extracción de semillas

La extracción de las semillas de los frutos secos se realizó en forma manual sacudiendo, agitando o frotando las muestras hasta lograr su desprendimiento. Posteriormente por medio de zarandas de distinto tamaño se separaron las semillas de los frutos y demás impurezas. Para la extracción de las semillas de los frutos carnosos, estos se maceraron en agua por 24 a 48 h. Posteriormente por frotación manual y sucesivos lavados se separaron

las semillas de la pulpa y demás restos de los frutos.

Medición de frutos

En las especies con frutos carnosos se determinó el diámetro ecuatorial (mm) utilizando un calibre digital, el peso unitario (g) en balanza de precisión (límite de resolución 0,02 g) y se contaron las semillas por fruto. Esto se determinó en 100 frutos tomados al azar (n=100) (Cruz, 2005; Ferreira *et al*, 2011; Torres *et al*, 1999).

Cálculo de la relación material cosechado/semillas limpias

De cada lote por especie se tomaron aleatoriamente tres muestras de material cosechado. Las muestras variaron en su peso inicial (1, 5 ó 10 g cada una), según el tamaño de semillas y frutos. Se extrajeron manualmente las semillas de los frutos obteniéndose dos fracciones: semilla pura y material inerte (frutos, restos de flores, hojas, ramillas, entre otros materiales), que se pesaron en forma separada. Con el dato del peso inicial dividido por el peso de la fracción de semilla pura, se calculó la relación de material cosechado/semillas limpias (Contardi *et al*, 2016; Jara, 1995), que expresa la cantidad de material que se debería cosechar para obtener un kg de semilla limpia (kg/kg).

Aspectos morfológicos, características físicas y estado sanitario

Las semillas limpias se describieron teniendo en cuenta su forma, color, textura y brillo (Bianco *et al*, 2000). Asimismo se evaluaron aspectos de su calidad física siguiendo las reglas internacionales de análisis de semillas (Internacional Seed Testing Association, 2018). Se calculó el peso (g) de 1000 semillas y el N° de semillas por kg mediante el peso de 8 muestras de 100 semillas cada una. En las especies que presentaron síntomas de daños por insectos se determinó el porcentaje de semillas dañadas. Para ello se tomaron al azar 4 muestras, de 100 semillas cada una, se remojaron en agua por 24 horas a temperatura ambiente de 20 °C y se inspeccionaron visualmente clasificándolas en semilla dañada y semilla sin daño (Rao *et al*, 2007).

Germinación en condiciones de vivero

Esta evaluación se llevó a cabo en cinco especies que fueron seleccionadas tomando como criterios la cantidad de semilla disponible, la falta de antecedentes publicados así como su potencialidad para ser utilizadas como productos alimenticios y nutraceuticos (*Berberis microphylla* (calafate) y *L. apiculata*), y en restauración ecológica (*Anemone multifida* (anémona), *Grindelia*

anethifolia (peinecillo), y *Senecio filaginoides* (senecio)). Asimismo, son especies para las cuales no están normalizadas otras pruebas como el Test de Tetrazolio, por lo cual no se realizó. Previo a la siembra las semillas de las especies con frutos secos como, *A. multifida*, *G. anethifolia* y *S. filaginoides* fueron remojadas en agua, durante 48 horas las dos primeras y 24 horas la última (Beider, 2012; Luna *et al*, 2008; Manzano *et al*, 2006). Las semillas de las especies de frutos carnosos recibieron estratificación fría-húmeda durante 60 días en *L. apiculata* (Figuerola *et al*, 1996) y 140 días en *B. microphylla* (Arena y Martínez Pastur, 1994). La siembra se llevó a cabo en almacigueras de 50 x 50 cm aproximadamente en un sustrato compuesto de tierra negra, arena volcánica y turba, en proporción 2:1:1; con al menos 3 repeticiones por especie de 50 o más accesiones cada una. Se realizó a fin del mes de mayo para *L. apiculata* y en julio para las otras especies. Previamente, las semillas se desinfectaron por inmersión durante un minuto en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, y luego se lavaron 3 veces con agua destilada (Castro y Romero García, 2003). Las almacigueras sembradas se mantuvieron en invernáculo con control de humedad mediante riegos periódicos y sin control de temperatura, quedando expuestas a las

bajas temperaturas invernales que ocurren normalmente. Se determinó el número de días necesarios para la emergencia y se contó el número total de semillas germinadas a los 30 días de iniciada la emergencia (González, 1991; Pérez-Hernández *et al*, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cosecha se extendió desde la última semana de enero hasta la primera semana de abril de 2017 debido a que la maduración de los frutos de las especies colectadas no es sincrónica. En todas las especies fue posible determinar el momento óptimo de cosecha reconociendo los cambios estructurales en los frutos y semillas durante la última parte de la fenofase de fructificación. Esta información permitió definir su índice de madurez (Tabla II), el cual puede ser tomado como patrón de referencia para futuras cosechas. El índice de madurez predominante fue el “cambio de color y consistencia del fruto” con variantes particulares entre especies. La realización de la cosecha en el momento óptimo de madurez es necesaria para garantizar la conservación y la germinación posterior (Hay y Probert, 2013). El recolector debe poder juzgar, preferiblemente por la apariencia del fruto, cuando es el momento óptimo para recolectar la mayor cantidad de semillas de buena calidad

(Schmidt, 2000). Un adelanto implicaría cosechar frutos verdes, con semillas poco maduras. En cambio una cosecha muy tardía, con el proceso de dispersión muy avanzado, podría ocasionar la pérdida de gran parte del material por eventos meteorológicos como los vientos intensos de la región patagónica, o por la acción de los organismos predadores (Bachetta *et al*,

2008). Una forma de evitar la pérdida de semillas maduras, en especies con una duración prolongada de la fenofase de fructificación, es realizar recolecciones parciales a lo largo del período de dispersión. Con esta práctica se disminuye también la exposición en el campo de los frutos y semillas a factores bióticos y abióticos desfavorables.

Tabla II. Descripción del índice de madurez de los frutos por especie.

Table II. Description of maturity fruit index by species.

Índice de madurez del fruto	Descripción para la especie	Especie
Cambio de color y consistencia del fruto	Infrutescencia color amarillento blanquecino, y los aquenios con su recubrimiento algodonoso totalmente expandido.	<i>Anemone multifida</i>
	Bayas color morado, turgentes.	<i>Berberis microphylla</i> <i>Luma apiculata</i>
	Bayas color azul brillante, turgentes.	<i>Rhaphithamnus spinosus</i>
	Drupas color morado, cobertura exterior apergaminada.	<i>Schinus johnstonii</i> <i>Schinus patagonicus</i>
	Infrutescencia (mericarpios) color amarillo ocre, de consistencia papirácea.	<i>Azorella prolifera</i>
Cambio de color, consistencia y apertura de frutos.	Cápsulas color blanco amarillento; de consistencia apergaminada; arilo rojo intenso, brillante.	<i>Maytenus boaria</i> <i>Maytenus chubutensis</i>
	Receptáculo que contiene los aquenios apergaminado; y con aspecto plumoso en el extremo superior por los papus expandidos.	<i>Grindelia anethifolia</i>
		<i>Grindelia chilensis</i>
		<i>Mutisia decurrens</i>
		<i>Mutisia spinosa</i> <i>Senecio filaginoides</i>
Cambio de color, consistencia y caída de frutos	Cápsulas tricocas de color castaño - amarronado, apergaminadas, desprendiéndose de la planta.	<i>Discaria articulata</i>
		<i>Discaria chacaya</i>
		<i>Ochetophila trinervis</i>

Cambio de color, consistencia, apertura y caída de frutos.	Lomentos color tostado, apergaminados, abriéndose y desprendiéndose de la planta.	<i>Adesmia boronioides</i>
		<i>Adesmia corymbosa</i>
		<i>Adesmia volckmanni</i>

La cantidad de material cosechado para obtener 1 kg de semilla limpia, expresado como rendimiento de material cosechado/semillas limpias (kg/kg) fue diferente entre las especies (Tabla III). Las especies que resultaron con valores más altos coinciden con aquellas que presentan frutos más pesados. Así por ejemplo se requiere cosechar 9,7 kg de material fructífero para obtener 1 kg de semilla limpia y pura de *L. apiculata* (Tabla IIIa). En cambio para *A. multifida* (Tabla IIIb),

que posee un fruto muy liviano, se requiere cosechar aproximadamente 1,1 kg de material fructífero para obtener 1 kg de semilla limpia. El rendimiento de la cosecha puede variar dependiendo de lo meticuloso y prolijo con que se lleve a cabo la misma. Si se realiza manualmente seleccionando solo los frutos, como fue en este estudio, se evita llevar material que posteriormente será desechado y por otra parte se facilita la tarea de limpieza y almacenamiento.

Tabla III. Características morfológicas de los frutos de las especies analizadas.

Table III. Morphological characteristics of fruits of analyzed species.

a) Especies con frutos carnosos. Se indica el valor medio de la variable $\pm$ un error estándar.

a) Species with fleshy fruits. Mean value of the variable is indicated $\pm$ a standard error.

Especie	Peso de la muestra (g) (n=3)	Relación material cosechado/ semillas limpias (kg/ kg)	Nº semillas por fruto	Diámetro ecuatorial del fruto (mm)	Peso unitario del fruto (g)
<i>Luma apiculata</i>	10	9,7 : 1	1,1 $\pm$ 0,5	9,2 $\pm$ 1,0	0,56 $\pm$ 0,10
<i>Berberis microphylla</i>	10	1,4 : 1	7,2 $\pm$ 3,4	8,1 $\pm$ 1,2	0,43 $\pm$ 0,20
<i>Rhaphithamnus spinosus</i>	10	3,0 : 1	2	7,8 $\pm$ 0,8	0,26 $\pm$ 0,06
<i>Schinus johnstonii</i>	10	1,3 : 1	1	7,5 $\pm$ 0,8	0,09 $\pm$ 0,02
<i>Schinus patagonicus</i>	10	1,2 : 1	1	5,8 $\pm$ 0,5	0,04 $\pm$ 0,01

b) Especies con frutos secos.
b) Species with dry fruits.

Especie	Peso de la muestra (g) (n=3)	Relación material cosechado/ semillas limpias (kg/ kg)	N° semillas por fruto
<i>Adesmia boronioides</i>	5	3,4 : 1	1 x artejo
<i>Adesmia corymbosa</i>	1	3,4 : 1	1 x artejo
<i>Adesmia volckmanni</i>	5	3,2 : 1	1 x artejo
<i>Anemone multifida</i>	1	1,1 : 1	1
<i>Azorella prolifera</i>	5	1,1 : 1	1
<i>Discaria articulata</i>	5	4,9 : 1	3
<i>Discaria chacaye</i>	5	3,5 : 1	3
<i>Ochetophila trinervis</i>	5	2,6 : 1	3
<i>Grindelia anethifolia</i>	5	1,6 : 1	> a 100
<i>Grindelia chilensis</i>	5	4,4 : 1	> a 100
<i>Maytenus boaria</i>	10	1,2 : 1	2
<i>Maytenus chubutensis</i>	10	1,4 : 1	2
<i>Mutisia decurrens</i>	1	3,0 : 1	*50 (35-80)
<i>Mutisia spinosa</i>	1	m/i	*36 (30-45)
<i>Senecio filaginoides</i>	1	2,1 : 1	*28 (20-35)

m/i = muestra insuficiente.

*Valor medio, y entre paréntesis se expresa el rango hallado en la muestra.

El número de semillas por fruto varió de un mínimo de uno como en *Schinus patagonicus* (laura), a varias como en *B. microphylla*, o centenares como en las especies de la familia Asteraceae, tales como *Grindelia sp.* (Tabla III). En el caso de *Mutisia decurrens* (mutisia) se observó una importante variabilidad entre los

capítulos analizados por lo que sería deseable comparar con otras procedencias para determinar el número medio de semillas por fruto. La forma de las semillas varió de redondeadas tipo ovoide-globosa a alargadas tipo cilindroide (Tabla IV). Respecto del color predominaron los tonos tostados y marrones con distintas

intensidades, diferenciándose notablemente *Maytenus boaria* (maitén) y *Maytenus chubutensis* (maitencillo) por el tono rojizo brillante del arilo que recubre sus semillas. El peso de semillas por kg de cada especie varió de 44.000 en *R. spinosus* a un máximo de 1.720.228 en *S. filaginoides* (Tabla IV). Gran parte de las especies estudiadas presenta semillas pequeñas, dado que superan las 100.000 unidades/kg, y sólo siete se ubicaron por debajo de ese valor. Son escasos los reportes sobre el número de semillas/kg para las especies analizadas en este trabajo. Teniendo en cuenta esto se considera pertinente continuar con la evaluación de lotes a través de años sucesivos de cosecha, así como de distintas poblaciones, con la meta de

establecer valores medios de referencia para cada especie.

Desde el punto de vista de la gestión de las semillas la descripción de su morfometría y de su tamaño aporta información valiosa para su manejo, y juega un papel importante al momento de recolectarlas, transportarlas y almacenarlas. También es una herramienta válida para predecir que especies son susceptibles de ser conservadas en bancos ex situ de germoplasma y posteriormente utilizadas en restauración (Romero-Saritama y Pérez-Ruiz, 2016). Por otra parte los caracteres mencionados pueden tener aplicación en estudios taxonómicos como el realizado por Pérez-Cortéz *et al* (2002), en el cual se reconocen y diferencian especies del género *Passiflora* L.

Tabla IV. Características morfológicas y físicas de las semillas de las especies analizadas. En Peso (g) de 1.000 semillas y N° de semillas/ kg se indica valor medio $\pm$ un error estándar.

Table IV. Morphological and physical characteristics of seeds of analyzed species. In Weight (g) of 1,000 seeds and N° of seeds / kg mean value $\pm$ standard error is indicated.

Especie	Forma y Color de la semilla	Peso (g) de 1.000 semillas	N° semillas/kg
<i>Adesmia boronioides</i>	Ovoide a reniforme, aplanada; verde oliváceo a amarillo ocre con veteado de manchas negras; lisa lustrosa.	5,8 $\pm$ 0,3	174.318 $\pm$ 9.086
<i>Adesmia corymbosa</i>	Ovoide con una pequeña protuberancia en el extremo superior; gris plumizo o amarillo ocre con manchas negras.	3,0 $\pm$ 0,1	333.705 $\pm$ 11.951
<i>Adesmia volckmanni</i>	Ovoide, aplanada; gris plumizo a gris ceniza, con veteado de manchas negras.	5,0 $\pm$ 0,4	199.908 $\pm$ 14.375

<i>Anemone multifida</i>	Ovoide asimétrica; castaño oscuro con pelos sedosos blanquecinos.	2,0 ± 0,1	509.868 ± 13.620
<i>Azorella prolifera</i>	Ovoide - globosa, comprimida lateralmente; amarillento - ocre.	7,6 ± 0,2	131.882 ± 3.574
<i>Berberis microphylla</i>	Elipsoide, pardo rojiza.	15,7 ± 0,3	63.668 ± 1.338
<i>Discaria articulata</i>	Ovoide - globosa; marrón café; brillantes.	5,8 ± 0,6	172.712 ± 16.293
<i>Discaria chacaye</i>	Ovoide - globosas; marrón café; brillantes.	4,1 ± 0,2	242.742 ± 9.464
<i>Grindelia anethifolia</i>	Oblonga, levemente comprimidas en los lados laterales; castaño amarillentas; con papus caedizo.	4,8 ± 0,2	208.139 ± 8.843
<i>Grindelia chilensis</i>	Presenta dimorfismo: ovoide, comprimidas lateralmente, y elipsoide con tres caras.	3,3 ± 0,1	303.717 ± 10.068
<i>Luma apiculata</i>	Reniforme; verde oliváceo a grisáceo; lisas, brillantes.	3,3 ± 0,13	59.851 ± 2.410
<i>Maytenus boaria</i>	Ovoide oblonga; rojiza por el arilo brillante.	13,9 ± 0,3	71.973 ± 1.596
<i>Maytenus chubutensis</i>	Ovoide oblonga; rojiza por el arilo brillante.	15,3 ± 0,4	65.453 ± 1.751
<i>Mutisia decurrens</i>	Cilindroide, con estrías; castaño clara, brillante	4,3 ± 0,4	233.308 ± 23.613
<i>Mutisia spinosa</i>	Cilindroide, con estrías; pardo oscuras.	9,6 ± 0,5	104.889 ± 5.589
<i>Ochetophila trinervis</i>	Ovoide - globosas; marrón oscuro; brillantes.	2,2 ± 0,1	455.016 ± 15.659
<i>Rhaphithamnus spinosus</i>	Semiglobosa; castaño clara.	22,2 ± 0,6	44.526 ± 1.277
<i>Senecio filaginoides</i>	Cilindroide, con estrías longitudinales, pardo grisáceo; pubescente; con papus blanco.	0,6 ± 0,1	1.720.228 ± 191.219
<i>Schinus johnstonii</i>	Esferoide, comprimida lateralmente; marrón tostado.	68,5 ± 2,1	14.623 ± 486
<i>Schinus patagonicus</i>	Esferoide, comprimida lateralmente; marrón tostado.	35,2 ± 0,7	28.440 ± 595

Las especies con semillas dañadas por insectos fueron 10 (Fig. 1), mientras que las especies sin síntomas también. Los porcentajes de daño fueron variables

desde un máximo de 69 % en *S. patagonicus* a solo un 1 % en *Ochetophila trinervis* (chacay) (Fig. 1). El estado sanitario de un lote condiciona su

almacenamiento y conservación, además de determinar el porcentaje de germinación y la posibilidad de obtener plántulas. Según Rao *et al.* (2007) se aconseja mantener en el banco de semillas lotes con infecciones menores al 5 %.

Cuando el porcentaje de semillas atacadas es alto (mayor al 30 %) para compensar las pérdidas se deberá incrementar la recolección o bien recolectar en otro sitio (Gold *et al.*, 2004).

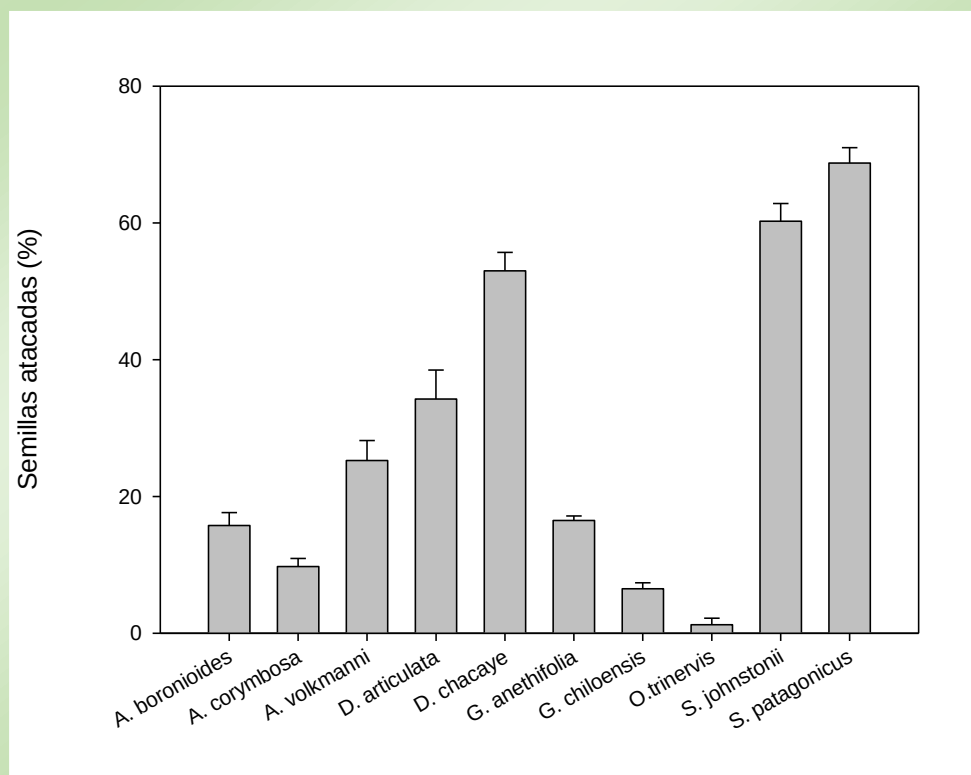


Figura 1. Porcentaje de semillas dañadas por insectos en los lotes de 10 especies nativas de la región patagónica.

Figure 1. Percentage of damaged seeds by insects in 10 lots of native species of the Patagonian region.

La germinación en vivero superó el 50 % en cuatro especies (Tabla V), correspondiendo los valores más elevados a *B. microphylla* y *A. multifida* con 90 y 77 % respectivamente. Estos resultados estarían indicando que son especies relativamente fáciles de propagar siendo factible la obtención de plantas tanto para restauración como para otros usos.

Asimismo, validarían su potencialidad para ser empleadas en acciones de rehabilitación de áreas degradadas mediante siembra directa (Pérez-Hernández *et al.*, 2011). En dos especies, *G. anethifolia* y *S. flaginoides*, el proceso de germinación comenzó a los 5 y 10 días posteriores a la siembra, mientras que en las restantes ocurrió a los 60 y 100 días

(Tabla V). La rapidez en la emergencia de las plántulas de *G. anethifolia* y *S. filaginoides* estaría reflejando que ambas especies tienen escasa dormancia. En cambio *A. multifida*, *B. microphylla* y *L. apiculata* necesitan pasar por un período de estratificación frío-húmedo para iniciar el proceso de germinación, tal como lo

reportan otros autores (Figueroa, 2000; Luna *et al.* 2008). También se ha comprobado que la cosecha de frutos maduros de *L. apiculata* de ejemplares adultos, cultivados en jardines, es una fuente confiable de semillas de calidad siendo similar a la de poblaciones naturales (Contardi *et al.*, en prensa).

Tabla V. Detalle de tratamiento pregerminativo y germinación por especie sembrada en vivero. N: número de repeticiones; inicio germinación corresponde a días desde la siembra; germinación: valor medio $\pm$ un error estándar.

Table V. Detail of pregerminative treatment and germination by species sowing in the nursery. N: number of repetitions; germination start corresponds to days from sowing; percentage of germination: mean value $\pm$ one standard error.

Especie	N	Semillas por repetición	Tratamiento pregerminativo	Fecha de siembra	Inicio germinación (días)	Germinación (%)
<i>Anemone multifida</i>	3	250	Remojo en agua x 48 h	27-07-17	60	77 $\pm$ 5
<i>Berberis microphylla</i>	5	300	Estratificación fría – húmeda x 140 d	10-07-17	60	90 $\pm$ 3
<i>Grindelia anethifolia</i>	4	72	Remojo en agua x 48 h	26-07-17	5	66 $\pm$ 7
<i>Luma apiculata</i>	4	50	Estratificación fría – húmeda x 60 d	29-05-17	100	52 $\pm$ 12
<i>Senecio filaginoides</i>	4	200	Remojo en agua x 24 h	18-07-17	10	45 $\pm$ 7

CONCLUSIONES

Las especies evaluadas presentan rasgos característicos en sus frutos y semillas que permiten identificarlas y/o diferenciarlas de otras similares, los cuales podrían ser empleados para establecer caracteres taxonómicos. El conocimiento de estos rasgos permite contar con herramientas para diseñar estrategias de conservación y

de manejo del germoplasma. Los datos aportados por este trabajo pueden aplicarse para planificar con mayor certeza futuras cosechas y estimar el volumen de material a recolectar en función de la necesidad de semillas facilitando la selección de contenedores, zarandas y demás equipos.

Por primera vez se establecen Indicadores de madurez del fruto para especies nativas de la región patagónica. Sería recomendable generar estos indicadores para otras especies de interés, dado que revelan el momento óptimo para cosechar semillas de calidad.

Tanto el porcentaje de germinación como el estado sanitario son aspectos relevantes para la propagación de las especies y el desarrollo de programas de restauración ecológica. El 50 % de las especies estudiadas presentó semillas con un buen estado sanitario, sin presencia de semillas dañadas por insectos. En las restantes el porcentaje de daño fue significativo, condicionando su almacenamiento. Los resultados de la germinación en vivero, para las cinco especies probadas, fue superior al 45 % confirmando la posibilidad de propagar estas especies tanto para planes de restauración como para avanzar en su domesticación, en vistas a generar nuevas producciones alternativas.

La información reunida es un aporte al manejo y gestión de frutos y semillas de especies nativas patagónicas. Si bien la conservación de los recursos vegetales se puede llevar a cabo en áreas como parques o reservas, también es factible mediante

acciones de restauración activa y la puesta en práctica de producciones alternativas que contemplen la sustentabilidad del recurso. La implementación de este tipo de propuestas conlleva avanzar en el conocimiento de la biología de las especies vegetales que componen el ecosistema con aporte de datos como los logrados en este trabajo. Un mayor conocimiento puede contribuir no solo a reproducirlas para su posterior uso, sino a mantener el delicado equilibrio ambiental de estos ecosistemas, realizando recolecciones que no sobrepasen la capacidad de cosecha del área. Considerando que los procesos ecológicos y socioculturales están estrechamente vinculados, las recolecciones sin aplicar criterios de sustentabilidad condicionan la preservación de la flora y fauna, y la calidad de vida de la población humana vinculada a dichos ambientes.

AGRADECIMIENTOS

A los estudiantes Melanie Paz y Franco Millaman, al Técnico Forestal Stefano Gianolini por su colaboración en los procesos de recolección de material en terreno y posterior análisis en laboratorio. A la Lic. Melisa Rago por la revisión del manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

- Arena, M.E. y G. Martínez Pastur. 1994. Seed propagation of *Berberis buxifolia* Lam. *Phyton*. **56** (XII): 59- 63.
- Bacchetta, G.; Bueno Sánchez, A.; Fenu, G.; Jiménez- Alfaro, B.; Mattana, E.; Piotto, B. y M.Virevaire (Eds.). 2008. Conservación *ex situ* de plantas silvestres. Principado de Asturias/ La Caixa, 378 pp.
- Beider, A. 2012. Viverización de especies nativas de zonas áridas. *Experimentia* 2. 68 pg.
- Bianco, C.A.; Nuñez, C.O.y T.A. Kraus. 2000. Identificación de frutos y semillas de las principales malezas del centro de la Argentina. Editorial de la Fundación UNRC, Río Cuarto, 142 pp.
- Castillo, F.E. y F.C. Sentis. 2001. Agrometeorología. Mundi-Prensa. Madrid, España. 517 p.
- Castro, J. y A.T. Romero Garcia. 2003. Tratamientos promotores de la germinación en tres especies autóctonas del matorral del SE ibérico. *Monogr. Fl. Veg. Béticas* **13**:111- 116.
- Contardi, L.; Paz, M. y M.F. Urretavizcaya, *en prensa*. Arrayán (*Luma apiculata*): aspectos relevantes de los frutos y semillas para su domesticación. *Patagonia Forestal*, CIEFAP.
- Contardi, L.; Silva Sofrás, F.y S.B. González. 2016. Paramela, una especie nativa de la Patagonia: análisis de frutos y semillas. *Patagonia Forestal*, **1**: 24-29.
- Cruz, E. D. 2005. Quantitative characteristics of fruits and seeds of *Pouteria pachycarpa* Pires - Sapotaceae. *Rev. bras. sementes*, **27**(2): 159-164.
- Damasco, M. A. 2011. Arbustos silvestres con frutos carnosos de Patagonia. Fondo Editorial Rionegrino, Viedma, 94 pp.
- Donoso, Z. C. 2006. Floración, fructificación y semillazón. En Z.C. Donoso (ed.), Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Autoecología. Marisa Cuneo Ediciones, Valdivia: 21-28.
- Escobar B.R. 2006. Cosecha de semillas. Pretratamientos y ensayos de germinación. En Z.C. Donoso (ed.), Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Autoecología. Marisa Cuneo Ediciones, Valdivia: 28-35.
- Eyssartier, C. 2011. Conocimiento hortícola y de recolección de recursos silvestres en comunidades rurales y semi-rurales del Noroeste de la Patagonia: Saber- cómo (know-how) y resiliencia. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires. [en línea] [fecha de consulta: 12 junio 2018]. Disponible en: <http://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n5096_Eyssartier.pdf>.
- Ferreira, N. R.; Franke, L. B.y M.C. Moço de Chiara. 2011. Estudos morfo-anatômicos relacionados à dormência em sementes de *Adesmia tristis* Vogel (Fabaceae). *Rev. bras. sementes*, **33** (3): 447-453.
- Fick, S. E. y R.J. Hijmans. 2017. WorldClim 2: New 1-km spatial resolution Climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, **37**, 4302–4315. <https://doi.org/10.1002/joc.5086>
- Figueroa, J.; Armesto, J. J. y J. F. Hernandez. 1996. Estrategias de germinación y latencia de semillas en especies del bosque templado de Chiloe, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, **69** (2): 243-251.
- Figueroa, J. 2000. Aspectos ecológicos de la germinación en especies del bosque templado-húmedo del sur de Chile. *Chloris Chilensis* [en línea] **2** (3). Disponible en: <<http://www.chlorischile.cl/>>
- Forcone, A. y A. Kutschker. 2006. Floración de las especies de interés apícola en el noroeste de

- Chubut, Argentina. *Rev. Mus. Argent. Cienc. Nat.*, **8** (2): 151-157.
- Gastaldi, B.; Assef, Y.; van Baren, C.; Di Leo Lira, P.; Retta, D.; Bandoni, A. y S. González. 2016. Antioxidant activity in teas, tinctures and essential oils of native species from Patagonia Argentina. *Rev. Cub. Pl. Med.*, **21**(1):51-62.
- Gold, K.; León- Lobos P.L. y M.Way. 2004. Manual de recolección de semillas de plantas silvestres para conservación a largo plazo y restauración ecológica. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Intihuasi, La Serena. Boletín *INIA* 110, 62 p.
- González, S.B.; Guerra, P.; Gastaldi, B.; van Baren, C.; Di Leo Lira, P. y A. Bandoni. 2014. Avances en el estudio de plantas aromáticas nativas y naturalizadas en la Patagonia Argentina. Variabilidad y constancia en la composición de sus aceites esenciales. *Lilloa* **52** (Suplemento): IV Jornadas Nacionales de Plantas Aromáticas Nativas y sus Aceites Esenciales, 37-42.
- González, J. 1991. Recolección y germinación de semillas de 26 especies arbóreas del bosque húmedo tropical. *Revista Biol. Trop.*, **39**(1): 47-51.
- Hay F.R. y R.J. Probert. 2013. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. *Conservation Physiology*, **1** (1): [en línea]. Disponible en: <https://academic.oup.com/conphys/article/1/1/cot030/365220>
- ISTA. 2018. International Rules for Seed Testing, Vol. 2018, Full Issue i–19-8. 276 pp.
- Jara, L. y F.M.A. Valle. 1995. Producción y rendimiento de diez especies tropicales en América Central. En Zalazar (ed.), *Memorias del Simposio Avances en la producción de semillas forestales en América Latina*. CATIE, Managua: 229-248.
- Luna, T. y K.M. Wilkinson. 2014. Collecting, Processing, and Storing Seeds. En K.M. Wilkinson, T.D. Landis, D.L. Haase, B.F. Daley, R.K. Dumroese (eds), *Tropical nursery manual: a guide to starting and operating a nursery for native and traditional plants*, p 141-161. US Department of Agriculture, Forest Service, Agriculture Handbook 732, Washington, DC.
- Luna, T., D. Wick y J. Hosokawa. 2008. Propagation protocol for production of container *Anemone multifida* Poir plants (172 ml containers); USDI NPS - Glacier National Park, West Glacier, Montana. In: Native Plant Network, University of Idaho, College of Natural Resources, Forest Research Nursery, Moscow, Idaho. [en línea]. Disponible en: <http://www.nativeplantnetwork.org/Network/ViewProtocols.aspx?ProtocolID=136>
- Manzano, E., Mansilla, A., Seemann, P., Schiappacasse, F., Musalem, M y P. Riedemann. 2006. Domesticación de dos especies de la flora patagónica para uso ornamental, *Anemone multifida* y *Gaultheria mucronata*. *Agro Sur* **34** (1-2):18-19
- Mattenet, F.; Goyheneixes, M. y P.L. Peri. 2015. Tintes naturales de plantas nativas. Colores de la Patagonia. INTA- PREPAP –UNPA, 64 pp.
- Miniño Mejía, V. A.; Rodríguez de Francisco, L. E.; Paino Perdomo, O.; León, Y. y L. Paulino. 2014. Caracterización de la morfología de la semilla de *Pinus occidentalis* Swartz. *Ciencia y Sociedad*, **39** (4): 777-801.
- Molares, S. y A.H. Ladio. 2009. Ethnobotanical review of the Medicinal Mapuche Flora: Use patterns on a regional scale. *J. Ethnopharmacol.*, **122**: 251 – 260.
- Oyarzabal, M.; Clavijo, J.; Oakley, L.; Biganzoli, F.; Tognetti, P.; Barberis, I.; Maturo, H. M.; Aragón, R.; Campanello, P. I.; Prado, D.; Oesterheld, M. y R. J.C. León. 2018. Unidades de vegetación de la Argentina. *Ecología Austral* **028**(01):040-063.

- Paruelo, J.M., A.B. Beltrán. E.G. Jobbágy, O.E. Sala y R.A. Golluscio. 1998. The climate of Patagonia: general patterns and controls on biotic processes. *Ecologia Austral* **8**:85-101.
- Pérez-Cortéz, S.; Tillett, S. y M. Escala. 2002. Estudio morfológico de la semilla de 51 especies del género *Passiflora* L. *Acta Bot. Venez.*, **25**(1): 67-96.
- Pérez-Hernández, I.; Ochoa-Gaona, S.; Vargas-Simón, S.; Mendoza-Carranza M. y N. A. González-Valdivia. 2011. Germinación y supervivencia de seis especies nativas de un bosque tropical de Tabasco, México. *Madera y Bosques*, **17**(1): 71-91.
- Rao N.K.; Hanson, J.; Dulloo, M.E.; Ghosh, K.; Nowell, D. y M. Larinde. 2007. Manual para el manejo de semillas en Bancos de Germoplasma. Bioversity International, Roma, 165 pp.
- Rapoport, E.H.; Ladio, A. y E.H. Sanz. 2003. Plantas nativas comestibles de la Patagonia andina argentino/ chilena. Parte I y II. Ediciones de Imaginaria, Bariloche. TI: 81 p; TII: 79 p.
- Richeri, M.; Ladio, A. H. y A.M. Beeskow. 2013. Conocimiento tradicional y autosuficiencia: la herbolaria rural en la Meseta Central del Chubut (Argentina). *BLACPMA*, **12**(1): 44-58.
- Romero-Saritamá, J.M. y C. Pérez- Ruiz. 2016. Rasgos morfológicos de semillas y su implicación en la conservación *ex situ* de especies leñosas en los bosques secos Tumbesinos. *Ecosistemas*, **25**(2): 59-65.
- Schmidt, L. H. 2000. Guide to handling of tropical and subtropical forest seed. Danida Forest Seed Centre, 532 pp.
- Strasburger, E.; Noll, F.; Schenck, H.; Schimper, A.F.; Sitte, P.; Ziegler, H.; Ehrendorfer, F. y A. Bresinsky. 1994. Tratado de Botánica. 8ª ed. castellana. Ediciones Omega S.A, Barcelona, 1068 pp.
- Thomas, E.; Jalonen, R.; Loo, J.; Boshier, D.; Gallo, L.; Cavers, S.; Bordács, S.; Smith, P. y M. Bozzano. 2014. Genetic considerations in ecosystem restoration using native tree species, *Forest Ecology and Management*, **333**, 66-75
- Torres, A.P.; Seguel, I.B.; Contreras G.J. y M.E. Castro. 1999. Caracterización físico – química de frutos de murta (murtilla) *Ugni molinae* Turez. *Agricultura Técnica*, **59** (4): 260-270
- Zuloaga, F.; Morrone, O. y M. Belgrano. 2009. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. Versión base de datos en sitio web del Instituto Darwinion, Argentina. [en línea]. [fecha de consulta: 10 junio 2019]. Disponible en: < <http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/FA.asp> >

Aspectos biológicos de la ictiofauna del curso inferior del río Chubut (Patagonia, Argentina)

Biological aspects of the ichthyofauna from the lower course of the Chubut River (Patagonia, Argentina)

Ana E. Ruiz¹ y Ricardo R. Fondacaro^{1*}

¹Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Inmigrantes 58, 9100 Trelew, Chubut, Argentina.

*ricardofonda@gmail.com

RESUMEN

La ictiofauna nativa del curso inferior del río Chubut se halla amenazada por distintos factores como los cambios en el régimen de flujo de agua, producidos por la construcción de la represa Hidroeléctrica Florentino Ameghino, la contaminación causada por el crecimiento demográfico e industrial, la degradación física del hábitat y la introducción de especies exóticas. Para conocer el estado en el que se encuentran estos peces, en el tramo comprendido entre la represa y su desembocadura en el mar (207,10 km), de marzo 2011 a septiembre 2014 se realizaron catorce muestreos en siete sitios del río. Para las capturas se emplearon redes de enmalle y pesca eléctrica. Se estudiaron la relación largo-peso, el factor de condición de Fulton (K) y la distribución estacional de madurez gonadal. Los peces nativos tuvieron mayor abundancia relativa en las capturas respecto a los salmónidos introducidos, según la siguiente secuencia descendente: Perca (*Percichthys trucha*), bagre patagónico (*Hatcheria macraei*), pejerrey patagónico (*Odontesthes hatcheri*), bagre aterciopelado (*Olivaichthys viedmensis*), trucha marrón (*Salmo trutta*), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y lamprea (*Geotria australis*). Los valores del coeficiente b muestran que los peces poseen un desarrollo dentro del rango isométrico y el factor K señala buen estado de condición somática. De acuerdo con los estadios de madurez gonadal las puestas podrían producirse entre invierno avanzado y principios de primavera. Se hallaron juveniles en todos los sitios de muestreo, lo que señala que las poblaciones cumplen su ciclo de vida en este tramo del río, con excepción de la lamprea que es anádroma. Los peces presentaron aspecto general saludable y no se observaron malformaciones corporales ni manchas tegumentarias.

PALABRAS CLAVE: Parámetros biológicos, peces, río Chubut

ABSTRACT

The ichthyofauna of the lower course of the Chubut River (Patagonia, Argentina) is threatened by changes in the water flow regime due to the construction of the Florentino Ameghino dam, the water pollution caused by the increase in the domestic and industrial effluents, the physical habitat degradation and the introduction of exotic species. To find out the current condition of the fishes, in the section between the dam and its mouth in the sea (207.10 km), from March 2011 to September 2014 fourteen samplings were carried out in seven river sites. Gill nets and electrofishing were used for the captures. The length-weight relationship, the Fulton condition factor (K) and the seasonal distribution of gonadal maturity were studied. The native fishes had a higher relative abundance in the catches compared to the introduced salmonids, according to the following descending sequence: perch (*Percichthys trout*), Patagonian catfish (*Hatcheria macraei*), Patagonian silverside (*Odontesthes hatcheri*), velvet catfish (*Olivaichthys viedmensis*), brown trout (*Salmo trutta*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and lamprey (*Geotria australis*). The exponent b showed that native specimens developed within the isometric range and K indicated good somatic condition. The seasonal distribution of gonadal stages suggested that spawning occurs between late winter and early spring. Juveniles were found at all sampling sites, which indicate that populations fulfil their life cycle in this river stretch, except for the lamprey which is anadromous. The fishes presented a healthy general appearance and no malformations or integumentary spots were observed.

KEY WORDS: Biological parameters, Chubut river, fishes

INTRODUCCION

En las aguas continentales de la Patagonia Argentina han sido reconocidas 15 especies de peces autóctonos, las que tienen como límite norte de distribución el río Colorado. Esta fauna íctica se distribuye en la Provincia Patagónica dentro de la Subregión ictiogeográfica Austral Sudamericana, definida por

Ringuelet (1975). Esta es una de las regiones del mundo más puras en términos de diversidad de peces, donde se destacan endemismos a nivel familiar y específico (Baigún & Ferriz, 2003; López & Miquelarena, 2005).

El río Chubut es el más largo de Patagonia y desciende terrazas escalonadas en dirección oeste este, desde la cordillera de

los Andes hacia su desembocadura en aguas del océano Atlántico. El río tiene un régimen mixto con aportes de lluvia y nieve que se van alternando a lo largo de su trayecto. Posee un régimen de precipitaciones que fluctúa entre 800 y 1200 mm en sus nacientes al oeste y desciende a 200 mm, aproximadamente, a sólo 50 km al este; y es prácticamente insignificante en el resto de la cuenca. En su trayectoria se destaca la represa Florentino Ameghino que forma un lago artificial de 65 km² de superficie. Las funciones principales para las que originalmente se proyectó esta obra fueron el control de crecidas, la derivación de caudales para riego y la generación de energía eléctrica (Kales *et al*, 2008).

En Patagonia se han identificado factores antrópicos que impactan al medio acuático y su fauna íctica nativa (Bello & Úbeda, 1998; Baigún & Ferriz, 2003; López-Arbarello, 2004; Ferriz, 2012). En tramo inferior el río Chubut los factores que impactan, además de la represa F. Ameghino, son el incremento poblacional de las localidades ribereñas, que en la Provincia homónima alcanzó más del 93,5 % entre los años 1980 y 2010, los cambios en el uso del suelo y la introducción de salmónidos. Por otro lado, Jones (2011) al estudiar la problemática del visón americano (*Mustela vison* Schreber) especie exótica invasora en el valle

inferior del río Chubut, explica que se trata de un mamífero depredador generalista y oportunista con posible efecto negativo sobre los peces.

Los peces son a menudo considerados bioindicadores en los ecosistemas acuáticos ya que ocupan un nivel trófico alto (Leyton *et al*, 2015) e integran impactos directos e indirectos. La relación largo-peso y el factor de condición de Fulton (K), son parámetros ampliamente utilizados para comparar el estado de las poblaciones que habitan en sistemas acuáticos con distintos grados de intervención antrópica. Aportan información indirecta sobre estrategias de crecimiento, estado nutricional, reproducción y por ende del estado de salud de los peces y de las poblaciones (Cifuentes *et al*, 2012; Leyton *et al*, 2015). Este trabajo tiene por objetivos reconocer las especies de peces presentes en el curso inferior del río Chubut y estudiar la relación largo-peso, el factor de condición de Fulton (K) y aspectos reproductivos de la ictiofauna nativa, con la finalidad de aportar información para su manejo.

MATERIALES Y METODOS

Area de estudio: Si bien existen estudios sobre la ictiofauna de los ambientes patagónicos, son escasas las investigaciones focalizadas en el curso inferior del río, aguas abajo de la represa

(Gosztonyi, 1988; Ruiz, 2007). El curso inferior del río Chubut escurre por el denominado Valle Inferior, desde la represa hasta la desembocadura (207,10 km de longitud). Éste es el sector con mayor población de toda su trayectoria (más de 170.000 habitantes). A la construcción de la represa se deben los cambios morfológicos ocurridos en los últimos cincuenta años. El caudal de cauce lleno, responsable de la modelación de la geometría del canal, se redujo 55% desde el estado previo a la construcción del dique (97 m³/s) hasta la actualidad (53,8 m³/s) (Kales *et al*, 2008).

Para la captura se emplearon redes de enmalle con luz de malla entrenudos de 30, 50 y 70 mm, equipo de pesca eléctrica y dos embarcaciones: canoa a remo y semirrígido con motor fuera de borda. Se seleccionaron siete sitios y el arte de pesca empleado en cada uno de ellos se relacionó con la profundidad de las aguas, la velocidad de la corriente y la posibilidad de acotar el tramo del río correspondiente. Se realizaron catorce muestreos entre los años 2011-2014 (Figura 1):

-Estuario: (43° 18' 45" S - 65° 03' 14" O), redes de enmalle. Forma parte de un tramo de 5 km del río entre el casco urbanizado de la ciudad y el puerto de Rawson. Es un estuario de planicie costera meso mareal, con cuña salina de régimen semidiurno de mareas y amplitudes medias de 3,83 m en

sicigias y 2,28 m en cuadraturas (Owen *et al*, 2005).

-Gaiman: (43° 17' 22,45" S - 65° 30' 22,39" O), pesca eléctrica. En aguas de escasa profundidad, sobre un sustrato de canto rodado, límpidas y carentes de vegetación sumergida como de ladera arbustiva.

-La Angostura: (43° 21' 20,97" S - 65° 39' 33,77" O), pesca eléctrica. Aguas poco profundas con corriente suave, límpidas o turbias por tramos. Presencia de vegetación sumergida y ribera de ladera arbustiva.

-28 de julio: (43° 22' 42" S - 65° 53' 18,2" O), redes de enmalle y pesca eléctrica. Aguas turbias, que oscilan entre dos y tres metros de profundidad y que corren entre laderas arbustivas.

-Boca Toma: canal principal norte (43° 26' 41,32" S - 65° 56' 29,97" O), redes de enmalle y pesca eléctrica. Aguas canalizadas con suave corriente, turbias, sobre un sustrato cubierto de canto rodado y riberas carentes de vegetación.

-Ameghino: (43° 21' 20,97" S - 65° 39' 33,77" O), redes de enmalle y pesca eléctrica. El dique F. Ameghino está localizado a 150 km al oeste de la desembocadura del río en el Océano Atlántico. Los lugares de pesca se ubicaron: a 50 m del dique, en zona de aguas someras con vegetación sumergida y a 120 m del mismo, en zona cuyas aguas

oscilaban entre dos y tres metros de profundidad con vegetación sumergida.

Los ejemplares recolectados se trasladaron al laboratorio donde se almacenaron en un freezer hasta su posterior procesamiento. Se llevó a cabo la identificación sistemática de los peces y se obtuvo el peso total (W) al g y el largo total (Lt) al mm menor más cercano. Se reconoció el sexo mediante examen macroscópico del dimorfismo sexual de gónadas y el estadio de madurez gonadal según la escala propuesta por Holden & Raitt (1975), modificada por Ruiz (2007) compuesta por siete estadios: I Virginal, II Preparación, III Madurando, IV Puesta, VI Pospuesta y VII Reversión.

Con los valores observados de longitud total y peso total se determinó la relación largo-peso y se estimaron los valores de a y b de la ecuación:

$$W = a LT^b$$

Según Froese (2006), la mayoría de las especies de peces (> 90 %) poseen un crecimiento isométrico (b = 3) o que fluctúan dentro de los valores b = 2,5 y b

= 3,5. En general, las especies que presentan valores fuera de este rango se deben a muestras no representativas numéricamente o a especies particulares que presentan cambios morfológicos notables durante su ontogenia.

Mediante el índice de Fulton (K) se estimó el estado de condición, o bienestar de los peces o de la población, basado en que los peces de mayor peso a determinada longitud presentan una mejor condición (Froese, 2006; Cifuentes *et al*, 2012). Es útil para comparar el estado nutricional de los individuos de una población (Froese, 2006).

$$K = \frac{W}{LT^3} * 100$$

Es de destacar la presencia de lobos marino de un pelo (*Otaria flavescens* Shaw) en aguas del río, desde el estuario hasta el límite de este estudio en el dique F. Ameghino (Jones, com. pers.). Esta situación impidió que se calaran redes de enmalle en diversos tramos del área de estudio, ante la posibilidad de su captura incidental.



Figura 1. Sitios de muestreo en el área de estudio.

Figure 1. Sampling sites in the study area.

RESULTADOS

En aguas del curso inferior del río Chubut se recolectaron 424 ejemplares. En la Tabla I se presenta el número de ejemplares capturados por fecha, sitio de muestreo y arte de pesca empleada. Entre ellos (Tabla II), se reconocieron siete especies: la lamprea, *agnatha*, junto a cuatro peces nativos, el bagre patagónico, el bagre aterciopelado, el pejerrey patagónico y la perca; y dos introducidas, la trucha marrón y la trucha arco iris. En la Figura 2 se observa que la perca fue la especie más abundante en las capturas con el 46,93 %. Presenta el modelo morfológico descrito como perca boca chica, denominada *P. laevis* por López-Albarello (2004) y que Ruzzante *et al.*

(2011) reconocen como *P. trucha*. Le sigue por su abundancia el bagre patagónico con el 28,77 %. Ambas especies fueron capturadas en las cuatro estaciones del año, la primera en todos los sitios de muestreo y la segunda estuvo ausente en la zona del dique. En un área reducida, con aguas de escasa profundidad y poca corriente, cercana al puente que cruza el canal norte de Boca Toma, fue capturado el bagre aterciopelado citado como *Diplomystes* sp. por Gosztonyi (1988), redesignado por Aspeliueta & Gosztonyi como *D. mesembrinus*, (1998) y que Arratia & Quezada-Romegialli (2017) nombran como *Olivaichthys viedmensis*.

Tabla I. Especies de peces capturadas en aguas del curso inferior del río Chubut.

Table I. Fish species caught in the lower course of the Chubut river.

	Familia	Especie	Nombre vulgar
Petromyzontiformes	Geotriidae	<i>Geotrias australis</i> Gray	Lamprea (L)
Siluriformes	Trichomycteridae	<i>Hatcheria macraei</i> (Girard) Eigenmann	Bagre patagónico (BP)
Siluriformes	Diplomystidae	<i>Olivaichthys viedmensis</i> Ringuelet	Bagre (BA) aterciopelado
Atheriniformes	Atherinopsidae	<i>Odontesthes hatcheri</i> (Eigenmann) Dyer	Pejerrey (PP) patagónico
Perciformes	Percichthyidae	<i>Percichthys trucha</i> Cuvier y Valenciennes	Perca (P)
Salmoniformes	Salmonidae	<i>Salmo trutta</i> Linneus	Trucha marrón (TM)
Salmoniformes	Salmonidae	<i>Oncorhynchus mykiss</i> Walbaum	Trucha arco iris (TAI)

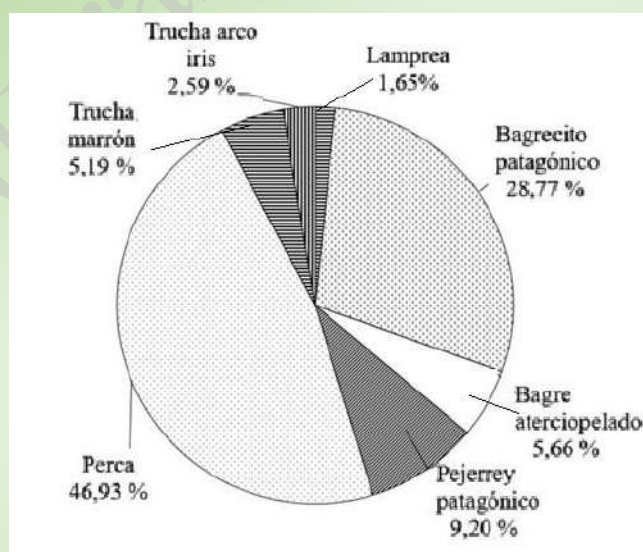


Figura 2. Distribución porcentual de las capturas de peces.

Figure 2. Percentage distribution of the catches of each fish species.

Tabla II. Distribución de la captura de peces por fecha y sitio de muestreo. En cada sitio de muestreo el arte de pesca empleado: R (redes), E (pesca eléctrica). Especies: (L) Lamprea, (BP) bagre patagónico, (BA) Bagre aterciopelado, (PP) Pejerrey patagónico, (P) Perca, (TM) Trucha marrón, (TAI) Trucha arco iris.

Table II. Distribution of fish catch by date and sampling site. At each sampling site the fishing gear used: R (nets), E (electric fishing). Species (L) Lamprey, (BP) Patagonian catfish, (BA) Velvet catfish, (PP) Patagonian silverside, (P) Perch, (TM) Brown trout, (TAI) Rainbow trout.

Fecha	Estuario	Gaiman	La Angostura	28 de Julio	Boca Toma	Embalse
	R	E	E	R-E	R-E	R -E
19/03/11	3L			13P		
8/04/11		7P-2PC				
8/07/11			1L -2P-1BP			
27/11/11		2P-1BP-4TAI				
9/02/12		6P-1TM				
10/02/12			2L-9P-7BP-23PP-TM			
1/04/12			20P-7BP-4TM			
13/08/12					22P-22BP 20BA-2TAI	
24/09/12			1L-17P-8BP 2TM			
31/03/13						16P-14PP
26/05/13					60P-9BP-1TAI 8TM-3BA	
4/03/14						4P-2PP
8/04/14					18P-5BP-1BA-TAI-3TM	
20/09/14					3P-1TAI-1TM	

En La Angostura, en primavera y verano, se hallaron cuatro lampreas semienterradas. Sus longitudes totales variaron entre 90 y 109 mm, las que corresponden al estado larvario *ammocoete*. Estos ejemplares presentaron ojos subcutáneos, piel hendida en la zona branquial y aletas indivisas. Asimismo, se capturaron tres ejemplares en aguas del estuario ($\overline{LT} = 504$ mm), en los estados

predadora (*velasia*) y senil (*geotria*) (Cousseau, 2010).

La Figura 3 presenta la distribución de frecuencias de largos totales del conjunto de ejemplares recolectados. Todas las especies están representadas por individuos juveniles y adultos, con mayor proporción de los primeros. En la Tabla III se observan, por especie, los valores de

tallas y pesos con sus promedios y desvíos estándar.

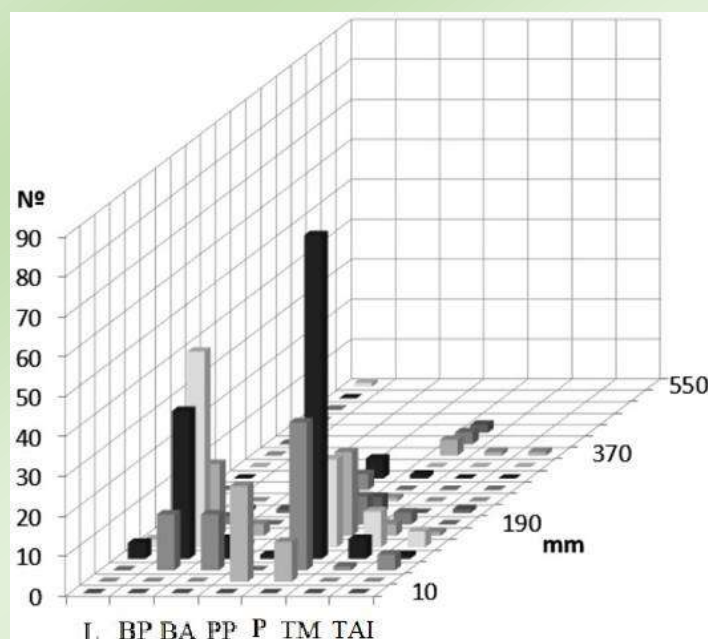


Figura 3. Distribución de frecuencias de tallas de los peces capturados. L Lamprea, BP Bagre patagónico, BA Bagre aterciopelado, PP Pejerrey patagónico, P Perca, TM Trucha marrón, TAI Trucha arco iris.

Figure 3. Size frequency distribution of the fish caught. L Lamprey, BP Patagonian catfish, BA Velvet catfish, PA Patagonian silverside, P Perch, TM Brown trout, TAI Rainbow trout.

Tabla III. Estadísticos descriptivos de la talla (Lt) y el peso (W) de los peces capturados.
Table III. Descriptive statistics of the size and weight of the fish caught.

	Lt (mm)					W (g)				
	N	Mín.	Máx.	Media	S	Mín.	Máx.	Media	S	
Lamprea	7	77	540	92	13,2	3	175	122,6	50,1	
Bagre patagónico	122	43	195	107,4	27,4	3,5	52,8	7,8	3,32	
Bagre aterciopelado	24	59	213	82,2	38,5	1,8	117,6	11,7	24,5	
Pejerrey patagónico	39	16	305	103,4	120,1	6	263	61,5	87,8	
Perca	199	24	420	107,8	72,6	2	950	49,0	150,9	
Trucha arco iris	22	52	364	125,5	43,9	1,8	477	55,7	14,7	
Trucha marrón	11	57	360	130,1	32,6	4,2	510	43,7	105,4	

De la relación largo-peso, los valores del coeficiente de crecimiento b muestran que las especies presentan un desarrollo comprendido dentro del rango isométrico (Tabla IV) es decir, que en el crecimiento se produce aumento del grosor proporcional a la talla. Las especies nativas tienen crecimiento isométrico o

con tendencia a la alometría positiva ($b > 3$). Por su parte las especies introducidas presentan una suave tendencia alométrica negativa ($b < 3$), en particular la trucha marrón $b = 2,75$. Los valores medios y desvíos estándares del factor de condición de Fulton ($\bar{k}$) se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Relación largo-peso y factor de condición de Fulton (K) de los peces capturados.
Table IV. Length–weight relationship and condition factor of Fulton (K) of fish caught.

Especies	N	a	b	$\bar{k}$	$S(\bar{k})$
Bagre patagónico	122	$2,25 \cdot 10^{-6}$	3,16	0,53	0,08
Bagre aterciopelado	24	$4,45 \cdot 10^{-6}$	3,17	0,95	0,11
Pejerrey patagónico	39	$5,94 \cdot 10^{-6}$	3,05	0,74	0,09
Perca	199	$1,15 \cdot 10^{-6}$	3,01	1,22	0,18
Trucha arco iris	11	$1,46 \cdot 10^{-6}$	2,93	1,12	0,1
Trucha marrón	22	$3,64 \cdot 10^{-6}$	2,75	1,11	0,27

La Figura 4 muestra que los ejemplares sexualmente indiferenciados alcanzaron más del 48 % en cada una de especies, como también ausencia de hembras del bagre aterciopelado y de machos entre las truchas. Si bien no se capturaron individuos en puesta en ninguna de las

especies (Figura 5), en otoño se reconoció la presencia de gónadas madurando en el bagre patagónico y en la perca. Además, se observó el estadio de reversión gonadal en verano e inicio otoñal en el pejerrey patagónico y en otoño en la perca.

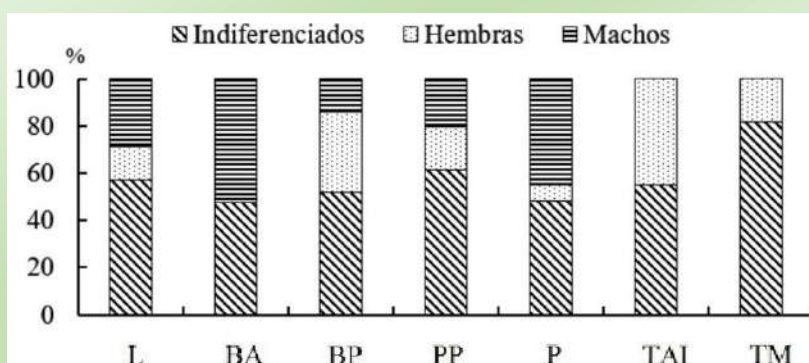


Figura 4. Proporción de sexos de los peces. L Lamprea, BA Bagre aterciopelado, BP Bagre patagónico, PP Pejerrey patagónico, P Perca, TAI Trucha arco iris, TM Trucha marrón.

Figure 4. Sex ratio of the fish. L Lamprey, BA Velvet catfish, PP Patagonian catfish, PP Patagonian silverside, P Perch, TAI Rainbow trout, TM Brown trout.

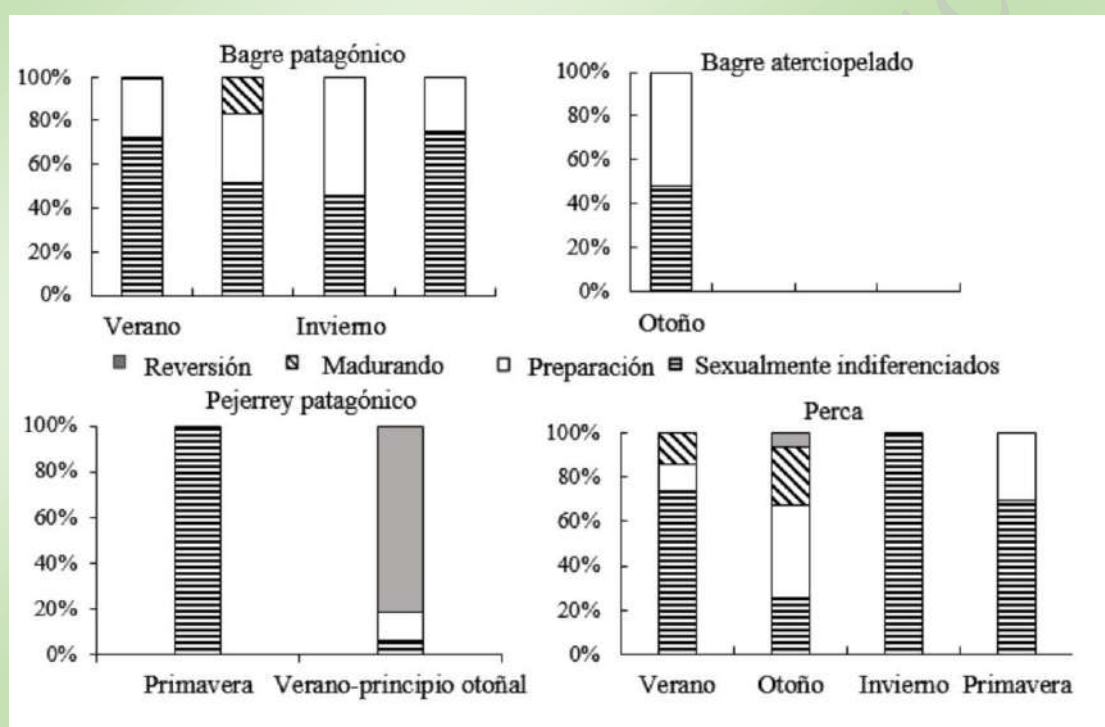


Figura 5. Distribución porcentual de estadios de madurez gonadal en peces nativos.

Figure 5. Percentage distribution of stages of gonadal maturity of native fish.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La ictiofauna del curso inferior del río Chubut comprende cinco especies nativas y dos introducidas. Estas especies cumplen su ciclo de vida en agua dulce, excepto la lamprea que es anádroma. Estos resultados son consistentes con las observaciones realizadas por Gosztanyi

(1988), con excepción de la lamprea cuya presencia no se había indicado. Puede decirse que la ictiofauna de este tramo del río es pobre, en coincidencia con lo señalado para otros ambientes de Patagonia por distintos autores (Baigún & Ferriz, 2003; Alvear *et al*, 2007; Aigo *et al*, 2008; Habit & Cussac, 2016).

Se destaca que los peces nativos tuvieron mayor abundancia relativa en las capturas respecto a los introducidos. La perca y el bagre patagónico poseyeron en conjunto el 75,7 % de las capturas y el pejerrey patagónico y el bagre aterciopelado el 14,86 %. La presencia de juveniles en todos los sitios de muestreo señala que las poblaciones cumplen su ciclo de vida en este tramo del río, con excepción de la lamprea que es anádroma.

La presencia del estado *ammocoete* de la lamprea permite reconocer que el ambiente del hallazgo sería propicio para el desarrollo larvario y juvenil. Consecuentemente, aporta información sobre el ciclo natural de esta especie en el río Chubut e indica un área favorable para el desove. El estado en metamorfosis *macrophthalmia* se había descrito en un ejemplar procedente de la cañería de agua potable de la ciudad de Trelew (Azpelicueta *et al*, 2001). El bagre aterciopelado, en distintos muestreos fue hallado en un espacio reducido de Boca Toma, característica de distribución ya señalada por otros autores (Bello & Úbeda, 1998).

El valor más bajo del Factor $\bar{k}$ en el bagre patagónico (0,53) respecto al del bagre aterciopelado (0,95) muestra que, a iguales tallas, los primeros tienen menor peso corporal; son menos robustos con cuerpo más alargado. El $\bar{k}$ observado en el

bagre aterciopelado se halla dentro del rango de variación estimado para diferentes especies del mismo género en otros ambientes (*D. nahuelbutaensis* y *D. camposensis*) (Habit, 2005; Cifuentes *et al*, 2012). El $\bar{k}$ = 0,74 del pejerrey patagónico, se encuentra dentro de los valores que indican buen estado de condición somática para esta especie (Ruiz, 2007; Mancini *et al*, 2016). El $\bar{k}$ = 1,22, S= 0,18 de la perca se halla comprendido dentro de las estimaciones obtenidas para la especie en la Provincia del Chubut en los lagos Musters y Colhue Huapi, laguna Esquel y el embalse F.Ameghino, (Baigún & De Nichilo, 1984; Fondacaro & Ruiz, 1995-2003). Los peces presentaron aspecto general saludable y no se observaron malformaciones corporales ni manchas tegumentarias.

Los estadios de maduración gonadal observados podrían señalar que el proceso madurativo comienza a fin del verano, prosigue en otoño e invierno, con posible puesta a fines de la estación fría y principios de primavera. Ello resulta coincidente con lo observado para el bagre patagónico, el pejerrey patagónico y la perca (Ruiz, 2007; López Cazorla & Sidorkewicz, 2008; Barriga & Battini, 2009).

Este estudio constituye un aporte para el manejo y la conservación de los recursos ícticos del curso inferior del río Chubut.

BIBLIOGRAFIA

- Arratia G. & Quezada-Romegialli C. 2017. Understanding morphological variability in a taxonomic context in Chilean diplomystids (Teleostei: Siluriformes), including the description of a new species. *PeerJ*, **5**:e2991: 1-40 <https://doi.org/10.7717/peerj.2991>
- Aigo, J, Cussac, V, Peris, S, Ortubay, S, Gómez, S, López H, Gross M, Barriga J & Battini M. 2008. Distribution of introduced and native fish in Patagonia (Argentina): patterns and changes in fish assemblages. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **18**: 387–408.
- Alvear P.A., Rechenco, M., Macchi P.J., Alonso M.F., Lippolt G. E., Denegri M. A., Navone G., Zattara E. E., García Asorey M. I. & Vigliano P. H. 2007. Composición, distribución y relaciones tróficas de la ictiofauna del río Negro, Patagonia Argentina. *Ecología Austral*, **17**: 231-246.
- Azpelicueta M. de las M. & Gosztonyi, A.E. 1998. Redescription of *Diplomystes mesembrinus* (Siluriformes, Diplomystidae). *Revue suisse de Zoologie*, **105** (4): 901–910.
- Azpelicueta, M. de las M., Figueroa D.E., Herrera R. & Gosztonyi A.E. 2001. The *macrophthalmia* stage *Geotria australis* Gray, 1851 (Petrizomizontiformes: Geotriidae) in Argentina. *Neotrópica*, **47**: 81-84.
- Baigún, C. & De Nichilo, A. 1984. Evaluación del potencial pesquero en seis lagos de la Provincia del Chubut. Tercera Parte. Pesca Experimental. Informe de Avance N°1. Departamento de Aguas Continentales, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero. 40pp., 62 Tablas, 34 Figuras.
- Baigún, C. & Ferriz R. 2003. Distribution patterns on native freshwater fishes in Patagonia (Argentina). *Organisms, Diversity and Evolution*, **3**: 151-159.
- Barriga J.P. & Battini M.A. 2009. Ecological significances of ontogenetic shifts in the stream-dwelling catfish, *Hatcheria macraei* (Siluriformes, Trichomycteridae), in a Patagonian River. *Ecology of Freshwater Fish*, **18**: 395-405.
- Bello, M.T. & Úbeda C. A. 1998. Estado de conservación de los peces de agua dulce de la Patagonia argentina. Aplicación de una metodología objetiva. *Gayana Zoología*, **02** (1): 45–60.
- Cifuentes, R., González, J., Montoya, G., Jara, A., Ortiz, N., Piedra, P. & Habit, E. 2012. Relación longitud-peso y factor de condición de los peces nativos del río San Pedro (cuenca del río Valdivia, Chile). *Gayana Especial*: 101-110.
- Cousseau, M.B. 2010. Las lampreas (Clase Petromyzontida). En: Cousseau, M.B. (Ed.). Ictiología. Aspectos fundamentales. La vida de los peces sudamericanos: 61-88. Eudem, Mar del Plata, Argentina. 665 pp.
- Ferriz, R.A. 2012. Dieta de *Hatcheria macraei* (Girard, 1855) (Teleostei, Siluriformes, Trichomycteridae) en el río Chubut, Argentina. *Latin American Journal of Aquatic Research*, **40** (1): 248-252.
- Fondacaro, R, Ruiz, A. Informes Técnicos: Controles de Ictiofauna en embalse Florentino Ameghino, 1995 a 2003. Hidroeléctrica Ameghino S. A. Trelew, Chubut, Argentina.
- Froese, R. 2006. Cube low, condition factor and weight-length relationships: history, meta-analysis

- and recommendations. *Journal of Applied Ichthyology*, **22**: 241-253.
- Gosztonyi, A.E. 1988. Peces del río Chubut inferior, Argentina. *Physis*, Buenos Aires, **B 46 (110)**: 41-50.
- Habit, E. 2005. Aspectos de la biología y hábitat de un pez endémico de Chile en peligro de extinción (*Diplomystes nahuelbutaensis* Arratia, 1987). *Interciencia*, Caracas, **30** (1): 8-11
- Habit, E. & Cussac, V. 2016. Conservation of the freshwater fauna of Patagonia: an alert to the urgent need for integrative management and sustainable development. *Journal of Fish Biology*, **89**: 369–370.
- Holden, M.J. & Raitt, D.F.S. 1975. Manual de Ciencias Pesqueras: Parte 2. Métodos para Investigar los Recursos y su Aplicación. *FAO, FIRS/115*, Rev.1, Roma., 211 pp.
- Jones, A.C. 2011. Distribución del visón (*Mustela vison*) en la provincia del Chubut y posibles conflictos con actividades humanas. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Patagonia San Juan Bosco, Trelew, Chubut, Argentina. 67 pp.
- Kaless, G., Matamala, F., Monteros, B. & Greco, W. 2008. Cambios hidrológicos y morfológicos en el río Chubut aguas debajo de la presa Florentino Ameghino [http://www.repositorio.cenpat-conicet.gob.ar/\(07/18\)](http://www.repositorio.cenpat-conicet.gob.ar/(07/18)).
- Leyton, F.S.A., Muñoz, E., Gordillo, S.M., Sánchez, G.G.C., Muñoz, L.A. & Soto, D.A. 2015. Estimación del factor de condición de Fulton (K) y la relación longitud-peso en tres especies ícticas presentes en un sector sometido a factores de estrés ambiental en la cuenca alta del río Cauca. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, Colombia, **27**: 24-31.
- López Cazorla, A. & Sidorkewicz, N. 2008. Age and Growth of largemouth perch *Percichthys colhuapiensis* in the Negro river, Argentine Patagonia. *Fisheries Research*, **92**: 169-179.
- López, H.L. & Miquelarena, A.M. 2005. Biogeografía de los peces continentales de la Argentina. I Jornadas Biogeográficas de la Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática (RIBES XIII-CYTED). Pp. 509-548, México. *ProBiota*. FCNyM, UNLP, La Plata, Argentina. URL: <http://hdl.handle.net/10915/50703>
- López-Albarello, A. 2004. Taxonomy of the genus *Percichthys* (Perciformes: Percichthyidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, **15** (4): 331–350.
- Mancini, M., Grosman, F., Dyer, B., García, G., Del Ponti, O., Sanzano, P. & Salinas, V. 2016. Pejerreyes del sur de Sudamérica. Aportes al estado del conocimiento con especial referencia a *Odontesthes bonariensis*. UniRío, Colección Académico-Científica, Córdoba, Argentina, 279 pp.
- Owen, J., Hughes, G., Herrera, G., Serdà, A. & Griznik, M. 2005. Manejo integral del estuario del Río Chubut. *Párrafos Geográficos*, Año IV N°4: 143-189. URL: http://igeopat.org/parrafosgeograficos/images/RevistasPG/2005_V4/4-7.pdf
- Ringuelet, R.A. 1975. Zoogeografía y Ecología de los peces de aguas continentales de la Argentina y algunas consideraciones sobre áreas ictiológicas de América del Sur. *Ecosur*, La Plata **3**: 1–122.
- Ruiz, A.E. 2007. Biología del Pejerrey Patagónico en el embalse Florentino Ameghino, Chubut, Argentina. 2007. Editorial UNIVERSITAS, Serie Ciencias Naturales. Córdoba, Argentina, 167 pp.
- Ruzzante, D.E., Walde, S.J., Macchi, P.J., Alonso, M. & Barriga, J. P. 2011. Phylogeography and phenotypic diversification in the Patagonian fish *Percichthys trucha*: the roles of Quaternary glacial cycles and natural selection. *Biological Journal of the Linnean Society*, **103**: 514-529.

Alternativas para mejorar la disposición final de residuos domiciliarios de medicamentos

Alternative options of improving household pharmaceutical waste disposal

Romina I. Merino Valle^{1*}, Rita R. Kurdelas¹, Adriana del Luján Mangani¹

¹Departamento de Química. Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Ruta Provincial N° 1, Km 4 (9000) Comodoro Rivadavia. Chubut, Argentina.

*romina-merino@hotmail.com

RESUMEN

Se observa preocupación creciente a nivel mundial respecto al cuidado del medio ambiente. Dentro de este marco, una problemática a abordar está relacionada con la correcta eliminación de los residuos de medicamentos domiciliarios, que no están contemplados en la legislación argentina. En la actualidad gran parte de los medicamentos que expiran o sobran de algún tratamiento son eliminados a través de los residuos domiciliarios o por la red cloacal pudiendo llegar a contaminar los distintos ambientes: biosfera, hidrosfera y/o geosfera. Se han planteado como objetivos de este trabajo buscar soluciones que minimicen el impacto ambiental producido por el desecho de residuos de medicamentos y encontrar una alternativa viable, sencilla y lo más amigable posible para el ambiente que pueda aplicarse a nivel domiciliario y permita introducir el producto obtenido en una economía circular. Se evaluaron cuatro posibles mezclas cementicias para inmovilizar los medicamentos en botellas plásticas (tipo PET) de 500 mL para una eliminación más racional de residuos domiciliarios de medicamentos. Se incluyeron medicamentos de forma farmacéutica sólida en blisters, manteniendo la integridad de su envase primario. Se retiraron las cajas, prospectos y recortes de blister sin medicamento, los que se pueden reciclar como residuo seco. Con esta separación se redujo el volumen aparente del residuo en un 85% y el peso en un 53% . Se evaluaron las distintas mezclas resultando más conveniente la que contenía cemento, arena, agua y medicamentos en proporción 1:3:1:1.

PALABRAS CLAVE: contaminación, economía circular, encapsulación, inmovilización, residuo de medicamento.

ABSTRACT

There is an increasing global concern for the environment. In this context, one of the issues to address is the appropriate elimination of household pharmaceutical waste. There is no legislation regarding this kind of waste collection and disposal in Argentina. Nowadays this waste is mostly thrown to the garbage or flushed down through the sewage. In this way it might contaminate different ecological systems: biosphere, hydrosphere and/or geosphere. The aim of this work is to bring approaches to minimize the environmental hazard of the household pharmaceutical waste and to find a simple viable alternative which could be applied in any home and which could be included in a circular economy. Four possible cementitious mixtures were evaluated to immobilize the medicines in 500 mL plastic bottles (PET). The medicines were solid forms packed in blisters. The integrity of the primary packaging was held. The outer packaging including boxes, paper and empty portions of the blisters were separated leading to a reduction in the original apparent volume of 85% and a reduction in weight of 53%. These separated materials may be recycled. After evaluating the different mixtures, the one containing cement, sand, medicines and water in 1:3:1:1 proportion resulted to be the best.

KEY WORDS: circular economy, encapsulation, immobilization, pharmaceutical waste, pollution.

INTRODUCCION

Se ha demostrado ampliamente la presencia de diversas sustancias farmacológicamente activas en aguas superficiales, subterráneas y aún en agua potable, suelo y biota (Heberer, 2002; Weber *et al*, 2014). En los últimos años se han reportado hallazgos de este tipo en Argentina (Elorriaga, 2013a y 2013b; Valdes, 2014; Llorca, 2016; Rojo, 2019; Ondarza, 2019; Delgado Espinosa, 2019). Las excretas humanas y de animales tratados con medicamentos constituyen la principal fuente de esta contaminación ya que contienen cantidades apreciables de

fármacos inalterados, así como sus metabolitos, los que permanecen en el ambiente y se acumulan en distintas localizaciones de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, tales como fotosensibilidad, biodegradabilidad y lipofilidad (Montague, 1998; Ralof, 2002; Heberer, 2002).

Los residuos de medicamentos inutilizados dispuestos de manera inapropiada se suman a las fuentes de contaminación anteriormente mencionadas, constituyendo una amenaza para el ambiente y los seres vivos que lo habitan.

Entre las principales consecuencias reportadas se pueden mencionar: la contaminación de las aguas, la destrucción de la flora microbiana responsable de la degradación de otros residuos, la aparición de cepas resistentes a los antimicrobianos en uso (Thiele-Bruhn, 2019), alteraciones diversas en distintas especies animales y vegetales (Montague, 1998; Raloff, 2002; Sanderson *et al*, 2003), la generación de productos tóxicos atmosféricos por combustión incompleta de residuos. Todos estos factores afectan indirectamente la salud humana, sin embargo también puede haber una afectación directa por consumo de estos medicamentos vencidos en forma voluntaria o inadvertida por niños (Dalmazzo, 2009), adolescentes o adultos en el propio domicilio o en lugares donde se almacenan los residuos (Mintegi, 2012).

Los residuos de medicamentos tienen su origen tanto en los hogares como en diversas instituciones, tales como establecimientos industriales y aquellas vinculadas con la atención de la salud y a la cadena de comercialización de medicamentos (Kurdela *et al*, 2005).

Anteriormente el grupo de trabajo puso en evidencia a través de una encuesta que el 77% de la población de tres localidades del sudeste de Chubut desecha sus residuos de medicamentos junto con los

residuos sólidos urbanos, el 91% estaría dispuesto a llevarlos a un sitio específico si lo hubiera y el 95% considera necesario un cambio en la forma de desecharlos (Merino Valle *et al*, 2019).

Esta situación genera preocupación creciente en la comunidad a nivel global como parte de los esfuerzos por minimizar el impacto de la actividad humana sobre el ambiente.

El problema ha sido abordado en otros países con sistemas de recolección, clasificación y tratamiento adecuado de los mismos, tales como SIGRE en España, Valormed en Portugal, Cyclamed en Francia, Recyclomed en Hungría, Corporación Punto Azul en Colombia, SINGREM en México, Descarte Consciente en Brasil, RUM en Australia, entre otros. En muchos casos estos sistemas son financiados total o parcialmente por la industria farmacéutica.

La legislación argentina ha reglamentado la disposición de residuos de medicamentos provenientes de instituciones (Ley 24.051), pero no ha avanzado mucho en materia de los desechos medicamentosos domiciliarios. A partir de 2019 se encuentra en consideración del Poder Legislativo Nacional un proyecto de ley para la implementación de un sistema de

recolección y eliminación de medicamentos pos consumo (SIREM).

Por su parte, la OMS ha dictado directivas para disponer de aquellos desechos acumulados en situaciones de conflictos bélicos y desastres naturales como consecuencia de la asistencia humanitaria ya que una parte considerable de las donaciones que llegan en esas circunstancias corresponde a medicamentos vencidos, próximos a vencer, inapropiados para las necesidades del caso, irreconocibles por estar rotulados en idioma extranjero o que llegan en cantidades superiores a lo necesario, creando problemas sanitarios adicionales (OMS, 1999).

Entre los métodos de disposición final propuestos para estos casos se menciona la inertización y la encapsulación.

La encapsulación consiste en la inmovilización de los productos farmacéuticos en un bloque sólido dentro de un recipiente de adecuada resistencia que se llena al 75% de su capacidad con fármacos sólidos y semisólidos, y luego se rellena el espacio restante con una mezcla cementicia.

La inertización es una variante de la encapsulación e incluye la separación de los materiales de envasado (papel, cartón o plástico) de las preparaciones farmacéuticas. Los fármacos se trituran y se agrega una mezcla cementicia para

formar una pasta homogénea. El personal que se ocupe de esta tarea debe utilizar ropa protectora y máscaras porque se encuentra más expuesto al polvo que liberan los medicamentos en el procedimiento.

En este trabajo nos planteamos como objetivos:

- Buscar soluciones que minimicen el impacto ambiental producido por el desecho de residuos de medicamentos.
- Encontrar una alternativa viable, sencilla y lo más amigable posible para el ambiente que pueda aplicarse a nivel domiciliario y permita introducir el producto obtenido en una economía circular.

METODOLOGIA

Siguiendo una de las alternativas propuestas de la OMS para la eliminación de residuos medicamentosos, se seleccionó como metodología la encapsulación con la particularidad de introducir la mezcla de medicamentos y cemento en botellas plásticas de desecho. El procedimiento ensayado consistió en inmovilizar medicamentos en botellas plásticas (tipo PET) de 500 ml con cuatro mezclas cementicias de distinta proporción a excepción de la D donde se cambia también la composición:

A: cemento, arena, agua, medicamentos en proporción 1:1:1:1.

B: cemento, arena, agua, medicamentos en proporción 1:2:1:1.

C: cemento, arena, agua, medicamentos en proporción 1:3:1:1.

D: cemento, cal, agua, medicamentos en proporción 1:1:1:1.

Se incluyeron medicamentos de forma farmacéutica sólida en blisters,

descartando las cajas, prospectos y partes vacías del blister, manteniendo la integridad de la zona en contacto directo con el medicamento. De esta forma el fármaco sigue recubierto con su envase primario que lo aísla y además evita que el operador tome contacto directo con el mismo (Figura 1).



Figura 1. Cajas y prospectos, medicamentos y partes de blisters sin medicamento por separado. Como se observa abajo a la izquierda quedan las unidades de medicamento con su envase primario conservado que serán incorporadas junto con la mezcla cementicia en las botellas plásticas.

Figure 1. Boxes, leaflets, medicines and parts of the blisters without medicines separately. Below, on the left, a view of the medicines maintaining their primary packaging as they'll be incorporated in the plastic bottles with the cementicial mixture.

Las botellas limpias se llenaron con fármacos sólidos y el volumen restante con la mezcla cementicia a ensayar (Figura 2). Luego de 72 hs se coloca la tapa a rosca.

Es necesario aclarar que se propone aplicar el método para cualquier tipo de medicamento en forma farmacéutica sólida a excepción de citotóxicos que por su peligrosidad para el ambiente y para el operador resulta más conveniente que sean remitidos a instituciones sanitarias para su tratamiento en incineradores de dos cámaras a alta temperatura (por lo menos 1200 °C en la cámara secundaria) equipados con filtros de alta seguridad (HEPA) para el lavado de gases.



Figura 2. A la izquierda se observa el llenado de las botellas y a la derecha el producto final con la mezcla solidificada.

Figure 2. On the left a view of the bottle filling procedure and on the right the final product with the solidified mixture

RESULTADOS

La separación de cajas, prospectos y partes de blister sin medicamento permitió una reducción de 85 % en el volumen aparente y 53 % en el peso de residuos a disponer.

Los productos obtenidos presentaron similar aspecto, con excepción de la mezcla D que posee cal, en la que se observó menor uniformidad.

Las otras tres mezclas ensayadas mostraron buena adherencia a los medicamentos y una resistencia satisfactoria. La mezcla C, que posee la mayor proporción de arena, habitualmente se utiliza para mampostería para evitar que el producto final se fisure durante el fraguado.

DISCUSIONES Y CONCLUSION

Una correcta disposición y eliminación de residuos de medicamentos de los hogares contribuiría a la protección del medio ambiente.

Al igual que con cualquier otro residuo potencialmente peligroso, la primera medida a adoptar es minimizar su generación. En este sentido, es

fundamental hacer todos los esfuerzos posibles para el logro de un manejo racional del medicamento. Esto implica múltiples acciones, tales como la prescripción responsable por parte de los profesionales de la medicina, odontología y veterinaria, y la educación de los consumidores en relación con la automedicación y la acumulación de

medicamentos en botiquines caseros. El método de separación propuesto contribuye a la minimización del residuo al reducir considerablemente el volumen a disponer.

Se conocen varios métodos para la disposición final de residuos provenientes de instituciones sanitarias, tales como: incineración a altas temperaturas (1200 °C); inertización e inmovilización y posterior enterramiento en rellenos sanitarios seguros, entre otros (Fernández Villagómez y Torres Rivera, 2014).

Elegimos para este trabajo la encapsulación de medicamentos por tratarse de un procedimiento simple, fácil de implementar y poco riesgoso para el operador. Con cualquiera de las cuatro mezclas ensayadas los productos obtenidos resultan más adecuados para la eliminación de los medicamentos en comparación con el desecho en los residuos sólidos urbanos o líquidos cloacales como ocurre mayormente en la actualidad.

BIBLIOGRAFIA

Dalmazzo, R. 2009. Intoxicación por ingesta de medicamentos. *Rev. Med. Clin. Condes.* **20**(6): 878-882.

Delgado Espinosa, N.Y. 2019. Diagnóstico y remoción de contaminantes emergentes en aguas superficiales y cloacales. Tesis doctoral, UNLP.

Elorriaga, Y., Marino, D.J., Carriquiriborde, P., Ronco, A.E., 2013a. Human pharmaceuticals in

De las otras cuatro mezclas ensayadas se concluye que la C resulta la más adecuada para inmovilizar los medicamentos por la buena adherencia, resistencia y menor costo.

El grupo de trabajo se propone en una próxima etapa estudiar la viabilidad de empleo de los productos resultantes como material de construcción u otra aplicación a fin de lograr una economía circular y sobre todo una eliminación segura que no perjudique a generaciones futuras. Cabe destacar que con la sola inmovilización propuesta se reduce considerablemente la peligrosidad del residuo. Esta propuesta podría ser utilizada a nivel municipal hasta tanto se promulgue una ley nacional al respecto.

Asimismo está previsto dar continuidad al trabajo comunitario de concientización sobre el uso responsable de medicamentos y el impacto que sus residuos producen en el medio ambiente.

wastewaters from urbanized areas of Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **90**, 397-400.

Elorriaga, Y., Marino, D.J., Carriquiriborde, P., Ronco, A.E., 2013b. Screening of pharmaceuticals in surface water bodies of the Pampas region of Argentina. *Int. J. Environ. Health* **6**: 330-339.

Fernández Villagómez, G. y Torres Rivera, P., 2014. Guía para la disposición segura de

- medicamentos caducos acumulados en situaciones de emergencia. CENAPRED, México. 26 pp.
- Heberer, T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* **131**: 5-17.
- Kurdela, R.; Botha, M.; Das Neves Guerreiro, M.; Condina, L.; Morales, M.; Salas, V.; Fernández, M.; Gamarra, K.; García, A.; Rossi, A.; Rowlands, M.; Parédez, S.; Vidal, S. 2005. Residuos de medicamentos en Comodoro Rivadavia, Argentina. *Acta Farm. Bonaerense*. **24**(2): 256-260.
- Ley N° 24.051/1992 y Decreto Reglamentario N° 831/1993. Residuos Peligrosos.
- Llorca, M.; Farré, M.; Eljarrat, E.; Díaz-Cruz, S.; Rodríguez-Mozaz, S.; Wunderlin, D. y Barcelo, D. 2016. Review of emerging contaminants in aquatic biota from Latin America: 2002-2016. *Environ. Toxicol. Chem.* **36** (7): 1716-1727.
- Merino Valle, R.I.; Kurdela, R.R.; Méndez, I.E.; Mangani, A. del L. 2019. Abordaje de la problemática de los residuos domiciliarios de medicamentos en la provincia de Chubut. *Acta Toxicol. Arg.* **27**: 59-60.
- Mintegi, S. 2012. Manual de Intoxicaciones en Pediatría. 3° Ed. 476 pp.
- Montague, P. 1998. Drugs in the water, *Rachel's Environment & Health Weekly*. **614**.
- Ondarza, P.M.; Haddad, S.P.; Avigliano, E.; Miglioranza, K.S.B.; Brooks, B.W. 2019. Pharmaceuticals, illicit drugs and their metabolites in fish from Argentina: Implications for protected areas influenced by urbanization. *Sci. Total Environ.* **649**: 1029-1037.
- Proyecto de ley Expte. S-2707/19. Disponible en: www.senado.gov.ar
- Raloff, J. 1999. Waterways carry antibiotic resistance. *Science News Online*, **155** (23): 356.
- Raloff, J. 2002. Pharm Pollution: Excreted antibiotics can poison plants. *Science News* **161** (26): 406-407.
- Rojo, M.; Alvarez-Muñoz, D.; Domanico, A.; Foti, R.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barcelo, D.; Carriquiriborde, P. 2019. Human pharmaceuticals in three major fish species from the Uruguay River (South America) with different feeding habits. *Environmental Pollution*. **252**: 146-154.
- Sanderson H., Johnson D.J., Wilson C.J., Brain R.A., Solomon K.R. 2003. Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicology Letters* **144**: 383-395.
- Thiele-Bruhn, S. 2019. Environmental risks from mixtures of antibiotic pharmaceuticals in soils – a literature review. Final report (UBA-FB) FB000071.
- Valdes, M.E., Ame, M.V., Bistoni, M.D.L.A., Wunderlin, D.A., 2014. Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquia River basin (Cordoba, Argentina). *Sci. Total Environ.* **472**: 389-396.
- Weber, F.; aus der Beek, T.; Bergmann, A.; Carius, A.; Grüttner, G.; Hickmann, S.; Ebert, I.; Hein, A.; Küster, A.; Rose, J.; Kock-Jugl, J.; Stolzenberg H. 2014. German Environment Agency. 12 pp.
- WHO. 1999. Guidelines for safe disposal of unwanted pharmaceuticals in and after emergencies. WHO/HTP/EDM/99.2.

Diseño de dispositivos para la determinación simultánea de cromo III y VI en multivitamínicos

Devices design for the simultaneous determination of chromium III and VI in multivitamins

Luis Eduardo Ojeda^{1,3}, Marianela Jaquelina Vega², Silvia Alejandra Miscoria^{1*}

¹Departamento de Química, ²Departamento de Medicina. Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. ³CONICET – CIT “Golfo San Jorge”. Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina. *silviamiscoria@unpata.edu.ar

RESUMEN

Este trabajo muestra el diseño una nueva plataforma sensora, con un ionóforo de cromo como elemento de reconocimiento y de detección amperométrica, basada en la modificación de electrodos *screen-printed* para la cuantificación de Cromo III y Cromo VI en formulaciones multivitamínicas. Se prepararon y caracterizaron electrodos serigrafiados a base de carbono simples, de bajo costo y resistentes a ácidos modificados para la detección de especies de cromo trivalente y hexavalente. Se examinó y optimizó el efecto de las condiciones experimentales para la preparación del sensor sobre el rendimiento analítico de los electrodos resultantes. Todos los materiales se formularon con oxaldihidrazona bis-ciclohexanona; también llamado cuprizona, como ionóforo selectivo para la detección de compuestos de cromo.

La excelente selectividad del ionóforo posibilitó la especiación debido a las corrientes de reducción del ion. No se observaron interferencias, incluso para un gran exceso de vitaminas y otros elementos. La respuesta del electrodo resultó ser rápida (4 s).

PALABRAS CLAVE: Cromo, electroquímica, ionóforo, sensores

ABSTRACT

This work reports on a new amperometric chromium ionophore platform as recognition element based on the modification of screen-printed electrodes for the quantification of Chromium III and Chromium VI in multivitamin formulations. Simple, low-cost and acid-resistant modified carbon-based screen-printed electrodes for detection of trivalent and hexavalent chromium species were prepared and characterize. The effect of the experimental

conditions for the preparation of the sensor on the analytical performance of the resulting electrodes is examined and optimized. All materials were formulated with bis(cyclohexanone)oxaldihydrazone; also called cuprizone, as the selective ionophore for chromium compound detection.

The excellent selectivity of the ionophore made speciation possible due to ion reduction currents. No interferences were observed, even for a large excess of vitamins and other elements. The electrode response turned out to be fast (4 s).

KEY WORDS: Chromium, electrochemistry, ionophore, sensors

INTRODUCCION

La correcta determinación de las distintas especies de un analito en su matriz, es siempre de gran importancia en química. Para determinar elementos, históricamente se han utilizado técnicas muy caras y complicadas. El método común es la separación de iones de cromo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), a menudo junto con sofisticados sistemas de detección como plasma acoplado inductivamente (ICP), emisión atómica o espectrometría de masas (Jen *et al*, 1993; Andrieu y Broekaert, 1993). Sin embargo, estos procedimientos no satisfacen todos los requisitos para los análisis de rutina, principalmente debido al complicado tratamiento de la muestra, al consumo de tiempo o al alto costo de la instrumentación. La determinación de estos analitos con electrodos es más práctica y económica.

El metal de transición cromo existe en varios estados de oxidación, los cuales

tienen distinta estabilidad. Los números de oxidación más comunes son 0, II, III y VI. Tanto el Cr (III) como el Cr (VI) se encuentran en la naturaleza con impactos distintos sobre el medio ambiente y la salud. El cromo trivalente es relativamente inofensivo y juega un papel importante en algunos procesos biológicos. El cromo es uno de los oligoelementos traza esenciales presentes en formulaciones farmacéuticas de multiminerales/multivitamínicos, las que contienen solo Cr III, ya sea de fuente inorgánica, en forma de cloruro de cromo, u orgánica, por lo que su detección es importante. Por otra parte, el cromo hexavalente es alrededor de 100 a 1000 veces más tóxico, dependiendo de las circunstancias. Su concentración en aguas subterráneas está restringida por la OMS; 0,05 mg/L (50 ppb). Las principales fuentes antropogénicas de contaminación por cromo de las aguas subterráneas son las industrias de galvanoplastia, torres de enfriamiento, tratamientos para la conservación de la madera, curtiembres y

fabricación de acero. Existe un alto riesgo de cáncer de pulmón entre los trabajadores expuestos al cromo (VI), en particular los asociados con la producción de pigmentos y cromado. También hay evidencia de aumento del cáncer de nariz y senos nasales, aunque muy poca información sobre la incidencia del cromo hexavalente en el cáncer de estómago (Kotas y Stasicka, 2000; Welch *et al*, 2005; OMS, 2012; Shanker y Venkateswarlu, 2011; OMS, 1993).

Las ventajas de los métodos electroanalíticos frente a otros tipos de procedimientos radican en su especificidad para cada estado de oxidación particular de un elemento y la cantidad muy pequeña de muestra requerida para el análisis, incluso insuficiente para otras técnicas. Las muestras a estudiar pueden ser turbias e incluso sólidas. Otra ventaja importante de los métodos electroquímicos es que la instrumentación es relativamente económica.

Los electrodos serigrafiados (SPE) son dispositivos planos de sustratos plásticos que se recubren con capas de tintas electroconductoras y aislantes de espesor controlado. El advenimiento de la tecnología de serigrafía de películas gruesas ha hecho posible la producción en masa de electrodos desechables económicos para su uso como

instrumentos electroquímicos (Yarnitzky *et al*, 2000; Ugo *et al*, 1998; Gholivand y Sharifpour, 2003; Gholivand y Raheedayat, 2004). Nuestro grupo tiene una gran experiencia en el diseño de SPE. La gran versatilidad de los electrodos serigrafiados reside en su amplia gama de posibles modificaciones. De hecho, la composición de las tintas utilizadas en el proceso de impresión se puede modificar mediante la adición de sustancias de muy distinta naturaleza, como metales, enzimas, polímeros, agentes complejantes, etc. Además, también existe la posibilidad de modificar los electrodos, una vez impresos, mediante la deposición de películas que contienen esas sustancias. Se ha reportado su uso en dispositivos potenciométricos, amperométricos y voltamperométricos para la detección de diferentes metales pesados y cromo, aunque la bibliografía muestra muy pocos ejemplos de determinación de su especiación con este tipo de electrodos (Beni *et al*, 2005; Palchetti *et al*, 2005; Rodriguez *et al*, 2004; Honeychurch *et al*, 2002; Kadara y Tothill, 2005, Serrano *et al*, 2010; El Rhazi y Majid, 2014; Ardakani *et al*, 2005).

MATERIALES Y METODOS

Los reactivos $K_2Cr_2O_7$ y $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ fueron de la marca Anedra y el H_2SO_4 de Cicarelli. Su utilize agua tridestilada ($\rho =$

18M Ω) para la preparación de todas las soluciones. Todos los reactivos fueron de grado analítico y se utilizaron sin otra purificación. El ionóforo oxaldihidrazona bis-ciclohexanona y los fosfatos mono y di ácido de potasio fueron de Sigma-Aldrich. Los electrodos *screen printed* (SPEs) utilizados en este trabajo fueron preparados con pintura de carbono comercial (Acheson). Los electrodos fueron secados y activados a 180 °C durante una hora y luego enfriados lentamente a temperatura ambiente. La capa aislante fue ESL protective ink 240-5B, ESL Inc. Las formulaciones farmacéuticas de multivitaminas y multiminerales fueron Centrum® de Pfizer and Supradyn® de Bayer.

Su composiciones, según etiqueta, son:

Supradyn®: Vitamina A 1000 mg, Vitamina B₁ 1,5 mg, Vitamina B₂ 1,7 mg, Vitamina B₆ 2,2 mg, Vitamina B₁₂ 0,0003 mg, Vitamina C 60 mg, Vitamina D₂ 7,5 mg, Vitamina E 15 mg, Biotina 0,2 mg, Pantotenato de calcio 5,5 mg, Ácido fólico 0,1 mg, Nicotinamida 19 mg, Calcio 62,5 mg, Fósforo 62,5 mg, Magnesio 50 mg, Hierro 4,5 mg, Manganeseo 0,5 mg, Cobre 0,5 mg, Zinc 3,75 mg.

Centrum®: Vitamina A 3,500 IU, Vitamina C 60 mg, Vitamina D 400 IU, Vitamina E 30 IU, Vitamina K 25 μ g, Tiamina 1,5 mg, Riboflavina 1,7 mg, Niacina 20 mg, Vitamina B₆ 2 mg, Ácido

fólico 400 μ g, Vitamina B₁₂ 6 μ g, Biotina 30 μ g, Ácido pantoténico 10 mg, Calcio 200 mg, Hierro 18 mg, Fósforo 20 mg, Iodo 150 μ g, Magnesio 50 mg, Zinc 11 mg, Selenio 55 μ g, Cobre 0,5 mg, Manganeseo 2,3 mg, Cromo 35 μ g, Molibdeno 45 μ g, Cloruro 72 mg, Potasio 80 mg, Boro 75 μ g, Niquel 5 μ g, Silicio 2 mg, Estaño 10 μ g, Vanadio 10 μ g.

Para los experimentos, las soluciones de cada marca se prepararon disolviendo 10 pastillas en 100 mL H₂SO₄ pH:1,0. Para el caso de Centrum®, la concentración de Cromo resultó en 67 mM.

Las soluciones de Cr (VI) se prepararon a partir de K₂Cr₂O₇ en H₂SO₄ pH:1,0 y las de Cr (III) a partir de CrCl₃·6H₂O en agua destilada.

Los experimentos electroquímicos se llevaron a cabo con un analizador potenciostato/galvanostato de tipo “hecho a mano” fabricado en Argentina. Las celdas electroquímicas que se utilizaron fueron sistemas de tres electrodos (BAS®) de diversos modelos y volúmenes de trabajo y los electrodos se insertaron en la celda a través de tapas de Teflon®. Los electrodos de referencia usados para este trabajo fueron de Ag/AgCl/Cl⁻, 3M NaCl (BAS®). Todos los potenciales fueron referidos respecto a éste. Se utilizó un alambre de platino de 7,5 cm de largo, con conector BAS® modelo MW-1032 como contraelectrodo y los electrodos de trabajo

de tipo serigrafiados, tuvieron un área expuesta de carbono de 20 mm x 40 mm. El control de los mismos se realizó mediante experimentos voltamperométricos en electrolito soporte, *buffer* fosfato 0,050 M pH 7,40, descartándose los que presentaban altas corrientes de base.

Diseño de las plataformas electroquímicas

Cada SPE pasó por un proceso de limpieza por voltamperometría cíclica, con una ventana de potencial entre -1000 y 1000 mV con velocidad de barrido de 50 mVs⁻¹ en H₂SO₄ pH:1,0. Luego, el ionóforo fue presentado mediante tres estrategias diferentes y los electrodos fueron evaluados mediante experimentos amperométricos. Las estrategias fueron:

- 1) Los electrodos se sumergieron durante un tiempo determinado, en una solución de H₂SO₄ pH: 1,0 que contenía diferentes cantidades del ionóforo y preparada mediante sonicación durante 5 min.
- 2) Los sensores se prepararon colocando una gota de 20 µL sobre los SPEs con de las mismas soluciones que en el inciso anterior y se dejaron secar durante

diferentes tiempos a temperatura ambiente.

- 3) El ionóforo se electrodepositó aplicando -400 mV durante 20 min utilizando las mismas soluciones.

Estos dispositivos se denominan SPE-ionóforo.

Medidas electroanalíticas

Todos los experimentos se realizaron en una celda electroquímica de tres electrodos a temperatura ambiente, (25 ± 1) °C. Las soluciones se sometieron a agitación permanente proporcionada por un agitador magnético durante las determinaciones amperométricas. El electrolito soporte fue ácido sulfúrico pH: 1,0 o multivitamínico/multiminerales comercial en ácido sulfúrico pH: 1,0. Las medidas amperométricas se llevaron a cabo aplicando el potencial deseado y permitiendo que la corriente llegara a una meseta antes de la adición de cromo y la posterior monitorización de la corriente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizaron dos tipos de medidas: 1) Voltamperometrías cíclicas, con distintas ventanas de potencial y velocidades de corrida y 2) Amperometrías, a potenciales fijos y agregados sucesivos de Cr (VI) o Cr (III) a las soluciones.

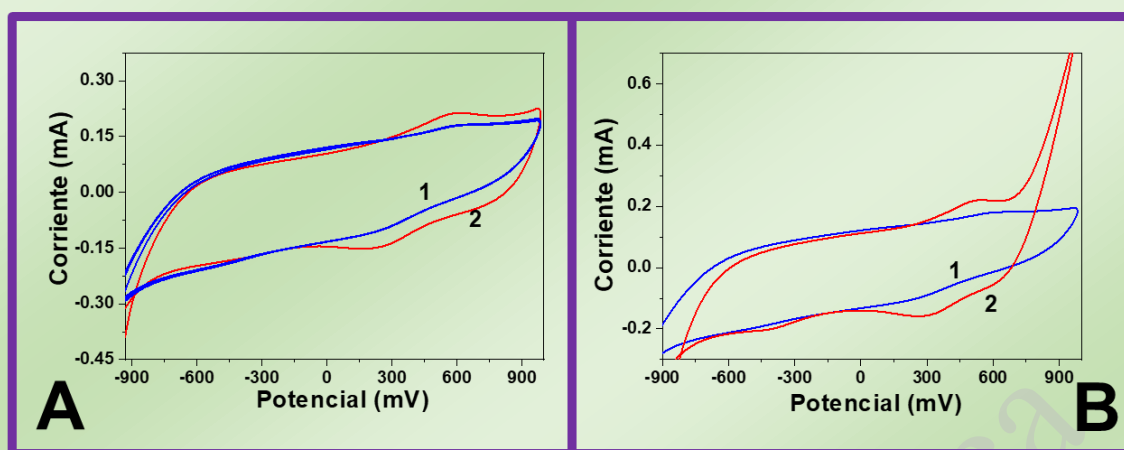


Figura 1: Voltamperogramas cíclicos para (A) SPE- desnudo y (B) SPE- ionóforo, en (1) H_2SO_4 pH: 1,0 y (2) Cr(VI) 0,2 mM en H_2SO_4 pH: 1,0. Los barridos se realizaron desde 1000 mV hasta -1000 mV para volver finalmente al potencial inicial. Velocidad de barrido: 50 mVs^{-1} . Electrodo de referencia: Ag/AgCl . Contraelectrodo: Platino.

Figure 1: Cyclic voltammograms for (A) SPE-nude and (B) SPE-ionophore, for (1) H_2SO_4 pH:1,0 and (2) 0,2 mM Cr(VI) in H_2SO_4 pH:1,0. The scans were performed from 1000 mV to -1000 mV to return finally to the initial potential. Scan rate: 50 mVs^{-1} . Reference electrode: Ag/AgCl . Counter electrode: Platinum.

La Figura 1 muestra voltamperogramas cíclicos obtenidos a 50 mV s^{-1} para un diseño (A) SPE-desnudo y (B) SPE-ionóforo por electrodeposición en soluciones oxigenadas de H_2SO_4 pH: 1,0. Los barridos se realizaron desde 1000 mV hasta -1000 mV para volver finalmente al potencial inicial. El contraelectrodo fue platino y el electrodo de referencia fue Ag/AgCl , como se indicó anteriormente. Como se puede ver en la Figura 1A, aparece un pequeño pico de reducción alrededor de +260 mV, para Cr(VI) 0,2 mM en H_2SO_4 pH: 1,0 (perfil 2); mientras que no aparece ninguna señal para el electrolito de soporte (perfil 1). Se realizaron experimentos idénticos utilizando Cr(III) , los cuales no mostraron señal a +260 mV. Este pico se consideró;

entonces, reducción de Cr(VI) en la superficie de carbono del electrodo. La Figura 1B no muestra respuesta para (1) electrolito soporte sobre SPE-ionóforo; pero sí una señal mayor de reducción de Cr(VI) y una segunda señal de reducción con una intensidad de corriente medible a un potencial alrededor de -410 mV atribuida a la reducción de Cr(III) , proveniente de la reducción del Cr(VI) y debido a la presencia del ionóforo complejante selectivo para esa especie en particular.

La sensibilidad de los sensores para detectar y cuantificar Cr(VI) se determinó mediante experimentos amperométricos en lugar de voltamperometrías cíclicas, observando el efecto de incrementos

sucesivos de concentración sobre la corriente detectada a potencial fijo.

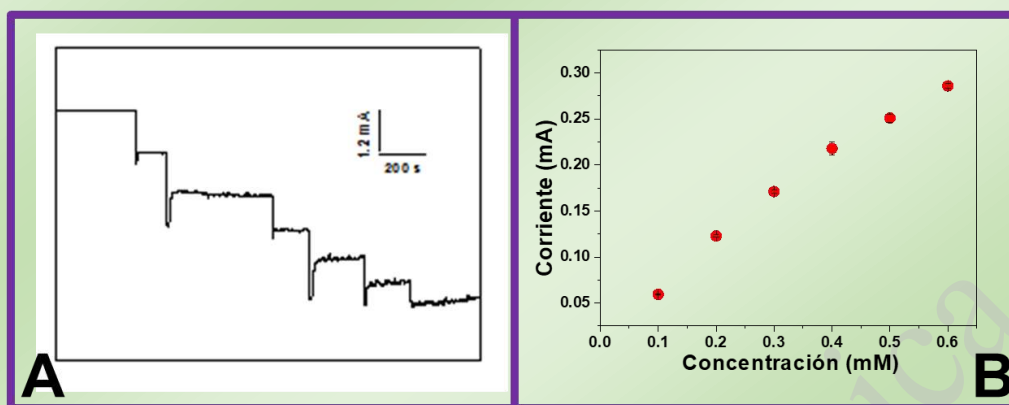


Figura 2: Registro amperométrico (A) y gráfico de calibración (B) obtenidos por adiciones sucesivas de Cr(VI) 0,1 mM, a +260 mV. Electrolito de soporte: H₂SO₄ pH: 1,0. Electrodo de referencia: Ag/AgCl. Contraelectrodo: Platino.

Figure 2: Amperometric recording (A) and calibration plot (B) obtained from successive additions of 0,1 mM Cr(VI), at +260 mV. Supporting electrolyte: H₂SO₄ pH: 1,0. Reference electrode: Ag/AgCl. Counter electrode: Platinum.

La Figura 2A muestra una porción de un registro amperométrico obtenido de un experimento realizado por adiciones sucesivas de Cr(VI) 0,1 mM, a +260 mV para un diseño SPE-ionóforo por electrodeposición, mientras que la gráfica de calibración respectiva se muestra en la Figura 2B. Se observa una señal catódica sensible con un tiempo de respuesta rápido. El promedio de los datos de cinco calibrados arrojó una sensibilidad para electrodo de $(0,540 \pm 0,007) \text{ mAmm}^{-1}$ con $R^2 0,994$. El comportamiento de la porción lineal se extendió en un rango dinámico hasta 10 mM con un límite de detección de $3 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$. El tiempo de respuesta fué de 4 segundos.

Con el fin de seleccionar la mejor estrategia para la adsorción del ionóforo, se probaron amperométricamente las tres formas mencionadas anteriormente. En todos los casos se determinó la sensibilidad, repetitividad y reproducibilidad de los electrodos. Las respuestas amperométricas de los sensores se evaluaron en función de la concentración de cromo (VI) y cromo (III) agregados, mediante experimentos de calibración. Las estrategias diseñadas fueron:

- 1) Los electrodos se sumergieron durante 30, 60, 90 y 120 minutos en una solución de H₂SO₄ pH: 1,0 que contenía 1 y 2 mg/mL del ionóforo preparado por sonicación

durante 5 min. Luego se lavaron con agua destilada. Ninguno de estos electrodos mostró una respuesta amperométrica a -430 mV. La voltamperometría cíclica mostró respuesta solo a Cr(VI) de las mismas características que el SPE-desnudo. Los experimentos realizados indicaron que el ionóforo no fue adsorbido por esta forma de diseño.

- 2) Los sensores se prepararon depositando sobre los SPEs, 20 μ L de ionóforo 2 mg/mL y dejando secar durante 60 y 120 minutos a temperatura ambiente. Aunque estos electrodos mostraron actividad a -430 mV, las señales fueron poco reproducibles entre electrodos y tampoco mostraron repetibilidad para el mismo electrodo. El ionóforo

probablemente se perdió en la solución de electrolito soporte en la celda electroquímica; incluso antes de comenzar el experimento, debido a una débil adsorción en la superficie del carbono.

- 3) El ionóforo se electrodepositó aplicando -400 mV durante 20 min utilizando las mismas soluciones. En este caso, fue posible obtener señal a Cr(III) con alta reproducibilidad, y la posibilidad de utilizar cada electrodo 3 veces con una RSD del 10%, demostrando la buena adsorción del ionóforo y la robustez del electrodo aunque sean descartables y se usen sólo una vez cada uno.

El tercer diseño, de mejor rendimiento analítico, fue elegido para los siguientes experimentos.

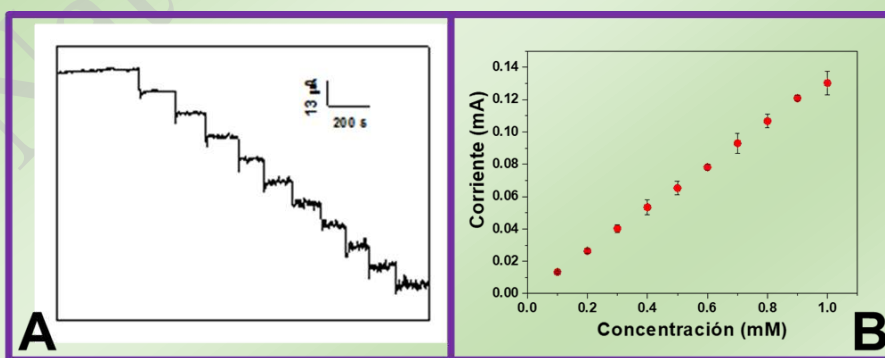


Figura 3: Registro amperométrico (A) y gráfico de calibración (B) obtenido por adiciones sucesivas de Cr(VI) 0,1 mM, a -430 mV. Electrolito de soporte: H₂SO₄ pH: 1,0. Electrodo de referencia: Ag/AgCl. Contraelectrodo: Platino.

Figure 3: Amperometric recording (A) and calibration plot (B) obtained from successive additions of 0,1 mM Cr(VI), at -430 mV. Supporting electrolyte: H₂SO₄ pH: 1,0. Reference electrode: Ag/AgCl. Counter electrode: Platinum.

La Figura 3(A) también muestra registros amperométricos y (B) gráficos de calibración obtenidos por un experimento similar al expuesto en la Figura 2 pero a -430 mV de potencial de trabajo. De manera semejante, se obtiene una señal catódica rápida en el electrodo. La sensibilidad de este grupo de electrodos

fue $(0,132 \pm 0,001) \text{ mAmM}^{-1}$, con un límite de detección de $5 \cdot 10^{-3} \text{ mM}$.

La Figura 4 ilustra el comportamiento del sensor mostrando un registro amperométrico obtenido a partir de experimentos realizados por aumento de concentración de Cr(VI).



Figura 4: Registros amperométricos obtenidos a partir de experimentos realizados por adiciones sucesivas de (A) 0,5 mM y (B) 1,0 mM Cr (VI) a -430 mV. Electrolito soporte: H_2SO_4 pH: 1,0. Electrodo de referencia: Ag/AgCl. Contraelectrodo: Platino.

Figure 4: Amperometric recordings obtained from experiments performed by successive additions of (A) 0,5 mM and (B) 1,0 mM Cr(VI) at -430 mV. Supporting electrolyte: H_2SO_4 pH: 1,0. Reference electrode: Ag/AgCl. Counter electrode: Platinum.

La respuesta es lineal, aunque la sensibilidad disminuye ligeramente a concentraciones superiores a 14 mM. El tiempo de respuesta es de 4 segundos. La sensibilidad del electrodo es de alrededor de 130 mAmM^{-1} . El efecto de usar diferentes superficies se verificó evaluando la sensibilidad arrojada por 6 calibrados. La RSD resultó en 4.8%.

El electrodo diseñado se utilizó para la determinación de Cr(III) en las soluciones del multivitamínico/multimineral. Se disolvieron las pastillas de las dos marcas comerciales y, conociendo el peso y contenido de las píldoras, se prepararon soluciones de distintas concentraciones.

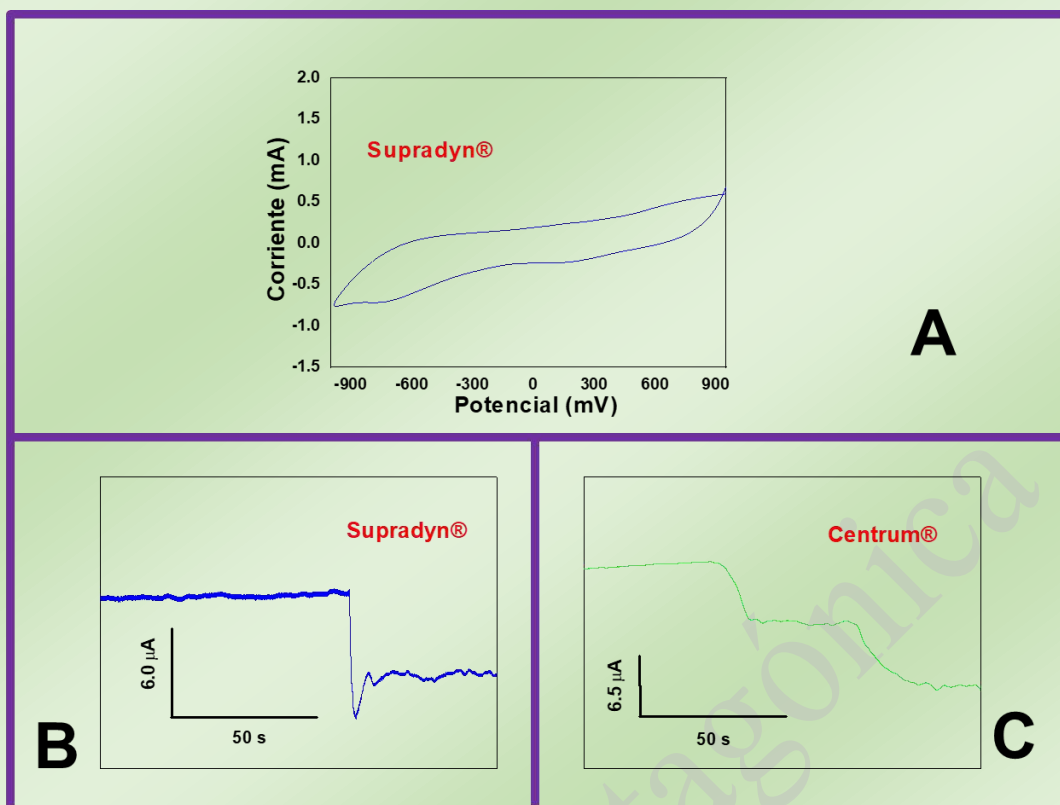


Figura 5: (A) Voltamperogramas cíclicos para SPE-ionóforo, en Supradyn®/H₂SO₄ pH: 1,0. Los barridos se realizaron desde 1000 mV hasta -1000 mV para volver finalmente al potencial inicial. Velocidad de barrido: 50 mVs⁻¹. Registros amperométricos obtenidos de experimentos realizados mediante adiciones de (B) Cr(III) 0,3 mM a Supradyn®/ H₂SO₄ pH: 1,0 y (C) Centrum®/H₂SO₄ 0,3 mM en Cr(III), pH: 1,0 a -430 mV. Electrolito de soporte: H₂SO₄ pH: 1,0. Electrodo de referencia: Ag/AgCl. Contraelectrodo: Platino.

Figure 5: (A) Cyclic voltammograms for SPE-ionophore, in Supradyn®/H₂SO₄ pH:1,0. The scans were performed from 1000 mV to -1000 mV to return finally to the initial potential. Scan rate: 50 mVs⁻¹. Amperometric recordings obtained from experiments performed by additions of (B) Cr(III) 0,3 mM a Supradyn®/ H₂SO₄ pH: 1,0 y (C) Centrum®/H₂SO₄ 0,3 mM en Cr(III), pH: 1,0 a -430 mV. Supporting electrolyte: H₂SO₄ pH: 100. Reference electrode: Ag/AgCl. Counter electrode: Platinum.

La Figura 5 muestra algunos experimentos relacionados con el estudio de presencia y concentración de cromo y de las interferencias en las medidas de Cr(III) por otros componentes de la formulación multivitamínico/multimineral. De la descripción de la composición de tales píldoras se puede considerar al Cromo como analito y a todos los demás componentes como interferentes de reacción. Se eligieron para este trabajo, dos marcas comerciales reconocidas y

muy comercializadas en Argentina. Ambas formulaciones contienen vitaminas en concentraciones cercanas a las necesidades de ingesta diarias. La diferencia entre los dos productos es que Centrum® contiene Cr(III) en forma de cloruro y que Supradyn® no contiene cromo.

La Figura 5 (A) muestra un voltamperograma cíclico para SPE-ionóforo en Supradyn®/H₂SO₄ pH: 1,0, entre 900 y -900 mV y una velocidad de

barrido de 50 mVs⁻¹. La formulación de esta marca no contiene Cromo. El perfil voltamperométrico no presentó una señal significativa para la reducción u oxidación de ningún compuesto presente. En esta amplia ventana de potencial se muestra que la medida de Cr en cualquiera de sus especies, si se sospechara su presencia, no tendría interferencia. Las mediciones amperométricas para resolver este mismo multivitamínico como electrolito soporte, con Cr(III) añadido en un solo agregado en la celda, muestran una clara señal de reducción a -430 mV, de 6,0 µA para 0,3 mM de Cr(III), demostrando que la matriz no presenta tampoco, interferencia negativa (B). El experimento agregando Centrum®, en dos inyecciones para concentración final 0,3 mM en Cr(III) de cada agregado en la celda, a partir de las soluciones de las pastillas, muestra una clara señal de reducción de alrededor de 6,5 µA para cada agregado (C), mostrando que el diseño electrodo es selectivo a cromo y tiene una alta sensibilidad al mismo.

BIBLIOGRAFIA

Andrle, C.M., Broekaert, J.A.C. 1993. Different analytical techniques for chromium speciation with atomic force microscopy. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **346**: 653-658.

Ardakani, M.M., Dastanpour, A., Niasari, M.S. 2005. Novel coated-wire membrane sensor based on bis(acetylacetonato) cadmium (II) for the

CONCLUSIONES

El presente trabajo muestra los excelentes parámetros de calidad para la detección de Cr(III) y Cr(VI) de sensores descartables para compuestos medicinales de formulaciones

multivitaminas/multiminerales.

El estudio de experimentos de interferencia demostró que los electrodos diseñados se pueden utilizar satisfactoriamente en el control de la ausencia o presencia de Cr(III), la medida de su concentración y en contaminaciones por Cr(VI) en estos complementos medicinales.

La optimización de las condiciones de preparación de los electrodos, permitió lograr un muy buen compromiso entre sensibilidad y selectividad. De este modo, se pudo obtener sensores con una excelente estabilidad.

El presente trabajo abre las puertas a nuevos diseños electroquímicos de rápida respuesta, para control de medicamentos.

determination of chromate ions. *Microchim. Acta*, **150**:67-72.

Beni, V., Ogurtsov, V.I., Bakunin, N.V., Arrigan, D.W.M., Hill, M. 2005. Development of a portable electroanalytical system for the stripping voltammetry of metals: Determination of copper in acetic acid soil extracts. *Anal. Chim. Acta*, **552**: 190-200.

- El Rhazi, M., Majid, S. 2014. Electrochemical sensors based on polydiaminonaphthalene and polyphenylenediamine for monitoring metal pollutants. *Trends in Env. Anal. Chem.*, **2**: 33-42.
- Gholivand, M.B., Raheedayat, F. 2004. Chromium (III) ion-selective electrode based on oxalic acid bis(cyclohexylidene hydrazide). *Electroanalysis*, **16**: 1330–1335.
- Gholivand, M.B., Sharifpour, F. 2003. Chromium (III) ion-selective electrode based on glyoxal bis(2-hydroxyanil). *Talanta*, **60**: 707–713.
- Honeychurch, K.C., Hawkins, D.M., Hart, J.P., Cowell, D.C. 2002. Voltammetric behaviour and trace determination of copper at a mercury-free screen-printed carbon electrode. *Talanta*, **57**: 565-574.
- Jen, J.F., Ouyang, G.L., Chen, C.S., Yang, S.M. 1993. Simultaneous determination of chromium (III) and chromium (VI) with reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. *Analyst*, **118**: 1281-1284.
- Kadara, R.O., Tothill, L.E. 2005. Stripping chronopotentiometric detection of bismuth film screen-printed electrode. *Talanta*, **66**: 1089-1093.
- Kotas, J., Stasicka, Z. 2000. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation, *Environ. Pollut.*, **107**: 263-283.
- OMS. 1993. Recommendations. En Guidance for Drinking Water Quality. WHO, Ginebra: 45–46.
- OMS. 2012. A Review of Human Carcinogens: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. WHO, Lyon, 527.
- Palchetti, H., Laschi, S., Mascini, M. 2005. Miniaturised stripping-based carbon modified sensor for in field analysis of heavy metals. *Anal. Chim. Acta*, **530**: 61-67.
- Rodriguez, B.B., Bolbot, J.A., Tothill, I.E. 2004. Urease-glutamic dehydrogenase biosensor for screening heavy metals in water and soil samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, **380**: 284-292.
- Serrano, N., Díaz-Cruz, J.M., Ariño, C., Esteban, M. 2010. Ex situ deposited bismuth film on screen-printed carbon electrode: a disposable device for stripping voltammetry of heavy metal ions. *Electroanalysis*, **22**: 1460-1467.
- Shanker, A.K., Venkateswarlu, B. 2011. Chromium: Environmental Pollution, Health Effects and Mode of Action. En Encyclopedia of Environmental Health, Elsevier; Amsterdam: 650-659.
- Ugo, P., Moretto, L.M., Bertocello, P., Wang, J. 1998. Determination of Trace Mercury in Saltwaters at Screen-Printed Electrodes Modified with Sumichelate Q10R. *Electroanalysis*, **10**: 1017-1021.
- Welch, C.M., Nekrassova, O., Compton, R.G. 2005. Reduction of hexavalent chromium at solid electrodes in acidic media: reaction mechanism and analytical applications. *Talanta*, **65**: 74-80.
- Yarnitzky, C., Wang, J., Tian, J.M. 2000. Hand-held lead analyzer. *Talanta*. **51**: 333-338.

Primer registro de epiteliocistis en dos especies de peces de arrecifes rocosos en Golfo Nuevo (Chubut, Patagonia Argentina)

First record of epitheliocystis in two fish species of rocky reefs in Golfo Nuevo (Chubut, Argentine Patagonia)

Gabriela Nayla Novacovsky^{1*}, Tamara Rubilar^{2,3}, María Cruz Sueiro¹

¹Grupo de Ecofisiología Aplicada al Manejo y Conservación de Fauna Silvestre (GEA). Centro para el Estudio de Sistemas Marinos (CESIMAR), Centro Nacional Patagónico – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CENPAT – CONICET) Puerto Madryn, Chubut, Argentina.

²Laboratorio de Oceanografía Biológica (LOBio). Centro para el Estudio de Sistemas Marinos (CESIMAR), Centro Nacional Patagónico – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CENPAT – CONICET) Puerto Madryn, Chubut, Argentina

³Laboratorio de Química de Organismos Marinos, Instituto Patagónico del Mar, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

*novacovsky@cenpat-conicet.gob.ar

RESUMEN

La epiteliocistis es una enfermedad infecciosa de la piel y las branquias de peces causada por bacterias intracelulares gram negativas. En este trabajo se registra y describe por primera vez la presencia de esta enfermedad en el esgrúfalo *Sebastes oculatus* y el turco *Pinguipes brasilianus*, dos especies de peces marinos de vida silvestre característicos de los ensambles de peces de arrecife del Golfo Nuevo (Chubut, Patagonia Argentina). De cada individuo se examinaron sus arcos branquiales mediante técnicas histológicas para determinar la presencia o ausencia de quistes característicos de epiteliocistis. Se encontró que ambas especies fueron positivas para la infección. La prevalencia e intensidad observadas no mostraron diferencias significativas entre especies. El porcentaje de individuos infectados fue de 22 y 23% para esgrúfalos y turcos respectivamente, siendo estos valores similares a los que han sido reportados para otras especies de vida silvestre. La intensidad en todos los casos fue menor de siete quistes por sección, sugiriendo un estado de infección leve. Estos resultados amplían la lista de especies hasta ahora reportadas como positivas para esta infección e incorporan la región a la amplia lista de distribución geográfica registrada. En el futuro se espera profundizar sobre la relación entre la presencia de esta enfermedad y el estado de salud de los individuos infectados.

PALABRAS CLAVE: enfermedades infecciosas, epiteliocistis, histología, branquias, peces, Patagonia.

ABSTRACT

Epitheliocystis is an infectious disease caused by gram-negative intracellular bacteria that affects the skin and gills of fish. In this work, we reported and described for the first time the presence of this disease from the rockfish *Sebastes oculatus* and the sandperch *Pinguipes brasiliensis*, two characteristic species of reef fish assemblages of Golfo Nuevo (Chubut, Patagonia Argentina). Branchial arches of each individual were examined using histological techniques to determine the presence or absence of cysts. Both species were found to be positive for infection. The observed prevalence and intensity did not show significant differences between species. The percentage of infected individuals was 22 and 23% for rockfish and sandperch respectively, these values were similar to those that have been reported for other wildlife species. Intensity was always less than seven cysts per section, suggesting a state of moderate infection. These results extend the list of species reported as positive for this infection and incorporate the region into the extensive list of registered geographical distribution. In the future it is expected to deepen the relationship between the presence of this disease and the health-status of infected individuals

KEY WORDS: infectious diseases, epitheliocystis, histology, gills, fishes, Patagonia.

INTRODUCCION

La epiteliocistis es una enfermedad de la piel y las branquias de peces marinos y de agua dulce causada por bacterias intracelulares (Blandford *et al*, 2018). Se caracteriza por la presencia de quistes en las células epiteliales de los órganos infectados. Estos quistes son formaciones esféricas que se producen cuando las bacterias, protegidas por una vacuola intracelular, se multiplican incrementando el volumen de la célula huésped (Nowak y LaPatra, 2006). Su tamaño puede variar ampliamente (10 - 400 μm) pudiendo ser

detectados histológicamente bajo microscopio óptico (Schmidt-Posthaus *et al*, 2012; Guevara Soto *et al*, 2016b), e incluso, en algunos casos, a simple vista (Fehr *et al*, 2013). En la actualidad, el diagnóstico de esta infección se realiza primariamente mediante técnicas histopatológicas donde la presencia de uno o más quistes se considera positivo para la enfermedad (Nowak y LaPatra, 2006; Draghi *et al*, 2007; Blandford *et al*, 2018). Por otro lado, para la identificación de los agentes causantes de la infección se necesitan técnicas moleculares específicas

(ej. PCR seguido por secuenciación) (Stride *et al*, 2013a,b; Blandford *et al*, 2018). En este sentido, se han identificado como principales agentes causantes bacterias intracelulares gram negativas pertenecientes al filo Chlamydiae pero también están incluidas γ - y β Proteobacterias (Toenshoff *et al*, 2012; Mendoza *et al*, 2013; Stride y Nowak, 2014; Katharios *et al*, 2015; Seth-Smith *et al*, 2016).

Los peces que son afectados con esta enfermedad pueden presentar una respuesta celular proliferativa o no proliferativa. En el primer caso la respuesta está caracterizada por una marcada hiperplasia epitelial lamelar con necrosis e inflamación variables (Kvellestad *et al*, 2005; Steinum *et al*, 2010), mientras que una respuesta no proliferativa podría abarcar un rango de no reacción a hiperplasia e inflamación mínimas (Paperna, 1977; Crespo *et al*, 1999; Draghi *et al*, 2004). Tales cambios morfológicos asociados a la enfermedad pueden presentarse con distintos grados de severidad, desde leves e irregulares hasta extremadamente severos (Stride y Nowak, 2014). Así mismo, en algunos casos, se han observado en peces infectados ciertos signos clínicos, como jadeo en la superficie del agua, disminución del consumo de alimentos, producción excesiva de mucosidad, natación débil,

letargo e incluso la muerte, que podrían estar asociadas con la enfermedad (Blandford *et al*, 2018). Entre las explicaciones posibles para dichos signos se ha mencionado la reducción en el área superficial de las branquias y disminución de mecanismos fisiológicos de excreción de amoníaco, intercambio de gases, equilibrio ácido-base y reducción de sal como consecuencia de la fusión de las láminas branquiales (Stride y Nowak, 2014). Por otro lado, existen registros de altas tasas de mortalidad a causa de esta enfermedad que, en algunos casos pueden llegar hasta el 100%, principalmente en larvas y juveniles de peces de cultivo (Nowak and LaPatra, 2006; Katharios *et al*, 2008; Mitchell and Rodger, 2011). Sin embargo, son pocos los estudios que evalúan los efectos de la epiteliocistis sobre la fisiología y el estado de salud de los peces infectados por lo que aún no se comprende completamente sus alcances. Desde el primer registro de epiteliocistis en 1920 (Plehn, 1920) y su posterior descripción en 1969 (Hoffman *et al*, 1969), hasta la actualidad esta condición infecciosa está mundialmente distribuida y ha sido descrita en al menos 90 especies de peces tanto óseos como cartilaginosos (Revisado por Blandford *et al*, 2018). La mayoría de los registros se han basado sobre especies de peces de cultivo y principalmente en el hemisferio norte,

mientras que registros basados en peces de vida silvestre y en el hemisferio sur son escasos (Tabla I). En particular para Sudamérica, si bien existen registros de epiteliocistis en peces de cultivo en Colombia para cobia (*Rachycentron canadum*, Linnaeus 1766) (Mendoza *et al*, 2013) y en Argentina (Córdoba) para el bagre anguila (*Heptapterus mustelinus*, Valenciennes 1835) (Vreys, 2016), hasta la fecha no se encontraron reportes de la presencia de la enfermedad en la Patagonia Argentina. Esto último, imposibilita conocer el estado actual de la región acerca de esta enfermedad creciente que afecta a países de todo el mundo tanto a sus cultivos como a su fauna silvestre. En este contexto, el objetivo de este trabajo es reportar y describir por primera vez la presencia de epiteliocistis en dos especies de peces

marinos de vida silvestre que habitan a lo largo de la costa del océano Atlántico, en la Patagonia Argentina: el escrófalo *Sebastes oculatus* Valenciennes, 1833 (Scorpaeniformes, Sebastidae) y el turco *Pinguipes brasilianus* Cuvier, 1829 (Perciformes, Pinguipedidae). Ambos representan dos de las especies más abundantes y conspicuas del ensamble de peces de arrecife rocoso de los golfos Norpatagónicos (Galván *et al*, 2009; Irigoyen *et al*, 2013) donde son considerados una importante atracción para buceadores recreativos y pescadores (Venerus, 2006). Los resultados de este trabajo ayudaran a llenar el vacío existente acerca de la presencia de enfermedades infecciosas en peces marinos de vida silvestre que habitan las costas del Golfo Nuevo.

Tabla I. Lista de ambientes y países para los cuales se ha identificado epiteliocistis

Table I. List of environments and countries for which epitheliocystis has been identified.

Ambiente/historia	Cultivo/silvestre	Origen	Referencia
Agua dulce	Cultivo	Austria	Kumar et al., 2013
		Canada	Draghi et al., 2010; Contador et al., 2016
		Hungría	Sellyei et al., 2017
		India	Sood et al., 2017
		Uganda	Steigen et al., 2013
		USA	Draghi et al., 2007; Draghi et al., 2010
Marinos	Cultivo	Australia	Lai et al., 2013; Stride et al., 2013; Taylor-Brown et al., 2017
		Colombia	Mendoza et al., 2013
		Grecia	Seth-Smith et al., 2017; Katharios et al., 2015
		Suiza	Polkinghorne et al., 2010
		USA	Camus et al., 2013
	Silvestre	Australia	Stride et al., 2013
		Hawaii	Corsaro & Work, 2012
		Italia	Fehr et al., 2013
	Cultivo	Irlanda	Mitchell et al., 2010; Draghi et al., 2004; Toenshoff et al., 2012
			Draghi et al., 2004; Karlsen et al., 2008; Steinum et al., 2010; Nylund et al., 2011; Schmidt-Posthaus et al., 2012; Toenshoff et al., 2012; Mitchell et al., 2013; Nylund et al., 2015
		Noruega	
Anádromos	Silvestre	Suiza	Karlsen et al., 2008; Steinum et al., 2010; Schmidt-Posthaus et al., 2012; Guevara Soto et al., 2016
Catádromos	Cultivo	Australia	
			Stride et al., 2013

Nota: Tabla adaptada de Blandford et al., 2018

Note: Table adapted from Blandford et al., 2018

MATERIALES Y METODOS

Se obtuvieron 22 individuos de turco *P. brasiliensis* (LT: 255-382 mm) y 36 individuos de esgrúfalo *S. oculatus* (LT: 190-323 mm) mediante pesca submarina y pesca con caña dentro del Golfo Nuevo (Chubut, Patagonia Argentina; Figura 1). Inmediatamente luego de su captura los individuos fueron sacrificados y conservados en hielo para su traslado al laboratorio. Una vez allí se registró la longitud total (LT) de cada ejemplar. Luego se procedió a la necropsia de cada individuo extrayéndose de cada uno, un arco branquial que fue fijado en formol al 10% y descalcificado con una solución de EDTA 10%-TRIS-HCl 0,05M. Posteriormente las branquias se seccionaron a 5 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina siguiendo protocolos estandarizados. Los preparados histológicos se examinaron mediante microscopía óptica de campo claro (Microscopio óptico Leica DM2500 con cámara incorporada) a una magnificación de 100, 200 y 400 aumentos. Para cada individuo se examinaron secciones branquiales sobre las cuales se determinó la presencia de quistes (individuos identificados como positivos para epiteliocistis) o su ausencia (individuos identificados como negativos para

epiteliocistis). Para cada individuo positivo se midió el diámetro de los quistes encontrados, para determinar el tamaño medio de los mismos, en el caso de los quistes ovoides se promediaron los dos diámetros principales para obtener un único valor. Las mediciones de los quistes se realizaron sobre imágenes tomadas con la cámara Leica DFC 450C incorporada al microscopio a una magnificación de 400x utilizando el software LAS, Version 4.5.0 Leica Microsystems, Switzerland. Con los datos obtenidos del examen histológico se calcularon la prevalencia e intensidad de la infección para cada una de las especies. La prevalencia fue definida como el porcentaje de individuos positivos sobre el total de individuos examinados dentro de cada especie. La intensidad individual se determinó como la cantidad de quistes por sección de branquia examinada de cada individuo y luego se obtuvo un promedio de las mismas. Para estudiar la posible existencia de diferencias entre especies en la prevalencia e intensidad de la epiteliocistis se realizaron pruebas de Chi cuadrado y ANOVA de una vía respectivamente. Los valores de P por debajo de 0,05 fueron considerados significativos en los análisis. Las pruebas estadísticas se realizaron con el software SPSS 15.0.

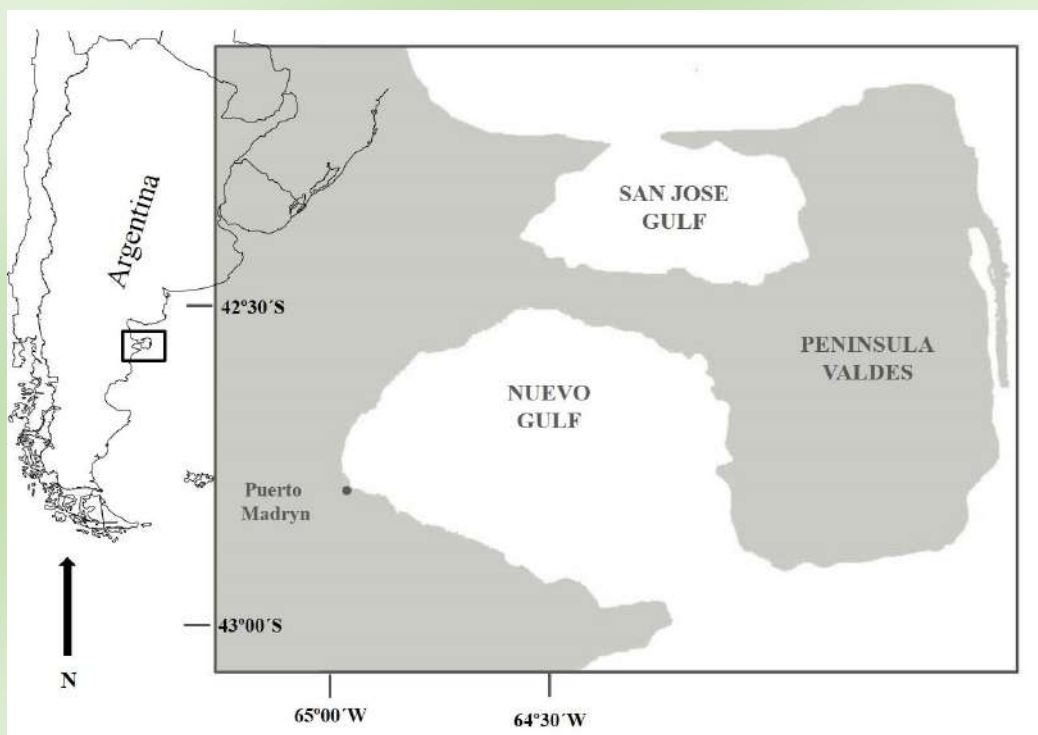


Figura 1. Mapa del área de estudio.
Figure 1. Map of the study area.

RESULTADOS

Tanto para *S. oculatus* como para *P. brasiliensis* las lesiones de epiteliocistis se pudieron evidenciar utilizando un microscopio óptico con un bajo aumento (objetivo 10 ×). Las células infectadas se observaron con hipertrofia y estuvieron principalmente distribuidas a lo largo de las laminillas secundarias o en la base de las mismas (83%) mientras que un menor porcentaje fueron observadas hacia las puntas de dichas laminillas (2%) e incluso algunas se encontraron en el tejido fibroso subepidérmico (15%). La identificación de las células infectadas es difícil de determinar en las secciones teñidas con eosina y hematoxilina, pero en función de su posición en las branquias, la mayoría

eran células epiteliales y de pavimento y algunas pocas células de cloruro. Los quistes, de tamaños variables, generalmente fueron de forma ovalada y redondeada (Figura 2) con un diámetro promedio mayor para *S. oculatus* que para *P. brasiliensis* (Tabla II). La prevalencia de la epiteliocistis no varió significativamente entre las especies ($X^2 = 0,002$, $p = 0,964$), encontrándose para *S. oculatus* un 23% de individuos infectados y para *P. brasiliensis* 22% de los individuos fueron positivos para la infección (Tabla II). Por su parte la intensidad de la infección fue menor de 7 quistes por sección para ambas especies entre las cuales no mostraron diferencias significativas ($F = 2,77$, $p = 0,12$; Tabla II).

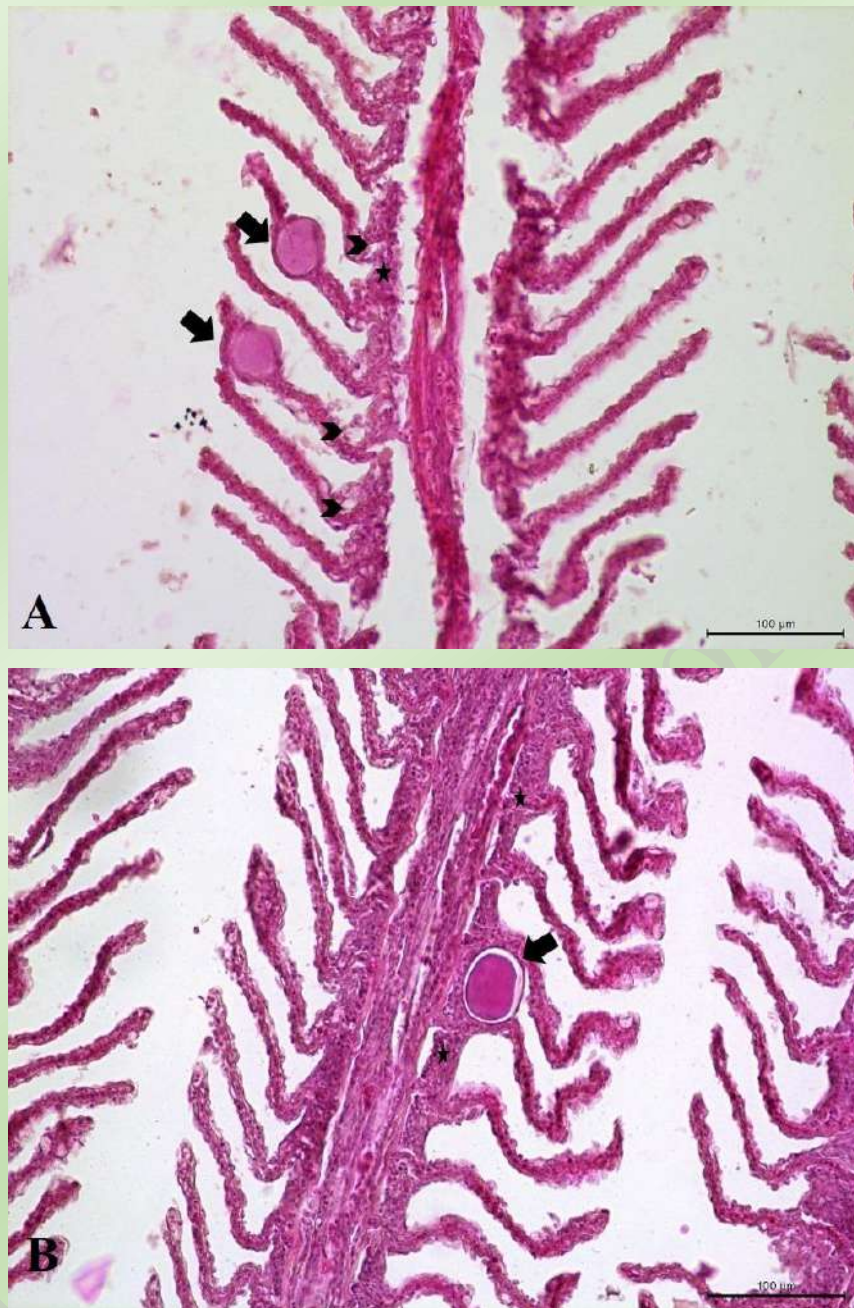


Figura 2. Fotografías de secciones histológicas de filamentos branquiales de (A) el escrófalo *Sebastes oculatus* y (B) el turco *Pinguipes brasilianus* donde pueden observarse quistes de epiteliocistis. En el caso del escrófalo los quistes (flecha) aparecen en las células epiteliales de las laminillas branquiales ubicándose en el centro y hacia la punta de las mismas. Se observa una hipertrofia moderada de las células epiteliales afectadas, edema subepitelial moderado (punta de flecha) e infiltración subepitelial leve (estrella). Para el tuco se muestra un quiste (flecha) en la base de la laminilla que genera una hipertrofia moderada a severa en la célula epitelial afectada e infiltración subepitelial moderada con linfocitos (estrella). Barra de 100 µm

Figure 2. Photographs of histological sections of branchial filaments of (A) the rockfish *Sebastes oculatus* and (B) the sandperch *Pinguipes brasilianus* showing epitheliocystis cysts. In the case of rockfish, the cysts (arrow) appear in the epithelial cells of the branchial lamellae, being located in the center and towards the tip of the lamellae. Moderate hypertrophy of affected epithelial cells, moderate subepithelial edema (arrowhead), and mild subepithelial infiltration (star) are observed. For the sandperch, a cyst (arrow) is shown at the base of the lamina that generates moderate to severe hypertrophy in the affected epithelial cell and moderate subepithelial infiltration with lymphocytes (star). 100 µm bar

Tabla II. Valores medios, desvíos estándar (DE) y rangos de los parámetros determinados en el escrúfalo *Sebastes oculatus* y en el turco *Pinguipes brasilianus* obtenidos en el Golfo Nuevo, Chubut.

Table II. Mean values, standard deviations (SD) and ranges of the parameters determined for the rockfish *Sebastes oculatus* and the sandperch *Pinguipes brasilianus* obtained from Golfo Nuevo, Chubut.

Especie	n	LT ± DE (min-máx)	Prev.	Int. ± DE (min-máx)	d ± DE (min-máx)
<i>Sebastes oculatus</i>	36	262,94±28,83 (190-323)	22,22	2,38±1,77 (1-6)	28,10±12,58 (10,26-46,19)
<i>Pinguipes brasilianus</i>	22	31604±38,73 (255-382)	22,73	4,2±2,17 (1-6)	24,65±10,98 (13,81-53,28)

Nota: LT (largo total, mm), Prev. (prevalencia, %), Int. (intensidad, quistes por sección) y d (diámetro de quistes, µm).

Note: LT (total length, mm), prev. (prevalence, %), int. (intensity, cysts per section) and d (diameter of cysts, µm).

DISCUSION

Nuestro trabajo registra por primera vez la presencia de epiteliocistis en dos de las especies de peces de arrecife más abundantes y conspicuas del Golfo Nuevo (Patagonia, Argentina): el escrúfalo *Sebastes oculatus* y en el turco *Pinguipes brasilianus*. Este registro significa una ampliación del número creciente de especies de peces afectadas por esta condición, así como la incorporación de la región Patagónica a la extensa lista de áreas en las que esta enfermedad ha sido diagnosticada. Hasta la actualidad, la mayoría de los datos sobre epiteliocistis derivan de estudios realizados en peces de piscifactoría (ej. Lai *et al*, 2013; Mendoza *et al*, 2013; Stride *et al*, 2013b; Taylor-

Brown *et al*, 2017) y una cantidad menor derivan de estudios en peces marinos de vida silvestre realizados en el hemisferio norte y Australia (ej. Corsaro y Work, 2012; Fehr *et al*, 2013; Stride *et al*, 2013b). Debajo se discuten los principales resultados encontrados.

En el presente estudio, tanto para *S. oculatus* como para *P. brasilianus*, en los individuos positivos para epiteliocistis, los quistes bacterianos se manifestaron como inclusiones basófilas granuladas encerradas por una membrana, tal como se ha descrito con anterioridad para una variedad de especies (Nowak y LaPatra, 2006; Fehr *et al*, 2013; Stride y Nowak 2014; Contador *et al*, 2016; Guevara Soto *et al*, 2016b; Blandford *et al*, 2018). Estas

inclusiones, en algunos casos estuvieron asociadas con proliferación celular mientras que en otros individuos no se observó dicha asociación. Trabajos previos han reportado este tipo de variación en la respuesta tisular dentro de una misma especie (Crespo *et al*, 1999; Stride y Nowak, 2014; Contador *et al*, 2016). La diferencia en el tipo de respuesta se ha relacionado a los dos tipos de ciclo de desarrollo que puede presentar la epiteliocistis, y se ha sugerido que la edad de los peces y las condiciones ambientales podrían influir en la determinación de estos diferentes ciclos de desarrollo (Crespo *et al*, 1999).

La mayoría de los quistes fueron observados a largo de las laminillas secundarias o en la base de las mismas y en una menor proporción fueron hallados hacia las puntas de dichas laminillas y en el tejido fibroso subepidérmico. Este tipo de patrón en la distribución de los quistes coincide con los resultados reportados para un gran número de especies (Nowak y Clark, 1999; Nowak and La Patra, 2006; Stride *et al*, 2013a; Guevara Soto *et al*, 2016b) sugiriendo que en estos sitios del tejido branquial podría ser más probable detectar la infección. Respecto del tamaño de los quistes, *P. brasiliensis* y *S. oculatus* presentaron diámetros medios de 24 y 28 μm respectivamente. Estos tamaños se encuentran dentro del rango (10 - 60 μm)

de diámetros medios reportados con mayor frecuencia para quistes de epiteliocistis (Nowak y Clark, 1999; Karlsen *et al*, 2008; Schmidt-Posthaus *et al*, 2012; Kumar *et al*, 2013; Contador *et al*, 2016; Guevara Soto *et al*, 2016a). Aunque han sido registrados quistes de hasta 300 μm de diámetro (Fher *et al*, 2013).

La prevalencia de infección encontrada para el turco *P. brasiliensis* y el escrófalo *S. oculatus* fue del 22 y 23% respectivamente. Estudios previos sobre epiteliocistis en distintas especies de peces de vida silvestre reportan prevalencias que pueden variar del 1 al 91% de individuos infectados (Kent *et al*, 1998; Nowak y La Patra, 2006; Schmidt-Posthaus *et al*, 2012; Guevara Soto *et al*, 2016a). Sin embargo, la prevalencia encontrada con mayor frecuencia está dentro del rango de 20 a 30% (Nowak y Clark, 1999; Nowak *et al*, 2004; Stride y Nowak, 2014; Guevara Soto *et al*, 2016b) contemplando este rango al valor encontrado en el presente trabajo. Respecto de los individuos infectados, las intensidades encontradas para *P. brasiliensis* y *S. oculatus* fueron de uno a seis quistes por sección, correspondiéndose con un escaso porcentaje de la superficie de la branquia afectada. Estos valores estuvieron por debajo de los encontrados por otros autores (Frances *et al*, 1997; Draghi *et al*,

2004; Schmidt-Posthaus *et al*, 2012; Guevara Soto *et al*, 2016b), sugiriendo un estado de infección leve de esta enfermedad.

Entre las variables ambientales que pueden afectar la prevalencia y la intensidad de la epiteliocistis o su impacto en la mortalidad de peces se han propuesto una variedad de factores. Entre ellos, cambios en la salinidad, en la temperatura (Maclean y Fuiman, 1993; Stride y Nowak, 2014), y/o en el estado de contaminación (Schmidt-Posthaus *et al*, 2001; Agamy, 2013) que deriven en condiciones estresantes se han relacionado con altas tasas de infección y la progresión de la enfermedad de fases agudas a crónicas. Sin embargo, estas evidencias han sido en gran medida circunstanciales y los tamaños de muestra para obtener estas inferencias son generalmente muy pequeños (Blandford *et al*, 2018). Por otro lado, se ha establecido que peces en condiciones de cautiverio pueden tener una mayor prevalencia y susceptibilidad a la enfermedad que los peces silvestres, argumentándose una combinación de factores. Entre los que se incluyen, la presencia de nutrientes, la edad de los peces y la alta densidad de huéspedes disponibles para facilitar la transmisión (Nowak y LaPatra, 2006). Finalmente, es esperable que peces con un estado de salud disminuido presenten una mayor

susceptibilidad a esta infección, en este sentido se ha encontrado una correlación positiva entre parámetros de función inmune y densidad de quistes en branquias (Lai *et al*, 2013).

Los individuos reportados como positivos para epiteliocistis, presentaron asociados a los quistes alteraciones histopatológicas, como hiperplasia y vacuolización celular con fusión lamelar. Este tipo de alteraciones asociados a los quistes han sido descritas previamente para otras especies (ej. Straid *et al*, 2013a; Guevara Soto *et al*, 2016b; Blandford *et al*, 2018). Por otro lado, un 20% de los individuos de *P. brasiliensis* y un 25% de los individuos de *S. oculatus* mostraron coinfecciones de epiteliocistis y ectoparásitos en el tejido branquial. En ambos casos la coinfección estuvo dada por la presencia de un Monogeneo perteneciente al género *Microcotyle*. Aunque se han informado previamente coinfecciones de epiteliocistis con parásitos monogénicos (Mansell *et al*, 2005; Stride y Nowak, 2014), la baja ocurrencia de coinfecciones sugiere que los parásitos tuvieron un efecto insignificante en las tasas de infección por epiteliocistis.

CONCLUSIONES

Este trabajo aporta información novedosa respecto de la presencia y del diagnóstico de una enfermedad infecciosa no

reportada previamente en la región de la Patagonia Argentina. El hallazgo de epiteliocistis, en el presente estudio, permite ampliar tanto la lista de especies hasta ahora reportadas como hospedadoras, así como la distribución geográfica de esta condición. La presencia de esta enfermedad y la información, hasta ahora virtualmente nula para la región, resalta la necesidad de profundizar en el estudio de esta infección. Así como, de sus posibles efectos sobre el estado de salud de los organismos de vida silvestre y las poblaciones que ellos integran, incluyendo otras especies de peces, invertebrados o huéspedes protistas. Este tipo de información será valiosa a la hora de la elaboración de planes de monitoreo y conservación así como también para la prevención y detección precoz de esta enfermedad en sistemas de cultivo y/o

especies de interés comercial para la región.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la ayuda en el campo para la obtención y manipulación de peces a M. Cuestas, M. Lupiano, G. Zamora y equipo del Centro Nacional Patagónico (CENPAT). El trabajo contó con el financiamiento de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT PICT 2013-3006). El acceso de los sitios de muestro ubicados dentro de Áreas Protegidas fueron autorizados por la Secretaría de Turismo y Áreas Protegidas del Chubut. La primera autora del trabajo posee una beca interna Doctoral financiada por CONICET. Este trabajo forma parte del proyecto doctoral de la primera autora.

BIBLIOGRAFIA

Agamy, E., 2013. Sub chronic exposure to crude oil, dispersed oil and dispersant induces histopathological alterations in the gills of the juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **92**: 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.027>

Blandford, M.I., Taylor-Brown, A., Schlacher, T.A., Nowak, B. & Polkinghorne, A. 2018. Epitheliocystis in fish: An emerging aquaculture disease with a global impact. *Transbound Emergency Diseases*. **65**:1436–1446. <https://doi.org/10.1111/tbed.12908>

Contador, E., Methner, P., Ryerse, I., Huber, P., Lillie, B.N., Frasca, S.Jr, & Lumsden, J.S. 2016. Epitheliocystis in lake trout *Salvelinus namaycush* (Walbaum) is associated with a beta-proteobacteria. *Journal of Fish Diseases*, **39**: 353–366. <https://doi.org/10.1111/jfd.12369>

Corsaro, D. & Work, T.M. 2012. *Candidatus Renichlamydia lutjani*, a Gram-negative bacterium in internal organs of blue-striped snapper *Lutjanus kasmira* from Hawaii. *Diseases of Aquatic Organisms*, **98**: 249–254. <https://doi.org/10.3354/dao02441>

- Crespo, S., Grau, A., & Padrós, F. 1990. Epitheliocystis disease in the cultured amberjack, *Seriola dumerili* Risso (Carangidae). *Aquaculture*, **90**: 197–207. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(90\)90245-i](https://doi.org/10.1016/0044-8486(90)90245-i)
- Crespo, S., Zarza, C., Padros, F. & Marin de Mateo, M. 1999. Epitheliocystis agents in sea bream *Sparus aurata*: morphological evidence for two distinct chlamydia-like developmental cycles. *Diseases of Aquatic Organisms* **37**: 61–72. <http://www.int-res.com/abstracts/dao/v67/n1-2/p47-54/>
- Draghi, A., Popov, V.L., Kahl, M.M., Stanton, J.B., Brown, C.C., Tsongalis, G.J., West A.B. & Frasca, S.Jr. 2004. Characterization of “*Candidatus piscichlamydia salmonis*” (order Chlamydiales), a chlamydia-like bacterium associated with epitheliocystis in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Clinical Microbiology*, **42**: 5286–5297. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.11.5286-5297.2004>
- Draghi, A., Bebak, J., Popov, V.L., Noble, A.C., Geary, S.J., West, A.B., Philip, B. & Salvatore, F. 2007. Characterization of a *Neochlamydia*-like bacterium associated with epitheliocystis in cultured Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **76**: 27–38. <https://doi.org/10.3354/dao076027>
- Fehr, A., Walther, E., Schmidt-Posthaus, H., Nufer, L., Wilson, A., Svercel, M., Richter, D., Segner, H., Pospischil, A. & Vaughan, L. 2013. *Candidatus Syngnamydia venezia*, a novel member of the phylum Chlamydiae from the broad nosed pipefish, *Syngnathus typhle*. *PLoS ONE*, **8**: e70853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070853>
- Frances, J., Tennent, R. & Nowak, B.F. 1997. Epitheliocystis in silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). *Journal of Fish Diseases*, **20**: 453–457. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1997.00326.x>
- Galvan, D.E., Venerus, L.A. & Irigoyen, A.J. The reef-fish fauna of the northern Patagonian Gulfs, Argentina, Southwestern Atlantic. *The Open Fish Science Journal*, **2**: 90–98. <http://dx.doi.org/10.2174/1874401X00902010090>
- Guevara Soto, M., Vaughan, L., Segner, H., Wahli, T., Vidondo, B., & Schmidt-Posthaus, H. 2016a. Epitheliocystis distribution and characterization in brown trout (*Salmo trutta*) from the headwaters of two major European rivers, the Rhine and Rhone. *Frontiers in Physiology*, **7**: 131. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00131>
- Guevara Soto, M., Vidondo, B., Vaughan, L., Seth-Smith, H.M., Nufer, L., Segner, H., Rubin, J.F., Schmidt-Posthaus, H. 2016b. The emergence of epitheliocystis in the upper Rhone region: Evidence for Chlamydiae in wild and farmed salmonid populations. *Archives of Microbiology*, **198**: 315–324. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1192-x>
- Hoffman, G. L., Dunbar, C. E., Wolf, K., & Zwillenberg, L. O. 1969. Epitheliocystis, a new infectious disease of the bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Antonie van Leeuwenhoek*, **35**: 146–158. <https://doi.org/10.1007/bf02219125>
- Irigoyen, A.J., Galván, D.E., Venerus, L.A. & Parma, A.M., 2013. Variability in abundance of temperate reef fishes estimated by visual census. *PLoS One*, **8**: 61072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061072>
- Karlsen, M., Nylund, A., Watanabe, K., Helvik, J.V., Nylund, S., & Plarre, H. 2008. Characterization of ‘*Candidatus Clavochlamydia salmonicola*’: An intracellular bacterium infecting salmonid fish. *Environmental Microbiology*, **10**: 208–218. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01445.x>

- Katharios, P., Papadaki, M., Papandroulakis, N. & Divanach, P. 2008. Severe mortality in mesocosm-reared sharpsnout sea bream *Diplodus puntazzo* larvae due to epitheliocystis infection. *Diseases of Aquatic Organisms*, **82**: 55–60. <https://doi.org/10.3354/dao01968>
- Katharios, P., Seth-Smith, H.M., Fehr, A., Mateos, J.M., Qi, W., Richter, D., Nufer, L., Ruetten, M., Guevara Soto, M., Ziegler, U., Thomson, N.R., Schlapbach, R. & Vaughan, L. 2015. Environmental marine pathogen isolation using mesocosm culture of sharpsnout seabream: Striking genomic and morphological features of novel *Endozoicomonas* sp. *Scientific Reports*, **5**: 17609. <https://doi.org/10.1038/srep17609>
- Kent, M.L., Traxler, G.S., Kieser, D., Richard, S.C., Dawe, R.W., Shaw, G., Prosperi-Porta, G., Ketcheson, J. & Evelyn T.P.T. 1998. Survey of salmonid pathogens in ocean-caught fishes in British Columbia. *Journal of Aquatic Animal Health*, **10**: 211–219. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1998\)010<0211:SOSPPIO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1998)010<0211:SOSPPIO>2.0.CO;2)
- Kumar, G., Mayrhofer, R., Soliman, H., & El-Matbouli, M. 2013. Novel Chlamydiales associated with epitheliocystis in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Veterinary Record*, **172**: 47. <https://doi.org/10.1136/vr.101193>
- Kvellestad, A., Falk, K., Nygaard, S.M.R., Flesja, K. & Holm, J.A. 2005. Atlantic salmon paramyxovirus (ASVP) infection contributes to proliferative gill inflammation (PGI) in seawater-Reared *Salmo salar* as demonstrated by immunofluorescence and immunohistochemistry. *Diseases of Aquatic Organisms* **67**: 47–54. <https://doi.org/10.3354/dao067047>
- Lai, C.C., Crosbie, P.B.B., Battaglione, S.C., & Nowak, B.F. 2013. Effects of epitheliocystis on serum lysozyme activity and osmoregulation in cultured juvenile striped trumpeter, *Latris lineata* (Forster). *Aquaculture*, **388–391**: 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.020>
- Maclean, S.A. & Fuiman, L.A. 1993. Pathological conditions of Narragansett Bay young of the year winter flounder. *Water quality and the early life stages of fishes*, American Fisheries Society Symposium **14**: 47–54.
- Mansell, B., Powell, M.D., Ernst, I. & Nowak, B.F. 2005. Effects of the gill monogenean *Zeuxapta seriolae* (Meserve, 1938) and treatment with hydrogen peroxide on pathophysiology of kingfish, *Seriola lalandi* Valenciennes, 1833. *Journal of Fish Diseases*, **28**: 253–262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00625.x>
- Mendoza, M., Guiza, L., Martinez, X., Caraballo, X., Rojas, J., Aranguren, L.F. & Salazar, M. 2013. A novel agent (*Endozoicomonas elysicola*) responsible for epitheliocystis in cobia *Rachycentrum canadum* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, **106**: 31–37. <https://doi.org/10.3354/dao02636>
- Mitchell, S.O., & Rodger, H.D. 2011. A review of infectious gill disease in marine salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*. **34**: 411–432. <http://doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01251.x>
- Nowak, B.F. & Clark, A. 1999. Prevalence of epitheliocystis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., cultured in Tasmania, Australia. *Journal of Fish Diseases*, **22**: 73–78. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1999.00140.x>
- Nowak, B.F., Dawson, D., Basson, L., Deveney, M. & Powell, M.D. 2004. Gill histopathology of wild marine fish in Tasmania potential interactions with gill health of cultured Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, **27**: 709–717. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00593.x>
- Nowak, B.F. & LaPatra, S.E. 2006. Epitheliocystis in fish. *Journal of Fish Diseases*, **29**: 573–588. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00747.x>

- Paperna, I. 1977. Epitheliocystis infection in wild and cultured sea bream (*Sparus aurata*, Sparidae) and grey mullets (*Liza ramada*, Mugilidae). *Aquaculture*, **10**: 169–176. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(77\)90018-7](https://doi.org/10.1016/0044-8486(77)90018-7)
- Plehn M. 1920. Praktikum der fischkrankheiten. In: Handbuch der Binnenfischeri Mitteleuropas (ed. by R. Demoll & H. Maier), pp. 301–429. E. Schwyerbart, Stuttgart.
- Schmidt-Posthaus, H., Bernet, D., Wahli, T. & Burkhardt-Holm, P. 2001 Morphological organ alterations and infectious diseases in brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to polluted river water. *Diseases of Aquatic Organisms*, **44**: 161–170. <https://doi.org/10.3354/dao044161>
- Schmidt-Posthaus, H., Polkinghorne, A., Nufer, L., Schifferli, A., Zimmermann, D. R., Segner, H., Steiner, P. & Vaughan, L. 2012. A natural freshwater origin for two chlamydial species, *Candidatus isichlamydia salmonis* and *Candidatus Clavochlamydia salmonicola*, causing mixed infections in wild brown trout (*Salmo trutta*). *Environmental Microbiology*, **14**: 2048–2057. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02670.x>
- Seth-Smith, H. M., Dourala, N., Fehr, A., Qi, W., Katharios, P., Ruetten, M., Mateos, J.M., Nufer, L., Weilenmann, R., Ziegler, U., Thomson, N.R., Schlapbach, R. & Vaughan, L. 2016. Emerging pathogens of gilthead seabream: Characterisation and genomic analysis of novel intracellular beta-proteobacteria. *The ISME Journal*, **10**: 1791–1803. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.223>
- Steinum, T., Kvellestad, A., Colquhoun, D.J., Heum, M., Mohammad, S., Grontvedt, R.N., & Falk, K. 2010. Microbial and pathological findings in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* with proliferative gill inflammation. *Diseases of Aquatic Organisms*, **91**: 201–211. <https://doi.org/10.3354/dao02266>
- Stride, M.C., Polkinghorne, A., Miller, T.L., Groff, J.M., LaPatra, S.E., & Nowak, B.F. 2013a. Molecular characterization of “*Candidatus Parilichlamydia carangidicola*,” a novel Chlamydia-like epitheliocystis agent in yellowtail kingfish, *Seriola lalandi* (Valenciennes), and the proposal of a new family, “*Candidatus Parilichlamydiaceae*” fam. nov. (order Chlamydiales). *Applied and Environmental Microbiology*, **79**: 1590–1597. <https://doi.org/10.1128/AEM.02899-12>
- Stride, M.C., Polkinghorne, A., Miller, T.L., & Nowak, B.F. 2013b. Molecular characterization of “*Candidatus Similichlamydia latridicola*” gen. nov., sp. nov. (Chlamydiales: “*Candidatus Parilichlamydiaceae*”), a novel Chlamydia-like epitheliocystis agent in the striped trumpeter, *Latris lineata* (Forster). *Applied Environmental Microbiology*, **79**: 4914–4920. <https://doi.org/10.1128/aem.00746-13>
- Stride, M.C. & Nowak, B. F. 2014. Epitheliocystis in three wild fish species in Tasmanian waters. *Journal of Fish Diseases*, **37**: 157–162. <https://doi.org/10.1111/jfd.12124>
- Taylor-Brown, A., Pillonel, T., Bridle, A., Qi, W., Bachmann, N.L., Miller, T.L., Greub, G., Nowak, B., Seth-Smith, H.M.B., Vaughan, L. & Polkinghorne, A. 2017. Culture-independent genomics of a novel chlamydial pathogen of fish provides new insight into host-specific adaptations utilized by these intracellular bacteria. *Environmental Microbiology*, **19**: 1899–1913. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13694>
- Toenshoff, E.R., Kvellestad, A., Mitchell, S.O., Steinum, T., Falk, K., Colquhoun, D.J. & Horn, M. 2012. A novel betaproteobacterial agent of gill epitheliocystis in seawater farmed Atlantic salmon

(*Salmo salar*). *PLoS ONE*, 7: e32696.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032696>

Venerus, L.A., Dinámica espacial del salmón de mar *Pseudoperca semifasciata* (Cuvier, 1829)

(Pinguipedidae)-Implicancias para el uso sustentable de sistemas de arrecifes rocosos, Doctoral Dissertation, Universidad de Buenos Aires, 2006. <http://hdl.handle.net/1834/9133>

Vreys, N. 2016. Evaluación de la calidad de agua de un sistema lótico y área terrestre de influencia, en relación a respuestas biológicas en la especie íctica *Heptapterus mustelinus*. *Repositorio digital Universidad Nacional de Córdoba*. <http://hdl.handle.net/11086/5561>

Análisis descriptivo de la utilización de inhibidores de la secreción ácida en pacientes adultos en un hospital público

Descriptive analysis of the use of acid secretion inhibitors in adult patients in a public hospital

Fernando Gabriel Olivares^{1*}, Verónica Mabel Álvarez¹, María Monserrat Urgel y Oria¹, Hugo César Sepúlveda¹

¹Servicio de Farmacia. Hospital Regional Río Gallegos. Río Gallegos. Argentina.

*olivaresfernando@hotmail.com

RESUMEN

La sobreutilización de los inhibidores de la secreción ácida (ISAs) en la profilaxis del sangrado gastrointestinal de los pacientes internados ha sido reportada en numerosas ocasiones. Su eficacia y seguridad está siendo cuestionada y cada vez más se asocia a eventos prevenibles como efectos adversos a medicamentos, neumonía y diarrea asociada a *Clostridium difficile*. En el Hospital Regional Río Gallegos nunca se ha realizado un análisis descriptivo de la prescripción de ISAs en las salas de internación nosocomial. El presente es un estudio retrospectivo observacional longitudinal con muestreo simple durante los meses de abril y mayo de 2018. Fueron relevadas las variables indicación de inhibidores de la acidez, tipo de fármaco, vía de administración, dosis diaria y servicio de internación, además de variables demográficas. Igualmente, se identificaron los casos de hemorragia digestiva alta (HDA) y su tratamiento. Se han prescrito ISAs en el 86 % de las indicaciones médicas, con predominancia de omeprazol sobre ranitidina, y de la vía de administración intravenosa sobre la oral, en el 87 % de los casos. Se atendieron doce casos de HDA, con tratamientos disímiles entre sí. La atención farmacéutica al paciente internado se ha ponderado como una alternativa de intervención válida para la adecuación de la terapéutica al tratamiento más eficaz, seguro y costo efectivo. Se hace necesario revisar la adecuación de las indicaciones médicas de ISAs a fin de evaluar su pertinencia, la elección del fármaco, el paso a vía oral o la suspensión de este. Finalmente, se requiere la protocolización nosocomial de los tratamientos con inhibidores de la bomba de protones en la HDA, a fin adecuarlos uniformemente a las Guías de Práctica Clínica actuales.

PALABRAS CLAVE: Atención Farmacéutica, Inhibidores de la Secreción Ácida, IBPs, ARH₂s, Hemorragia Digestiva Alta.

ABSTRACT

The overuse of acid secretion inhibitors (ASIs) in the prophylaxis of gastrointestinal bleeding in hospitalized patients has been reported on numerous occasions. Its efficacy and safety are being questioned and it is increasingly associated with preventable adverse drug events, pneumonia and diarrhea associated with *Clostridium difficile*. At the Río Gallegos Regional Hospital, a descriptive analysis of the prescription of ASIs has never been carried out in the nosocomial hospitalization rooms. This is a retrospective observational longitudinal study with simple random sampling during the months of April and May 2018. The variables indication of acidity inhibitors, type of drug, route of administration, daily dose, and hospitalization service, in addition to demographic variables, were analyzed. Likewise, cases of upper gastrointestinal bleeding (UGB) and their treatment were identified. ASIs have been prescribed in 86% of medical indications, with a predominance of omeprazole over ranitidine, and the intravenous route of administration over oral, in 87% of cases. Twelve cases of UGB were treated, with therapies that were dissimilar to each other. Pharmaceutical care for hospitalized patients has been considered as a valid intervention alternative for adapting the therapy to the most effective, safe, and cost-effective treatment. It is necessary to review the adequacy of the medical indications of ASIs to evaluate its relevance, the choice of the drug, the switch to oral route or its suspension. Finally, the nosocomial protocolization of proton pump inhibitor treatments in UGB events is required, to uniformly adapt them to the current Clinical Guidelines.

KEY WORDS: Pharmaceutical Care, Acid Secretion Inhibitors, PPIs, H₂RAs, Upper Gastrointestinal Bleeding.

INTRODUCCION

La utilización de inhibidores de la secreción ácida (ISAs) está ampliamente difundida tanto en pacientes ambulatorios como en las salas de internación hospitalarias. En la mayoría de los casos se ha documentado una sobreprescripción de los mismos, sin revisar los esquemas

terapéuticos y su uso llega a ser habitual, a pesar de las dudas que surgen en cuanto a su eficacia, y de los potenciales efectos adversos e interacciones medicamentosas que traen aparejados (Buedgens *et al*, 2014). El uso más común en las instituciones sanitarias es la prevención del sangrado gastrointestinal por stress

(Avendaño-Reyes y Jaramillo-Ramírez, 2014).

El paciente críticamente enfermo puede desarrollar erosiones gástricas y, en ocasiones, úlceras por estrés con sangrado gastrointestinal grave que puede ser fatal. Las úlceras por estrés son lesiones de la mucosa gástrica, asociadas con eventos estresantes tales como quemaduras extensas, ventilación mecánica, cirugía mayor, sepsis, coagulopatía y traumatismo grave. Los hallazgos endoscópicos comunes varían de erosiones superficiales a úlceras focales profundas que penetran la submucosa, y ocurren por lo general entre el tercer y el séptimo día después de ingresar en la unidad de cuidados intensivos (UCI). El sangrado gastrointestinal nosocomial debido a úlceras de estrés se asocia con tasas elevadas de mortalidad intrahospitalaria, por lo general en la UCI. Esto ha fomentado la administración profiláctica de varios medicamentos, tales como antiácidos, sucralfato, antagonistas de los receptores de histamina 2 (ARH_2) e inhibidores de la bomba de protones (IBP) (Avendaño-Reyes y Jaramillo-Ramírez, 2014).

Los antiácidos y sucralfato ya no son utilizados en la mayoría de las UCI. Los ARH_2 reducen la secreción del ácido gástrico a través de una inhibición reversible y competitiva de la secreción de

ácido estimulado por histamina y frecuentemente se asocia con la taquifilaxia (efecto reducido después de 48 h de uso). Los IBP suprimen de manera irreversible la producción de ácido gástrico a nivel de la bomba de hidrógeno/potasio adenosina trifosfatasa, proporcionando una inhibición de larga duración, y son los agentes antiseoretos más potentes que se utilizan en la actualidad. En contraste con los ARH_2 , los IBPs inhiben la secreción de ácido gástrico tanto inducido por histamina como mediado vagalmente. En años recientes los IBP se han convertido en los medicamentos que se utilizan con más frecuencia, en comparación con los ARH_2 , para la prevención de úlceras por estrés y de sangrado gastrointestinal. Sin embargo, se ha demostrado que la sobreutilización de estos medicamentos en pacientes sin factores de riesgo en la UCI, así como en los pacientes hospitalizados que no se encuentran en la UCI, es muy frecuente. Esta prescripción inapropiada ha incrementado tanto la cantidad de efectos adversos como los costes por hospitalización. Así mismo, tal prescripción generalmente se continúa una vez que el paciente ha abandonado el hospital, con las mismas consecuencias en relación con los efectos adversos y costes (Nasser *et al*, 2010).

La utilización de estos medicamentos por periodos largos no es inofensiva. Las complicaciones principales, aunque poco frecuentes, son: riesgo incrementado de neumonía nosocomial o adquirida en la comunidad, baja absorción de calcio con osteoporosis y riesgo de fractura de cadera y riesgo incrementado de infección por *Clostridium difficile*.

Debido a que el sangrado gastrointestinal visible ocurre en una minoría de los pacientes en la UCI y el sangrado clínicamente importante ocurre solo en el 1-3 %, algunos autores han argumentado que la profilaxis se encuentra sobreutilizada en la actualidad. Por lo tanto, la pregunta es: ¿qué pacientes en la UCI deben recibir profilaxis? Ciertamente, los pacientes con fallo respiratorio que requieren de ventilación mecánica > 48 h están en riesgo, así como los que sufren de coagulopatía grave. Los pacientes que se presentan con una lesión cerebral cerrada con una puntuación de Glasgow baja o con quemaduras graves también deben recibir terapia profiláctica. Los pacientes que no están dentro de ninguno de estos grupos tienen menos de 0.5 % de riesgo de sangrado clínico significativo y probablemente no requieren de terapia profiláctica (Avendaño-Reyes y Jaramillo-Ramírez, 2014).

En la actualidad, la mayoría de las UCI utilizan los IBP en lugar de los ARH₂ como agentes profilácticos para las úlceras por estrés, pareciera ser que los IBP son más efectivos que los ARH₂ en la prevención clínica de la hemorragia digestiva alta significativa en pacientes críticos, sin embargo, se ha identificado la administración de IBP como un factor de riesgo importante de diarrea asociada a *Clostridium difficile* (DACD) en pacientes en UCI (Buedgens *et al*, 2014; Barbateskovic *et al*, 2019; Sachar *et al*, 2014).

La patogénesis de las lesiones de la mucosa relacionada con el estrés y las úlceras por estrés son multifactoriales. La hospitalización o el ingreso en la UCI por sí solas no son razones suficientes para comenzar la profilaxis. Los IBP son al menos tan efectivos como los ARH₂, pero son más caros, y la evidencia sigue siendo muy limitada. Se debe individualizar cada paciente de la UCI, evaluar su riesgo y determinar la necesidad de comenzar con profilaxis de sangrado relacionado con el estrés (Avendaño-Reyes y Jaramillo-Ramírez, 2014; Boletín de Farmacia Hospital El Cruce, 2013; Sreedharan *et al*, 2012).

En pacientes no hospitalizados en la UCI, la administración de IBP es asociada con un riesgo significativamente mayor de complicaciones infecciosas,

especialmente de neumonía adquirida en la comunidad o nosocomial y DACD. Además de los factores de riesgo conocidos desde hace mucho tiempo asociados a DACD, como el uso de ciertos antibióticos y a una edad más avanzada, varios estudios en entornos que no pertenecen a la UCI identificaron los ISA, especialmente IBP, como un factor de riesgo adicional e independiente en una escala similar a los antibióticos (Buedgens *et al*, 2014; Nasser *et al*, 2010).

Regionalmente, se han reportado tasas de utilización de antiulcerosos, sin la presencia de factores de riesgo que la justifiquen, desde un 20 % a un 79 %, superando las más altas tasas reportadas en otros centros. Igualmente, en un estudio transversal de utilización de antiulcerosos, Di Líbero *et al* (2018) evaluaron que el 72 % de los pacientes estudiados no calificaban para ninguna indicación válida de terapia supresora de la acidez por bibliografía. Aun así, el 83 % de los mismos la tenía indicada.

En nuestro hospital, el Servicio de Farmacia posee un sistema de dispensación de medicamentos con intervención del farmacéutico clínico con posterioridad a la dispensación. El mismo tiene por objetivo conocer la historia farmacoterapéutica de los pacientes y la imputación de costo de forma individualizada y como requisitos

mínimos conocer las unidades de medicamentos administrados en un periodo de 24 horas. Dicha modalidad permite establecer programas de intervención farmacéutica que promuevan la utilización adecuada de los medicamentos prescritos (Resolución N° 641 del Ministerio de Salud, 2000).

En el nosocomio se cuenta con dos clases de ISA en el Formulario Terapéutico (FT) para la prescripción médica, con un principio activo por clase farmacológica: un inhibidor de la bomba de protones, omeprazol (OME), y un antagonista de los receptores de histamina H₂, ranitidina (RAN), en tres tipos de presentaciones farmacéuticas: ampollas y polvo liofilizado para solución inyectable intravenosa e infusión continua, cápsulas o comprimidos y jarabes, para administración oral.

Actualmente, el nosocomio no cuenta con un Vademécum Hospitalario que protocolice la utilización de los medicamentos incluidos en el FT respecto a patologías y su tratamiento farmacológico. Lo cual dificulta normar una indicación médica uniforme entre los profesionales de la salud que sea la más eficaz, costo-efectiva y segura para el paciente. Cada unidad de internación posee una cultura de prescripción de acuerdo con el tipo de pacientes y las patologías prevalentes que atiende, sin

embargo, al no ser parte de una norma institucional, se obstaculiza la consulta, revisión y actualización periódica de la misma.

Es objetivo de este estudio describir la utilización de inhibidores de la secreción ácida en los pacientes adultos internados en las salas de cuidados críticos, cirugía general y clínica médica, durante el período seleccionado. Se pretende conocer la distribución de las variables demográficas edad y sexo de los pacientes internados en las distintas salas y cuantificar la prescripción de ISAs de acuerdo con la proporción de pacientes que recibieron protección gástrica. Es prioritario clasificar la prescripción de ISAs de acuerdo con el fármaco indicado, la vía de administración y la dosis, además de realizar un análisis multivariado para determinar cuál de las distintas variables independientes es la que más influye en los hábitos de prescripción. Finalmente, se espera evaluar la uniformidad y adecuación del tratamiento de hemorragia digestiva alta con IBP en los servicios de internación, basados en guías de práctica clínica.

MATERIALES Y METODOS

El análisis realizado corresponde a un estudio descriptivo retrospectivo longitudinal con muestreo simple. La unidad de análisis fue la prescripción

médica diaria realizada al total de pacientes mayores de 18 años internados durante los meses de marzo y abril del año 2018.

Los datos se relevaron de la planilla de indicaciones diarias, la historia clínica del paciente y el registro de dispensación de medicamentos del Servicio de Farmacia. Las variables de estudio fueron la edad, el sexo, la prescripción médica de un ISA, el tipo de fármaco, la vía de administración, la dosis y el diagnóstico de ingreso según la Clasificación Internacional de Enfermedades, 10ª edición (CIE-10). Las fuentes secundarias supra citadas, al igual que el sistema informático SCA4 (intranet del nosocomio), fueron utilizados para realizar la conciliación terapéutica de la farmacoterapia del paciente al migrar entre servicios de internación de cuidados críticos y no críticos.

Para la recolección y tratamiento de la información, se efectuó la codificación de las variables del estudio mediante una base de datos utilizando el software de Microsoft® Excel para Windows 10, suscripción a Office 365. Para el análisis estadístico se utilizó el software InfoStat®, licencia provista por la Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

La variable edad fue cuantificada como variable continua discreta y variable categórica ordinal, según la siguiente clasificación: JOVEN, de 15 a 24 años;

JOVEN ADULTO, de 25 a 44 años; ADULTO, de 45 a 65 años, y ADULTO MAYOR, mayores a 65 años. La variable cualitativa dicotómica sexo, como MASCULINO o FEMENINO. Tanto la edad como el sexo de cada paciente constituyó un único dato durante toda su estancia de internación en el nosocomio.

La variable cualitativa dicotómica indicación de prescripción médica de un ISA se consideró positiva (SÍ) o negativa (NO) dependiendo de su consignación en los apartados “Plan Parenteral”, “Medicación intravenosa” o “Medicación oral” de la planilla de indicaciones diarias.

La variable categórica servicio de internación fue definida: unidad de cuidados críticos, como TERAPIA; cirugía general, traumatológica y neurocirugía, CIRUGÍA; y clínica médica, CLÍNICA. La variable categórica ordinal dosis diaria del ISA se clasificó de la siguiente manera: 20 mg de OME O, 40 mg de OME IV, 150 mg de RAN O y 100 mg de RAN IV, como BAJA; 40 mg de OME O, 80 mg de OME IV, 300 mg de RAN O y 150 mg de RAN IV, como MEDIA; $\geq$ a 40 mg de OME O, $\geq$ a 120 mg de OME IV, $\geq$ a 450 mg de RAN O y $\geq$ a 200 mg de RAN IV, como ALTA.

Las variables cuantitativas continuas se describieron como figuras de histogramas de frecuencia, mientras que las variables cualitativas categóricas se diagramaron como figuras de gráficos de tortas o de barras. Las tablas de frecuencias relativas por filas con el análisis del estadístico χ^2 de Pearson se presentaron como tablas, mientras que el análisis de correspondencia múltiple se ilustró en una figura Biplot, junto a su contribución al χ^2 de Pearson.

RESULTADOS

Fueron atendidos 410 pacientes durante el período de estudio. La distribución de frecuencias de edades en el histograma evidencia una distribución no normal, con asimetría negativa o hacia la izquierda, curtosis platocúrtica menor a cero, con una media de 53,82 años, una mediana de 56,50 años y una moda de 57 años, con un rango de edades entre 18 y 95 años. La Figura 1A muestra la distribución de edades de los pacientes internados como histograma, mientras que la Figura 1B la clasifica por grupo etario. La distribución por sexo correspondió: un 57 % al sexo masculino, mientras que un 43 % al sexo femenino.

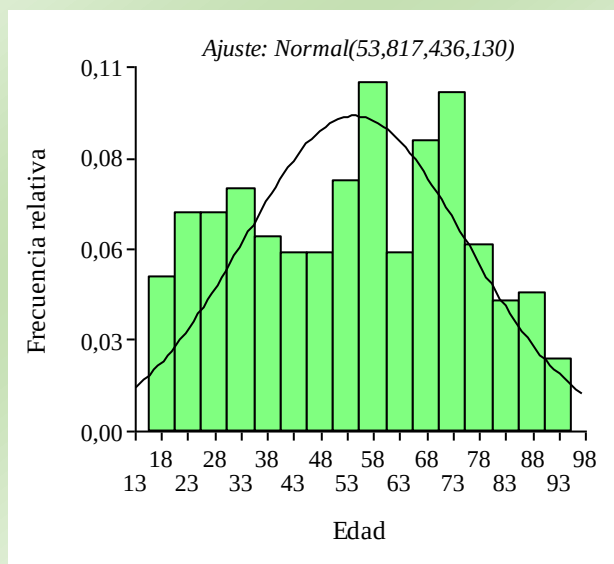


Figura 1A. Histograma de frecuencias de la edad de los pacientes internados en el HRRG durante marzo y abril de 2018.

Figure 1A: Histogram of frequencies of the age of patients hospitalized in the HRRG during March and April 2018.

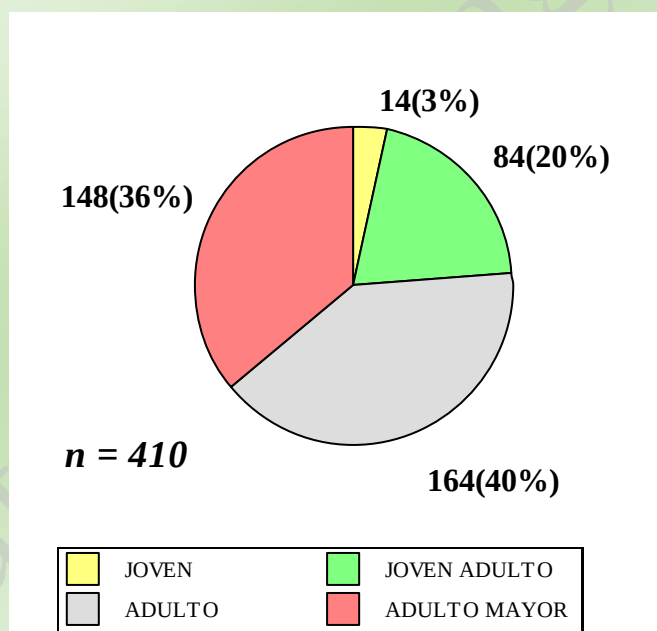


Figura 1B. Distribución categórica de edades según grupo etario.

Figure 1B. Categorical distribution of ages according to age group.

Se totalizaron 3.123 prescripciones diarias, según distribución por servicio de internación en la Figura 2A. Del número total de indicaciones médicas el 86 % (n = 2699) incluía un ISA, siendo ranitidina u omeprazol, administrado por vía

intravenosa o vía oral. La indicación de protección gástrica por servicio fue del 83 % (n = 892) en cirugía general (CIR), del 85 % (n = 1308) en clínica médica (CLIN) y del 97 % (n = 499) en cuidados críticos (UCI).

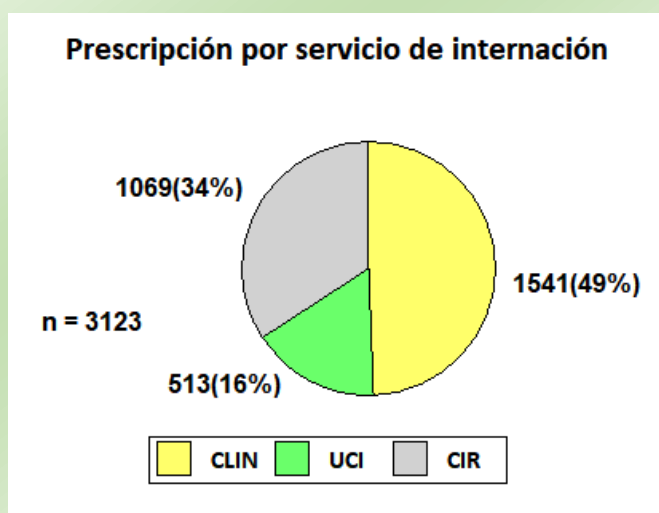


Figura 2. Proporción de prescripciones médicas diarias por servicio de internación hospitalaria.
Figure 2. Proportion of daily medical prescriptions by hospitalization area.

La elección del fármaco inhibidor de la secreción ácida fue el 68 % (n = 1.827) de las veces omeprazol, mientras que el 32 % (n = 872), ranitidina; la vía de administración seleccionada fue el 87 % (n = 2.343) por vía intravenosa mientras que el 13 % (n = 353) por vía oral. La UCI registró 95 % (n = 474) de prescripción de omeprazol, con el 100 % (n = 499) de administración por vía intravenosa; en CLIN, a su vez, el 73 % (n = 955) de las

indicaciones médicas fueron de omeprazol, mientras que el 27 % (n = 353) de ranitidina, con un 74 % (n = 968) de administración parenteral; en CIR, el 45 % (n = 225) de las prescripciones correspondieron a omeprazol y el 55 % (n = 274) a ranitidina, con un 99 % (n = 494) de administración intravenosa.

La Figura 3 representa la prescripción acumulada total de ISA por fármaco y vía de administración.

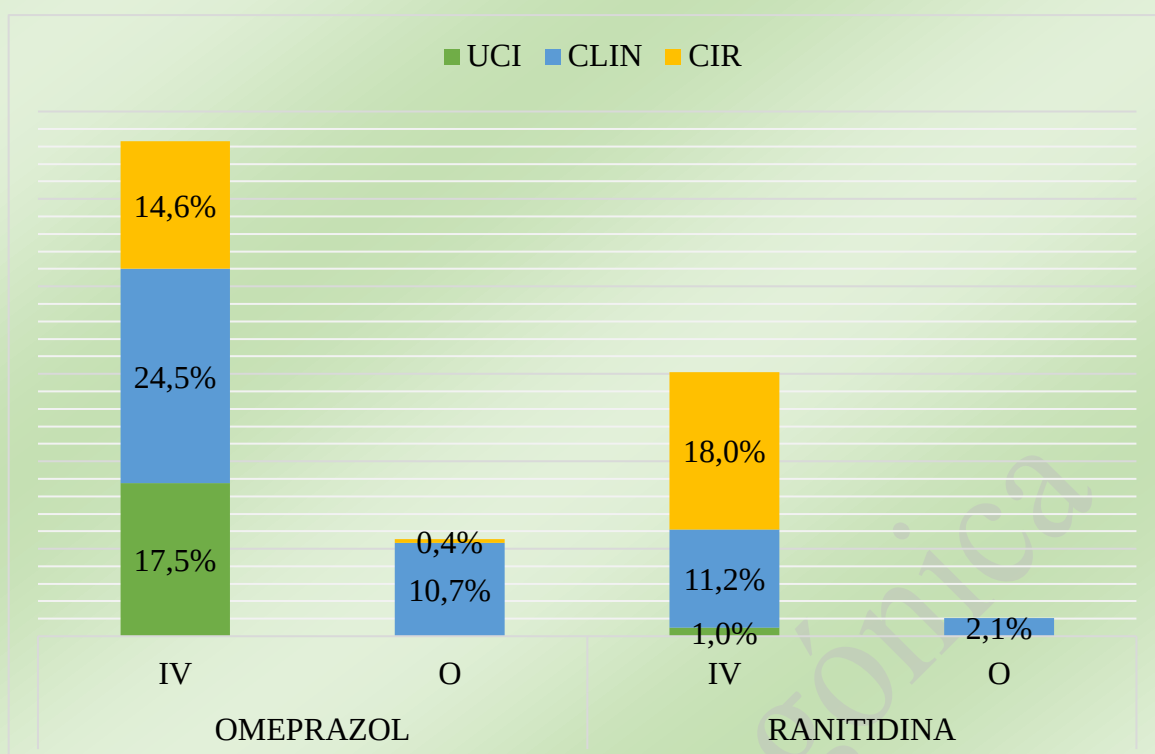


Figura 3. Proporción de utilización de inhibidores de la secreción ácida por fármaco y vía de administración.
Figure 3. Proportion of use of acid secretion inhibitors by drug and route of administration.

Respecto a la utilización de ambos grupos farmacológicos en el tratamiento de la secreción ácida, se identificó un 1,4 % (n = 38) de indicaciones médicas con duplicidad terapéutica, en seis pacientes internados. Dichos pacientes fueron tratados con ranitidina y omeprazol, ambos por vía intravenosa, en dosis fijas de ranitidina de 150 mg/día y dosis de omeprazol de 40 mg/día o 80 mg/día. Tres de los pacientes en una sola indicación

diaria, mientras que en los otros tres el tratamiento combinado se prolongó por 5 o 6 días.

La Tabla 1 resume las prescripciones de ISA por servicio, por dosis y vía de administración, expresadas como frecuencias relativas por filas. La administración de dosis altas de ambos ISA se realizó exclusivamente por vía intravenosa.

Tabla I. Frecuencias relativas por filas de las prescripciones de inhibidores de la secreción ácida por servicio, dosis/día y vía de administración.

Table I. Relative frequencies by rows of acid secretion inhibitor prescriptions by service, dose/day, and route of administration.

Dosis categorizada	Servicios de internación			Total
	CIRUGÍA	CLÍNICA	TERAPIA	
OME ALTA	36,67 %	36,67 %	26,67 %	100,00%
OME MEDIA	30,49 %	66,83 %	2,68 %	100,00%
OME BAJA	18,64 %	49,90 %	31,46 %	100,00%
RAN ALTA	100,00 %	0,00 %	0,00 %	100,00%
RAN MEDIA	59,35 %	37,13 %	3,52 %	100,00%
RAN BAJA	56,06 %	43,49 %	0,00 %	100,00%
Total	33,05 %	48,46 %	18,49 %	100,00%

En la Figura 4 se muestra en un gráfico Biplot el análisis de correspondencia múltiple (ACM) de las variables en estudio: servicio de internación, fármaco inhibidor de la secreción ácida, vía de administración y dosis diaria categorizada.

El ACM adjudicó un autovalor de 0,70 al eje 1, la variable medicamento, y de 0,59 al eje 2, la vía de administración, explicando el 55,61 % de variabilidad total (Tabla 2).

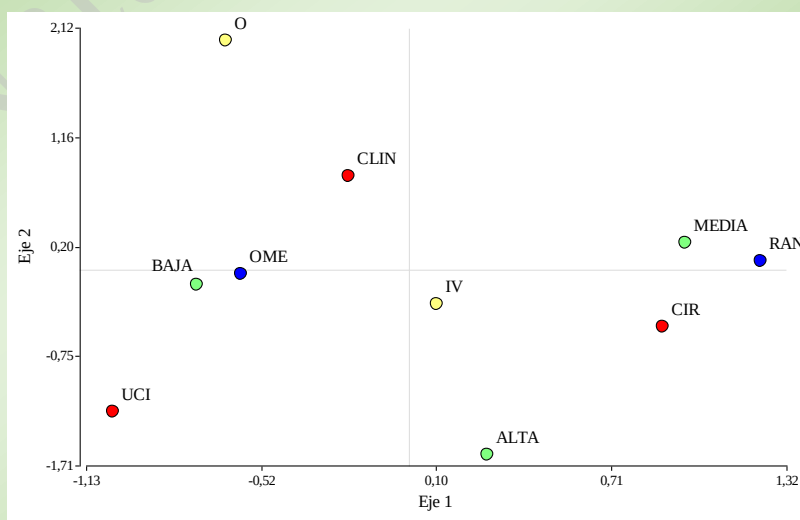


Figura 4. Análisis de correspondencia multivariado de las variables categóricas: servicio de internación, fármaco, dosis/día y vía de administración.

Figure 4. Multivariate correspondence analysis of the categorical variables: hospitalization service, drug, dose/day, and route of administration.

Tabla II. Contribución al χ^2 de Pearson de las componentes principales del análisis de correspondencia múltiple y sus autovectores (autovalores).

Table II. Contribution to Pearson's χ^2 of the principal components of the multiple correspondence analysis and their eigenvectors (eigenvalues).

Contribución al Chi cuadrado

	Autovalor	Inercias	Chi Cuadrado	(%)	% acumulado
1	0,70	0,49	6805,57	32,70	32,70
2	0,59	0,34	4767,04	22,91	55,61

Coordenadas fila

	Eje 1	Eje 2
CLIN	-0,21	0,82
UCI	-1,03	-1,24
CIR	0,89	-0,50
OME	-0,59	-0,03
RAN	1,23	0,07
O	-0,64	2,00
IV	0,10	-0,30
BAJA	-0,74	-0,13
MEDIA	0,96	0,24
ALTA	0,27	-1,62

Se sucedieron doce casos de hemorragia digestiva alta (HDA) en los tres servicios de internación durante el período de estudio. Dos en CLIN, cinco en UCI y cuatro en CIR, mientras que uno de ellos comienza en UCI y continúa tratamiento en CIR. Cinco de los doce casos descriptos

motivaron la internación de los pacientes, uno en CLIN con diagnóstico K92.2 (Hemorragia gastrointestinal no especificada), uno en UCI que luego continúa tratamiento en CIR con diagnóstico K92.2 y tres en CIR, con diagnósticos K25.2 (Úlcera gástrica aguda

con hemorragia y perforación), K92.0 (Hematemesis) y K92.2. Por lo tanto, se produjeron siete eventos de HDA durante la internación nosocomial. En la mayoría de los casos, el tratamiento consistió en omeprazol en infusión continua, con o sin dosis de carga, y con dosis de

mantenimiento de duración variable. La Tabla 3 muestra el tratamiento recomendado de omeprazol para la HDA, en contraste con los diversos esquemas que se utilizaron en cada servicio de internación y en cada caso.

Tabla III. Indicación de tratamiento farmacológico con inhibidores de la bomba de protones para la hemorragia digestiva alta.

Table III. Indication of pharmacological treatment with proton pump inhibitors for upper gastrointestinal bleeding.

Dosis de carga	Infusión continua (IC)	Dosis de mantenimiento
80 mg en bolo	8 mg/h x 72 h	20-40 mg/día x 6 semanas
40 mg en bolo	IC 8 mg/h x 24 h	40 mg/12 h
80 mg en bolo	IC 8 mg/h x 24 h	40 mg/12 h
	IC 8 mg/h x 48 h	40 mg/12 h
160 mg en bolo	IC 8 mg/h x 72 h + 40 mg/12 h	-----
Sin dosis de carga	IC 8 mg/h x 120 h	40 mg/12 h
	IC 8 mg/h x 24 h + 40 mg/12 h	40 mg/12 h
	IC 8 mg/h x 48 h + 40 mg/12 h	40 mg/12 h
	IC 8 mg/h x 24 h	40 mg/12 h
	40 mg/8 h x 24 h	80 mg/12 h

DISCUSION

Este es el primer estudio descriptivo de la utilización de inhibidores de la secreción ácida que se realiza en nuestra institución. La prescripción de ISAs en los pacientes internados es elevada, con el 83 % de las indicaciones médicas incluyendo un ISA. Esta práctica profesional no se circunscribe solo al área de UCI, en la cual

se espera mayor riesgo de úlcera por stress, sino también en las salas de internación de menor complejidad, CLIN y CIR, en proporción ligeramente inferior, 97 %, 85% y 83 %, respectivamente. Esta sobreutilización de ISA ha sido destacada como práctica habitual e instaurada en las instituciones sanitarias, no solo en las áreas de cuidados críticos, sino también en

salas de internación común, e incluso en el alta médica (Nasser *et al*, 2010; Cook y Guyatt, 2018; Buendgens *et al*, 2014; Bez *et al*, 2011).

Igualmente, al comparar el uso del omeprazol con el de ranitidina, es evidente el mayor uso de IBPs antes que del ARH₂s. El hecho de que la UCI utilice el 95 % de las veces un IBP y la sala de CLIN el 73 % de las mismas, evidencia la preferencia por drogas de dicho grupo farmacológico, siendo el área de CIR el que muestra una proporción similar en el uso entre un IBP y un ARH₂, un 45 % y un 55 %, respectivamente. Estos hallazgos concuerdan con el concepto generalizado de que los IBP son más eficaces que los ARH₂s, si bien estos también cumplen eficientemente con la función de prevenir el sangrado gástrico (Avendaño-Reyes y Jaramillo-Ramírez, 2014; MacLaren y Campbell, 2013). Sin embargo, cabe destacar a Buedgens *et al*, (2014), quienes identificaron en su estudio (Alemania) que, aproximadamente el 73% de todos los pacientes recibieron IBP en la UCI, comparado con las encuestas de los Estados Unidos y el Reino Unido, que informaron que se eligieron ARH₂s para aproximadamente dos tercios de los pacientes de la UCI para la profilaxis de hemorragias por úlceras por estrés.

Con respecto a las diversas formulaciones farmacéuticas disponibles, inyectables vs

comprimidos, se puede observar que la vía de administración utilizada más ampliamente es la intravenosa, en el 100 % de las prescripciones en la UCI, el 99 % de las mismas en CIR y el 74 % en CLIN. Lo antedicho evidencia la necesidad de evaluar la farmacoterapia, ya que, de ser esta necesaria y oportuna, se debería optar por la vía de administración más segura y que incurra en la disminución de los costes, de ser posible. Con respecto a pacientes en asistencia ventilatoria mecánica críticamente enfermos, la terapia con ARH₂s reduciría los costos comparados a los IBP para la profilaxis de úlcera por stress (MacLaren y Campbell, 2013). Mientras que en las salas de cuidados generales no críticos como CLIN o CIR podrían reducirse los costes por el cambio a vía oral lo antes posible luego de iniciada la terapia intravenosa. Nasser *et al* (2010) evidenciaron que solo alrededor del 50 % de los pacientes que se iniciaron con IBP por vía intravenosa se consideraron apropiados, de los cuales la mitad eran candidatos para cambiar a la forma oral durante su hospitalización. Asimismo, destacan que la iniciación inapropiada de IBP por vía intravenosa tuvo más probabilidades de tener lugar en el piso médico en comparación con el piso quirúrgico.

Regionalmente, cabe destacar los hallazgos de Di Líbero *et al* (2018)

respecto a las formulaciones farmacéuticas utilizadas en la terapia para la supresión de la acidez. Si bien el estudio observacional incluía pacientes de sectores como la Unidad de Terapia Intensiva, la Unidad Coronaria, Cardiología, Clínica Médica y Cirugía, la distribución de los tratamientos de ISAs y vías de administración utilizados fueron: 27 % de ranitidina intravenosa, 40 % de ranitidina vía oral y 33 % de omeprazol vía oral. La exclusión del uso de omeprazol por vía intravenosa de manera profiláctica sin duda repercute en los costos de la farmacoterapia.

La baja duplicidad terapéutica detectada puede considerarse una buena práctica de prescripción médica, ya que no se atribuye mayor eficacia al uso conjunto de distintos ISAs de acción farmacológica complementaria, y predisponen al aumento de eventos adversos a medicamentos prevenibles.

El análisis de correspondencia permite explorar gráficamente asociaciones entre variables categorizadas. El Biplot del ACM representa una forma útil de observar los resultados (Figura 4). El Biplot de la CP1 y CP2 explica el 55,61 % de la variabilidad total de los datos. Es importante observar en primera instancia en sentido Este-Oeste, y ver las proyecciones de las variables sobre la CP1. A partir de la dispersión de las

observaciones, podemos inferir que la prescripción de OMEPRAZOL se asocia con la UCI y CLIN antes que con CIR, mucho más relacionada con la prescripción de RANITIDINA. Igualmente, respecto a la dosis diaria BAJA se asocia con la prescripción de omeprazol y de la vía ORAL, la prescripción de la dosis diaria MEDIA con la prescripción de ranitidina, y la prescripción de la dosis diaria ALTA se relaciona con la vía INTRAVENOSA. En el sentido Norte-Sur, sobre la CP2, la proyección de la vía ORAL se asocia directamente con CLIN, mientras que la vía INTRAVENOSA con CIR y UCI.

La combinación lineal de cada autovector con el valor observado para dicha variable conforma la Componente Principal. Se denomina CP1 a la componente principal con mayor autovalor, es decir, la CP que explique la mayor variabilidad de los datos (32,70 %), luego, se denomina CP2 a la siguiente componente que explique alta variabilidad, pero ésta explicará menos que la CP1 y más que la CP3 (22,91 %). En este caso, las dos primeras CP (CP1+CP2) explican el 55,61 % de la variabilidad total de los datos. Los autovectores, coeficientes asociados a las variables son ponderadores o pesos, mientras más grande sea este coeficiente mayor inercia o “peso” tendrá esa variable para explicar la variabilidad de las

observaciones (Balzarini *et al*, 2015). Por lo tanto, en nuestro análisis multivariado el mayor peso en la CP1 lo posee la variable medicamento (con el autovector de RAN de 1,23), mientras que en la CP2 lo tiene la variable vía de administración (con el autovector de O de 2,00).

La incidencia del sangrado gastrointestinal clínicamente importante durante la hospitalización en nuestros hallazgos supone un 1,7 %, aproximadamente un 50 % inferior al 3 % reportado en estudios descriptivos actuales (Di Líbero *et al*, 2018). El consenso aceptado como tratamiento de las HDA pondera la superioridad de los IPBs antes los ARH₂s o placebo, y la vía intravenosa antes que la oral. Se administra una dosis de carga de 80 mg de IBP, como omeprazol, seguido por 72 h de una infusión continua intravenosa de 8 mg/h, y finalmente, por una dosis de mantenimiento de 20 a 40 mg/día (Barkun *et al*, 2019; Lam *et al*, 2015; Boletín de Farmacia Hospital El Cruce, 2013). La terapéutica relevada en todos los casos de HDA se muestra inconsistente con las recomendaciones actuales. En varias ocasiones no se administra la dosis de carga del IPB, la infusión intravenosa continua dura en su mayoría 24 h o 48 h, llegando a un límite superior de 120 h de duración. Incluso se ha tratado con administración del IBP en bolo de 40 mg

cada 8 h por 24 h seguido de una dosis de mantenimiento cuatro veces superior a la recomendada. Lo antedicho evidencia la carencia de un protocolo institucional que permita un tratamiento acorde a las recomendaciones terapéuticas actuales, indistintamente del servicio de internación en donde se produzca el evento, o el profesional sanitario que asuma la responsabilidad de la prescripción de este. Queda clara la necesidad de reevaluar la prescripción de ISAs en nuestro nosocomio, sobre todo la pertinencia de la indicación médica según los criterios clínicos, la selección del tipo fármaco, el cambio a la vía oral si están dadas las condiciones y la suspensión oportuna del tratamiento. Se pueden brindar recomendaciones pertinentes como parte del seguimiento farmacoterapéutico a los pacientes internados desde el Servicio de Farmacia a fin de posibilitar una mejora continua en la eficacia, seguridad y costes de los tratamientos dispensados.

CONCLUSIONES

El alto índice de prescripción de ISAs evidencia uso habitual de los mismos, sin revisar los esquemas terapéuticos, a fin de propiciar el intercambio por el fármaco más efectivo de menor costo, la vía oral o la suspensión del tratamiento. Es necesario protocolizar el tratamiento con IBP de las hemorragias digestivas altas, a

fin de adecuar los mismos a las recomendaciones actuales respecto a dosis de carga, administración en infusión continua y terapia de mantenimiento. La atención farmacéutica al paciente

internado se percibe como una oportunidad de intervención apropiada para garantizar el uso apropiado de los ISAs.

BIBLIOGRAFIA

Avendaño-Reyes J., Jaramillo-Ramírez H. 2014. Profilaxis para sangrado por úlceras de estrés en la unidad de cuidados intensivos. *Rev. Gastroenterol. Mex.*, **79**(1): 50-55.

Balzarini M., Bruno C., Córdoba M. y Teich I. 2015. Herramientas en el Análisis Estadístico Multivariado. Escuela Virtual Internacional (CAVILA). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.

Barbateskovic M., Marker S., Granholm A., Anthon C., Krag M., Jakobsen J., Perner A., Wetterslev J., Møller M. 2019. Stress ulcer prophylaxis with proton pump inhibitors or histamin-2 receptor antagonists in adult intensive care patients: a systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *Intensive Care Med.*, **45**: 143-158.

Barkun A., Almadi M., Kuipers E., Laine L., Sung J., Tse F., Leontiadis G., Abraham N., Calvet X., Chan F., Douketis J., Enns R., Gralnek I., Jairath V., Jensen D., Lau J., Lip, G., Loffroy R., Maluf-Filho F., Meltzer A., Reddy N., Saltzman J., Marshall J., Bardou M. 2019. Management of Nonvariceal Upper Gastrointestinal Bleeding: Guideline Recommendations From the International Consensus Group. *Ann. Intern. Med.*, **171**: 805-822.

Bez C., Perrottet N., Zingg T., Leung Ki E., Demartines N., Pannatier A. 2013. Stress ulcer prophylaxis in non-critically ill patients: a prospective evaluation of current practice in a

general surgery department. *J. Eval. Clin.*, **19**: 374-378.

Buendgens L., Bruensing J., Matthes M., Dückers H., Luedde T., Trautwein C., Tacke F., Koch, A. 2014. Administration of proton pump inhibitors in critically ill medical patients is associated with increased risk of developing Clostridium difficile-associated diarrhea. *J. Crit. Care*, **29**: 696.e11-696.e15.

Cook, D., Guyatt, G. 2018. Prophylaxis against Upper Gastrointestinal Bleeding in Hospitalized Patients. *N. Engl. J. Med.*, **378**: 2506-2516.

Di Líbero E., Araujo J., Martínez I., Zaffaroni R., Tucci O. 2018. Terapia supresora de la acidez: estudio transversal de utilización de antiulcerosos en un Hospital Interzonal de Agudos. *Revista de la AAFH*, **5**(2): 17-25.

Hospital el Cruce Dr. Calos Néstor Kirchner. 2012. OMEPRAZOL. Boletín FARMACIA N° 5. http://farmacia.blogs.hospitalelcruce.org/files/2013/01/boletin_farmacia_53.pdf

Lam K., Wong J., Lau J. 2015. Pharmacological Treatment in Upper Gastrointestinal Bleeding. *Curr. Treat. Options Gastro.*, **13**: 369-376.

MacLaren R., Campbell J. 2013. Cost-Effectiveness of Histamine Receptor-2 Antagonist Versus Proton Pump Inhibitor for Stress Ulcer Prophylaxis in Critically Ill Patients. *Crit. Care Med.*, **42**: 809-815

Ministerio de Salud. Resolución N° 641/2000. Argentina.

<http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/60000-64999/64079/norma.htm>

Nasser S., Nassif J., Dimassi H. 2010. Clinical and cost impact of intravenous proton pump inhibitor use in non-ICU patients. *World J. Gastroenterol.*, **16**(8): 982-986.

Sachar H., Vaidya K., Laine L. 2014. Intermittent vs Continuous Proton Pump Inhibitor Therapy for High-Risk Bleeding Ulcers. A Systematic Review

and Meta-analysis. *JAMA Intern. Med.*, **174**(11): 1755-1762.

Sreedharan A., Martin J., Leontiadis G., Dorward S., Howden C., Forman D., Moayyedi P. 2012. Proton pump inhibitor treatment initiated prior to endoscopic diagnosis in upper gastrointestinal bleeding (Review). *The Cochrane Library*, **3**: 1-55.

Naturalia Patagónica

Obtencion de Quitina y Quitosán por un método sustentable a partir de cáscaras de langostino

Obtaining of Chitin and Chitosan by a sustainable method from prawn shrimps

Virginia Pasotti^{1*}, Adelaida Ávila¹, Marisa Martinelli²

¹Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Ruta 1 s/Nº, Km 4, CP 9000, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

²Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Químicas. Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP). Córdoba, Argentina. Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA). CONICET. Córdoba, Argentina.

vir_p76@hotmail.com

RESUMEN

En los últimos años, la investigación científica ha buscado orientar sus esfuerzos en la protección del medio ambiente con el objetivo de disminuir el impacto negativo de la acumulación de residuos y aprovechar recursos naturales desperdiciados para aumentar su valor. La Quitina (Qi) es el material de sostén presente en el exoesqueleto de artrópodos como langostinos y centollas. Los caparazones de langostino constituyen parte del residuo de la industria pesquera de particular preocupación en la costa Patagónica de nuestro país, por lo que existe una continua búsqueda de tecnologías efectivas para permitir su reutilización y capitalización. La obtención de Qi por fermentación láctica a partir de este residuo proporciona un método óptimo, sin generar exceso de residuos químicos. Por otro lado, permite aprovechar un subproducto de la industria láctea como es el lactosuero. El objetivo del presente trabajo fue aplicar una metodología sustentable para obtener Qi a partir de caparazones de langostino recolectados en el Golfo San Jorge y su conversión a Quitosán (Qh), por desacetilación alcalina, caracterizar el producto obtenido y evaluar su capacidad para formar películas. El Qh puede hincharse en medio acuoso, ligeramente ácido, formando *films* con amplia variedad de aplicaciones como las biomédicas. La caracterización estructural se realizó por espectroscopía infrarroja FTIR. Se obtuvo un mayor rendimiento

gravimétrico cuando se realizó la fermentación láctica durante 11 días y el Qh de langostino obtenido mostró un patrón de bandas similar al comercial.

PALABRAS CLAVE: fermentación, lactosuero, langostino, quitina, quitosán, sustentabilidad.

ABSTRACT

In recent years, scientific research has sought to guide its efforts in protecting the environment with the aim of reducing the negative impact of the accumulation of waste and taking advantage of wasted natural resources to increase their value. Chitin (Qi) is the support material present in the exoskeleton of arthropods such as prawns and spider crabs. Shrimp shells constitute part of the residue of the fishing industry of particular concern on the Patagonian coast of our country, so there is a continuous search for effective technologies to allow their reuse and capitalization. Obtaining Qi by lactic fermentation from this residue provides an optimal method, without generating excess chemical residues. On the other hand, it allows to take advantage of a by-product of the dairy industry such as whey. The objective of this work was to apply a sustainable methodology to obtain Qi from shrimp shells collected in the San Jorge Gulf and its conversion to Chitosan (Qh), by alkaline deacetylation, to characterize the product obtained and evaluate its capacity. to form films. Qh can swell in a slightly acidic, aqueous medium, forming films with a wide variety of applications such as biomedical. The structural characterization was carried out by infrared spectroscopy FTIR. A higher gravimetric yield was obtained when lactic fermentation was carried out for 11 days and the shrimp Qh obtained showed a band pattern similar to the commercial one.

KEY WORDS: fermentation, whey, shrimp, chitin, chitosan, sustainability.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe una revolución en el desarrollo de biomateriales con nuevas propiedades y control de su biodegradabilidad. Los materiales más "verdes" son ampliamente utilizados, y la investigación química presta más atención al desarrollo de procesos sustentables. En este sentido, los estudios sobre polímeros

naturales como la quitina (Qi) y el quitosán (Qh), juegan un papel central en este momento. Debido a la creciente necesidad de reemplazar parte de los polímeros sintéticos, derivados del petróleo, cobra relevancia, en las últimas décadas, el estudio de la obtención de polímeros naturales derivados de fuentes renovables, como los polisacáridos, con

amplia utilidad en la industria biotecnológica y biomédica, Castro *et al.* (2011). Los polisacáridos, en general, son de carácter hidrofílico, no son tóxicos, son biocompatibles y biodegradables. Muchas de estas propiedades particulares son debidas a los grupos funcionales específicos que poseen dichas moléculas, como el grupo amino, el grupo acetamida y el grupo carboxilo que son susceptibles de modificación química para elaborar materiales funcionales avanzados (Kurita, 2006). La importancia del Qh como biomaterial, se sustenta en estas conocidas ventajas de biocompatibilidad y biodegradabilidad (Youseff y Lucian, 2012). Por otro lado, la industrialización y comercialización de crustáceos como el langostino, la centolla y el camarón en las costas del Golfo San Jorge generan grandes recursos económicos y a la vez, la producción de grandes toneladas de residuo tras la extracción de la parte comestible y el descarte de los caparazones. El residuo, en la provincia de Chubut es actualmente depositado sobre la playa, o bien enterrado en piletas naturales cavadas en la arena. Esto genera un impacto ambiental negativo, debido al desarrollo de microorganismos patógenos que utilizan estos depósitos como medio de cultivo y generan una cadena de descomposición difícil de resolver. Se producen alteraciones en el agua

subterránea con los productos de degradación (nitrogenados o fosforados) y la proliferación de vectores sanitarios (roedores, insectos, gaviotas), además de la generación de olores nauseabundos. La posibilidad de obtener biopolímeros, por un método sustentable, a partir de estos residuos, ha captado la atención de investigadores en los últimos años con el fin de resolver dos grandes inconvenientes, uno industrial y otro ambiental (Ambrosio, 2016). La especie más recogida de langostino en las costas patagónicas es el *Pleoticus muelleri*, del cual se desecha aproximadamente un 13% de caparazón total húmedo. La composición del caparazón de langostino, presenta un 15– 40% de Qi (α -quitina), proteínas alrededor del 20 al 40% y carbonato de calcio entre 20–50% como componentes principales, y presenta en menor cantidad pigmentos y otras sales metálicas (Ávila *et al.*, 2007). La Qi es un polisacárido, está presente en el exoesqueleto de artrópodos y en la pared celular de algunas familias de hongos y levaduras. También se encuentra en las alas y en las cutículas de algunas especies de insectos (Colina *et al.*, 2014). Es el segundo polisacárido en abundancia en la naturaleza luego de la celulosa (Jelen, 2003). La Qi (Figura 1) da por desacetilación el Qh (Figura 2), ambos son copolímeros lineales de residuos de N-

glucosamina (D-GlcN) y N-Acetil glucosamina (D-GlcNAc) distribuidos al azar y unidos mediante enlace β -1,4 y producen una estructura rígida no ramificada. Se diferencian en el número de grupos acetilados en la molécula (Romero Peñalosa, 2011). El contenido de grupos acetilo ($-\text{COCH}_3$) residuales (grado de acetilación), es el porcentaje de grupos acetilo aún presentes en la cadena de Qi, parcial o totalmente desacetilada (Rinaudo, 2006). La Qi es soluble en soluciones de dimetilacetamida o N-metilpirrolidona conteniendo del 5 al 7% de cloruro de litio. Es insoluble en agua y en la mayoría de los disolventes. Las metodologías de extracción utilizadas para obtener Qi se dividen en químicas y enzimáticas (Felse y Panda, 1999). Las primeras consisten en sucesivas etapas de desproteinización con hidróxido de sodio en caliente, desmineralización con ácido clorhídrico frío y blanqueo con hipoclorito de sodio. A pesar de que existen numerosos progresos en las metodologías químicas de obtención; el uso de soluciones concentradas de ácido y álcali continúan generando grandes cantidades de desechos corrosivos, presentan efectos en el peso molecular de los biopolímeros y en consecuencia en sus aplicaciones, además de hacer difícil la recuperación de sub-productos como hidrolizados proteicos, calcio y pigmentos. La

fermentación láctica es un proceso prometedor para la obtención de Qi, debido a la disminución de residuos químicos y la reutilización del suero de leche descartado en la industria láctea (Colina *et al*, 2014). De esta manera, la aplicación de procesos no agresivos favorece la recuperación de subproductos aumentando la sustentabilidad del proceso. Por su parte, el Qh, se obtiene a partir de un proceso de desacetilación de la Qi por métodos enzimáticos o químicos (Marcia *et al*, 2011). Es soluble en soluciones acuosas de ácidos orgánicos, debido a la presencia de grupos amino libres que, al ser protonados, promueven la solubilización. Se considera que el Qh posee un alto potencial para la elaboración de películas (*films*), con aplicaciones biomédicas, ya que tiene propiedades antimicrobianas que le permiten inhibir una amplia variedad de bacterias. Las películas elaboradas con este material son transparentes, con una tonalidad levemente amarillenta, cuentan con buenas propiedades mecánicas y presentan baja permeabilidad al O_2 y CO_2 . Su principal inconveniente es que son altamente permeables al vapor de agua. Sin embargo, esta dificultad puede minimizarse incorporando algunos aditivos o combinándolo con otro tipo de biopolímeros. La utilidad de estas películas está determinada por sus

propiedades mecánicas y de barrera, las cuales dependen de la microestructura y composición, aspectos básicos que aportan datos útiles y permiten caracterizar a las películas desarrolladas para su aplicación industrial (Rubio-Anaya y Guerrero-Beltrán, 2012). Otro de los componentes que se incluyen en las formulaciones son los plastificantes; los cuales ayudan a mantener la integridad de las películas, ya que reducen su fragilidad, aumentando la flexibilidad y la resistencia a la ruptura (López, 2011). Debido a su origen natural, tanto la Qi como el Qh no presentan una estructura química única, sino que constituyen una familia de polímeros que presentan una alta variabilidad en el tamaño de las cadenas

(pesos moleculares de 50 kDa a 2000 kDa) y en sus propiedades fisicoquímicas (Hidalgo *et al*, 2009). La diferencia en su estructura química, respecto de la celulosa, debido a la presencia de grupos acetamida y amino le confieren a la Qi propiedades únicas y diferentes (Prashanth y Tharanathan, 2007).

Para lograr el objetivo del presente trabajo se aplicó la fermentación láctica, buscando obtener Qi por una metodología sustentable a partir de caparazones de langostino, con un rendimiento óptimo y Qh, mediante un proceso de desacetilación alcalina de la primera. Se caracterizó el Qh obtenido por espectroscopía infrarroja y se evaluaron sus propiedades.

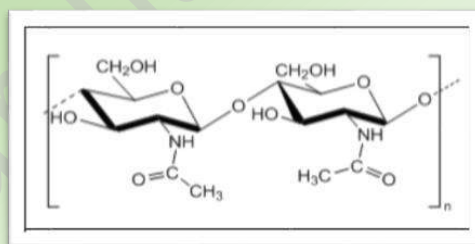


Figura 1. Estructura química de la quitina.

Figure 1. Chemical structure of chitin.

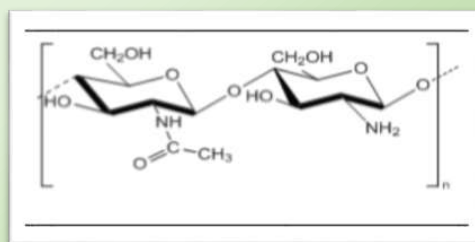


Figura 2. Estructura química del quitosán.

Figure 2. Chitosan chemical structure.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

Se trabajó con caparazones de langostinos (*Pleoticus muelleri*) proporcionados por industrias pesqueras de Comodoro Rivadavia, que recogen estos y otros productos de mar de las costas del Golfo San Jorge-Patagonia-Argentina.

Reactivos

Quitosán comercial ($C_{13}H_{14}O_9N_2$ LW, Aldrich), Ácido acético ($C_2H_4O_2$, Wiener, HAc), Hidróxido de sodio (NaOH, Wiener), Cloruro de Sodio (NaCl, Cicarelli), Ácido Clorhídrico (HCl, Cicarelli), Leche (descremada La Serenísima), Buffer pH 4 y 7 (Biopack).

Equipos

Equipo de fermentación (Figura 3), Microscopio infrarrojo FT-IR (Thermo Fisher Nicolet iN10), Balanza analítica (Mettler Toledo New Classic MF-Modelo MS 204S), Viscosímetro de Ostwald, Baño termostático, Peachímetro (Oakton pHtester2), Agitador Magnético (DLAB

MS-H-S), Estufa (Dalvo Instrumentos), Centrífuga (Arcano).

Obtención de Quitina (Qi)

Los caparazones de langostinos fueron lavados para extraer restos de materia orgánica. Se descartaron las colas, las patas y las cabezas. Finalmente fueron secados a temperatura ambiente y triturados con mortero hasta obtener un tamaño de partícula de 1 cm de lado aproximadamente. Se colocaron en el equipo de fermentación, dentro de un vaso de precipitados con el suero de leche, en una proporción 1:2 de material sólido/líquido. Para obtener el suero, previamente, se realizó una precipitación ácida, en caliente, de la leche líquida y se separó la parte sólida precipitada del suero sobrenadante. La fermentación se realizó a temperatura ambiente por un período 7 a 12 días. La mezcla se agitó cada 6 horas en forma manual. Luego de este tiempo, el sólido se separó y se lavó con abundante agua para finalmente secarse en estufa a 30°C hasta peso constante. El ensayo se realizó por triplicado.



Figura 3. Equipo de fermentación.
Figure 3. Fermentation equipment.

Obtención de Quitosán (Qh)

La Qi obtenida, en diferentes períodos de fermentación, fue desacetilada para obtener quitosán de langostino (Qhl). La reacción de desacetilación se llevó a cabo con solución de NaOH al 50% en una proporción 1:2 sólido/líquido a 100°C en baño de arena, durante 1,5 h. Se realizaron dos procedimientos de desacetilación a cada muestra de Qi. El sólido así obtenido se lavó con agua acidificada con HCl hasta pH neutro y se secó en estufa a 30°C hasta peso constante. Se determinó el rendimiento gravimétrico (RG) de cada muestra de Qhl obtenida, luego de 1 y 2 procedimientos de desacetilación a partir de la Qi. A partir de este paso se trabajó con la muestra seleccionada: quitosán de langostino obtenido a partir de quitina con 11 días de fermentación. (Qhl₁₁)

Determinación del Peso Molecular Promedio Viscosimétrico (Mv) del Qhl₁₁

El peso molecular del Qhl₁₁ se determinó por viscosimetría capilar utilizando un

viscosímetro de Ostwald y aplicando las ecuaciones de Huggins y Mark – Houwink – Sakurada. Se determinó primero la constante B del viscosímetro, para lo cual se calibró el instrumento con un buffer de ácido acético 0.1 M y NaCl 0.2 M sumergido en un baño termostático a 25°C (Kassai, 2007). Una vez calibrado, se preparó una solución de Qhl₁₁ al 2% p/v en buffer HAc 0,1 M y NaCl 0,2 M. A partir de esta última se prepararon diluciones de concentraciones 0,001, 0,003, 0,005, 0,007, 0,009, y 0,01 g/mL a las cuales se les midió el tiempo de escurrimiento, en el viscosímetro, por triplicado. A partir del valor obtenido para la viscosidad intrínseca $[\eta]$ se calculó el peso molecular promedio viscosimétrico del polímero. La viscosidad intrínseca tiene unidades de volumen/masa y está directamente relacionada con el peso molecular promedio del polímero en solución. (Mv)

Porcentaje de Desacetilación (DD) del Qhl₁₁

Para determinar el porcentaje de desacetilación del Qhl₁₁ se utilizó el método potenciométrico. Para ello, se preparó una disolución de 0,5 g del Qhl₁₁ en 20 mL de HCl 0,3 M (Jiang *et al*, 2003). A continuación, se tituló con una solución valorada de NaOH 0,1 M. El peachímetro se calibró a pH 4, 7 y 10. La valoración se llevó a cabo midiendo el pH cada 2 mL de base añadida, la adición se realizó de forma lenta y con agitación continua para homogeneizar la solución. Las medidas se realizaron por duplicado. Se realizó el mismo procedimiento con Qhc.

Preparación de los films de Qhc y Qhl₁₁ mediante Cold Casting

La técnica de Cold Casting consiste en verter sobre una caja de Petri de polipropileno, de 5 mm de diámetro, limpia y seca, 40 mL de la mezcla homogénea y centrifugada del polímero y dejar secar a temperatura ambiente. Para obtener los films de Qhl₁₁ y Qhc se preparó 40 mL de solución de cada polímero al 2% en HAc 5% v/v y se agitó por 48 h a 40°C en agitador magnético. Cada una de las mezclas se centrifugó y se volcó en la caja de Petri correspondiente. Se dejaron secar por 24-48 h a temperatura ambiente hasta peso constante. Los films obtenidos se conservaron a temperatura

ambiente (20°C, 30% HR) hasta su utilización. Se retiraron de la placa y se les midió su espesor con calibre en escala micrométrica.

Índice de Hinchamiento en el Equilibrio (Esw) de los films preparados

La capacidad de absorción de agua de los films se determinó mediante medidas de índice de hinchamiento en soluciones buffers a distintos pH (4,0 y 7,0), a temperatura ambiente. Para ello un trozo de cada film, de masa conocida (entre 100 y 200 mg) se introdujo en solución buffer durante 2 h, hasta alcanzar el equilibrio. Los trozos de films hinchados fueron colectados a diferentes tiempos de exposición, secados superficialmente y pesados en balanza analítica. El valor del índice de hinchamiento en el equilibrio (Esw) se calculó, luego, a partir de los datos medidos experimentalmente según las ecuaciones correspondientes (Schott, 1992).

Permeabilidad al Vapor de agua (WVP) de los films

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó según una modificación del método desecante, descrito en la norma ASTM E96M-10. Cada film de aproximadamente 3,14 cm² (sin defectos como rajaduras, burbujas, etc.) se colocó dentro de un recipiente de permeación (2,0

cm de diámetro y 2,5 cm de profundidad) que contiene CaCl_2 anhidro. Una vez armado cada recipiente, se llevó a una cámara de humedad controlada. Los recipientes de permeabilidad con los *films* se pesaron en intervalos de 24 h, durante 7 días. Posteriormente se graficó la variación de la masa (g) de la cápsula (Δm) en función del tiempo (h). Se determinó la velocidad de transmisión al vapor de agua y la permeabilidad al vapor de agua según las ecuaciones correspondientes para el método utilizado. Esta determinación se realizó para los *films* preparados con Qhc y con Qhl₁₁.

Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La caracterización del Qhl₁₁ se realizó mediante espectroscopía infrarroja y se comparó con el espectro del Qhc. Las mediciones se realizaron con un

Microscopio infrarrojo FT-IR (Thermo Fisher Nicolet iN10) en el Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP) de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNC.

RESULTADOS Y DISCUSION

Rendimiento Gravimétrico

El rendimiento gravimétrico del Qhl obtenido por desacetilación de la Qi se calculó con la Ecuación 1 y se compararon los resultados de los periodos de 7 a 12 días de proceso de fermentación. En la Tabla I se detallaron, para los distintos días de proceso de fermentación (columna 1), la masa inicial de cáscara de langostino de la que se partió (columna 2), las masas finales, en g, luego de 1 (mDD₁) y 2 (mDD₂) procedimientos de desacetilación (columnas 3 y 4 respectivamente) y los porcentajes de rendimiento gravimétrico (RG₁ y RG₂) correspondientes (columnas 5 y 6).

Tabla I. Rendimientos de la obtención de quitosán a partir de quitina, obtenida por fermentación láctica en diferentes días.

Table I. Yields of obtaining chitosan from chitin, obtained by lactic fermentation on different days.

<i>Días de fermentación</i>	<i>Masa inicial cáscara (g)</i>	<i>mDD₁ (g)</i>	<i>mDD₂ (g)</i>	<i>RG₁ (%)</i>	<i>RG₂ (%)</i>
7	5,00	1,27	0,93	25,40	18,60
8	5,01	1,42	0,91	28,34	18,16
9	5,11	1,63	0,92	31,90	18,00
10	5,03	2,31	1,23	45,92	24,45
11	5,02	2,51	1,14	50,00	22,71
12	6,81	2,91	1,77	42,73	25,99

La muestra de Qi obtenida con 11 días de fermentación arrojó el mayor rendimiento con dos procedimientos de desacetilación, 50% en la primer desacetilación y 22,71% en la segunda, por lo que este es el tiempo seleccionado para el proceso y el quitosán de langostino obtenido (Qhl₁₁) se utilizó para las próximas determinaciones. El rendimiento de quitosán obtenido a partir de cáscaras de langostino por fermentación láctica depende en parte de la materia prima de partida y de las variables de la técnica implementada: tiempo de reacción, pH y agitación, entre otras. Por otro lado, puede ocurrir pérdida de masa inherente al proceso de lavado. En bibliografía se encontraron valores de rendimiento algo superiores, de 29,1% en la obtención de Qi a partir de caparazones de langostinos (*Pleoticus muelleri* argentine) por método químico y de 76,8 % para el quitosán obtenido por desacetilación con NaOH concentrado al 50%. El método de fermentación, sin embargo, aporta las ventajas de no generar residuos químicos y reutilizar el suero de la industria láctea (Dima *et al*, 2013). Se plantea seguir realizando futuros trabajos para mejorar los rendimientos gravimétricos del proceso.

$$RG \% = \frac{PESO\ PRODUCTO}{PESO\ DE\ CAPARAZONES} \times 100$$

Ecuación 1

Peso Molecular Promedio Viscosimetrico (Mv) del Qhl₁₁

El valor obtenido de Mv para el Qhl₁₁ fue de 4,64x10⁵ g/mol y la [η] fue de 337,1 Poise. Se determinó primero la constante B del viscosímetro, para lo cual se calibró el instrumento con una solución de HAc al 0,1 M y NaCl al 0,2 M, aplicando la ecuación 2 donde:

η= Coeficiente de viscosidad de la solución HAc/NaCl

B= Constante B del viscosímetro

δ= densidad de la solución HAc/NaCl a 25 °C.

t= tiempo requerido para que el fluido atraviese la marca desde el menisco superior al inferior.

La constante B determinada para el viscosímetro fue de 2,22 x 10⁻⁶ mL/s²cm. La viscosidad intrínseca, [η] se determinó con la Ecuación 3 donde:

c = concentración en gramos de soluto en 100 mL de solución

η_{sp} = viscosidad específica

η = viscosidad de la solución

η₀ = viscosidad del solvente puro.

Se confeccionó un gráfico de $\left(\frac{1}{c} \ln \frac{\eta}{\eta_0}\right)$ en función de c, este tiene una dependencia lineal con la concentración a concentraciones bajas, lo que permite extrapolar a concentración cero para hallar el valor de la [η]. La viscosidad intrínseca [η] del polímero se determinó entonces

extrapolando a concentración cero la gráfica de viscosidad reducida en función de la concentración en masa de las soluciones (Figura 4). Este valor se reemplazó en la ecuación 4 para calcular el peso molecular promedio viscosimétrico del polímero, donde la constante K y α son $1,81 \times 10^{-3}$ y 0,93 respectivamente, en las condiciones empleadas (densidad de la solución a 25°C, coeficiente de viscosidad de la solución: 1.056×10^{-5} poise) (Kassai,

2007). En la Tabla II se detallaron los resultados obtenidos.

$$\frac{\eta}{\delta} = Bt$$

Ecuación 2

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/c = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{1}{c} \ln \frac{\eta}{\eta_0} \right)$$

Ecuación 3

$$[\eta] = KMv^a$$

Ecuación 4

Tabla II. Determinación de Peso Molecular del quitosán de langostino (Qhl₁₁) por viscosimetría.
Table II. Determination of Molecular Weight of shrimp chitosan (Qhl₁₁) by viscometry.

C (g/mL)	δ (g/mL)	t (s)	n (poise)	nsp/c (mL/g)
0	1,0032	4,742	$1,06 \cdot 10^{-5}$	
$1,00 \cdot 10^{-3}$	1,0329	6,760	$1,55 \cdot 10^{-5}$	$4,68 \cdot 10^{+2}$
$3,00 \cdot 10^{-3}$	1,0339	11,73	$2,04 \cdot 10^{-5}$	$5,16 \cdot 10^{+2}$
$5,00 \cdot 10^{-3}$	1,0345	22,83	$2,54 \cdot 10^{-5}$	$7,93 \cdot 10^{+2}$
$7,00 \cdot 10^{-3}$	1,0356	39,91	$3,03 \cdot 10^{-5}$	$1,10 \cdot 10^{+3}$
$9,00 \cdot 10^{-3}$	1,0360	49,54	$3,52 \cdot 10^{-5}$	$1,09 \cdot 10^{+3}$
$1,10 \cdot 10^{-3}$	1,0368	73,80	$4,02 \cdot 10^{-5}$	$1,51 \cdot 10^{+3}$

Debido a su alto peso molecular y a su estructura lineal no ramificada, el quitosán es un potente agente viscosante en medio ácido. El método viscosimétrico es uno de los más empleados en las determinaciones de pesos moleculares de polímeros por su exactitud y sencillez, y puede ser aplicado a todo el rango de masas macromoleculares, exceptuando el caso de

macromoléculas esféricas o muy ramificadas, debido a que en ellas la viscosidad es independiente del peso molecular. En la determinación de la viscosidad se emplean viscosímetros capilares del tipo Ostwald, entre otros (De la Paz *et al*, 2013). Para un fluido incompresible fluyendo a través de un capilar vertical, el flujo está gobernado por

la ley de Poiseuille. En soluciones poliméricas diluidas la viscosidad intrínseca $[\eta]$ es una medida del tamaño de una molécula en solución, dependiendo no sólo del tamaño de la macromolécula sino también de su conformación y de la naturaleza del solvente. La $[\eta]$ es una propiedad que viene determinada por la longitud y la conformación de las cadenas de quitosán, las cuales adquieren una forma de hélice extendida cuando se encuentran en solución, y aporta información sobre el peso molecular promedio del polímero (Weinhold *et al*, 2009). La viscosidad de las soluciones de quitosán aumenta al incrementarse la concentración de esta, mientras que disminuye al elevar la temperatura y el grado de desacetilación del producto (Kassai, 2007). Se hallaron en bibliografía valores de peso molecular de $2,39 \times 10^5$ y $3,1 \times 10^5$ g/mol para quitosán de langostino

(*Pleoticus muelleri argentine*) y cangrejo (*Ovalipes trimaculatus*) respectivamente, provenientes de Chubut, Argentina. Otros autores reportaron un peso molecular promedio de $4,40 \times 10^5$ g/mol para quitosán de cáscara de camarón (*Penaeus Vannamei*) proveniente de Quito, Ecuador (Dima *et al*, 2013), y de $5,54 \times 10^5$ g/mol para quitosán de cáscara de camarón (*Litopenaeus Vannamei*) proveniente de Lima, Perú (Rivera-Toapanta, 2013). La fuente de Qi y los incontrolados procesos de desacetilación son los principales factores que afectan las propiedades finales del producto (Pacheco López, 2010; Jáuregui- Nongrados, 2015). El peso molecular depende del proceso mediante el cual el Qh ha sido extraído; en general, condiciones severas de temperatura y concentración de reactivos provocan un acortamiento de la cadena (Tsaih y Chen, 2003).

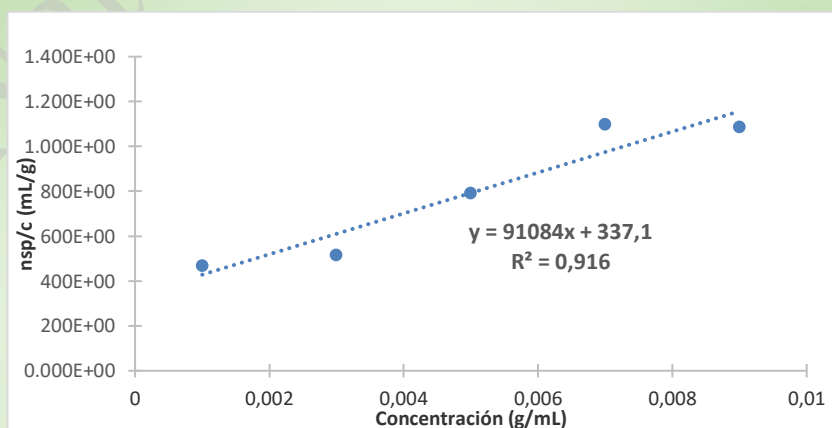


Figura 4. Gráfica de viscosidad reducida en función de la concentración en masa de las soluciones de quitosán para determinar el Mv de Qhl₁₁ por viscosimetría.

Figure 4. Graph of reduced viscosity as a function of the mass concentration of chitosan solutions to determine the Mv of Qhl₁₁ by viscometry.

Porcentaje de Desacetilación (DD) del Qhl₁₁

El contenido de grupos amino en el quitosán representa la proporción de unidades de D-glucosamina con respecto al número total de unidades en el biopolímero. Es una de las propiedades más importantes en la caracterización del quitosán pues, dependiendo de su valor, el polímero tendrá diferentes aplicaciones. Las propiedades fisicoquímicas del quitosán se atribuyen en gran medida al grupo amino, el cual a pH 6.4 o menor se encuentra protonado. El método utilizado en este trabajo fue la titulación potenciométrica. Se realizó una curva de titulación, gráfico de pH vs volumen de NaOH, (Figura 5) y luego se buscó la diferencia entre los dos puntos de inflexión que corresponden a la cantidad

de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosán (Hernández-Cocoletzi *et al*, 2009). (Figura 6) El DD se determinó de acuerdo a la Ecuación 5, donde (V₂-V₁) es la diferencia entre los dos puntos de inflexión mencionados, M es la molaridad de la solución de NaOH, w el peso en gramos de la muestra seca de Qhl₁₁ utilizada y 16,1 es un valor relacionado con el peso equivalente del quitosán (Parada *et al*, 2004).

$$\%NH_2 = 16,1 \left(\frac{V_2 - V_1}{w} \right) M$$

Ecuación 5

El grado de desacetilación obtenido para el Qhl₁₁ fue de 78,45% y para el Qhc de 69,91% (Tabla III).

Tabla III. Resultados de la valoración potenciométrica del quitosán comercial (Qhc) y de langostino (Qhl₁₁) Determinación del % DD.

Table III. Results of the potentiometric titration of commercial chitosan (Qhc) and shrimp chitosan. (Qhl₁₁) Determination of % DD.

Muestra	Conc NaOH (M)	(V ₂ -V ₁)	%DD
Qhl ₁₁	0,097	10	78,45
Qhc	0,098	22	69,91

Usualmente, en el caso del Qhc se establece que el grado de desacetilación se encuentre comprendido entre el 60 y 95% (Dima et al, 2013). El conocimiento de este parámetro estructural es fundamental, ya que influye en la solubilidad, hidrofiliidad, densidad de carga, cristalinidad e incluso en la biodegradabilidad del quitosán. La desacetilación completa difícilmente se logra (Ramirez et al, 2016). Se argumenta que la quitina natural posee un grado de acetilación de 0,66, es decir, que dos de cada tres de sus unidades se encuentran

acetiladas. Si bien existen a la fecha una gran cantidad de métodos reportados para estimar el DD de quitosán como espectrofotometría UV-Vis (Wu y Zivanovic, 2008), resonancia magnética nuclear (RMN) (Fernandez-Megia et al, 2005), espectroscopia de infrarrojo (FTIR) (Brugnerotto et al, 2001) y recientemente espectroscopia Raman (Zajac et al, 2015), la titulación potenciométrica es uno de los métodos más simples utilizado por la industria del quitosán debido a su bajo costo en reactivos y equipamiento (Jiang et al, 2003).

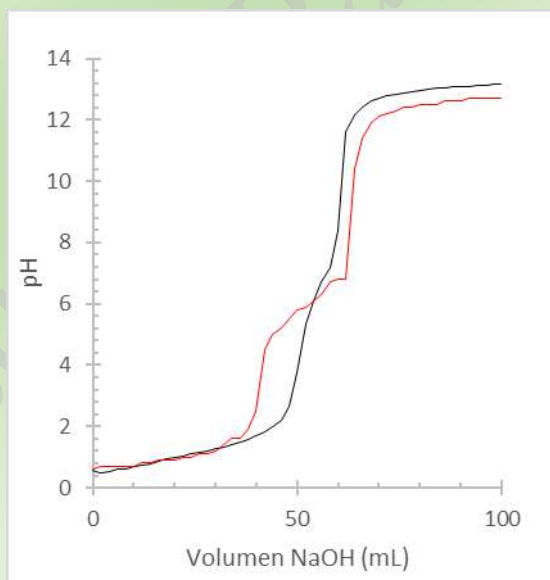


Figura 5. Curva de titulación potenciométrica del Qhl₁₁ y Qhc.
Figure 5. Potentiometric titration curve of Qhl₁₁ y Qhc.

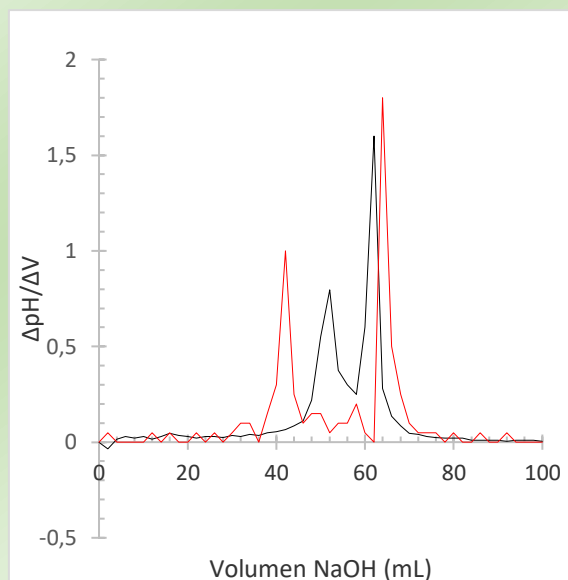


Figura 6. Determinación de grupos NH_2 del Qhl_{11} y Qhc .

Figure 6. Determination of NH_2 groups of Qhl_{11} y Qhc .

Preparación de los films

Se observa que los *films* obtenidos de Qhc y Qhl_{11} son uniformes, homogéneos, sin burbujas de aire en su superficie, delgados y levemente amarillentos. En 48 h se encuentran secos y se pueden retirar de la placa de polipropileno con facilidad presentando buena flexibilidad. Poseen un espesor de aproximadamente 50 μm .

Índice de Hinchamiento en el Equilibrio (E_{sw}) de los films preparados

El índice de hinchamiento en equilibrio (E_{sw}) de los *films* fue calculado de acuerdo a la Ecuación 6, en soluciones buffers a pH 4,0 y 7,0, a temperatura ambiente, donde w_s es la masa en equilibrio de hinchamiento y w_0 la masa inicial de los *films*. Los valores de hinchamiento en el equilibrio para el Qhl_{11} fueron de 590 % a pH 4 y de 670 % a pH

7 (Figura 7). A pH 4, el *film* de Qhl_{11} alcanzó un valor de hinchamiento máximo de aproximadamente un 600%, mientras que el Qhc mostró un valor significativamente mayor de alrededor de 1000 %. A pH 7 el valor máximo de hinchamiento fue cercano a un 700% para el *film* de Qhl_{11} y 800% para el *film* de Qhc . De esta manera, se observó un alto incremento en el hinchamiento a pH 4 para el Qhc . Es importante destacar que tanto los films de Qhc como de Qhl_{11} fueron estables a ambos valores de pH mostrando un alto valor de hinchamiento y una rápida disolución en poco tiempo. El quitosán por ser un hidrogel, tiene la capacidad de absorber una gran cantidad de agua, aumentando considerablemente su volumen hasta alcanzar el equilibrio de hinchamiento. La difusión incluye la migración de buffer en los espacios

preexistentes o dinámicamente formados entre las cadenas del hidrogel (Katime *et al*, 2001). El hinchamiento del hidrogel implica un aumento de la distancia de separación entre las cadenas del mismo. Debido a las múltiples posibilidades de aplicación de los polímeros hinchables, el mecanismo de difusión de solventes a

través de la red tridimensional de estos materiales ha recibido considerable atención en los últimos años (Benítez *et al*, 2011).

$$Esw = \frac{w_s - w_o}{w_o} \times 100$$

Ecuación 6.

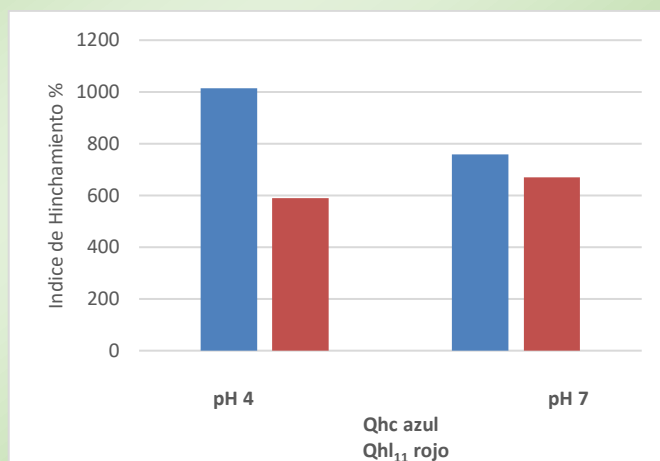


Figura 7. Índice de Hinchamiento en el equilibrio (Esw%) de los *films* de Qhc y Qhl₁₁ a diferentes pH.
Figure 7. Swelling Index at equilibrium (Esw%) of Qhc and Qhl₁₁ films at different pH.

Permeabilidad al vapor de agua

Se determinó la velocidad de transmisión al vapor de agua (WVTR, Kg s⁻¹m⁻²) a partir de la ecuación 7 y la permeabilidad al vapor de agua (WVP, Kg m Pa⁻¹ s⁻¹ m⁻²) a partir de la ecuación 8.

$$WVTR = \frac{F}{A}$$

Ecuación 7

$$WVP = \frac{(WVTR \cdot e)}{Sp \cdot (RH1 - RH2)}$$

Ecuación 8

Donde *F* es flujo (pendiente del gráfico de variación de masa en función del tiempo) (g/h), *A* es el área de trabajo (área de la boca del recipiente m²), *e* corresponde al espesor de los *films* (m), *S_p* es la presión de saturación (Pa) a la temperatura de trabajo, *RH₁* es la humedad relativa en la cámara de humedad, y *RH₂* corresponde a la humedad relativa dentro de la celda de trabajo. Los valores de permeabilidad para los *films* preparados a partir de Qhl₁₁ y Qhc (Tabla IV) mostraron un valor de WVP, según la Ecuación 8, de 1,70 x10⁻¹² (gm⁻¹s⁻¹Pa⁻¹) para el film de Qhl₁₁.

Tabla IV. Valores de permeabilidad al vapor de agua y velocidad de transmisión al vapor de agua para films de quitosán comercial y quitosán de langostino.

Table IV. Water vapor permeability and speed of transmission to water vapor values for commercial chitosan films and shrimp.

	WVTR (g/dia.m ²)	Espesor (micras)	WVP (x10 ⁻¹² g/Pa.s.m)
Qhc	1710,6	53	5,10 ± 5
Qhl ₁₁	815,6	51	1,70 ± 5

La permeación del vapor de agua a través de un *film* hidrofílico, está relacionada con la solubilidad y la difusión de las moléculas de agua en la matriz polimérica. Este parámetro, resulta útil para entender el posible mecanismo de transferencia de masa en los *films*. Las películas de quitosán, tienden a retener el agua en su estructura, lo cual conduce al hinchamiento de la misma (Aldana *et al*, 2013). Para mejorar este inconveniente es que se recurre al agregado de agentes plastificantes (Trejo *et al*, 2001). A diferencia de los materiales poliméricos sintéticos hidrófobos, el WVP de las películas preparadas a partir de biopolímeros, depende de su espesor. Otros autores atribuyen el efecto del espesor a cambios en la estructura del film ocasionados por el hinchamiento que provoca el agua en el polímero (Bertuzzi *et al*, 2002).

FTIR

El Qhl₁₁ presentó un patrón de bandas semejante al observado para el Qhc. (Figura 8) Se obtuvieron las siguientes bandas: una banda de absorción característica a 3300 cm⁻¹, la cual corresponde a las vibraciones de estiramiento del grupo -OH. La banda de absorción característica del grupo amino (3260 cm⁻¹) se encuentra enmascarada por la banda de absorción amplia del grupo -OH. En el espectro se observan también bandas del estiramiento C-H a 2800 y 2900 cm⁻¹ y otras originadas por estiramientos C=O y N-H, característicos de grupos amida, entre 1.650-1.550 cm⁻¹. La banda característica a 1600 cm⁻¹ se relaciona con el grupo C=O presente en un grupo amida (I) y la banda de absorción relativa a deformaciones del grupo amino se observa a 1500 cm⁻¹. La banda centrada en 1300 cm⁻¹ (amida III) surge de vibraciones del estiramiento del grupo

metilo (C-H) presente en el grupo acetamido (R-NHCOCH_3) residual que está allí debido a la desacetilación incompleta de la quitina (Hernández-Cocoletzi *et al*, 2009). La banda observada a 1100 cm^{-1} se debe a la tensión asimétrica del grupo C-O-C, mientras que un conjunto de bandas características situadas en el rango de 1100 a 900 cm^{-1} corresponden a la vibración de la estructura piranósica del quitosán. La Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una de las herramientas más usadas para el estudio de los polímeros. El método FTIR es rápido y sensible, sus técnicas de muestreo son fáciles, la operación del equipo es simple, así como el servicio y

mantenimiento (Brugnerotto *et al*, 2001). Dado que los niveles de energía vibracional son diferentes para cada molécula (y sus isómeros), el espectro FTIR se puede considerar como la huella digital de cada molécula (López Serrano Ramos *et al*, 2015). Se basa en las vibraciones de los átomos y grupos funcionales en las moléculas a causa de su interacción con la radiación emitida en la región infrarroja del espectro electromagnético. El espectro se obtiene haciendo pasar a través de la muestra una radiación de la longitud de onda adecuada y determinando que fracción de la energía incidente es absorbida a causa de los diferentes movimientos moleculares.

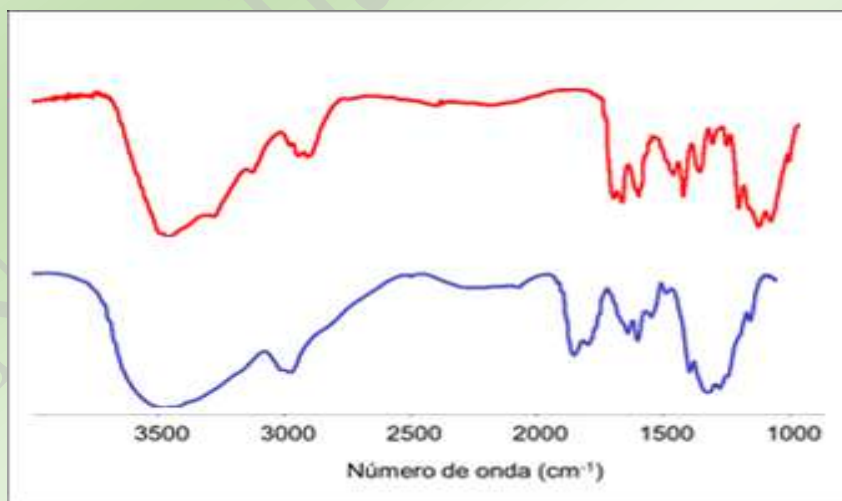


Figura 8. Espectro FTIR del Qhc y el Qhl₁₁.
Figure 8. FTIR spectrum of Qhc y el Qhl₁₁.

CONCLUSIONES

La fermentación láctica para obtener quitosán a partir de quitina extraída de residuos de langostino resultó un proceso económico, efectivo y compatible con el cuidado del medio ambiente, permitiendo fundamentalmente disminuir la generación de residuos químicos como ácidos y álcalis.

El tiempo óptimo para el proceso de fermentación fue de 11 días dando un mejor rendimiento de producto obtenido.

El Qhl₁₁, extraído de cáscaras de langostino, mostró características estructurales (FTIR) comparables al comercial lo que permitió la formación de *films* con propiedades comparables a los obtenidos a partir del polímero comercial. Los resultados fueron alentadores desde el punto de vista de la sustentabilidad y el cuidado del medio ambiente. Todo esto representa un impacto socio-económico importante para el área del Golfo San Jorge de la Patagonia ya que se reutilizaron, un desecho de la industria

pesquera, como materia prima, y un subproducto de la industria láctea, como reactivo, para obtener el polímero.

AGRADECIMIENTOS

Al CONICET por la beca CIT de posgrado otorgada para la realización del Doctorado en Química.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud y Facultad de Ingeniería de la UNPSJB, Comodoro Rivadavia, Chubut.

Al Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP). Córdoba, Argentina. Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA). CONICET.

A la Dra. Karina Bierbawer de CEPROCOR-CONICET-Córdoba.

A la directora de tesis, Dra. Marisa Martinelli de la UNC y a la co-directora Dra. Adelaida Ávila de la UNPSJB.

A la co-directora de beca CIT-CONICET Dra. María Isella Gutiérrez de la UNPSJB.

BIBLIOGRAFIA

Aldana, A.A., Strumia, M.C & Martinelli, M. 2013. Nanomodification of Chitosan Microspheres with Dendron Molecules. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, **3**: 157-163.

Ambrosio, M. (2016). Procesamiento pesquero, disposición de residuos e impacto ambiental. <https://www.researchgate.net/publication/266409250>.

Ávila, A. Costamagna, V & Strumia, M. 2007. Obtención de Quitina y Quitosano a partir de caparzones de langostinos y centollas. *Naturalia patagónica*, **3**: 1-8.

Benítez, J.L., Contreras, D., Guzmán, P., Ramírez, A, Prin, J.L & Rojas de Gáscue, B. 2011. Estudio de la difusión y cinética de hinchamiento en hidrogeles de poliacrilamida. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **12**: 292-299.

- Bertuzzi, M.A., Armada, M., Gottifredi, J.C., Aparicio, A.R & Jiménez, P. 2002. Estudio de la permeabilidad al vapor de agua de films comestibles para recubrir alimentos. Congreso Regional de Ciencia y Tecnología NOA, 1-10.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J & Rinaudo, M. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, **42**: 3569 – 3580.
- Castro, P. Nerlis, P. Olivero, V & Tadeo, J. 2011. Química verde: un nuevo reto. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, **21**: 169-182.
- Colina, M. Ayala, A. Rincón, D. Molina, J. Medina, J. Ynciarde, R. Vargas, J & Montilla, B. 2014. Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos. Escala piloto e industrial. *Revista Iberoamericana de Polimeros*, **15**: 21-43.
- De la Paz, N., Perez, N., Fernández, D., Lopez, O.D., Nogueira, A., Rapado-Paneque, M., Altanés-Valentin, S & García, C.M. 2013. Evaluación viscosimétrica del quitosano derivado de la quitina de langosta. *Rev. Iberoam. Polim*, **14**: 84-91.
- Dima, J.B. Sequeiros, C. & Zaritzky, N.E. 2013. Optimización de la obtención de quitosano de crustáceos patagónicos (Puerto Madryn, Chubut): Desarrollo de micropartículas y evaluación de su acción bactericida en patógenos de usual frecuencia en maricultura. *Revista de Asociación Argentina de Ingeniería Química*, **57**: 1-19.
- Felse, P. & Panda, T. 1999. Studies on applications of chitin and its derivatives. *Bioprocess Engineering*, **20**: 505-512.
- Fernandez-Megía, E., Novoa-Carballal, R., Quiñoá, E & Riguera, R. 2005. Optimal routine conditions for the determination of the degree of acetylation of chitosan by ¹H-NMR. *Carbohydrate Polymers*, **61**: 155 – 161.
- Hernández-Cocoletzi, H., Águila-Almanza, E., Flores, A.O., Viveros-Nava, E.L & Ramos-Cassellis, e. 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío*, **22**: 57-60.
- Hidalgo, C. Fernández, M. Nieto, O.M. Paneque, A.A. Fernández, G & LLópiz, J.C. 2009. Estudio de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **10**: 11-27.
- Jáuregui- Nongrados, J.R. 2015. Adsorción y desorción de iones plata sobre quitina y quitosano de *Litopenaeus Vannamei* (Tesis de maestría). Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima, Perú.
- Jelen, P. 2003. Whey processing. Utilization and Products. In: H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox (eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, London, UK. 2739-2745.
- Jiang, X. Chen, L & Zhon, W. 2003. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, **54**: 457-463.
- Katime, I., Novoa, R & Zuluaga, F. 2001. Swelling kinetics and release studies of theophylline and aminophylline from acrylic acid/n-alkyl methacrylate hydrogels. *European Polymer Journal*, **37**: 1465-1471.
- Kassai, M.R. 2007. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscosimetric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental report viscosimetric constants data. *Carbohyd. Polym*, **68**: 477 - 488.
- Kurita, K. 2006. Chitin y Chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol*, **8**: 203 - 26.
- López, O.V. 2011. Desarrollo. Caracterización y Aplicación de Envases Biodegradables A partir de Almidón. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de La Plata.

- López Serrano Ramos, F & Mendizábal Mijares, E., Ortega Gudiño, P. 2015. Introducción a la Ciencia de los Polímeros. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Ecupei, Mexico, 155 pp.
- Marcia, E. Malespin, J. Sanchez, M & Benavente, M. 2011. Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos lácticos. *Nexo Revista Científica*, **24**: 33-42.
- Pacheco López, N.A. 2010. Extracción biotecnológica de Quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación. *Food and Nutrition*. Universite Claude Bernard Lyon I. Español. NNT: 2010LYO10054.
- Parada, L., Crespin, G., Miranda, R & Katime, I. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Rev. Iberoam. Polim*, **5**: 1 - 16.
- Prashanth, K.H & Tharanathan, R.N. 2007. Chitin/chitosan: Modifications and their unlimited application potential-an overview. *Trends Food Sci. Technol*, **18**: 117–131.
- Ramirez, C., Delgado E, & Andrade, A. 2016. Determinación del grado de desacetilación del quitosán mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. *Journal CIM*, **4**: 769-776.
- Rinaudo, M. 2006. Chitin and Chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci*, **31**: 603 – 632.
- Rivera-Toapanta, E.A. 2013. Evaluación de la capacidad de esferificación de quitosano como sustituto de alginato en la elaboración del falso caviar (tesis de grado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Romero Peñalosa, E. L. 2011. Obtención de Hidrogeles de Quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger* y su estudio en la liberación controlada de Cefalexina (Trabajo de Grado). Universidad del Valle, Santiago de Cali, Colombia.
- Rubio-Anaya, M & Guerrero-Beltrán, J.A. 2012. Polímeros utilizados para la elaboración de películas biodegradables. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. **6**: 173-181.
- Schott, H. 1992. Kinetics of swelling of polymers and their gels. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **81**: 467–470.
- Trejo, V., Aragón, N & Miranda, P. 2001. Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán. *Revista de la Sociedad Química de México*, **45**: 1-5.
- Tsaih, M.L & Chen, R.H. 2003. The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *Applied Polymer Science*, **88**: 2917 – 2923.
- Weinhold, M.X., Sauvageau, J.C.M, Kumirska, J & Thöminga, J. 2009. Studies on acetylation patterns of different chitosan preparations. *Carbohydrate Polymers*, **78**: 678 – 684.
- Wu, T & Zivanovic, S. 2008. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. *Carbohydrate Polymers*, **73**: 248 – 253.
- Youseff, H & Lucian, A. L. 2012. Polysaccharide Building Blocks: A Sustainable Approach to the Development of Renewable Biomaterials. J. Wiley & Sons, New York, 430 pp.
- Zajac, A., Hanuza, J., Wandas, M & Dymińska, L. 2015. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **134**: 114 – 120.

Perfil metabólico y actividad biológica de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae) colectada en invierno en el Golfo San Jorge, Argentina

Metabolic profile and biological activity of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae) collected at winter in the Golfo San Jorge, Argentina

Diana Paula Quezada^{1,3,4}, María Luján Flores^{1,3}, Osvaldo León Córdoba^{2,3*}

¹Farmacognosia FCNyCS-UNPSJB, ²Química Biológica II FCNyCS-UNPSJB, ³GQBMRNP y AAI - CRIDECIT, FCNyCS-UNPSJB. Km 4, s/Nº, Comodoro Rivadavia, 9000, Chubut, Argentina. ⁴CONICET, Argentina. *okylola@gmail.com

RESUMEN

Las algas constituyen materias primas para importantes aplicaciones en diferentes procesos, destacándose la industria alimentaria y la producción de compuestos activos aplicables en Salud. *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae) es un alga parda alóctona y fuertemente invasora, originaria de Oriente, que habita nuestra región. Ha sido descripta como fuente de metabolitos interesantes con diferentes actividades biológicas. En base a los antecedentes existentes, se planteó la evaluación del perfil metabólico del alga, la determinación de los pigmentos constituyentes, y el análisis de la actividad antioxidante por medio del DPPH y de la citotoxicidad por medio de la *Artemia salina*, a partir de extractos obtenidos de la especie colectada en invierno en la región central del Golfo San Jorge. El perfil químico evidenció la presencia de flavonoides, taninos, esteroides y triterpenos. En el análisis de pigmentos se destacaron cryptoxantina, zeaxantina, capsantina, fucoxantina, caroteno, clorofila a y feofitina a. La actividad antioxidante del extracto de metanol se correlaciona con los fenoles contenidos en dicho extracto; la citotoxicidad fue importante en los extractos de hexano (rico en esteroides) y de cloroformo (rico en pigmentos). Los resultados evidencian la potencialidad del recurso para su aplicación en el desarrollo de productos de interés farmacéutico, alimenticio y textil.

PALABRAS CLAVE: *Undaria pinnatifida*, actividad biológica, metabolitos bioactivos, Golfo San Jorge, recursos renovables.

ABSTRACT

Seaweeds constitute raw materials for important applications in different process, standing out the alimentary industry and the production of active compounds applicable in Health. *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae) is a brown seaweed, foreign, with strong invasive characteristics, original from the East, that inhabits our region. It has been described as a source of interesting metabolites with different biological activities. Because of the antecedents existing, it was proposed to evaluate the metabolic profile of the seaweed, determinate the constitutive pigments and the analysis of the antioxidant activity by the DPPH method and the cytotoxicity by the *Artemia salina* method, in extracts obtained from the individuals collected in winter, at the central region of the Golfo San Jorge. The chemical profile showed the presence flavonoids, tannins, steroids and triterpenes. The pigment analysis showed the presence of cryptoxanthin, zeaxanthin, capsanthin, fucoxanthin, carotene, chlorophyll a and pheophytin a. The antioxidant activity in the methanol extract is correlated with the phenols contained in it, the cytotoxicity was important at the hexane extract (rich on steroids) and the chloroform extract (rich in pigments). The results evidence the potentiality of the resource for it application in the development of products of interest in pharmaceutical, alimentary and textile fields.

KEY WORDS: *Undaria pinnatifida*, biological activity, bioactive metabolites, Golfo San Jorge, renewable resources.

INTRODUCCION

Los océanos son considerados una de las principales reservas de biodiversidad. En ellos habitan aproximadamente la mitad de las especies que componen la biodiversidad global, compartiendo un ambiente competitivo muchas veces agresivo no solo por sus propias características sino por efectos externos, fundamentalmente contaminaciones de diversa índole. Como parte de las estrategias de supervivencia que desarrollan para afrontar estas condiciones, incluyen la síntesis de

moléculas bioactivas, las que pueden ser aprovechadas por el hombre (Kim y Ta, 2016). Las algas son especialmente interesantes desde este punto de vista; existen numerosos antecedentes en los cuales se describe su aplicación en distintos campos, entre ellos el campo farmacéutico, mediante la producción de metabolitos con actividades biológicas tales como antiproliferativa, antibacteriana, antiviral, antioxidante y antiinflamatoria (García-Galaz *et al*, 2013). También son importantes desde el punto de vista alimenticio al aportar a la

dieta ácidos grasos insaturados, y más recientemente, como materia prima para el desarrollo de biodiesel, bioetanol y biopolímeros, como plásticos reciclables (Suhaila *et al*, 2012; Rasul *et al*, 2017).

Una de las especies que habita el Golfo San Jorge, es *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae), un alga parda alóctona interesante fundamentalmente desde dos puntos de vista. En primer lugar, es una especie fuertemente invasora que en pocos años se arraigó en la región Patagónica tal como ocurrió en otras zonas del mundo mostrando una gran adaptación metabólica; por otro lado, existe gran cantidad de antecedentes del uso de la misma que se remontan a la Medicina Tradicional China. Es de origen asiático, y se cree que fue introducida accidentalmente en nuestra región por medio del agua de lastre de los buques, documentándose por primera vez en cercanías de la ciudad de Puerto Madryn, en 1992 (Dellatorre *et al*, 2014).

Se ha descrito que *U. pinnatifida* biosintetiza diversos metabolitos, entre ellos polisacáridos, lípidos, péptidos, fenoles diversos, esteroides, terpenos (Wang *et al*, 2018). Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación con ejemplares colectados en primavera en la costa de Comodoro Rivadavia, evidenciaron un patrón

semejante incluyendo una importante proporción de alginatos con destacada bioactividad (Escobar Daza *et al*, 2016, 2019).

En este contexto, continuamos el estudio de la especie que habita el Golfo San Jorge a fin de profundizar el conocimiento de su metabolismo y potenciales aplicaciones, para posicionarla como un recurso natural renovable de la región. Para ello en este trabajo describimos los resultados obtenidos a partir de extractos exhaustivos obtenidos de ejemplares de invierno.

MATERIALES Y METODOS

Los ejemplares de *Undaria pinnatifida* fueron colectados en la región central del Golfo San Jorge (-45,987688; -67,588525), en Playa Bonita a 20 km al sur de Comodoro Rivadavia, en forma estacional. Un ejemplar de cada colecta fue herborizado y depositado en el Herbario Regional Patagónico, bajo los N° HRP 7649, 7651, 7648, 7652, para invierno, primavera, verano y otoño, respectivamente. El resto del material constituido por las frondas fue secado a temperatura ambiente y al abrigo de la luz solar, y reducido a polvo en un molinillo de paletas provisto de un tamiz de malla 20. En el presente trabajo describiremos lo correspondiente a la estación invierno.

La extracción fue exhaustiva y secuencial con hexano, cloroformo y metanol; con

agitación por 9 días y recambio de solvente cada 3 días. Se trabajó con una proporción de 1 kg de material molido / 2 l de solvente. Los productos extraídos se recuperaron mediante centrifugación refrigerada, se concentraron a presión reducida en un evaporador rotatorio y se secaron en estufa de vacío. Se obtuvieron así tres extractos de diferente polaridad. Los extractos fueron analizados mediante reacciones cualitativas usuales a fin de determinar el perfil químico.

Por otra parte, se analizaron los pigmentos en todos los extractos mediante la determinación de perfiles cromatográficos planares e instrumentales. En el primer caso el sistema se realizó sobre Sílicagel

G60_{F254} como fase estacionaria, empleando como fase móvil acetato de etilo-diclorometano (1:4); se trabajó en condiciones normales de temperatura, presión y humedad. El revelado fue con luz visible y luz UV a 365 nm. Para la cromatografía instrumental se empleó un equipo HPLC-DAD (Waters Co), con una columna de fase reversa C18 y un gradiente con solvente A: MeOH-acetato de amonio 0,5 M (80:20), solvente B: acetonitrilo 90 % y solvente C: acetato de etilo (Tabla I). Se identificaron los pigmentos por medio de la comparación de los espectros de absorción de fuentes bibliográficas (Wright y Jeffrey, 1997).

Tabla I. condiciones del sistema cromatográfico instrumental para el análisis de pigmentos.
Table I. conditions of the instrumental chromatographic system for pigment analysis.

Tiempo (min)	Flujo (ml min ⁻¹)	% A	% B	% C
0	1	100	0	0
4	1	0	100	0
18	1	0	20	80
21	1	0	100	0
24	1	100	0	0
29	1	100	0	0

La actividad antioxidante se evaluó en los tres extractos por el método del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo),

determinado el % de inhibición y la SC₅₀ (capacidad de atrapamiento de radicales libres 50%) cuando el porcentaje de

inhibición fue mayor a 50 (Choi *et al*, 2002). También se determinó la citotoxicidad por el test de la *Artemia salina* y se calculó la DL_{50} mediante el programa de Finney (Nunes *et al*, 2006).

RESULTADOS

La colecta fue realizada en Playa Bonita, en donde se evidenció una importante cantidad de ejemplares del alga en estudio (Figura 1).



Figura 1. Ubicación geográfica e imagen del sitio de colecta (Playa Bonita, Golfo San Jorge, Argentina); secado de ejemplares de *U. pinnatifida* (Alariaceae) y detalle del ejemplar de herbario correspondiente a invierno.

Figure 1. Geographic location and image of the collection site (Playa Bonita, Golfo San Jorge, Argentina); drying of *U. pinnatifida* (Alariaceae) individuals and detail of the herbarium specimen corresponding to winter season.

El screening químico de los extractos obtenidos a partir de las frondas correspondientes a la estación invierno, evidenció la presencia marcada de flavonoides, taninos, esteroides y

triterpenos. En el extracto de hexano se destacaron los lípidos y los esteroides. La Tabla II muestra todos los resultados obtenidos.

Tabla II. Perfil químico determinado mediante reacciones cualitativas, de los extractos exhaustivos obtenidos a partir de las frondas de *U. pinnatifida* colectada en invierno (EUpI-), en Playa Bonita, Golfo San Jorge, Argentina.

Table II. Chemical profile determined by qualitative reactions, from exhaustive extracts obtained from the fronds of *U. pinnatifida* collected in winter (EUpI-), in Playa Bonita, Golfo San Jorge, Argentina.

Reacción / Grupo químico	EUpIHex	EUpIClorof	EUpIMeOH
Molisch / carbohidratos	-	-	-
Shinoda / flavonoides	++	+++	-
Vapores de I ₂ / lípidos	+++ (mantiene en t)	++ (mantiene en t)	+ (mantiene en t)
K ₂ Cr ₂ O ₇ / taninos	+++	++	+
FeCl ₃ al 2 % / OH fenólicos	+ amarillo verdoso (1 y 2 OH adyacentes)	+ verde grisáceo (2 OH adyacentes)	+ amarillo (OH aislado)
Bornträger / quinonas	-	-	-
Liebermann – Burchard / esteroides y triterpenos	+++ verde azulado (esteroide)	++ verde y + pardo (esteroide y triterpeno)	+ verde y + pardo (esteroide y triterpeno)
Kedde / cardenólidos	-	-	-
Dragendorff / alcaloides	-	-	-
Rosenheim / leucoantocianos	-	-	-

El análisis de los pigmentos efectuado mediante cromatografía planar (Figura 2 A) permitió determinar la presencia de cryptoxantina, zeaxantina, capsantina y fucoxantina, los que han sido descriptos por su capacidad antioxidante; además, desde el punto de vista industrial, pueden ser aprovechados por su capacidad tintórea. En el extracto metanólico no se observó fucoxantina ni capsantina (este

último fue observado en los otros extractos). Mediante el sistema de HPLC-DAD utilizado se pudieron identificar: caroteno, fucoxantina con restos de xantofila, clorofila a y feofitina a. Otras señales observadas correspondían a derivados de las clorofilas. La Figura 2 B muestra el cromatograma y los espectros de los compuestos identificados.

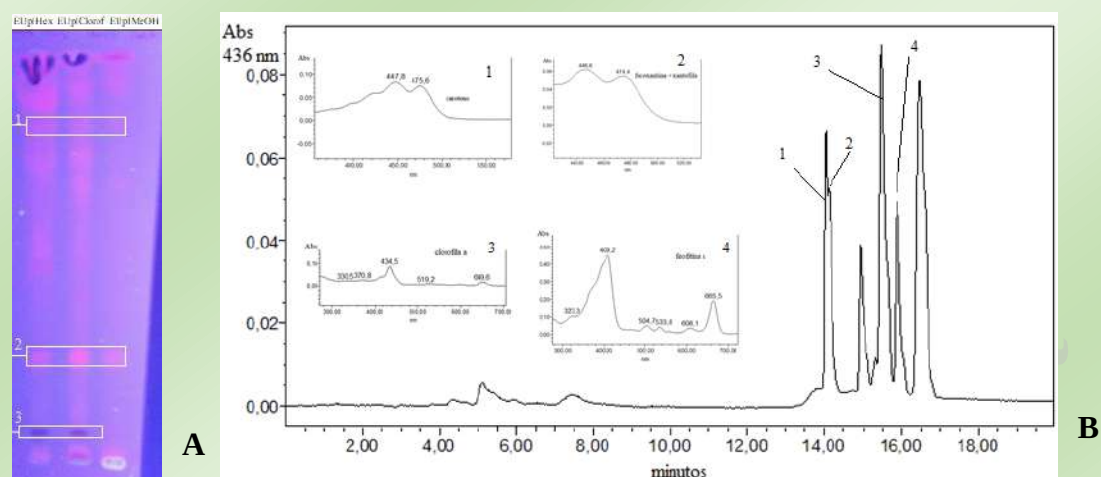


Figura 2. Perfiles cromatográficos de los pigmentos de *U. pinnatifida* colectada en invierno (EUpI-), en Playa Bonita, Golfo San Jorge, Argentina. **A**, perfil obtenido mediante cromatografía planar; **B**, perfil obtenido mediante HPLC-DAD mostrando los espectros de absorción de los principales pigmentos identificados.

Figure 2. Chromatographic profiles of *U. pinnatifida* pigments collected in winter (EUpI-), in Playa Bonita, Golfo San Jorge, Argentina. **A**, profile obtained by planar chromatography; **B**, profile obtained by HPLC-DAD showing the absorption spectra of the main identified pigments.

La actividad antioxidante resultó interesante para el extracto de metanol, EUpImeOH, con una inhibición del 58,43 % y una SC_{50} de 651 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla III).

Tabla III. Actividad antioxidante determinada mediante el ensayo del DPPH, de los extractos exhaustivos obtenidos a partir de las frondas de *U. pinnatifida* colectada en invierno (EUpI-), en Playa Bonita, Golfo San Jorge, Argentina.

Table III. Antioxidant activity determined by DPPH test, of the exhaustive extracts obtained from the fronds of *U. pinnatifida* collected in winter (EUpI-), in Playa Bonita, Golfo San Jorge, Argentina.

Extracto	% de inhibición	SC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
EUpIHex	38,55	-
EUpIClorof	35,50	-
EUpImeOH	58,43	651

En cuanto a la evaluación de la citotoxicidad por el test de la *Artemia*

salina, los extractos EUpIHex y EUpIClorof fueron los más potentes, con

una DL_{50} de 97,8 y 144,4 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (Tabla IV).

Tabla IV. Citotoxicidad determinada mediante el test de la *Artemia salina*. de los extractos exhaustivos obtenidos a partir de las frondas de *U. pinnatifida* colectada en invierno (EUpI-), en Playa Bonita, Golfo San Jorge, Argentina.

Table IV. Cytotoxicity determined by the *Artemia salina* test from exhaustive extracts obtained from the fronds of *U. pinnatifida* collected in winter (EUpI-), in Playa Bonita, Golfo San Jorge, Argentina.

Extracto	% de organismos muertos a las 24 h					DL_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Intervalo de Confianza del 95 %
	d1	d2	d3	d4	d5		
	(10 $\mu\text{g/ml}$)	(100 $\mu\text{g/ml}$)	(250 $\mu\text{g/ml}$)	(500 $\mu\text{g/ml}$)	(1000 $\mu\text{g/ml}$)		
EUpIHex	19,3	8,3	-	93,5	100	97,8	57,9 - 154,7
EUpIClorof	6,7	51,7	-	-	66,7	144,4	77,9 - 275,8
EUpIMeOH	3,3	6,5	82,8	72,4	74,2	597,3	352,9 - 1156,2

DISCUSION

La actividad antioxidante resulto interesante para el extracto de metanol, EUpIMeOH, y este resultado guarda relación con la presencia de fenoles observada en el extracto mediante el screening químico realizado (Tabla II), considerando que los fenoles poseen capacidad atrapadora de radicales libres (Chew *et al*, 2008). Por otro lado, si bien algunos pigmentos también evidenciados en el alga, como la fucoxantina, presentan actividad antioxidante (Fung *et al*, 2013), en este extracto no se encontraba presente, lo cual permite suponer que en este caso la actividad está relacionada con los fenoles. También han sido descriptos algunos esteroides, como el fucoesterol, con

propiedades semejantes (Hamid *et al*, 2015).

Los radicales libres y otros derivados reactivos del oxígeno se producen en algunas reacciones biológicas y juegan un rol fisiológico importante. Sin embargo, estas especies reactivas constituyen factores que participan directamente en mecanismos fisiopatológicos como la aterosclerosis, diabetes, cáncer, entre otros; ello permite indicar que los antioxidantes podrían resultar beneficiosos frente a estas complicaciones. Las algas marinas son una fuente importante de sustancias antioxidantes, las cuales constituyen sistemas de defensa frente a las condiciones ambientales a las que se

hallan expuestas, sobre todo variaciones en la intensidad lumínica y en las concentraciones de O₂ y CO₂ a lo largo de la columna de agua que desencadenan un estrés oxidativo. Por ello, estos organismos constituyen una fuente importante de antioxidantes para las industrias alimentaria y farmacéutica (Matsukawa et al., 1997).

En cuanto a la evaluación de la citotoxicidad por el test de la *Artemia salina*, los extractos EUpIHex y EUpIClorof fueron los más potentes, y existe evidencia, que algunas moléculas de naturaleza esteroideal poseen actividad antiproliferativa (Kim et al., 2012; Garcia-Galaz et al., 2012); en nuestro caso, si bien los esteroides fueron determinados en todos los extractos, se destacaron en el de hexano (Tabla II).

Existen amplios antecedentes de *U. pinnatifida* dada su distribución global, en los que se describe el perfil metabólico de esta especie, en los cuales se destacan los hidratos de carbono, lípidos, proteínas, vitaminas, aminoácidos, minerales, polifenoles, flavonoides, alcaloides y esteroides, los cuales le otorgan una importante variedad de actividades biológicas, fundamentalmente antioxidante, antiinflamatoria, antiproliferativa y antidiabética (Wang et al., 2018).

Ha sido demostrada la actividad antitumoral, antioxidante, antimutagénica, antiproliferativa y antiangiogénica de pigmentos tales como la fucoxantina proveniente de *Undaria pinnatifida*, la clorofila a del alga parda *Fucus vesiculosus* y la feofitina a presente también en algas verdes como *Enteromorpha prolifera* (Pangestuti y Kim, 2011). También se ha encontrado que algunos lípidos derivados de ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido eicosapentaenoico y el ácido araquidónico, algunos esteroides como el fucosterol y algunos terpenoides, poseen actividad antitumoral, antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa (Li et al., 2015).

En el presente trabajo resulta evidente que los fenoles son al menos en su mayor parte, responsables de la capacidad antioxidante; mientras que los pigmentos (fundamentalmente fucoxantina, feofitina y carotenoides) y los esteroides, todos descritos por su actividad anticáncer comprobada, guardan relación con la citotoxicidad demostrada.

CONCLUSIONES

Los resultados observados para la especie alóctona que habita la región patagónica, colectada en invierno, sugieren una potencialidad importante como fuente de metabolitos de interés para la salud y la

alimentación, posicionándola como un recurso natural renovable para el desarrollo de productos de mayor valor agregado con un esperado impacto en la producción, el trabajo y la economía regional, considerando la relación cotidiana de nuestra región con el mar. A la vez, un aprovechamiento integral del alga podrá contribuir al control de su expansión. Los estudios continúan a fin de

profundizar en el conocimiento de los principales metabolitos y su aplicación en la generación de productos innovadores.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de la UNPSJB y el FONCYT de Argentina, y las becas de apoyo a la investigación del CIN y de doctorado del CONICET.

BIBLIOGRAFIA

- Chew Y.; Lima, Y. Omara M. y Khoob K. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT-Food Sci. Technol.*, **41**: 1067–1072.
- Choi C., Kim S., Hwang S., Choi B., Ahn H., Lee M., Park S. y Kim S. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, **163**: 1161-1168.
- Dellatorre F., Amoroso R., Saravia J. y Orensanz J. 2014. Rapid expansion and potential range of the invasive kelp *Undaria pinnatifida* in the Southwest Atlantic. *Aquat. Invasions.*, **9 (4)**: 467–478.
- Escobar Daza M.D., Flores M.L. y Córdoba O.L. 2019. Evaluación de cito y genotoxicidad de extractos etanólicos y del alginato de sodio obtenidos de las frondas de *Undaria pinnatifida* (Alariaceae) colectada estacionalmente en el Golfo San Jorge. *Nat. pat.*, **14**: 118-119.
- Escobar Daza M.D., Quezada D.P., Braidot E., Flores M.L. y Córdoba O.L. 2016. Estudio fisicoquímico y actividad biológica *in vitro* de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae) colectada en el norte y centro del Golfo San Jorge. *Nat. pat.*, **2016, 9**: 60-75.
- Fung A., Hamid N. y Lu J. 2013. Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chem.*, **136**: 1055–1062.
- García-Galaz A., Gutiérrez-Millán L., Acedo-Félix E., Burgos-Hernández A., López-Torres M., Valdés-Covarrubias M. y Burboa-Zazueta M. 2013. Las algas y otros organismos marinos como fuente de moléculas bioactivas. *Rev. cienc. biol. tecnol. Salud*, **15 (1)**: 25-32.
- Hamid N., Ma Q., Boulom S., Liu T., Zheng Z., Balbas J. y Robertson J. 2015. Seaweed minor constituents, en Tiwari B. K. y Troy D. J. (eds), *Seaweed Sustainability*. Elsevier, Amsterdam: 193-242.
- Kim S. y Ta Q. 2012. Bioactive Sterols from Marine Resources and Their Potential Benefits for Human Health, en Kim S. K. (ed), *Marine Medicinal Foods Implications and Applications - Animals and Microbes*. Elsevier, Amsterdam: 261-268.
- Li Y.X., Li Y., Kim S.K. 2015. Anticancer Compounds from Marine Algae, en Kim S.K., Chojnacka F. (Eds.), *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim: 267-274
- Matsukawa R., Dubinsky Z., Kishimoto E., Masaki K., Masuda Y., Takeuchi T., Chihaara M.,

Yamamoto Y., Niki E. y Karube I. 1997. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J Appl Phycol*, **9**: 29-35.

Nunes B., Carvalho F., Guilhermino L. y Van Stapten G. 2006. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ Pollut.*, **144**: 453-462.

Pangestuti R. y Kim S.K. 2011. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J. Funct. Foods*, **3**: 255-266.

Rasul I., Azeem F., Siddique M., Muzammil S., Rasul A., Munawar A., Afzal M., Ali M. y Nadeem H. 2017. Algae Biotechnology: A Green Light for Engineered Algae. En Zia K. M., Zuber M., Ali M. (eds), *Algae Based Polymers, Blends, and Composites*. Elsevier: Amsterdam: 301-334.

Suhaila M., Siti N. y Hafeedza A. 2012. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci Technol.*, **23**: 83-96.

Wang L., Park Y., Jeona J. y Ryua B. 2018. Bioactivities of the edible brown seaweed, *Undaria pinnatifida*: A review. *Aquaculture*, **495**: 873-880.

Wright S. W. y Jeffrey S. W. 1997. High-resolution HPLC system for chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton. En Jeffrey S. W., Mantoura R. F. C., Wright S. W. (eds), *Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods*. UNESCO Publishings, Paris: 327-341.

Mucílago de *Opuntia ficus indica* como potencial excipiente natural de productos cosméticos

Mucilage of *Opuntia ficus indica* as natural excipient potential of cosmetic products

Lisi Betiana Diez¹, Cristina Marisel Pérez Zamora^{1,2}, Ariel Germán Michaluk³, María Beatriz Nuñez¹, Carola Analía Torres^{1,2,*}, Ana María Gonzalez⁴

¹Laboratorio de Farmacotecnia y Farmacognosia, Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAUS), Comandante Fernández N° 755, Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco. ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). ³Laboratorio de Industrias Alimentarias, UNCAUS. ⁴Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET), Sargento Juan Bautista Cabral N° 2131, Corrientes.

*carito@uncaus.edu.ar

RESUMEN

El mucílago de *Opuntia* es un fitoingrediente atractivo por su habilidad para retener agua y modificar propiedades como viscosidad, elasticidad y textura. Los objetivos del trabajo fueron evaluar las características fisicoquímicas, la actividad antioxidante y la potencial toxicidad de mucílagos obtenidos de *Opuntia ficus indica* para su posible uso en fitocosmética. Las pencas fueron lavadas, despinadas, cortadas y secadas en estufa hasta peso constante. Para la obtención de los mucílagos, otra porción de las pencas cortadas fue licuada con agua tibia (1:6) y dividida en tres fracciones. La fracción M1 fue macerada en baño termostatzado, la M2 fue sometida a agitación a 6000 rpm, ambos procedimientos se realizaron por 1 h a 80°C, se filtraron y precipitaron con etanol (1:3). La fracción M3 partió de la misma técnica de M1, con una centrifugación previa a la precipitación. Los productos se secaron en estufa a 40 °C, se pulverizaron y caracterizaron por espectroscopía IR. Se cuantificó el contenido de clorofilas y se determinaron los atributos de color (CIELAB). Se calculó la capacidad de retención de agua (CRA) y la solubilidad en distintos sistemas de solventes. Por último, se prepararon suspensiones (1% p/v) para medir pH, actividad secuestrante de radicales libres con DDPH e irritabilidad *in vitro* mediante la técnica HET-CAM. El contenido de agua superó el 90%. Los rendimientos de extracción fueron 1,15% (M1), 1,18 % (M2) y 0,49% (M3). Los espectros IR mostraron bandas típicas de polisacáridos. El contenido de clorofila fue superior en M1, mientras que resultó más bajo en M3. La CRA para los tres mucílagos fue cercana a 1 g/g. M3 mostró mejor solubilidad

en los distintos sistemas solventes. Todos los mucílago presentaron un ángulo de tono (h^*) amarillo-verdoso y alta luminosidad. Los valores de pH de las suspensiones estuvieron entre 5,07 y 6,50. Si bien todos mostraron capacidad antioxidante, M2 presentó la mayor actividad de depuración. Ninguno resultó irritante. La agitación contribuyó a mejorar la actividad antioxidante y la centrifugación previa a la precipitación aumentó la solubilidad. Por lo tanto, en futuras extracciones se implementará una combinación de ambas técnicas.

PALABRAS CLAVE: antioxidante, capacidad de retención de agua, color, espectro IR, formulación, polisacáridos.

ABSTRACT

Opuntia mucilage is an attractive phytoingredient due to its ability to retain water and modify properties such as viscosity, elasticity and texture. The aims of this work were to evaluate the physicochemical characteristics, the antioxidant activity, and the potential toxicity of mucilages obtained from *Opuntia ficus indica* for its possible use in phytocosmetics. The cladodes were washed, de-stoned, cut, and put into a stove to constant weight. To obtain the mucilage, another portion of the cut cladodes was liquefied with warm water (1:6) and divided into three fractions. The M1 fraction was macerated in a thermostatic bath, the M2 was stirred at 6000 rpm, both procedures were performed for 1 h at 80°C, filtered and precipitated with ethanol (1:3). For the M3 fraction the same technique was used as for M1 but with a centrifugation before precipitation. The products were dried in an oven at 40 °C, powdered and characterized by IR spectroscopy. Chlorophyll content was quantified and color attributes (CIELAB) were determined. Water holding capacity (WHC) and solubility in different solvent systems were calculated. Finally, suspensions (1% w/v) were prepared to measure pH, free radical scavenging activity with DDPH, and irritability *in vitro* by HET-CAM method. The water content was over 90%. The extraction yields were 1.15% (M1), 1.18% (M2) and 0.49% (M3). IR spectra showed typical polysaccharide bands. The chlorophyll content was higher in M1, while it was very low in M3. The WHC for the three mucilages was close to 1 g/g. M3 showed better solubility in the different solvent systems. All mucilages had a yellow-green tone angle (h^*) and high brightness. The pH values of the suspensions were between 5.07 and 6.50. Although all showed antioxidant capacity, M2 presented the highest radical scavenging activity. None of them were irritating. Agitation contributed to improve antioxidant activity and centrifugation prior to precipitation increased solubility. Therefore, a combination of both techniques will be implemented in future extractions.

KEY WORDS: antioxidant, water retention capacity, color, IR spectrum, formulation, polysaccharides.

INTRODUCCIÓN

Opuntia ficus-indica (L.) Mill. f. *ficus-indica*, comúnmente conocida como nopal, es una planta arbustiva perteneciente a la familia Cactaceae. Sus propiedades le son atribuidas desde antes del descubrimiento de nuestro continente, los nativos la usaban como alimento, hierba medicinal, fuente de agua y como barrera o cerca protectora (Ochoa y Barbera, 2018). Es una de las Cactáceas más estudiadas debido a su gran versatilidad de transformación para el consumo humano, su uso como forraje y a sus posibilidades industriales, las cuales hacen aún más interesante su cultivo y explotación.

Los nopales contienen sustancias viscosas generalmente conocidas como mucílago o hidrocoloide, el cual contiene principalmente dos polímeros naturales orgánicos: la amilasa y la amilopectina (Rodríguez Henao, 2017). La primera se encuentra formando una cadena helicoidal que, en solución, tiene la capacidad de formar películas delgadas que al secar presentan alta rigidez (Masschelein-Kleiner, 1995), la amilopectina como todo compuesto de alto peso molecular, presenta viscosidad elevada en estado puro, pero es altamente soluble en agua.

Combinadas y encontrándose en solución acuosa, ambas pueden formar capas con diferentes propiedades mecánicas. El mucílago, en solución acuosa, ofrece características de cohesión, las cuales han sido aprovechadas para unir diferentes materiales (Rodríguez Henao, 2017).

Se conoce que los principales compuestos presentes en el mucílago de *Opuntia ficus indica* son: L-arabinosa (24,6-42%), D-galactosa (21-40,1%), L-ramnosa (7-13,1%), D-xilosa (22-22,2%) y ácido D-galacturónico (8-12,7%) (Martínez, 2010). La proporción de estos monómeros varía según la edad de la planta, las condiciones ambientales del cultivo, el momento del día donde se realiza su recolección y la estructura empleada para la extracción del mucílago pudiendo ser el fruto, la cáscara o el cladodio. Debido a su composición, tiene una gran capacidad para ligar o retener agua, de manera similar a las pectinas, las gomas y algunos polisacáridos de algas. A causa de esta gran capacidad de absorción de agua, el mucílago puede encontrar aplicaciones como aditivo en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos, en los que puede disolverse, dispersarse y formar coloides (Del Valle *et al*, 2005; Abraján Villaseñor, 2008).

Teniendo en cuenta las posibles aplicaciones en la industria farmacéutica y cosmética y, con el propósito de revalorizar la flora de la provincia del Chaco (Argentina), los objetivos de este trabajo fueron evaluar las características fisicoquímicas, la actividad antioxidante y la irritabilidad *in vitro* de mucílagos de *Opuntia ficus indica* cultivadas en localidades del sudoeste del Chaco, para una potencial aplicación como fitoingrediente.

MATERIALES Y METODOS

Extracción del mucílago: para la extracción de mucílago se utilizaron los cladodios maduros frescos de plantas de dos años de edad recogidos por la mañana. Después del lavado y despinado, los cladodios frescos se cortaron, se llevaron a una licuadora con un volumen de agua tibia (45 °C) y luego se dividieron en tres fracciones. Las fracciones 1 (M1) y 3 (M3) se colocaron en un baño termostatzado a 80° C por una hora para la liberación de mucílago en el agua. La fracción 2 (M2) fue sometida a maceración a 80° C pero con agitación constante a 6000 rpm, durante una hora. Posteriormente, los tres macerados se filtraron al vacío, M1 y M2 directamente se concentraron en estufa durante 24 horas a 60 °C, mientras que el filtrado obtenido para M3 fue centrifugado y el

sobrenadante fue llevado a estufa para su concentración. Finalmente, todos los concentrados se trataron con etanol al 96 % para favorecer la precipitación del mucílago, el cual fue separado por centrifugación y secado en estufa para obtener los mucílagos M1, M2 y M3 de cada tratamiento.

Cálculo del rendimiento de extracción: se calculó mediante la relación de los gramos de mucílago obtenidos por cada 100 gramos de cladodios frescos.

Evaluación de la actividad antioxidante: Se utilizó la técnica del radical DPPH°. Previamente, se preparó una suspensión al 1% de cada mucílago en agua y se los mantuvo en agitación durante una hora y media. A 1 ml de la suspensión de mucílago se le adicionó 750 µL de la solución del radical DPPH° (300 mM) y se dejó en incubación durante 2 horas. Finalmente se leyó la absorbancia de cada muestra a 514 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Shimadzu Ultimate 1800). La actividad antioxidante fue expresada como porcentaje (%) de depuración del radical usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de depuración (\%)} = 100 \times \frac{(Absc - Absm)}{Absc}$$

Siendo Absc la absorbancia de la solución de DPPH sin antioxidante y Absm la

absorbancia de la solución de DPPH con el mucílago.

Caracterización química de los mucílagos: para identificar los grupos funcionales de los mucílagos extraídos se utilizó la espectroscopía IRTF en el rango de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ empleando un espectrómetro Nicolet Summit (Thermo Fisher Scientific, USA).

Determinación de pH: las mediciones fueron realizadas usando un pH-metro digital (Oakland) por inmersión del electrodo en 50 ml de la suspensión de cada mucílago.

Determinación de clorofila: A 0,1 g de muestra de mucílago se le añadió 5 ml de metanol, se homogeneizó y posteriormente se centrifugó durante 25 minutos. Luego se leyó el valor de absorbancia a 663 nm y 646 nm. Los cálculos se realizaron con las fórmulas descritas a continuación:

$$\text{Clorofila a: } Ca = 2,21 A_{663} - 2,81 A_{646}$$

$$\text{Clorofila b: } Cb = 20,13 A_{646} - 5,03 A_{663}$$

$$\text{Clorofila total: } Ca + Cb$$

Los resultados se expresaron en mg de clorofila por gramo de mucílago.

Determinación del color: los mucílagos deshidratados fueron tratados mecánicamente con un mortero con la

finalidad de reducir el tamaño de sus partículas y homogeneizar el material. La evaluación del color fue realizada utilizando un espectrofotómetro UV-Visible con esfera integradora (EVO600PC, Thermo Fisher Scientific, USA). La escala de color CIELab fue empleada para medir la luminosidad (L^*) y los parámetros cromáticos (a^* y b^*), utilizando un iluminante D_{65} y un ángulo de observación de 10° . Las medidas fueron realizadas por triplicado. El croma (C^*) y el tono (h°) se calcularon a partir de las coordenadas a^* y b^* utilizando un convertidor de parámetros de color en línea (ColorMine.org)

Determinación de la capacidad de retención de agua (CRA): cada muestra de mucílago (0,5 g) se colocó en un tubo de centrífuga y se registró su peso (tubo + muestra). Se añadieron 50 mL de agua destilada y las suspensiones se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 h con agitación durante 5 segundos cada 15 minutos. Después de 20 minutos de centrifugación a 5000 rpm, se descartó el sobrenadante (líquido no absorbido) y se inclinó el tubo a un ángulo de 45° en un papel de filtro; luego de escurrir durante 30 min se pesó el tubo. La CRA se registró y se calculó como la relación entre el peso del tubo al drenar el

agua no retenida y el peso del tubo con el mucílago seco.

Determinación de la solubilidad: Se trabajó con cuatro sistemas de solventes de uso farmacéutico: agua-etanol (1:1), agua-propilenglicol (2:1), agua-glicerina (2:1) y aceite de almendras. Se pesaron 0,01 gr de cada muestra para 3 ml de cada sistema solvente, se colocaron en tubos de ensayo y se agitaron con agitador Vortex durante 1 minuto, cada 30 minutos, durante 3 h. Se observó el resultado a las 3 y 24 horas. Se seleccionaron estos sistemas porque son componentes que se usan en formulaciones farmacéuticas tópicas.

Determinación de irritabilidad dérmica in vitro para suspensiones de mucílagos de *O. ficus indica*: Para este ensayo se realizó la prueba de HET-CAM (Harnoss *et al*, 2019). Se utilizaron huevos de gallinas *Gallus gallus domesticus* suministrados por un productor de la localidad de Juan José Castelli (Chaco). Los huevos fueron incubados durante 10 días a 37° C con 65% de humedad y circulación de aire. Al noveno día se controló la viabilidad de los huevos con ayuda del ovoscopio. Pasado este tiempo se procedió a la realización del ensayo usando 200 µl de la suspensión al 1% del mucílago y 200 µl de laurilsulfato de sodio al 1% y polietilenglicol (PEG),

como controles positivos y negativos, respectivamente. Se utilizaron dos huevos para cada uno. Los productos fueron aplicados en la membrana corioalantoidea para evaluar las lesiones de lisis, hemorragia y coagulación, a los 300 segundos. Se halló el potencial de irritación de los tres compuestos aplicando la siguiente fórmula (Inocente Camones *et al*, 2013):

$$I.I. = ((301-TH)/300) \times 5 + ((301-TL)/300) \times 7 + ((301-TC)/300) \times 9$$

Donde:

I.I. = Índice de irritación, TH = Tiempo de aparición de hemorragia, TL = Tiempo de aparición de lisis y TC = Tiempo de aparición de coagulación.

RESULTADOS

El contenido de agua de las pencas superó el 90%. Los rendimientos de extracción en cada caso fueron 1,15% (M1), 1,18 % (M2) y 0,49% (M3).

Los espectros IR se muestran en la Figura 1. Todos mostraron una banda entre 1300 y 1000 cm⁻¹ típica de polisacáridos, y a 890 cm⁻¹ la correspondiente a uniones α-glucosídicas (Cai, 2008). Presentaron también una banda asociada con el estiramiento del carboxilato simétrico y antisimétrico, típico de las sales de ácido carboxílico presentes en los mucílagos comprendida entre 1423 y 1625 cm⁻¹ (Rodríguez-Gonzalez *et al*, 2014).

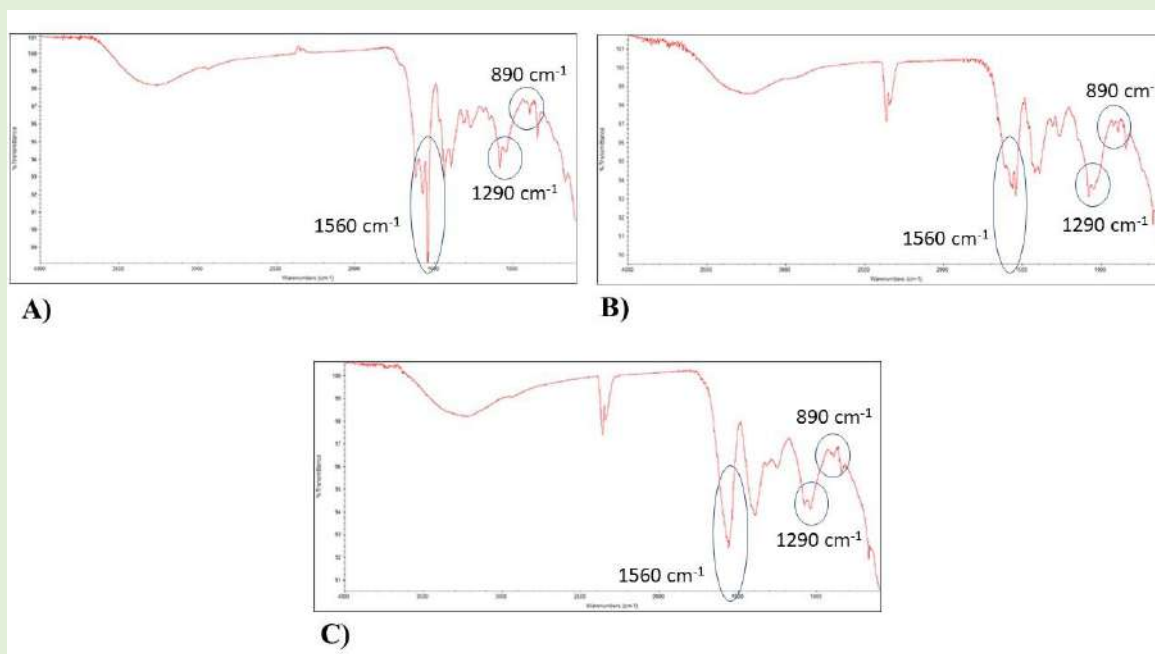


Figura 1. Espectros IR de los mucílago obtenidos A) M1, B) M2 y C) M3.
Figure 1. IR spectra of the mucilages A) M1, B) M2 and C) M3.

El contenido de clorofila fue 58,9 $\mu\text{g/g}$ (M1), 11,58 $\mu\text{g/g}$ (M2) y 5,07 $\mu\text{g/g}$ (M3). Los resultados del análisis de color se muestran en la Figura 2. Los valores de luminosidad L^* mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los mucílago obtenidos. El valor osciló entre 75 y 85, valores que son altos considerando que la escala es de 0 a 100, por lo que los mucílago tienden a ser claros. En lo que concierne al valor de a^* , M1 y M2 tienden al verde, mientras que M3 tiende al rojo. Los tres mucílago

tuvieron un valor de b^* positivo, lo que muestra una tendencia al amarillo. En lo que respecta al ángulo de tono (h^*) M1 y M2 se encontraron en el área correspondiente a los tonos amarillo-verdosos, mientras que M3 mostró un valor en el rango del amarillo-rojizo. El croma representa la saturación relativa de un color y comienza en 0, donde 0 indica color insaturado (matiz) y 100 indica pureza del color (brillo), por lo que M2 resultó ser el más saturado.

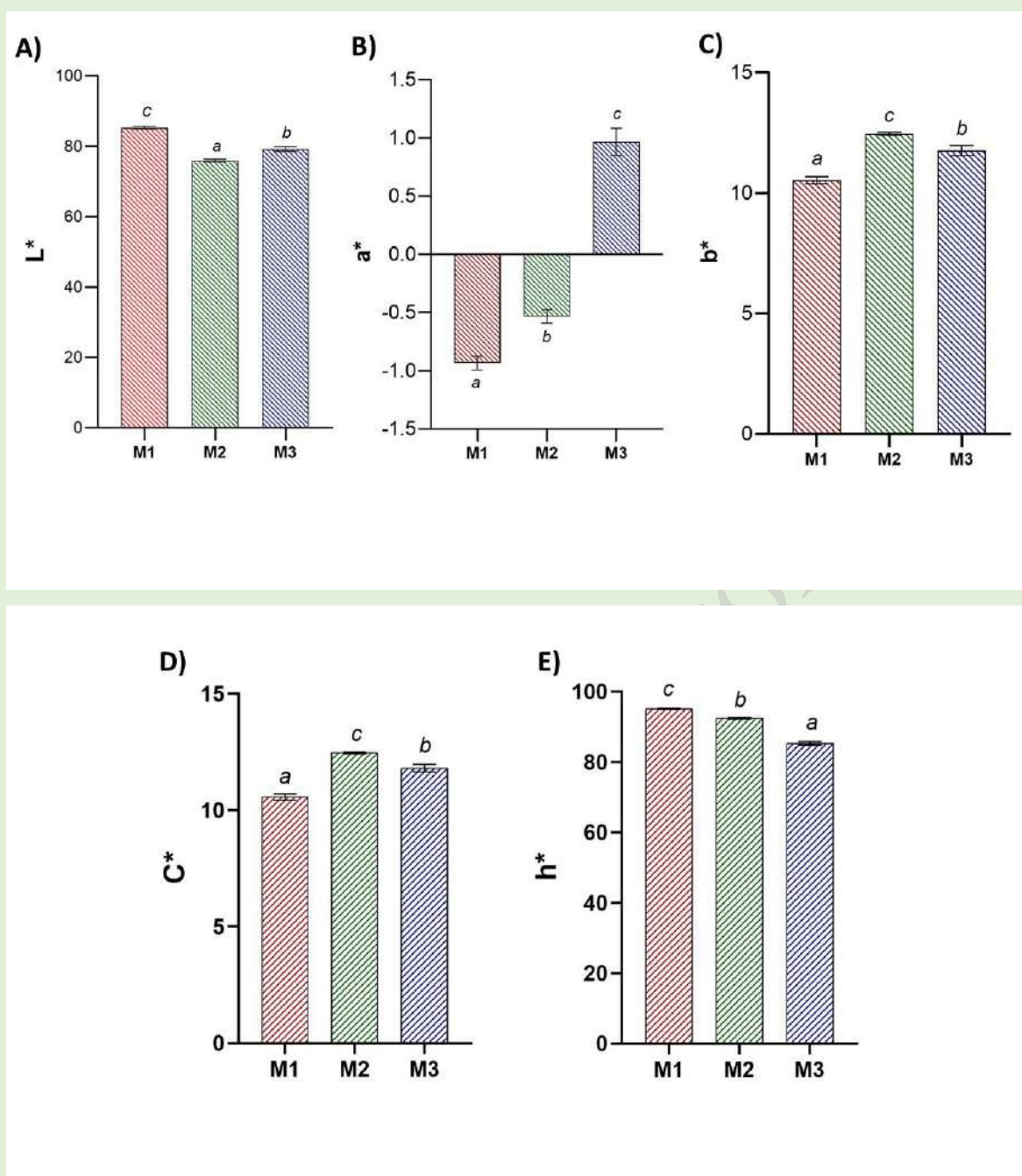


Figura 2. Análisis de color de los mucílago en polvo. A) Luminosidad (L), B) Tendencia al rojo o al verde (a) C) Tendencia al amarillo o al azul (b), D) Tono (h), e) Cromo (C).

Letras iguales indicarían que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Figure 2. Colour analysis of powdered mucilages A) Luminosity (L), B) Tendency to red or green (a) C) Tendency to yellow or blue (b), D) Tone (h), e) Chroma (C).

Equal letters would indicate that there are no statistically significant differences ($p < 0.05$).

Los valores de pH de las suspensiones fueron de 5,07 (M1), 6,50 (M2) y 5,55 (M3). Estos resultados muestran que todas las suspensiones son ligeramente ácidas.

En lo que respecta a la actividad atrapadora de radicales libres, los valores se muestran en la Figura 3. Si bien todos mostraron capacidad antioxidante luego

de 2 horas de reacción, M2 presentó la mayor actividad de depuración con un 40,27% a una concentración de 4 mg/ml.

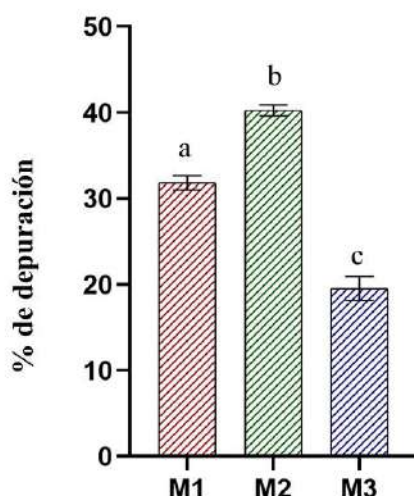


Figura 3. Actividad depuradora del radical DPPH por parte de los tres mucílagos. Letras iguales indicarían que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).
Figure 3. Scavenging activity of the DPPH radical by the three mucilages. Equal letters would indicate that there are no statistically significant differences ($p < 0.05$).

En el análisis de la CRA, los tres mucílagos mostraron un valor cercano a 1 g de agua/g de mucílago seco, siendo para M1 1,04, M2 0,97 y M3 0,99 g de agua/g mucílago.

En la prueba con los sistemas de solventes, M3 mostró mejor solubilidad en todos los sistemas.

En el ensayo HET-CAM como prueba *in vitro* de irritabilidad dérmica, los mucílagos no mostraron signos de lisis, coagulación o hemorragia en el tiempo del ensayo al igual que el PEG usado como

control negativo. El lauril sulfato de sodio, mostró un índice de irritación de 11,09, siendo un irritante severo.

DISCUSION

Los rendimientos de extracción de las fracciones M1 y M2 fueron cercanos al 1,2%, similar al obtenido por Dick *et al* (2019) y mayores a los informados por Espino-Díaz *et al* (2010). Estos valores, expresados con respecto al peso en fresco, resultaron inferiores a los obtenidos por Sepúlveda *et al* (2007), que obtuvieron un

1,5% para el mucílago de *O. ficus indica*. Esta variación observada en los rendimientos puede explicarse tanto por las diferencias relativas al material vegetal utilizado para la extracción (condiciones de cultivo, estado de desarrollo, etc.), condiciones climáticas en el momento de la recogida de los cladodios (invierno, frío y lluvia), así como por el método aplicado para el aislamiento del mucílago (procedimientos de separación, purificación y secado) (Dick *et al*, 2019). Sin embargo, comparando el rendimiento de los tres mucílagos obtenidos en nuestro laboratorio, el porcentaje de extracción de M3 fue mucho menor, probablemente debido a las modificaciones en el proceso de extracción original, el cual evidentemente influye negativamente en el resultado.

El objetivo de modificar el procedimiento original de extracción (M1), fue obtener un producto lo más blanco posible, lo cual se analizó evaluando los parámetros de color de los tres mucílagos. Las hipótesis que se tenían para justificar el aspecto heterogéneo y verdoso del mucílago obtenido por el método tradicional eran que se debía a la presencia de la clorofila o a una oxidación enzimática de los polifenoles presentes en la penca. Por eso se estudió la conveniencia de adicionar algunos pasos más al proceso. Los valores negativos de a^* y los valores positivos de

b^* son característicos del color verde-amarillo debido al contenido de clorofila del mucílago en M1 y M2. Esto se condice con los resultados obtenidos en el contenido de clorofila de los tres mucílagos, donde M1 y M2 fueron los que presentaron mayor cantidad del pigmento verde. Dicha observación nos permite inferir que la incorporación de la centrifugación, como paso previo en la precipitación del mucílago M3, ayuda en la obtención de un polvo más homogéneo, claro y con menor tendencia al verde por la separación de la clorofila del mucílago. Al observar los resultados de la actividad antioxidante, M2 fue el más activo. Esto demuestra que la agitación favorecería la extracción de componentes con actividad antioxidante. Los resultados para este mucílago son cercanos a los obtenidos por Bayar *et al* (2016) quienes obtuvieron 50% de depuración con 4,6 mg/mL de mucílago, pero inferiores a los hallados por Messina *et al* (2020). Estas diferencias podrían deberse a la metodología de extracción usada, la edad de los cladodios y a la época de recolección de los mismos. La actividad secuestradora de radicales libres se da porque los carbohidratos también tienen actividad antioxidante, debido a sus grupos reductores (Kardosová & Machová, 2006), los cuales son capaces de contrarrestar los radicales libres (Salehi *et al*, 2019). Esto también

puede deberse a la composición química de las células mucilaginosas, entre ellas, carotenos y componentes fenólicos. Estos posiblemente tienen un efecto sinérgico entre los compuestos bioactivos que conforman al mucílago de nopal (Luna-Sosa *et al*, 2019; Messina *et al*, 2020). El intento de purificación del mucílago para obtener un polvo más homogéneo influiría negativamente en esta actividad biológica, probablemente por el efecto antioxidante que tiene la clorofila y que podría contribuir potenciando la actividad secuestradora de radicales (Pérez-Gálvez *et al*, 2020).

Como se mencionó al inicio, el mucílago es un polisacárido que contiene una estructura molecular de hasta 30.000 azúcares diferentes, con residuos de arabinosa, galactosa, ácido galacturónico, ramnosa y xilosa (Medina-Torres *et al*, 2006, Ginestra *et al*, 2009). Debido a la alta concentración de grupos hidroxilos, el polisacárido se hidrata formando puentes de hidrógeno, forma una red tridimensional en contacto con el agua, atrapándola y dando lugar a soluciones con alta viscosidad. Esta característica hidrocoloide es tan particular en los mucílagos que posee una medida propia, el Índice de Hinchamiento o CRA, que es usado como referencia para los controles de calidad (Serván Alcántara, 2018). La CRA influye en la formación de

soluciones viscosas que pueden facilitar los procesos industriales. Analizando la CRA, los tres mucílagos mostraron valores menores a los informados por otros autores para otras especies de *Opuntia* (Monrroy *et al*, 2017). La diferencia podría deberse al contenido de oxalato de calcio en los mucílagos. El ión calcio existe en el mucílago del cactus como oxalato de calcio y tiene un fuerte efecto en la conformación molecular que a su vez conduce a una mejora en la capacidad de retención de agua del mucílago (Gebresamuel & Gebre-Mariam, 2012). El contenido de calcio aumenta con la edad de los cladodios (Sepúlveda *et al*, 2007). En este ensayo se usaron cladodios jóvenes, lo cual puede ser la causa de las discrepancias con los otros resultados informados. En próximos estudios se prevé el uso de cladodios con más de 2 años de edad y el análisis del contenido de calcio para mejorar la CRA y tener mayor información de este parámetro.

Cuando los hidrocoloides presentan carga son sensibles a los cambios de pH o a la concentración de electrolitos. En este caso, si el mucílago posee restos de ácido galacturónico, la interacción de los grupos ácidos con las moléculas presentes en el medio podría ser otro factor que afecte la CRA y en consecuencia la solubilidad (Abraján Villaseñor, 2008).

Los resultados de pH ligeramente ácidos coinciden con los encontrados por León-Martínez *et al* (2011). Según el valor hallado por diferentes investigadores, los cladodios se indicaron como un órgano de la planta con pH bajo (Samia El-Safy, 2013). Stintzing & Carle (2005) afirmaron que el jugo de los cladodios tenía típicamente un pH de 4,6. Gebresamuel & Gebre-Mariam (2012) reportaron valores de pH entre 5,57 y 6,43 en diferentes concentraciones (1-12%) de dispersiones del mucílago de *O. ficus indica*. La acidez del mucílago se explicaría por la presencia de ácidos glucurónicos (Vargas Mamani *et al*, 2019). Si bien los valores de pH de las suspensiones de mucílagos fueron ligeramente ácidos resultan aceptables para una formulación cosmética pues los valores son cercanos al pH de la piel (4,5-5,5).

De acuerdo con Vargas Mamani (2019) el mucílago es más soluble en agua y soluciones ácidas débiles, pero en solventes orgánicos y alcoholes provocan deshidratación del mucílago por lo que lo precipitan. Este podría ser el motivo por el cual los mucílagos no se solubilizaron en la mezcla agua-etanol (1:1) y tampoco en aceite de almendras. El mucílago M3 fue el más purificado, presentando mejor solubilidad en los distintos sistemas hidrofílicos evaluados. No alcanzó a solubilizarse completamente, pero se

observó que M3 se hidrató, gelificando y modificando la viscosidad del medio. Este comportamiento coincide con lo expresado en el trabajo de Kalegowda *et al*, (2016), quienes estudiaron el mucílago de *Opuntia dillenii* y encontraron que en agua fría forma soluciones viscosas. La mayoría de los trabajos expresan que los mucílagos en general son solubles en agua caliente (Kalegowda *et al*, 2016; Vargas Mamani, 2019). Posiblemente, haber estudiado la solubilidad a temperatura ambiente (27 °C) haya sido un factor influyente en la limitada solubilidad, a su vez, la presencia de clorofila y otras moléculas pudieron haber afectado la solubilidad de M1 y M2.

En lo que concierne a los resultados del estudio de irritabilidad *in vitro*, la ausencia de signos de hemorragia, lisis y coagulación darían un indicio de la seguridad de los mucílagos como fitoingredientes en formulaciones dermatológicas. Esta propiedad de los mucílagos se suma a su calidad para su uso como excipiente farmacéutico debido a su naturaleza menos ácida (Gebresamuel & Gebre-Mariam, 2012).

CONCLUSIONES

Los tres mucílagos presentaron bandas características en el espectro IR y CRA similares. Los valores de pH fueron aceptables para una formulación

cosmética. La agitación contribuyó a mejorar la actividad antioxidante y la centrifugación previa a la precipitación aumentó la solubilidad. Por lo tanto, en futuras extracciones se implementará una combinación de ambas técnicas para seleccionar la más apropiada.

Los mucílagos son prometedoras matrices naturales biodegradables con aplicaciones útiles en varios campos, especialmente en las industrias farmacéutica y cosmética. Su baja toxicidad y biocompatibilidad ofrecen varias ventajas sobre los

materiales sintéticos. Sin embargo, aún quedan muchos ensayos por realizar para revelar su compleja composición estructural y tener información más amplia para su caracterización como fitoingrediente.

AGRADECIMIENTOS

A la Secretaría de Investigación, Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Chaco Austral (PI 90) y al CONICET. Al Consejo Interuniversitario Nacional por la beca EVC de la señorita L. B. Diez.

BIBLIOGRAFIA

Abraján Villaseñor, M. 2008. Efecto del método de extracción en las características químicas y físicas del mucílago del nopal (*Opuntia ficus-indica*) y estudio de su aplicación como recubrimiento comestible (Tesis Doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos. Valencia, España.

Bayar, N., Kriaa, M., Kammoun, R. 2016. Extraction and characterization of three polysaccharides extracted from *Opuntia ficus indica* cladodes. *Int. J. Biol. Macromol.*, **92**: 441-450.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.042>

Cai, W., Gu, X., Tang, J. 2008. Extraction, purification, and characterization of the polysaccharides from *Opuntia milpa alta*. *Carbohydr Polym.*, **71**: 403-410.

Del-Valle, V., Hernández-Muñoz, P., Guarda, A., Galotto, M.J. 2005. Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. *Food Chem.*, **91**(4): 751-756.

Dick, M., Dal Magro, L., Costa Rodrigues, R., de Oliveira Rios, A., Hickmann Flôres, S. 2019.

Valorization of *Opuntia monacantha* (Willd.)

Haw cladodes to obtain a mucilage with hydrocolloid features: physicochemical and functional performance. *Int. J. Biol. Macromol.*, **123**: 900-909.

Espino-Díaz, M., de Ornelas-Paz, J., Martínez-Téllez, M.A., Santillán, C., Barbosa Cánovas, G.V., Zamudio-Flores, P.B., Olivas, G.I. 2010. Development and characterization of edible films based on mucilage of *Opuntia ficus-indica* (L.). *J. Food Sci.*, **75**: 347-352.

<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01661.x>

Gebresamuel, N., Gebre-Mariam, T. 2012.

Comparative physico-chemical characterization of the mucilage of two cactus pears (*Opuntia* spp.) obtained from Mekelle, Northern Ethiopia. *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, **3**: 79-86.

<http://dx.doi.org/10.4236/jbnb.2012.31010>

Ginestra, G., Parker, M.L., Bennett, R.N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., Lo Curto, R., Bisignano, G., Faulds, C.B., Waldron, K.W. 2009. Anatomical, Chemical, and

- Biochemical Characterization of Cladodes from Prickly Pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *J. Agric. Food Chem.* **57**:10323-10330. <https://doi.org/10.1021/jf9022096>
- Harnoss, J.C., Assadian, O., Koburger, T., Dissemond, J. 2019. Irritative potency of selected wound antiseptics in the hen's egg test on chorioallantoic membrane to predict their compatibility to wounds. *Wound Repair Regen*; **27**(2):183-189. <https://doi.org/10.1111/wrr.12689>
- Inocente Camones, M.A., Toscano Guerra, E.M., Castañeda Castañeda, B. 2013. Efecto irritante *in vitro* de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu, mediante el método Het Cam. *Horizonte Médico*, **13**(2):12-18. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371637129003>
- Kalegowda, P., Chauhan, A.S., Mysore, S., Urs, N. 2016. *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw cladode mucilage: physico-chemical, rheological and functional behavior. *Carbohydr. Polym.*, **157**: 1057-1064. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.070>
- Kardosová, A., Machová, E. 2006. Antioxidant activity of medicinal plant polysaccharides. *Fitoterapia*, **77**(5): 367-373.
- León-Martínez, F.M., Méndez-Lagunas, L.L., Rodríguez-Ramírez, J. 2011. Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): effects on powder properties and characterization. *Carbohydr. Polym.*, **81**: 864-870.
- Luna-Sosa, B. 2019. Formulación y caracterización de películas comestibles de mucílagos hidropónicos de Nopal (*Opuntia* spp.) sobre manzanas golden (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía. San Nicolás de los Garza, México.
- Martinez, R. 2010. Estabilizantes en las industrias lácteas. Recuperado de <https://www.portalechero.com/innovaportal/v/696/1/innova.front/estabilizantes-en-la-industria-lactea-.html>
- Masschelein-Kleiner, L. 1995. Ancient binding media, varnishes and adhesives. 2nd ed. ICCROM, Rome, Italy.
- Medina-Torres, L., Brito-De La Fuente, E., Gómez-Aldapa, C.A., Aragon-Piña, A., Toro-Vazquez, J.F. 2006. Structural characteristics of gels formed by mixtures of carrageenan and mucilage gum from *Opuntia ficus indica*. *Carbohydr. Polym.*, **63**(3): 299-309. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.04.022>
- Messina, C.M., Arena, R., Morghese, M., Santulli, A., Liguori, G., Inglese, P. 2020. Seasonal characterization of nutritional and antioxidant properties of *Opuntia ficus-indica* [(L.) Mill.] mucilage. *Food Hydrocoll.*, **111**. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106398>
- Monrroy, M., García, E., Ríos, K., García, J. 2017. Extraction and physicochemical characterization of mucilage from *Opuntia cochenillifera* (L.) Miller. *J. Chem.*, article ID 4301901. <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2017/4301901/>
- Ochoa, M.J., Barbera, G. 2018. Historia e importancia agroecológica. En: Inglese P, Mondragon Jacobo C, Nefzaoui A, Sáenz C. Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en Zonas Áridas Roma. Revista ICARDA. https://agroavances.com/img/publicacion_documento/I7628ES.pdf
- Pérez-Gálvez, A., Viera, I., Roca, M. 2020. Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. *Antioxidants*, **9**, 505. <https://doi.org/10.3390/antiox9060505>
- Rodríguez-González, S., Martínez-Flores, H., Chávez-Moreno, C., Macías-Rodríguez, L.,

Zavala-Mendoza, E., Garnica-Romo, M., Chacón-García, L. 2014. Extraction and characterization of mucilage from wild species of *Opuntia*. *J Food Process. Eng.*, **37**: 285-292.

Rodríguez Henao, Y.C. 2017. Evaluación del mucílago de nopal (*Opuntia ficus-indica*) como agente estabilizante en néctar de maracuyá (*Passiflora edulis*) (Tesis de Grado). Universidad de la Salle, Facultad de ingeniería. Bogotá, Colombia.

Salehi, E., Emam-Djomeh, Z., Askari, G., Fathi, M. 2019. *Opuntia ficus indica* fruit gum: Extraction, characterization, antioxidant activity and functional properties. *Carbohydr. Polym.*, **206**: 565-572.

Samia El-Safy, F. 2013. Evaluation and utilization of cladodes flour in formulating functional sponge cake. *World Appl. Sci. J.*, **27**(4): 512-523. DOI: 10.5829/idosi.wasj.2013.27.04.81117

Sepúlveda, E., Sáenz, E., Aliaga, E., Aceituno, C. 2007. Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp. *J. Arid Environ.*, **68**(4): 534-545. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.08.001>

Serván Alcántara, M.A. 2018. Interés Farmacéutico de los Mucílagos (Trabajo de Fin de Grado). Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia. Sevilla, España. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/82306/TFG%20terminado.pdf>

Stinzing, F., Carle, R. 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry, technology, and uses. *Mol. Nutr. Food Res.*, **49**(2): 175-194. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400071>

Vargas Mamani, J.J., Vera Vargas, G.V., Suppé Tejada, N.A. 2019. Caracterización físico-química, microscópica de barrido y dispersión de rayos X del mucílago de cladodios de *Opuntia ficus indica* en la región alta de Tacna. *Rev. Soc. Quím. Perú*, **85**(3).

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X20190003000003&script=sci_arttext

Evaluación del conocimiento sobre la utilización de la Anticoncepción Hormonal de Emergencia en alumnas de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Assessment of the knowledge on the use of the Hormonal Emergency Anticonception in students of the Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Claudia Vera¹, Rosmary Cardozo¹, Fiamma Corna¹, Agustina Maza¹, Antonella D'Angelo¹, Marianela Robles¹, Andrea Carrizo¹, Camila Galarza¹, Sandra Alcalde Bahamonde^{1,2}, Analía Uhrich^{1*}.

¹Farmacología II y ²Farmacología I. Departamento de Farmacia. Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB), Km 4, 9000, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina. *auhrich2001@yahoo.com

RESUMEN

La Anticoncepción Hormonal de Emergencia (AHE), también conocida como “la pastilla del día después”, consiste en el uso de una alta dosis hormonal dentro de los 5 días de una relación sexual no protegida para prevenir un embarazo no planificado. La falta de información acerca de la AHE provoca que muchas veces sea mal utilizada, y no se conozca las consecuencias que esto pueda ocasionar. El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar el grado de conocimientos de alumnas de la UNPSJB sobre AHE y promocionar el uso adecuado de este grupo de medicamentos. Para tal fin se diseñó una encuesta y se administró a 329 alumnas de la UNPSJB durante los meses de octubre y noviembre de 2018. Los resultados indicaron que: el 95,88 % conoce el método AHE y el 53,79 % admite haberlo utilizado alguna vez, el 41,8 % lo utilizó una vez por año, mientras que el 32,2 %; el 12,99 % y el 6,21 % lo utilizaron 2, 3 y 4 veces en un año. El 54,8 % afirmó haberlo usado luego de una relación sexual sin protección, el 28,81 % por rotura de preservativo, el 12,42 % por toma incorrecta de anticonceptivos orales, el 2,82 % como método anticonceptivo y el 1,13% por abuso sexual. El 55,4 % señaló que se lo recomendó un familiar o amigo; solo el 29,3 % lo indicó un profesional de la salud. El 88,7 % lo adquiere en la farmacia. El 37,1 % manifestó haber experimentado alteraciones en el ciclo menstrual, un 9 % náuseas y un 8,5 % dolor de cabeza. El 88 % no considera la AHE como un método de anticoncepción

habitual. Se pudo observar que si bien el grupo encuestado en su mayoría conoce el método AHE y sabe cuando utilizarlo; continúa siendo importante promover el correcto uso del mismo y la prevención de enfermedades de transmisión sexual.

PALABRAS CLAVE: anticoncepción hormonal de emergencia, alumnas universitarias, prevención

ABSTRACT

Hormonal Emergency Contraception (EHC), also known as "the morning-after pill", consists of the use of a high dose of hormones within 5 days of unprotected sexual intercourse to prevent an unplanned pregnancy. The lack of information about the EHC causes that it is often misused, and the consequences that this may cause are not known. The objective of our work was to evaluate the degree of knowledge of UNPSJB students about EHC and promote the appropriate use of this group of drugs. To this end, a survey administered to 329 UNPSJB female students during the months of October and November 2018 was designed. The analyzed results indicated that 95.88% said they know the EHC method and 53.79% admitted having used it at some time, 41.8% used it once a year, while 32.2%, 12.99% and 6.21% used it 2, 3 and 4 times in a year. 54.8% claimed to have used it after unprotected sexual intercourse, 28.81% due to condom breakage, 12.42% due to incorrect use of oral contraceptives, 2.82% as a contraceptive method and 1.13% for sexual abuse. 55.36% said it was recommended by a family member or friend; only 27.36% indicated it by a health professional. 88.7% buy it at the pharmacy. 37.08% stated having experienced alterations in the menstrual cycle, 9% nausea and 8.47% headache. 88% do not consider EHC as a regular contraception method. It was observed that although the majority of the surveyed group knows the EHC method and knows when to use it, it is still important to promote its correct use and the prevention of sexually transmitted diseases.

KEY WORDS: hormonal emergency contraception, university female students, prevention

INTRODUCCION

La Anticoncepción Hormonal de Emergencia (AHE), también conocida como "la pastilla del día después", consiste en el uso de una alta dosis hormonal dentro de los 5 días de una relación sexual no protegida para prevenir

un embarazo no planificado (OPS; OMS,2014) En la actualidad en Argentina se utiliza levonorgestrel en una dosis de 1,5 mg por vía oral (en dosis única o en 2 dosis de 0,75 mg con un intervalo de 12 h). En 1998, la Organización Mundial de la Salud declaró el levonorgestrel como

medicamento esencial (Serra-Torres *et al*, 2007). En relación al mecanismo de acción del levonorgestrel se considera que es múltiple, ya que en función del momento del ciclo en que se administre puede inhibir o retrasar la ovulación, alterar el transporte de los espermatozoides, e interferir con la fertilización (Croxato *et al*, 2001; Suárez *et al*, 2010; Pelaez Mendoza, 2011).

La AHE a diferencia de otros métodos anticonceptivos de uso regular (anticonceptivos orales, parches transdérmicos, anticonceptivos inyectables, implante dérmico, anillo vaginal, DIU hormonal), debe usarse únicamente como método de emergencia. Se considera que una situación es de emergencia siempre que haya habido una relación sexual sin protección en los siguientes casos: Relación sexual sin un método anticonceptivo, o falla potencial del método anticonceptivo (ruptura, deslizamiento o uso incorrecto del preservativo; expulsión completa o parcial del DIU; olvido en la toma de píldoras anticonceptivas orales; retraso en la inyección de un anticonceptivo de depósito; cuando el parche transdérmico (o el anillo vaginal) se ha desplazado, ha habido un retraso en su colocación o se ha extraído antes de lo debido; el diafragma se ha desplazado, roto o se ha extraído antes de lo debido; una tableta (o película

espermicida) no se ha derretido antes de la relación sexual); a ocurrido una agresión sexual y la mujer no está protegida por un método anticonceptivo eficaz (OPS; OMS, 2014). Es importante destacar que la AHE no protege contra el contagio de enfermedades de transmisión sexual.

Existe escasa información sobre el conocimiento y el uso de la AHE, en consecuencia, no se utiliza este método correctamente (Peláez Mendoza, 2011), por este motivo el objetivo de este trabajo fue evaluar el grado de conocimientos que tienen las alumnas de diferentes carreras de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco sobre AHE y educar sobre su uso adecuado.

MATERIALES Y METODOS

Se llevó a cabo un estudio transversal y descriptivo. Para tal fin se diseñó el instrumento de recolección de datos que consistió en una encuesta con 15 preguntas, cerradas con opción para marcar, divididas en dos apartados. El primer apartado permitió recolectar datos personales tales como edad y método anticonceptivo utilizado; y el segundo apartado eran preguntas destinadas a explorar el uso de la AHE y su conocimiento por las estudiantes: uso correcto, indicaciones, efectos adversos, lugar de adquisición. La encuesta se aplicó a 329 alumnas de la UNPSJB. Los datos

fueron tomados entre los meses de octubre y noviembre de 2018. Se analizaron los resultados y en base a ellos se confeccionó material educativo (folletos). El material educativo fue entregado a los estudiantes de la UNPSJB.

RESULTADOS

Se llevaron a cabo 329 encuestas sobre el conocimiento de la utilización de la anticoncepción hormonal de emergencia en alumnas de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

El 75 % de las alumnas encuestadas presentaron una edad entre 18 y 25 años (**Figura 1**).

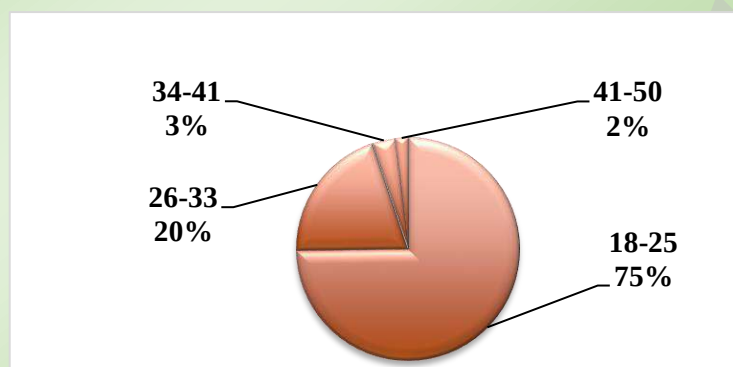


Figura 1. Distribución por edad de las alumnas encuestadas.

Figure 1. Age distribution of the respondents.

Los métodos anticonceptivos más utilizados por las estudiantes fueron el preservativo masculino y los anticonceptivos orales, sin embargo, el 1,9

% manifestó que no utiliza ningún método y el 8,57 % utiliza el método natural (**Figura 2**).



Figura 2. Métodos anticonceptivos utilizados.

Figure 2. Contraceptive methods used.

El 95,88 % manifestó conocer el método AHE (**Figura 3**) y el 53,79 % admitió haberlo utilizado alguna vez (**Figura 4**).

En cuanto a la frecuencia de su uso, el 41,8 % lo utilizó una vez por año, mientras que

el 32,2 %, el 12,99 % y el 6,21 % lo utilizaron 2, 3 y 4 veces en un año (**Figura 5**).

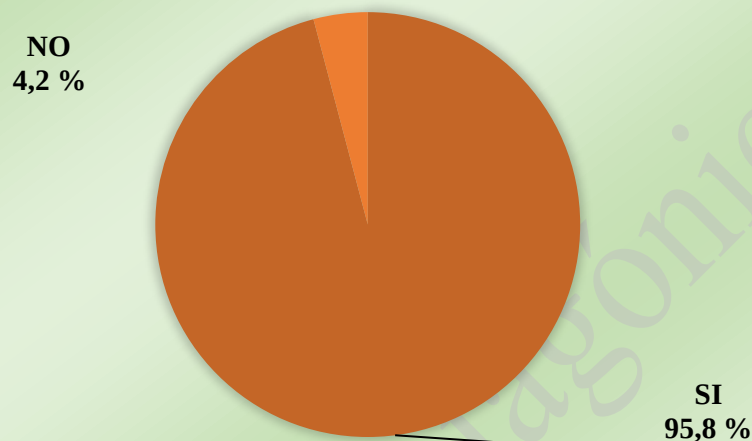


Figura 3. Conocimiento de la Anticoncepción Hormonal de Emergencia.
Figure 3. Knowledge of Emergency Hormonal Contraception.

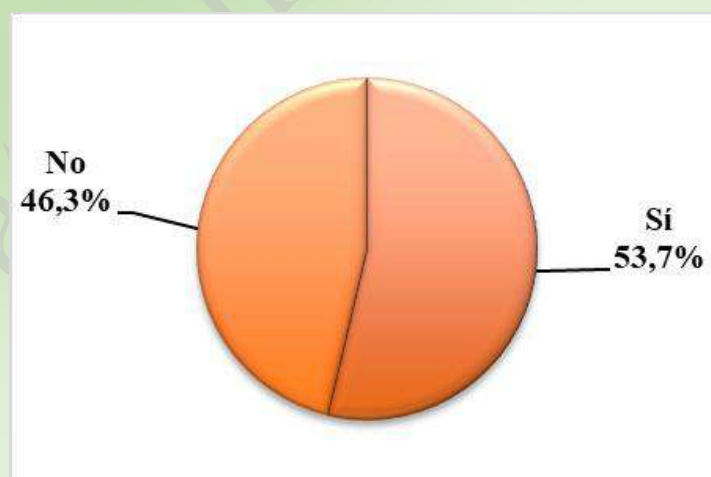


Figura 4. Utilización de la Anticoncepción Hormonal de Emergencia.
Figure 4. Utilization of the Emergency Hormonal Contraception.

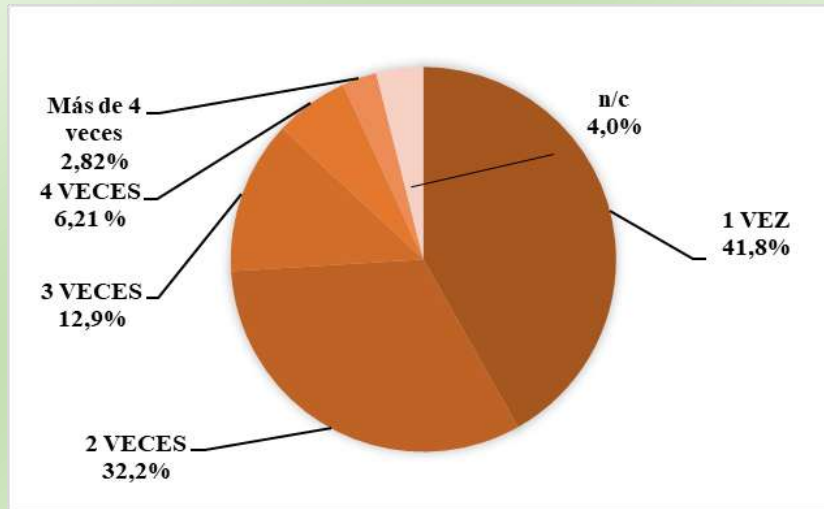


Figura 5. Frecuencia de uso de la Anticoncepción Hormonal de Emergencia.
Figure 5. Frequency of the use of the Emergency Hormonal Contraception.

Respecto a los motivos que llevaron al empleo del método, el 54,8 % afirmó haberlo usado luego de una relación sexual sin protección, el 28,81 % por rotura de preservativo, el 12,42 % por

toma incorrecta de anticonceptivos orales, el 2,82 % como método anticonceptivo y el 1,13% por abuso sexual (**Figura 6**).

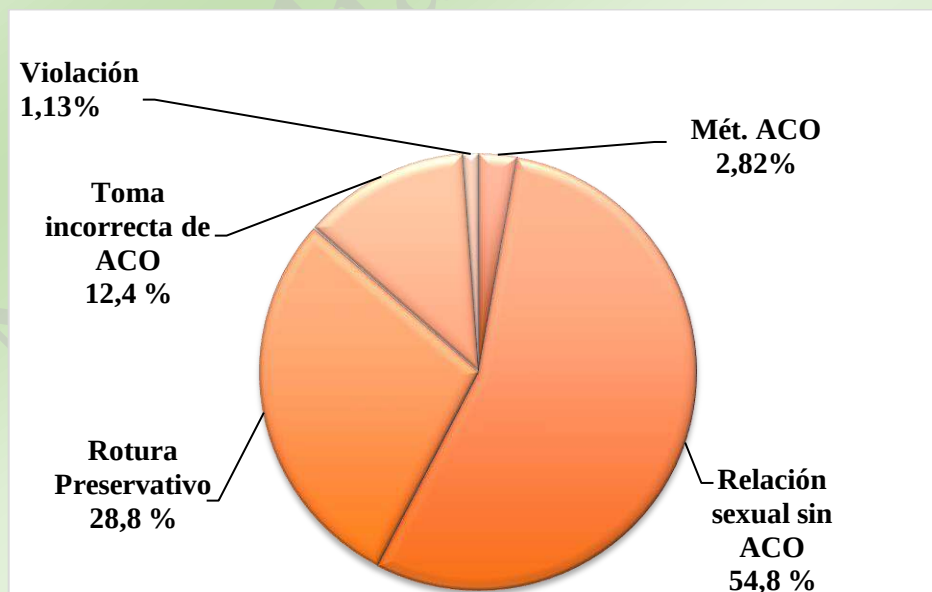


Figura 6. Motivos que llevaron al empleo de la Anticoncepción Hormonal de Emergencia.
Figure 6. Reasons that led to employment of the Emergency Hormonal Contraception.

En relación a la fuente de obtención, el 55,4 % señaló que se lo recomendó un

familiar o amigo; solo el 29,3 % lo indicó un profesional de la salud (**Figura 7**).

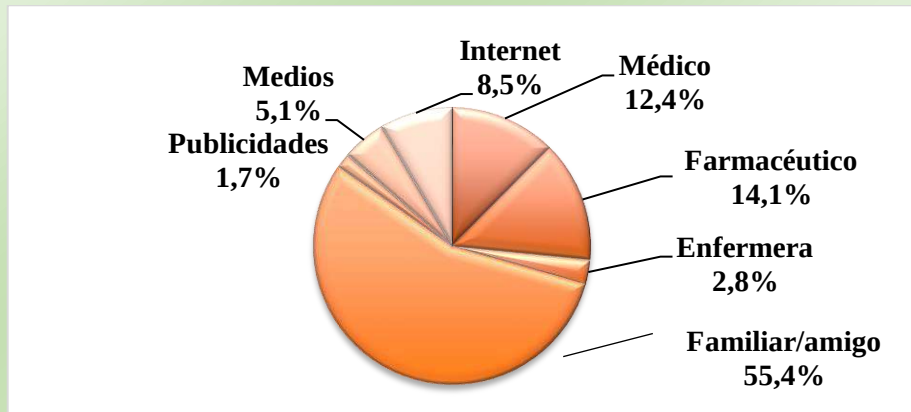


Figura 7. Fuente de la información.

Figure 7. Source of information.

El 88,7 % lo adquiere en la farmacia comunitaria, el resto en centros de salud. En cuanto a los efectos adversos, el 37,1 % manifestó haber experimentado alteraciones en el ciclo menstrual, un 9 % náuseas y un 8,5 % dolor de cabeza (Figura 8).

El 88 % no considera la AHE como un método de anticoncepción habitual (Figura 9).

En función de estos resultados se realizaron folletos informativos.

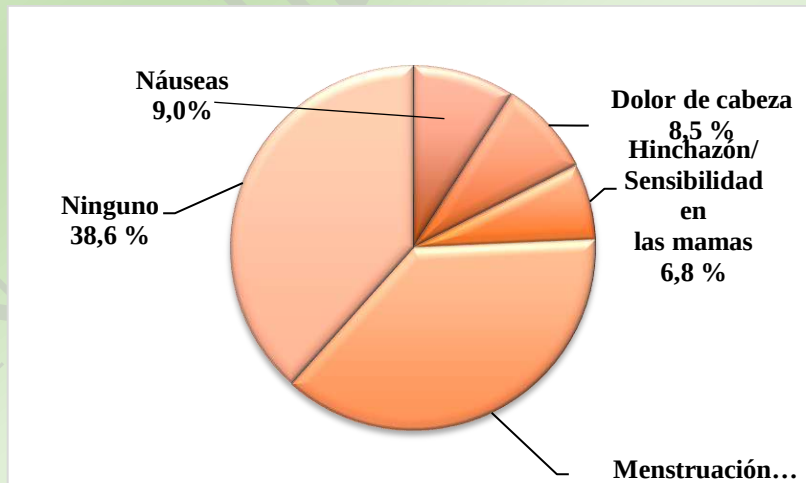


Figura 8. Efectos adversos.

Figure 8. Adverse effects.

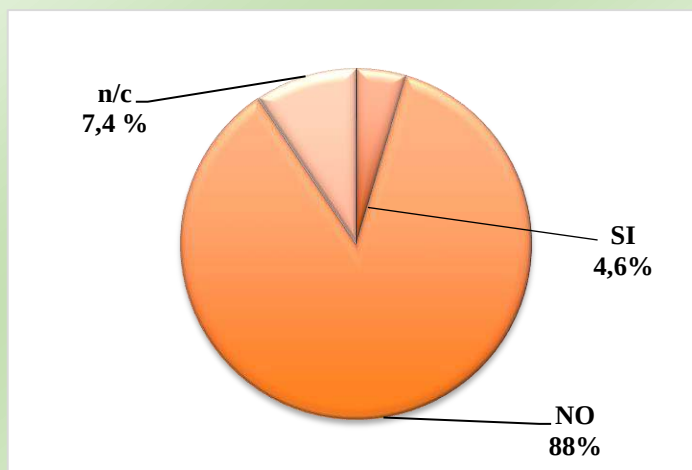


Figura 9. Consideración como método anticonceptivo habitual.
Figure 9. Consideration as a regular method of contraception.

DISCUSION

Los resultados evidenciados en nuestro estudio acerca del conocimiento y frecuencia de uso de la AHE por parte de las estudiantes que participaron son comparables respecto a otras poblaciones estudiadas (Gómez *et al*, 2010; López *et al*, 2010; Cárdenas García *et al*, 2014). Los resultados indican que las estudiantes conocen la existencia del método; pero el 46,3 % no lo utilizan, esto podría deberse a que utilizan bien el método anticonceptivo, por la buena información que tienen acerca de cómo utilizar la AHE y conocen los riesgos que esta práctica conlleva.

Las razones principales por la que utilizaron la AHE fueron por una relación sexual desprotegida y el uso incorrecto o la falla del método anticonceptivo. Resulta importante destacar que un 2,82 % de las estudiantes manifestaron usarlo como método anticonceptivo de uso regular, a

pesar de este bajo porcentaje, resulta necesario educar a las estudiantes sobre la existencia de métodos anticonceptivos más seguros que pueden utilizarse de manera regular. La Organización Panamericana de la Salud señala que la anticoncepción de emergencia debe ser difundida enfatizando en que no sea utilizada como método anticonceptivo regular (OPS; WHO, 2005).

Cuando indagamos la fuente de obtención de la AHE, nuestros resultados demostraron que la información les llega sobre todo por recomendación de familiares o amigos, y en menor medida del personal de salud, coincidiendo esto con Gómez *et al* (2010) y Ojeda Vela *et al* (2018).

Se destaca la presencia de efectos adversos en un porcentaje de la población en estudio los cuales también han sido descriptos por otros autores (Ministerio de Salud, 2017)

Para continuar con la promoción del correcto uso de este método, se realizaron folletos informativos los cuales fueron entregados en distintas campañas de concientización organizadas por el grupo de trabajo en la UNPSJB.

CONCLUSIONES

La mayoría de las alumnas encuestadas conoce el método de AHE y lo utiliza de forma adecuada. Existe predominio de consejo no profesional. Se continuará trabajando en la concientización del uso adecuado del método de AHE y la

prevención de enfermedades de transmisión sexual en los estudiantes de la UNPSJB y se podrá hacer extensivo en otras áreas educativas de la ciudad de Comodoro Rivadavia y en la población en general.

AGRADECIMIENTOS

Secretaría de Extensión. Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Comodoro Rivadavia. Chubut. Argentina.

BIBLIOGRAFIA

Cárdenas-García, L.J.; Sánchez-Zamora, M.E.; Ramírez-de la Roche, O.F.; Robledo-Domínguez, A. 2014. Uso de la anticoncepción de emergencia en un grupo de estudiantes universitarias. *Aten. Fam.*, **21**:90-93.

Croxato, H.B.; Devoto, L.; Durand, M.; Ezcurra, E.; Larrea, F.; Nagle, C. 2001. Mechanism of action of hormonal preparations used for emergency contraception: a review of the literature. *Contraception*, **63**: 111-21.

Gómez, P.; Arguello, K.; Cáceres, C.; Gutiérrez, E.; Rodríguez, A.; Rojas, L.; Torres M. 2010. Anticoncepción de emergencia hormonal: conocimientos, actitudes y prácticas en estudiantes universitarias. Estudio de corte transversal. Colombia. *Rev. Col. Enf.*, **5**: 9-14.

López, A.; Chávez, R.; Atienzo, E.; Allen, B.; Ramírez, D.; Yunes, E.; Leonor Rivera, L. 2010. Anticoncepción de emergencia en estudiantes mexicanos. *Salud Pub. Mex.*, **52**:156-164.

Ministerio de Salud Presidencia de la Nación (2017) “Anticoncepción hormonal de emergencia”, Buenos Aires, Argentina. (<http://www.salud.gob.ar/dels/entradas/anticoncepcion-hormonal-de-emergencia#:~:text=Tambi%C3%A9n%20pueden%20presentarse%20n%C3%A1useas%20y,transmisi%C3%B3n%20sexual%2C%20incluido%20el%20VIH>)

Ojeda-Vela, D.; Orellano-Sanchez, A.; Seminario-Ruiz, K.; Soto- Cáceres, V. 2018. Conocimiento y uso del anticonceptivo oral de emergencia en estudiantes de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque 2016. *Rev. Exp. Med.*, **4**: 67-70

Organización Mundial de la Salud (2014) “Anticoncepción de emergencia”, Ginebra, Suiza.

Organización Panamericana de la Salud. Programa Mujer, Salud y Desarrollo. Hoja informativa del Programa Mujer, Salud y Desarrollo sobre la Anticoncepción de Emergencia en las Américas.

Washington DC.

(<http://www.paho.org/Spanish/AD/GE/emergencycontraceptionsp.pdf>)

Pelaez Mendoza, J.O. 2011. Significance of knowledge and promotion of emergency contraception. *Rev Cubana Obstet Ginecol.*, **37**: 399-408.

Serra-Torres, A.; Montanes- Amorós, M.; Sitjar-Martinez de Sas, S.; Sisó-Almirall, A.; Espanyol-Navarro, M.; Devant- Altimir, M. 2007. Anticoncepción de emergencia: evaluación de los conocimientos de las mujeres, un requisito para la efectividad del tratamiento. *At Primaria*, **39**: 87-91.

Suárez, V.; Zavala, R.; Ureta, J.; Hjar, G.; Lucero, J.; Pachas P. 2010. Efecto del levonorgestrel como anticonceptivo oral de emergencia en la ovulación, el endometrio y los espermatozoides. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.*, **27**: 222-30.

World Health Organization (2005) "Selected practice recommendations for contraceptive use", Ginebra, Suiza.

Tesis de Doctorado

Reproducción y ecología trófica del opistobranquio *Pleurobranchaea* sp. en Golfo Nuevo, Chubut

Reproduction and trophic ecology of *Pleurobranchaea* sp. (Opisthobranchia) in Golfo Nuevo, Patagonia, Argentina

Tesista: Lic. Verena Diana Bökenhans

Director: Dr. Andrés Averbuj; **Co-director:** Dr. José Elías Fernández Alfaya

Carrera: Doctorado en Ciencias Biológicas

Lugar de realización: Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco-UNPSJB.

Lugar de presentación: Virtual (<https://youtu.be/q2J0DoJk0hM>)

Fecha de defensa: 30 de Julio 2020

Número total de páginas de la Tesis: 141 páginas

RESUMEN

Las especies introducidas que logran establecerse con éxito en un nuevo hábitat presentan ciertos rasgos de su historia de vida que las hacen muy eficientes y fuertes competidoras, favoreciendo su expansión. Entre estos rasgos se destacan: mecanismos reproductivos que promuevan una alta tasa reproductiva, una rápida madurez reproductiva, un largo período de oviposición, una alta fecundidad, una rápida dispersión, una fuerte resistencia a condiciones adversas, una alta tolerancia a la heterogeneidad ambiental y un uso eficiente de los recursos del nuevo hábitat, entre otras (Johnston *et al*, 2009, Zhan *et al*, 2015).

El opistobranquio *Pleurobranchaea maculata* es una especie invasora que actualmente se encuentra en expansión a lo largo de la costa Argentina. Desde su ingreso en 2009, ha sido reportado desde Mar del Plata, provincia de Buenos Aires, hasta Bahía Camarones, provincia de Chubut (Farias *et al*, 2015). La amplia distribución de la especie, así como la gran abundancia que se observa en adultos y puestas, sugiere que la especie presenta una capacidad invasora exitosa (Battini *et al*, 2019). De este modo, es posible que ciertas características de la biología reproductiva y de la ecología trófica de *P. maculata* favorezcan su establecimiento y expansión a lo largo de la costa Argentina.

Esta Tesis se propone como objetivo general estudiar la biología reproductiva y la ecología trófica del opistobranquio *P. maculata* en Golfo Nuevo, Chubut. Para ello se plantearon tres objetivos específicos: 1- Estudiar el comportamiento y mecanismos reproductivos de *P. maculata*, así como la estacionalidad y madurez reproductiva y relacionar el ciclo reproductivo con variables ambientales. 2- Describir las masas ovígeras y el desarrollo embrionario hasta la eclosión. Estimar la fecundidad individual y evaluar el efecto del fotoperiodo sobre la oviposición de *P. maculata* así como el efecto de la temperatura sobre el desarrollo embrionario. 3- Describir la dieta y la trama trófica de *P. maculata* mediante técnicas directas e indirectas.

Los muestreos fueron realizados en el Golfo Nuevo, en sitios cercanos a la ciudad de Puerto Madryn, Chubut, Argentina. La biología reproductiva de la especie se estudió mediante un enfoque múltiple de observaciones directas a campo y experiencias en acuarios, sumado a técnicas histológicas clásicas, además de microscopía óptica y electrónica de barrido (MEB), de modo de comprender aspectos de su ciclo de vida. Complementariamente, mediante la

técnica de TUNEL (del inglés *TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling*), se identificaron los tipos celulares que sufren apoptosis durante la gametogénesis. El estudio del período de oviposición, estructura de la masa ovígera y del desarrollo embrionario fue abordado a través de observaciones a campo, microscopía óptica y experiencias en acuario. Mientras que la ecología trófica de *P. maculata* fue descrita mediante observaciones de alimentación *in situ* y estudios de contenido estomacal en dos sitios de muestreos (técnicas directas), complementando con análisis de isótopos estables de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de individuos que habitan zonas costeras y profundas (técnicas indirectas).

El estudio del ciclo gametogénico evidencia que *P. maculata* es una especie hermafrodita con una estrategia reproductiva semélpara y un ciclo reproductivo anual. Durante los meses de febrero y marzo se observó una coexistencia de individuos inmaduros (ausencia de acinos en sus gónadas) con individuos cuya gónada se encuentra en deterioro (post-reproductivos), observándose raramente individuos maduros (acinos espermátogénicos y oogénicos maduros) (Figura 1).

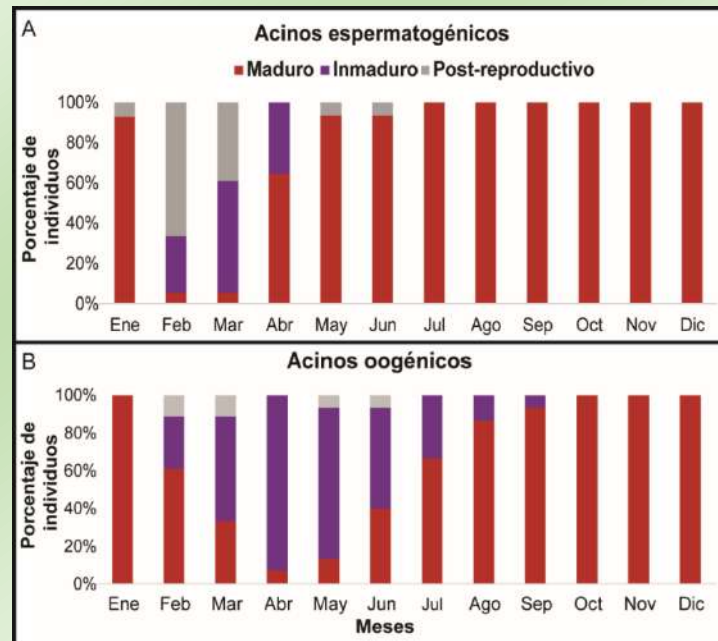


Figura 1. Porcentaje promedio de individuos que presentan los acinos espermatogénicos (A) y los acinos oogénicos (B) maduros, inmaduros o post-reproductivos a lo largo del año comprendido entre los meses de octubre 2015 a septiembre 2016.

La mayor actividad gametogénica ocurrió entre julio y enero, observándose además en dicho periodo un aumento en el número de masas ovígeras en el campo. Los aumentos naturales en el fotoperíodo

condicen con el inicio del período de oviposición (julio) así como en la frecuencia de masas ovígeras, con un máximo de puestas encontradas en enero (Figura 2).

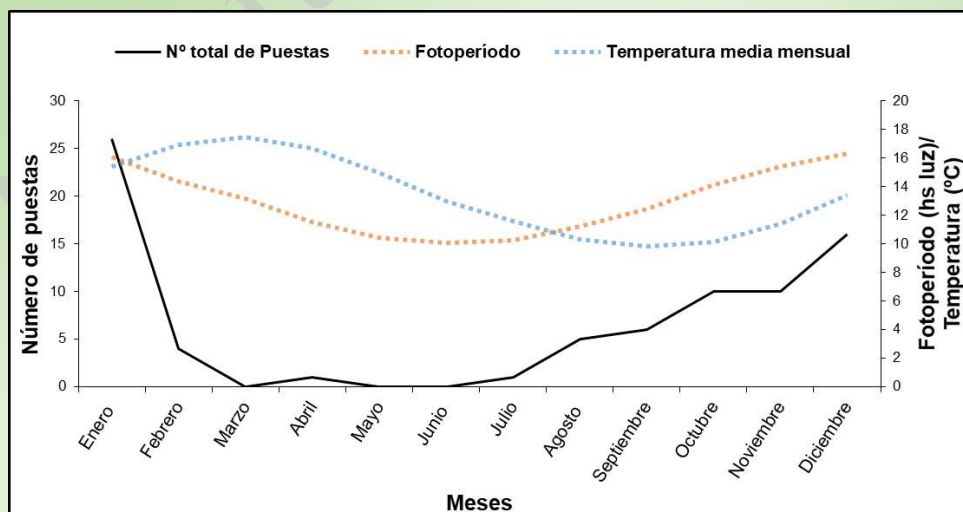


Figura 2. Número de masas ovígeras de *Pleurobranchaea maculata* encontradas en campo a lo largo del año comprendido entre mayo 2018 y abril 2019; se muestran también el fotoperíodo y temperatura del agua de mar para el mismo período.

Las masas ovígeras de *P. maculata* consisten en una matriz gelatinosa transparente en forma de cilindro (Figura 3), dentro de la cual se encuentran distribuidas de manera periférica las ovicápsulas. Cada una de estas contienen en promedio tres huevos/embriones. En ambos extremos de las puestas se observaron cápsulas vacías. El número de masas ovígeras estimadas por individuo en experimentos en acuarios fue de cinco puestas anuales con un promedio de 101.842,07 embriones por masa ovígera, evidenciando una alta fecundidad anual para la especie. El desarrollo embrionario concluye con la eclosión de una larva planctotrófica, lo que podría facilitar la dispersión y colonización de nuevos

hábitats. A su vez, se observó un aumento en la talla de eclosión al aumentar la temperatura del agua (ANOVA: $F_{2,21} = 4,4$; $p < 0,01$), mientras que el tiempo total de desarrollo embrionario disminuyó ante el aumento de la temperatura (ANOVA: $F_{2,23} = 96,29$; $p < 0,01$), resultando exitoso dentro de un rango térmico similar a las fluctuaciones del agua de mar observadas en el sitio de estudio. Los huevos de las masas ovígeras expuestas a temperaturas extremadamente bajas y altas (5 y 22 °C) no completaron el desarrollo embrionario. Estos límites de tolerancia térmica durante el desarrollo embrionario sugieren que la especie podría continuar ampliando su rango de distribución hacia el sur al menos a lo largo del Golfo San Jorge.



Figura 3. Individuo y masa ovígera de *Pleurobranchaea maculata* en su nuevo hábitat (Golfo Nuevo, Chubut).

Adicionalmente, el comportamiento de cópula de *P. maculata* combinó una etapa de transferencia interna de fluidos en la abertura genital femenina seguida de una etapa de transferencia hipodérmicas post-copulatorias. Esta combinación particular de modalidades reproductivas no ha sido registrada previamente para otras especies de opistobranquios y podría representar una estrategia adaptativa de selección sexual (aumentando la producción de huevos, reduciendo la producción de esperma, inhibiendo siguientes cópulas y/o favoreciendo el almacenamiento espermático en la pareja de cópula, entre otros).

Los estudios dietarios mediante métodos directos e indirectos, revelaron que la especie incluye frecuentemente algas en su dieta, siendo el primer registro para este género, el cual era considerado exclusivamente carnívoro. Adicionalmente, el mayor porcentaje de

ocurrencia de presas observadas en los contenidos estomacales se encontró representado por invertebrados marinos, siendo los tentáculos de poliquetos de la familia Terebellidae los ítems predominantes (Bökenhans *et al*, 2019). El análisis comparativo de isótopos estables de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ entre individuos de zonas costeras y profundas (> 30 m de profundidad, ausencia de algas), mostraron nichos isotópicos distintos entre grupos y un menor nivel trófico enfatizando que la especie *P. maculata* presenta una amplia plasticidad en el uso de los recursos alimenticios en el nuevo hábitat.

Los resultados de esta Tesis brindan información novedosa y relevante acerca de la biología reproductiva y ecología trófica de *P. maculata*, que contribuyen a explicar el éxito de establecimiento y expansión a lo largo de la costa Argentina.

BIBLIOGRAFIA

Battini N, Farias N, Giachetti CB, Schwindt E, Bortolus A. 2019. Staying ahead of invaders: using species distribution modeling to predict alien species potential niche shifts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **612**:127-140.

Bökenhans V, Fernández Alfaya JE, Bigatti G, Averbuj A. 2019. Diet of the

invasive sea slug *Pleurobranchaea maculata* in Patagonian coastal waters. *N. Z. J. Zool.*, **46**(1):87-94.

Farias NE, Obenat S, Goya AB. 2015. Outbreak of a neurotoxic side-gilled sea slug (*Pleurobranchaea* sp.) in Argentinian coasts. *N. Z. J. Zool.*, **42**(1):51-56.

Johnston EL, Piola RF y Clark GF. 2009. The role of propagule pressure in invasion

success. En: Biological invasions in marine ecosystems. Springer, Berlin, Heidelberg. pp: 133-151.

Zhan A, Briski E, Bock DG, Ghabooli S y MacIsaac HJ. 2015. Ascidiars as models for studying invasion success. *Mar. Biol.*, **162(12)**:2449-2470.

Naturalia Patagónica

Tesis de Doctorado

Distribución espacial de elefantes marinos y sus implicancias para el turismo y la recreación en Península Valdés y zonas adyacentes

Spatial distribution of southern elephant seal and its implications for tourism and recreation in Península Valdés and adjacent areas

Tesista: María Belén González

Directora: Mirtha Noemí Lewis, **Co – directora:** Alexandra Sapoznikow

Carrera de posgrado: Doctorado en Ciencias Biológicas

Lugar de realización: Centro para el estudio de sistemas marinos (CESIMAR) – CONICET

Fecha de la defensa: 27 de mayo del 2020

Lugar de la presentación: la defensa de la tesis fue bajo la modalidad virtual a causa de la cuarentena establecida el 20 de marzo del año 2020 debido a COVID - 19

Número total de páginas de la tesis: 119

RESUMEN

El estudio de la demografía permite entender los cambios que las poblaciones experimentan a través del tiempo. Dicho conocimiento permite gestionar y manejar los recursos biológicos y desarrollar estrategias de conservación.

Las áreas donde se distribuye una gran diversidad de especies constituyen sitios de considerable importancia y valor para la creación de áreas naturales protegidas, destinadas a la conservación de dicha biodiversidad. Si las áreas protegidas se encuentran en zonas accesibles al público, brindan la posibilidad de observar a los animales en su medio natural, interés que crece dentro de la sociedad, lo que ha

favorecido el uso turístico de las mismas.

La colonia patagónica del elefante marino del sur (*Mirounga leonina*) constituye un ejemplo de esta situación: la gran mayoría de los individuos de esta población se distribuye a lo largo de todo el frente costero de Península Valdés (Figura 1), área natural protegida de la provincia del Chubut (Argentina) y Patrimonio Natural de la Humanidad (UNESCO, 1999), donde junto a otras especies forman parte de un paisaje con interés turístico y recreativo. Su biodiversidad ha permitido que el avistaje de fauna se convierta en la principal actividad turística y económica de Península Valdés.

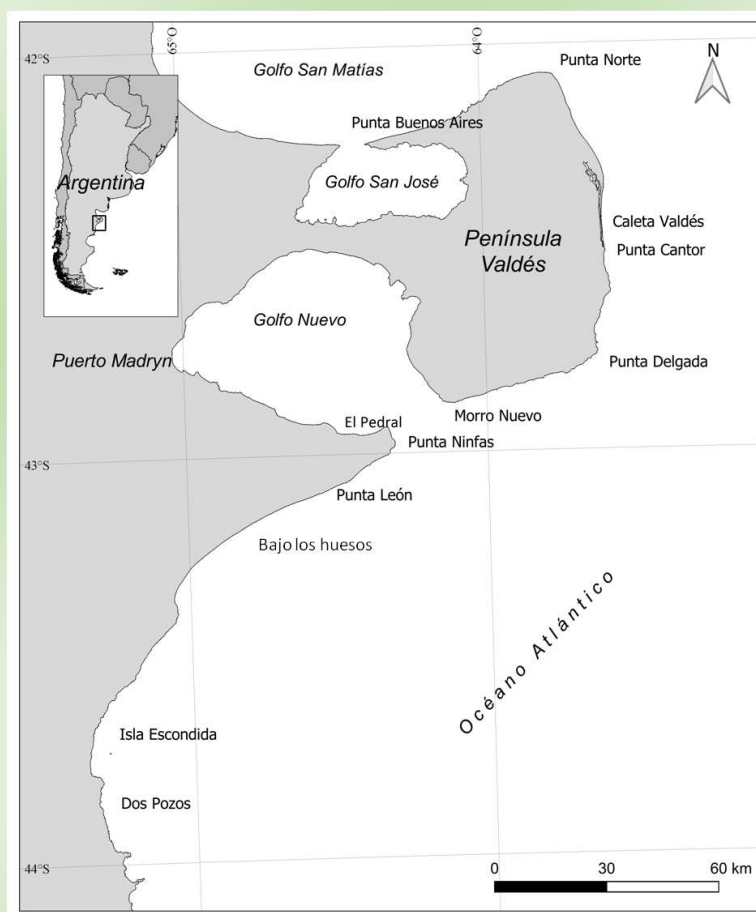


Figura 1. Localización de los sitios estudiados en Península Valdés y áreas adyacentes

Las actividades turísticas y recreativas no se restringen únicamente a Península Valdés, sino que también se desarrollan en áreas adyacentes a la misma, por ejemplo, en Punta Ninfas, Punta León, Bajo los huesos e Isla Escondida (Figura 1). Si bien dichas áreas aledañas forman parte de Reservas de Biósfera, están incluidas en la zona de amortiguación (en los tres primeros casos) y en la zona de transición (Isla Escondida) de sus respectivas reservas, que, hasta el momento, no presentan un plan de manejo.

Entre 1982 y 2001 se registraron cambios en la abundancia y distribución del

elefante marino en Península Valdés, donde se desarrollan excursiones guiadas o visitas con vehículos propios para observarlo. A este hecho se suma el creciente turismo y el desarrollo de actividades recreativas en áreas adyacentes a la península, en las que existe un aumento en el número de elefantes marinos. Este contexto motivó a desarrollar este estudio a partir del concepto de sistema socio – ecológico (SSE), con el fin de vincular las dimensiones sociales y naturales del ecosistema costero marino de Península

Valdés y zonas adyacentes, y alcanzar una mejor comprensión de sus interrelaciones. Bajo la concepción de SSE y considerando que se desarrolla una actividad turística en torno al elefante marino, con una tendencia y distribución cambiantes, el presente estudio tuvo como objetivo general: evaluar los aspectos relacionados a la distribución y abundancia del elefante marino en Península Valdés y zonas adyacentes (dimensión natural), e integrarlos con las necesidades y características de la actividad turística (dimensión social) para formular recomendaciones que permitan el desarrollo de un turismo sustentable. Los objetivos específicos fueron: **1)** conocer la abundancia, estructura social reproductiva y distribución del elefante marino del sur durante la temporada reproductiva 2015, en Península Valdés y zonas adyacentes, **2)** describir cambios de distribución y estructura social reproductiva asociados a la colonia del elefante marino, durante el período 2001 – 2015, **3)** conocer cómo se organiza la actividad de avistaje de fauna en Península Valdés, **4)** evaluar los intereses de turistas y guías de turismo, y su percepción acerca del avistaje de elefantes marinos en Península Valdés, y **5)** sugerir recomendaciones que integren tanto la actividad turística como la protección de los elefantes marinos.

La recolección de datos se llevó a cabo a través de: **1)** censos terrestres de elefantes marinos en Península Valdés y zonas adyacentes, durante el período 2001 – 2015, en la primera semana del mes de octubre (pico de la temporada reproductiva), **2)** entrevistas estructuradas realizadas a los turistas durante las excursiones regulares, en los años 2014, 2015 y 2016, y **3)** un taller de trabajo con guías de turismo.

En el año 2015, se censaron 29.122 elefantes marinos (14.592 hembras, 11.414 crías, 1.747 machos, 1.322 crías destetadas y 47 juveniles), el 92% distribuido en Península Valdés, donde la mayor concentración de individuos fue hacia el sudeste, según las herramientas de estadística espacial utilizadas (centro medio y elipse de desviación estándar). El 8% restante se localizó fuera de la península, específicamente en Punta Ninfas, Punta León, Bajo los huesos, Isla Escondida y Dos Pozos. Mediante la elipse se diferenciaron, en todo el rango de distribución, los límites georeferenciados de tres zonas con diferentes densidades de elefantes marinos. Dentro de Península Valdés, zona norte (desde Punta Buenos Aires hasta la porción inicial de Caleta Valdés) y zona núcleo (desde Caleta Valdés hasta Morro Nuevo), cuyas densidades fueron 34 y 215 elefantes marinos por kilómetro lineal de costa

(elefantes marinos/km), respectivamente. Fuera de Península Valdés, la zona sur incluyó a Punta Ninfas, Punta León, Bajo los huesos, Isla Escondida y Dos Pozos. Las densidades fueron: 41 elefantes marinos/km en el sector Puntas Ninfas – Punta León, 26 individuos/km entre Punta León y Bajo los huesos, 25 individuos/km en Isla Escondida y 14 individuos/km en Dos Pozos. Los dos últimos sitios representarían áreas nuevas de distribución, porque hasta el momento no hay datos publicados sobre presencia previa de elefantes marinos, como tampoco se hallaron restos de esta especie en el registro arqueológico. Durante la temporada 2015, se observó que la proporción de hembras y machos respecto al total de elefantes marinos contados fue diferente en cada sector ($\chi^2_{0,05; 4} = 241,04$, $p < 0,0001$). Fuera de Península Valdés, la proporción de hembras fue menor que en la península (en Dos Pozos, el 41% fueron hembras y en Península Valdés las hembras representaron el 50%), y la proporción de machos fue mayor (20% en Dos Pozos y 5% en la península). La forma de agrupamiento de los machos varió según el sector de costa ($\chi^2_{0,05; 4} = 43,69$, $p < 0,0001$). En Península Valdés y en los sectores Punta Ninfas – Punta León y Punta León - Bajo los huesos, la mayoría de los machos estuvieron agrupados (77, 65 y 65%, respectivamente), en Isla

Escondida la proporción de machos agrupados y no agrupados comenzó a equipararse (55% agrupados y 45% no agrupados o solitarios), mientras que en Dos Pozos el 64% eran machos solitarios. Entre 2001 y 2015 se observaron cambios en la distribución del elefante marino en Península Valdés. En la zona norte, el número total de elefantes marinos disminuyó de 4.309 individuos en 2001 a 3.366 en el año 2015 (disminución del 22%) y al comparar el número de animales distribuidos en segmentos de 2 km, se observaron diferencias significativas entre años (Prueba pareada de Wilcoxon: $T = 1690,5$, $p = 0,004$). Contrariamente, en la zona núcleo el número total de elefantes marinos varió de 20.900 en 2001 a 23.341 individuos en 2015, sin diferencias significativas entre años respecto al número de elefantes marinos distribuidos en 2 km. Durante el período 2001-2015, se detectaron cambios en la estructura social reproductiva a pesar de ser un periodo de relativa estabilidad poblacional. Dichos cambios fueron diferentes según la zona: **A)** en la zona norte, hubo una disminución anual en el número de machos (Pendiente regresión lineal = -0,02, $p = 0,007$) y de crías (Pendiente regresión lineal = -0,01, $p = 0,001$), **B)** en la zona núcleo el número de machos se mantuvo relativamente constante (Pendiente regresión lineal = -0,002, $p = 0,46$) y el número de crías

incrementó (Pendiente regresión lineal = 0,01, $p = 0,0001$), y C) en la zona sur (sólo se incluyó a Punta Ninfas y Punta León) no se observaron diferencias significativas en el número de machos (Pendiente regresión lineal = -0,02, $p = 0,08$) y el número anual de crías aumentó (Pendiente regresión lineal = 0,02, $p = 0,01$). Los cambios de distribución del elefante marino dentro de Península Valdés y su expansión por fuera de la misma en dirección sur, podrían ser promovidos por la interacción conjunta de la competencia intraespecífica e interespecífica. Dichos factores podrían afectar el éxito reproductivo de los individuos, haciendo que se dispersen hacia otros sitios, y en el caso del establecimiento en nuevas áreas, los individuos más jóvenes podrían ser el componente fundador.

En las zonas norte, núcleo y sur, caracterizadas por su tendencia y estructura social, se llevan a cabo excursiones regulares para realizar el avistaje de fauna. Los resultados demostraron que el guía de turismo tiene en cuenta diversos factores para organizar dichas excursiones dentro de Península Valdés (horario del avistaje embarcado de ballenas, sitio para almorzar, estado de la marea, fauna presente según la época del año) y que priorizan el avistaje de ballenas, siendo el elefante un recurso turístico secundario. En cambio, durante

las excursiones regulares en Punta Ninfas e Isla Escondida (fuera de Península Valdés) el elefante marino adquiere protagonismo. Otro resultado que surge del estudio es que durante las excursiones regulares los guías de turismo le dan mayor relevancia a temáticas vinculadas con la biología del elefante marino, y no tanto a los aspectos sobre su conservación y la del ambiente marino.

Tanto turistas como guías de turismo manifestaron que el avistaje de fauna es el principal motivo de la visita a Península Valdés y que las especies más convocantes son la ballena y el pingüino, mientras que el elefante marino tiene un lugar secundario dentro de las expectativas de los turistas. A pesar de esto, la experiencia de observar a estos animales en su hábitat fue, en general, satisfactoria para los turistas, y la especie generó en ellos asombro, interés en conocer más sobre su biología y comportamiento, y es percibido como un animal atractivo. Los turistas indicaron estar satisfechos con la información recibida, el número de personas durante el avistaje y con la duración de dicha actividad en Caleta Valdés y en Punta Delgada, ambos accesos ubicados en la zona núcleo. Sin embargo, expresaron mayor satisfacción en Punta Delgada con la cantidad de elefantes marinos y con la distancia de observación en relación a

Caleta Valdés. Turistas y guías coincidieron que la observación de elefantes marinos en Punta Ninfas e Isla Escondida fue satisfactoria. Se destaca que el grado de satisfacción de los turistas durante el avistaje de fauna está influenciado por aspectos vinculados con la especie en cuestión y por factores contextuales, información relevante para planificar las actividades turísticas y maximizar la satisfacción del turista, haciendo que éste recomiende y/o repita su experiencia. Por otro lado, se elaboraron recomendaciones para mejorar la experiencia de avistaje del elefante marino, basadas en las sugerencias e intereses de turistas y guías, que, en general, se relacionaron con los servicios ofrecidos, infraestructura, información brindada y capacitaciones. Se plasmaron los resultados del dominio biofísico y

social en el marco de un sistema socio – ecológico para analizar la información ya obtenida bajo una mirada interdisciplinaria. Esto permitió identificar faltantes de información y adaptar el sistema a nuevas presiones que afectan a los elefantes marinos. De este modo, se podrá compatibilizar la protección del elefante marino y el desarrollo turístico, aplicando un enfoque novedoso para el manejo del sistema, que tantas implicancias tiene para la economía local. En este sentido, esperamos que este estudio sea un aporte para alcanzar dicho objetivo.

PALABRAS CLAVE: avistaje de fauna, conservación, distribución espacial, elefante marino del sur, Península Valdés, percepciones en turismo.

Tesis de Doctorado

Efecto del estrés físico y el calentamiento global sobre gasterópodos marinos de costas rocosas patagónicas

Physical stress and global warming effects in Patagonian rocky intertidal gastropods

Tesista: Rocío Aimé Nieto Vilela

Directores: Federico Márquez, Sebastián Jesús Giulianelli

Carrera: Doctorado en Ciencias Biológicas

Lugar de realización: Puerto Madryn

Defendida de manera virtual: 28/5/2020

Número de páginas totales de la Tesis: 174

RESUMEN

Todos los sistemas marinos costeros son vitales tanto desde una perspectiva ecológica como por sus aportes socioeconómicos (Harley *et al*, 2006). En la Argentina el sistema costero Patagónico alberga una gran biodiversidad de invertebrados marinos, que son el sustento trófico de aves y otros vertebrados marinos (Yorio *et al*, 1998; Rechimont, 2011). Dentro de los sistemas intermareales, se encuentran ensambles de invertebrados que se exponen a un gradiente de condiciones físicas durante cada ciclo de marea (Denny y Wetthey, 2001). Las poblaciones de gasterópodos que tienen una distribución tanto intermareal como submareal, se encuentran expuestos a diferentes tipos de

estrés ambiental modelando distintas respuestas adaptativas. Sin embargo, el calentamiento climático global a través de las modificaciones predichas en las condiciones físicas, tales como la acidificación y el aumento de la temperatura del mar, pueden afectar a los invertebrados marinos (Haugan, 1997; Feely *et al*, 2004; Roessing *et al*, 2005; Harley *et al*, 2006; Guinottea y Fabry, 2008; Collins *et al*, 2013). Numerosos organismos marinos presentan variaciones de forma y tamaño para hacer frente a estas presiones ambientales (Pöhlmann *et al*, 2011; Márquez, 2015). Fisiológicamente también pueden desarrollar defensas contra perturbaciones físicas, un ejemplo está dado por las proteínas de choque térmico (*Heat shock*

protein, Hsp por sus siglas en inglés) (Parsell y Lindquist, 1993; Tomanek y Zuzow, 2010). Particularmente las Hsp70 son un grupo conservado que actúan como chaperonas manteniendo la estabilidad molecular de las proteínas celulares (Pöhlmann *et al*, 2011). Cada organismo expuesto a estrés sintetiza rápidamente proteínas de choque térmico, las cuales pueden condicionar su distribución en el intermareal (Somero, 2002; Tomanek y Zuzow, 2010; Pöhlmann *et al*, 2011). Para poder evidenciar y predecir el grado de estrés físico y la tolerancia a escenarios futuros que tendrían los moluscos con distribuciones intermareales y submareales de Patagonia, se planteó el siguiente objetivo general: estudiar las respuestas morfométricas y fisiológicas de

dos especies de gasterópodos marinos que habitan sitios con distintos grados de estrés físico ambiental en costas de Norpatagonia Argentina y evaluar las potenciales variaciones morfométricas y fisiológicas a temperaturas que simulen un escenario de cambio climático global. Se seleccionaron dos especies que cumplieran roles ecológicos diferentes, de amplia distribución y fácil manipulación. Se trabajó con una especie herbívora de desarrollo indirecto *Tegula patagonica* y otra carnívora de desarrollo directo *Trophon geversianus*. Se realizaron muestreos estacionales en el inter (IN) y submareal (SUB) de tres localidades dentro de un gradiente latitudinal (Figura 1).

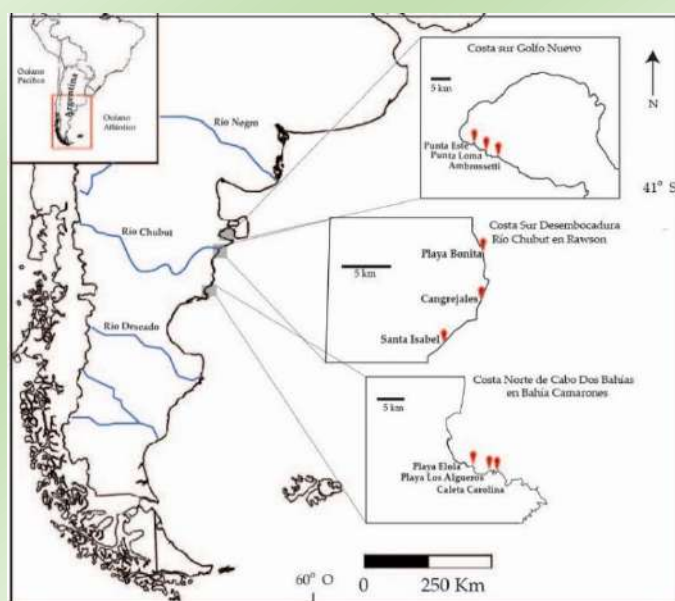


Figura 1. Localización geográfica de los sitios de muestreo de cada localidad: Punta Este, Punta Loma y Ambrossetti en la Costa Sur del Golfo Nuevo (GN). Playa Bonita, Cangrejales y Santa Isabel en la Costa Sur Desembocadura Río Chubut en Rawson (RW). Elola, Algueros y Caleta Carolina en la Costa Norte de Cabo Dos Bahías en Bahía Camarones (BC).

Figure 1. Sampling sites: Punta Este, Punta Loma and Ambrossetti on the South Coast of Golfo Nuevo (GN). Playa Bonita, Cangrejales and Santa Isabel on the South Coast of Chubut River in Rawson (RW). Elola, Algueros and Caleta Carolina on the North Coast of Cabo Dos Bahías in Bahía Camarones (BC).

Inicialmente, se analizó el estrés ambiental dentro y entre localidades, asociando las características ambientales encontradas a la latitud y la geomorfología de las costas donde se realizaron las mediciones.

Posteriormente, se estudió el patrón de variación morfológica de las especies, mediante el uso de morfometría geométrica y clásica. Se comparó la variación en la micro escala (inter y submareal) y macroescala (entre los sitios en un gradiente latitudinal) geográfica. Complementariamente, se determinó el grado de estrés fisiológico basal presente en los ejemplares de cada sitio, determinando la expresión de proteínas Hsp70 mediante la técnica de Western

blot. Finalmente, se seleccionó la especie de desarrollo directo que se encuentra en abundancia tanto en el intermareal como en el submareal (*T. geversianus*), para evaluar experimentalmente los efectos fisiológicos y morfológicos en un escenario de calentamiento climático. Para eso, por un lado se trabajó con adultos del intermareal (IN) y submareal (SUB), determinando la tasa de síntesis de Hsp70 frente al incremento de temperatura esperado para el 2100. Por otro lado, se recolectaron ovicápsulas del SUB y se las expuso a distintas temperaturas para evaluar el cambio de forma de la concha al eclosionar. Se encontraron diferencias significativas en el nivel de estrés físico entre las localidades relacionadas

principalmente con la latitud y la geomorfología de cada costa en términos de exposición al estrés. La localidad de mayor estrés físico fue la costa expuesta a mar abierto, ubicada en una latitud media. Analizando la forma de la concha, se encontró que *T. geversianus* presenta menor variación que *T. patagonica*, pero estructurada en función al sitio y los

niveles de donde provenían los individuos. En cada caso, la influencia de las escalas fue diferente, *T. geversianus* mostró una gran separación en forma en una micro escala (inter y submareal), corroborando la presencia de dos ecomorfotipos para esta especie en la costa sur del Golfo Nuevo y ampliando su presencia a las otras localidades muestreadas (Figura 2).

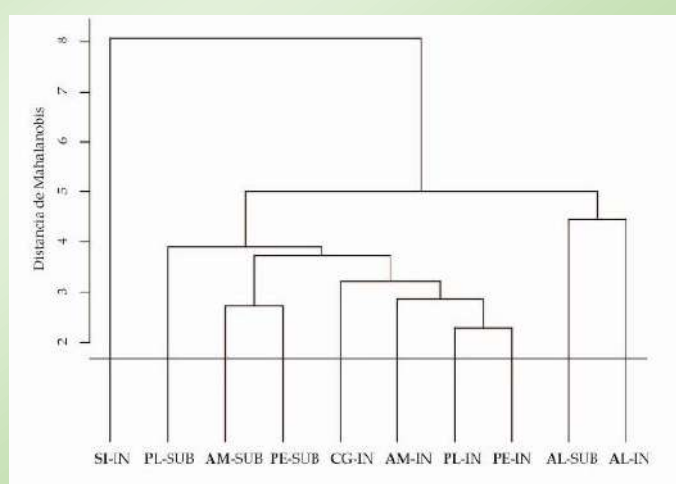


Figura 2. *Trophon geversianus*: Análisis de conglomerado jerárquico UPGMA sobre las distancias de Mahalanobis, con los componentes principales de todos los sitios. El criterio de corte ($p < 0.05$) se indica con una línea horizontal. Abreviaturas: SI: Santa Isabel, PL: Punta Loma, AM: Ambrossetti, PE: Punta Este, CG: Cangrejales, AL: Algüeros.

Figure 2. *Trophon geversianus*: UPGMA hierarchical cluster analysis over Mahalanobis distances, with principal components from all sites. The cutoff criterion ($p < 0.05$) is indicated by a horizontal line. Abbreviations: SI: Santa Isabel, PL: Punta Loma, AM: Ambrossetti, PE: Punta Este, CG: Cangrejales, AL: Algüeros.

A macroescala se encontró un patrón de variación latitudinal, evidenciándose una menor variación en forma entre los submareales. En cambio, *T. patagonica* no

presentó diferencias a microescala y sí a macroescala, aunque sin un patrón latitudinal (Figura 3).

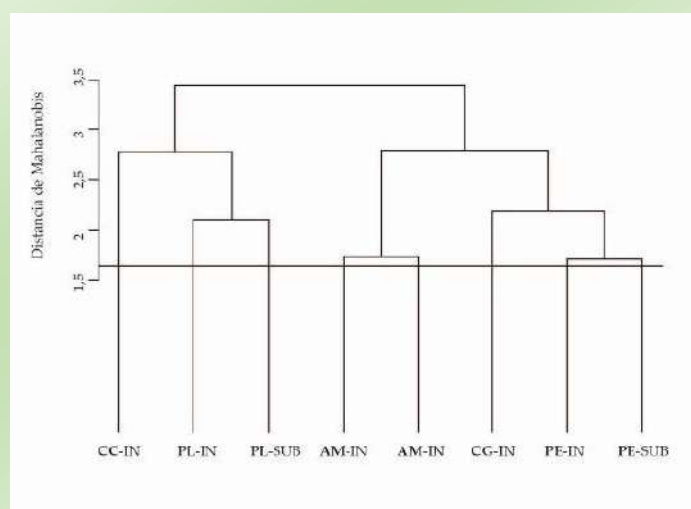


Figura 3. *Tegula patagonica*: Análisis de conglomerado jerárquico UPGMA sobre las distancias de Mahalanobis, con los componentes principales de todos los sitios. El criterio de corte ($p < 0.05$) se indica con una línea horizontal. Abreviaturas: CC: Caleta Carolina, PL: Punta Loma, AM: Ambrossetti, CG: Cangrejales, PE: Punta Este.

Figure 3. *Tegula patagonica*: UPGMA hierarchical conglomerate analysis over the Mahalanobis distances, with the principal components of all sites. The cutoff criterion ($p < 0.05$) is indicated by a horizontal line. Abbreviations: CC: Caleta Carolina, PL: Punta Loma, AM: Ambrossetti, CG: Cangrejales, PE: Punta Este.

En el análisis fisiológico, se encontró un perfil de expresión de Hsp70 diferencial entre las dos especies estudiadas. Para *T. geversianus*, el factor de estrés entre niveles fue determinante en la expresión de Hsp70, registrándose los valores más

elevados en el IN. Al comparar la expresión de Hsp70 entre distintos intermareales en diferentes épocas del año, se encontraron diferencias significativas entre las localidades, observando una menor expresión de Hsp70 en los individuos obtenidos de la localidad de menor estrés (Figura 4).

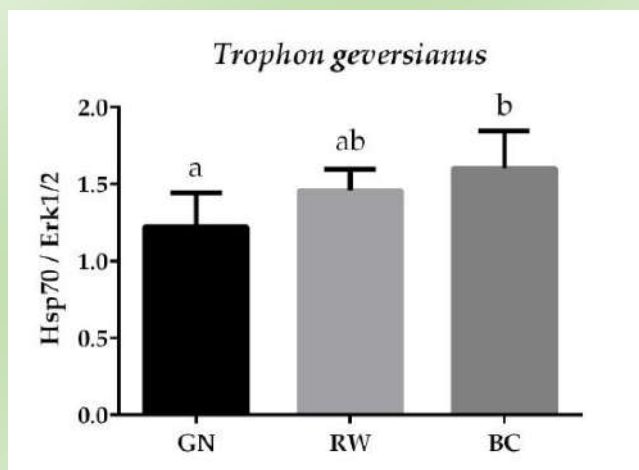


Figura 4. Niveles de expresión Hsp70 en gónada de *Trophon geversianus*, sobre muestras recolectadas en el IN durante las temporadas de verano e invierno en GN, RW y BC. Los graficos resumen la expresion de Hsp70 en 3-5 muestras independientes (media±DS). Letras distintas hacen referencia a diferencias significativas entre las medias de las localidades, con un $p < 0,05$ correspondiente a una prueba a posteriori de Tukey.

Figure 4. Hsp70 expression levels in *Trophon geversianus* gonad, on IN samples collected during the summer and winter seasons in GN, RW and BC. The graphs summarize the expression of Hsp70 in 3-5 independent samples (mean ± SD). Different letters refer to significant differences between the means of the localities, with a $p < 0.05$ corresponding to a Tukey a posteriori test.

Por el contrario, para *T. patagonica* no se observaron diferencias de expresión de Hsp70 entre niveles. Solo respondió de

manera distinta entre los intermareales en una macro escala, aunque sin un patrón latitudinal (Figura 5).

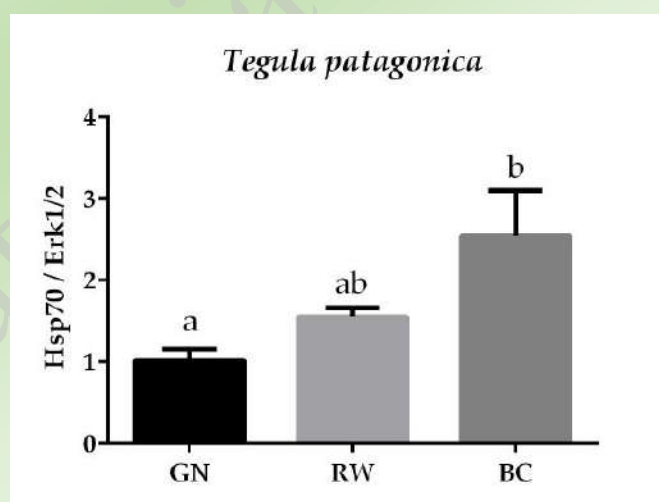


Figura 5. Niveles de expresión Hsp70 en gónada de *Tegula patagonica*, sobre muestras recolectadas en el IN durante las temporadas de verano e invierno en GN, RW y BC. Los graficos resumen la expresion de Hsp70 en 3-5 muestras independientes (media±DS). Letras distintas hacen referencia a diferencias significativas entre las medias de las localidades, con un $p < 0,05$ correspondiente a una prueba a posteriori de Tukey.

Figure 5. Hsp70 expression levels in *Tegula patagonica* gonad, on IN samples collected during the summer and winter seasons in GN, RW and BC. The graphs summarize the expression of Hsp70 in 3-5 independent samples (mean ± SD). Different letters refer to significant differences between the means of the localities, with a $p < 0.05$ corresponding to a Tukey a posteriori test.

Finalmente, en las experiencias que simularon un escenario de calentamiento climático, los resultados sugieren que frente al incremento de 4 °C en la temperatura del agua, los ejemplares de *T. geversianus* que habitan el IN tendrían una mayor capacidad de responder

fisiológicamente a dicho incremento, frente a los individuos que habitan en el SUB. Por otro lado, se encontró que *T. geversianus* presenta plasticidad fenotípica en la etapa de juveniles frente a variaciones en la temperatura del agua (Figura 4).

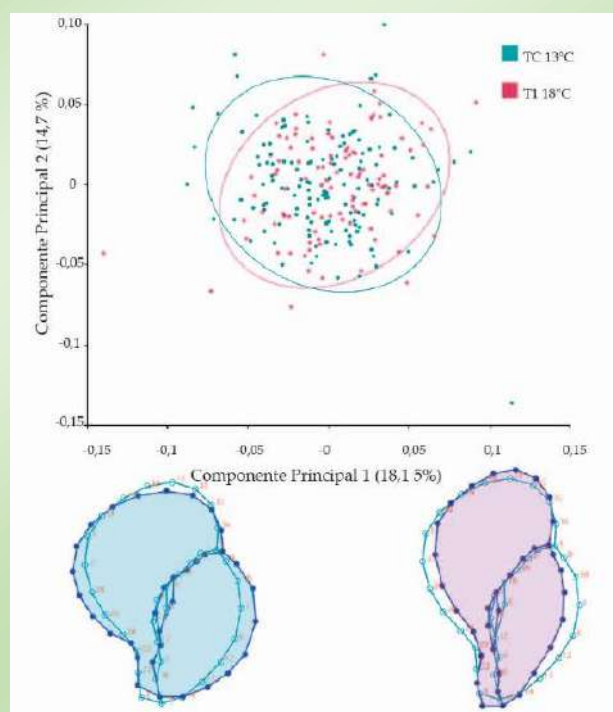


Figura 6. Gráfico de dispersión entre los dos primeros componentes principales (CP1 vs CP2). Las elipses representan el 90% de confianza alrededor de la forma media de los tratamientos. Entre paréntesis se encuentra el porcentaje de la variación explicada por cada eje. Los gráficos inferiores representan los extremos de variación con un factor de escala de -0,15 y 0,15 respectivamente. En ambos casos se muestra la deformación en color en comparación a la forma consenso de polígono celeste. Abreviaturas: TC: Tratamiento Control, T1: Tratamiento uno.

Figure 6. Dispersion plot between principal components 1 and 2 (CP1 vs CP2). The ellipses represent the 90% of confidence around the mean shape of the treatments. In parentheses is the percentage of the variation explained by each axis. The lower graphs represent the extremes of variation with a scale factor of -0.15 and 0.15 respectively. In both cases the deformation is shown in color compared to the consensus form of a celestial polygon. Abbreviations: TC: Control Treatment, T1: Treatment one.

Discutiendo los resultados obtenidos, postulamos que los gasterópodos estudiados presentan diferentes adaptaciones al estrés ambiental, relacionadas con las condiciones físicas a

las que se encuentran expuestos y al sitio de donde provienen. En el caso de *T. geversianus* se encontraron diferencias tanto en su morfología como en su fisiología en una micro escala geográfica.

Debido a que el tamaño corporal de los gasterópodos influye en el equilibrio térmico (Helmuth, 1998), se relacionó la variación intraespecífica de las tallas con el grado de tolerancia a elevadas temperaturas. Además, la variación en la forma de las conchas de los ejemplares que habitan en los intermareales y submareales muestreados, indicaron una separación en dos ecomorfotipos. A su vez, analizando la respuesta fisiológica a la variación de la temperatura, también se encontraron diferencias entre los organismos del IN y SUB. Los individuos del IN presentaron un nivel elevado de proteínas Hsp70, en cada sitio muestreado, independientemente de la estación, en contraste a los ejemplares del SUB. Cuando se comparó la expresión de dicha proteína en una macroescala, la diferencia dependió de la localidad. Por otra parte, *T. patagonica* no presentó variación en la forma de la concha frente a un estrés diferencial entre los niveles, así como tampoco diferencias latitudinales. Al encontrarse distribuida en el IN bajo y el SUB, la ausencia de diferenciación entre los niveles puede presentar dos vías de explicación. Primero puede deberse a que los individuos presentes en el IN sean de origen SUB o debido a que su reproducción es mediante la presencia de larvas y con fecundación externa, por lo que existe mayor flujo de genes entre los

ejemplares de los distintos niveles. A su vez, la expresión de las proteínas Hsp70 en *T. patagonica* entre los niveles IN y SUB no mostró diferencias, solamente el grado de estrés ambiental entre los intermareales fue el factor determinante en la expresión de dicha proteína. Esto sería un indicador, de que las pocas horas que los individuos de esta especie pasan expuestos en el IN, no son suficientes para que la diferencia en el gradiente físico con el SUB demande cambios morfológicos o fisiológicos significativos. Finalmente, en los experimentos realizados para determinar la tolerancia de *T. geversianus* a escenarios térmicos de cambio climático futuro, se pudo determinar que los ejemplares que se encuentran expuestos frecuentemente a condiciones de estrés tienen una defensa térmica más efectiva. Complementariamente, analizando los potenciales cambios en la forma de la concha en embriones debidos a los potenciales efectos del calentamiento climático, se encontró que *T. geversianus* presenta plasticidad fenotípica frente al incremento de temperatura. Asimismo, *T. geversianus*, presentó variaciones fisiológicas y morfológicas diferenciales entre los niveles IN y SUB. Dichas variaciones, podrían ser la respuesta a su abundancia en ambientes con distintos niveles de estrés como los intermareales presentes a distintas latitudes. En

contraposición, *T. patagonica* mostró una defensa antiestrés deficiente en términos fisiológicos y morfológicos estudiados. Demostrando que su distribución en la

zona baja del IN y su mayor abundancia en el SUB, serían los indicadores de una respuesta menos satisfactoria a ambientes estresantes.

BIBLIOGRAFIA

- Collins, M.; Knutti, R.; Arblaster, J.; Dufresne, J.L.; Fichefet, T.; Friedlingstein, P. *et al.* (2013) Long-term climate change: Projections, commitments and irreversibility. In: Climate change 2013: The physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change (eds. Stocker, TF, Qin, D, Plattner, GK, Tignor, M, Allen, SK, Boschung, J *et al.*). *Camb. Un. Press.*, **1**: 1029-1136.
- Denny, M.W. & Wethey, D.S. 2001. Physical processes that generate patterns in marine communities. In: Marine Community Ecology (eds. Bertness, MD, Gaines, SD & Hay, ME). Sinauer Associates Inc. Sunderland, **1**: 3-37.
- Feely, R.A.; Sabine, C.L.; Lee, K.; Berelson, W.; Kleypas, J.; Fabry, V.J. *et al.* (2004). Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans. *Science*, **305**: 362-366
- Guinotte, J.M. & Fabry, V.J. (2008). Ocean acidification and its potential effects on marine ecosystems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1134**: 320-342.
- Harley, C. (2007). Zonation. In: Encyclopedia of tidepools and rocky shores. (eds. Denny, MW & Gaines, SD). University of California Press Berkeley, California, USA, **1**: 647-653.
- Haugan, P.M. (1997). Impacts on the marine environment from direct and indirect ocean storage of CO₂. *Waste Man.*, **17**: 323-327.
- Helmuth, B.S.T. (1998). Intertidal mussel microclimates: predicting the body temperature of a sessile invertebrate. *Ecol. Monogr.*, **68**: 51-74.
- Márquez, F.; Nieto Vilela, R.A.; Lozada, M. & Bigatti, G. (2015). Morphological and behavioral differences in the gastropod *Trophon geversianus* associated to distinct environmental conditions, as revealed by a multidisciplinary approach. *J. Sea. Res.*, **95**: 239-247.
- Parsell, D.A. & Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.*, **27**: 437-496.
- Pöhlmann, K.; Koenigstein, S.; Alter, K.; Abele, D. & Held, C. (2011). Heat-shock response and antioxidant defense during air exposure in patagonian shallow-water limpets from different climatic habitats. *Cell Stress Chaperon.*, **16**: 621-632.
- Roessing, J.M.; Woodley, C.M.; Cech, J.J. & Hansen, L.J. (2005). Effects of global climate change on marine estuarine fishes and fisheries. (ed. Fund, WW). University of California Washington.
- Rechimont, M.E. (2011). Tesis de licenciatura: Patrón de distribución y abundancia de invertebrados bentónicos en costas del Golfo Nuevo. In: Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Puerto Madryn, Chubut.
- Somero, G. (2002). Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: Optima, limits, and costs of living. *Integr. Comp. Biol.*, **42**: 780-789.
- Tomanek, L. & Zuzow, M.L. (2010). The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance

limits and metabolic costs of thermal stress. *J. Exp. Biol.*, **213**: 3559-3574.

Yorio, P.; Bertellotti, M.; Garcia Borboroglu, P.; Carribero, A.; Giaccardi, M.; Lizurume, M.E. *et al.* (1998). Distribución reproductiva y abundancia de

las aves marinas de Chubut. Parte I: de Península Valdés a Islas Blancas. In: Atlas de la distribución reproductiva de aves marinas en el litoral patagónico argentino. Fundación Patagonia Natural, **1**: 39-74.

Naturalia Patagónica

Tesis de Doctorado

Histología de la afección de *Phytophthora austrocedri* en los tejidos de conducción de *Austrocedrus chilensis*

Histology of *Austrocedrus chilensis* conduction tissues affected by *Phytophthora austrocedri*

Tesista: Oscar Troncoso

Directora: Dra. Dra. Alina Greslebin, **Co-Directora:** Dra. Beatriz Galati

Carrera: Doctorado en Ciencias Biológicas

Lugar de realización: Facultad de Ciencias Naturales y de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Esquel.

Fecha de defensa: 11 de mayo de 2018.

Número total de páginas de la Tesis: 119 páginas.

RESUMEN

El "Ciprés de la Cordillera" [*Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Ser. et Bizzarri] es una conífera nativa del Bosque Subantártico de Chile y Argentina, que pertenece a la familia de las Cupresáceas (subfamilia Callitroideae tribu Libocedreae). Su área de distribución se encuentra a ambos lados de la Cordillera de los Andes, entre Neuquén y Chubut del lado argentino. Desde un punto de vista económico reviste gran importancia por la calidad de su madera, muy apreciada tanto para la construcción como para la fabricación de muebles. Mientras que ecológicamente tiene un alto valor porque es una especie capaz de formar bosques en la zona ecotonal y adentrarse en la estepa.

Sin embargo su rol ecológico y socioeconómico se ve negativamente afectado por una enfermedad que causa el debilitamiento de las raíces y la muerte de los árboles. Esta enfermedad afecta a los bosques de ciprés de la cordillera desde hace varios años, y se observa en muchos sitios a lo largo de su área de distribución. *Phytophthora austrocedri* es un patógeno exótico causante primario de la enfermedad de *A. chilensis*. El síntoma distintivo de la afección por *P. austrocedri* en árboles naturalmente infectados es una lesión necrótica que se extiende desde las raíces muertas hacia el tronco, pudiendo alcanzar hasta 1 metro de altura por encima del suelo. La necrosis afecta al cambium, al floema y a la albura. Conocer

los cambios y alteraciones de los tejidos de conducción afectados por *P. austrocedri* en el ciprés de la cordillera, como así también cómo es el desarrollo del patógeno en dichos tejidos, son aspectos fundamentales para el entendimiento de la histopatología de la enfermedad. El presente trabajo se propuso como objetivo general contribuir al conocimiento del mecanismo de acción de *Phytophthora austrocedri* en la patología del ciprés de la cordillera y de la respuesta defensiva del árbol. Los objetivos particulares fueron los siguientes: a) estudiar y describir los tejidos de conducción afectados por *P. austrocedri*, b) analizar y describir las alteraciones, daños y/o malformaciones estructurales y funcionales producidas por el patógeno, c) relacionar las alteraciones observadas con la sintomatología del “Mal del Ciprés” y con posibles respuestas defensivas. En esta investigación se seleccionaron árboles infectados

naturalmente con *P. austrocedri* y se inocularon artificialmente árboles jóvenes para el estudio de los tejidos de conducción. El cambium, el xilema y el floema afectados por *P. austrocedri* de todos los árboles en estudio fueron analizados y descriptos con microscopía óptica (MO) aplicando diferentes técnicas de histoquímica, y también con microscopía electrónica de barrido (MEB). Se analizaron y describieron las alteraciones, daños y/o deformaciones celulares y funcionales producidas por el patógeno, como así también se relacionaron las alteraciones observadas con posibles mecanismos de defensa y con la sintomatología del MDC. Se determinó que el primer tejido afectado por el patógeno es el cambium vascular, con una necrosis general del mismo que luego se extiende al floema y por último afecta al xilema (Figura 1).

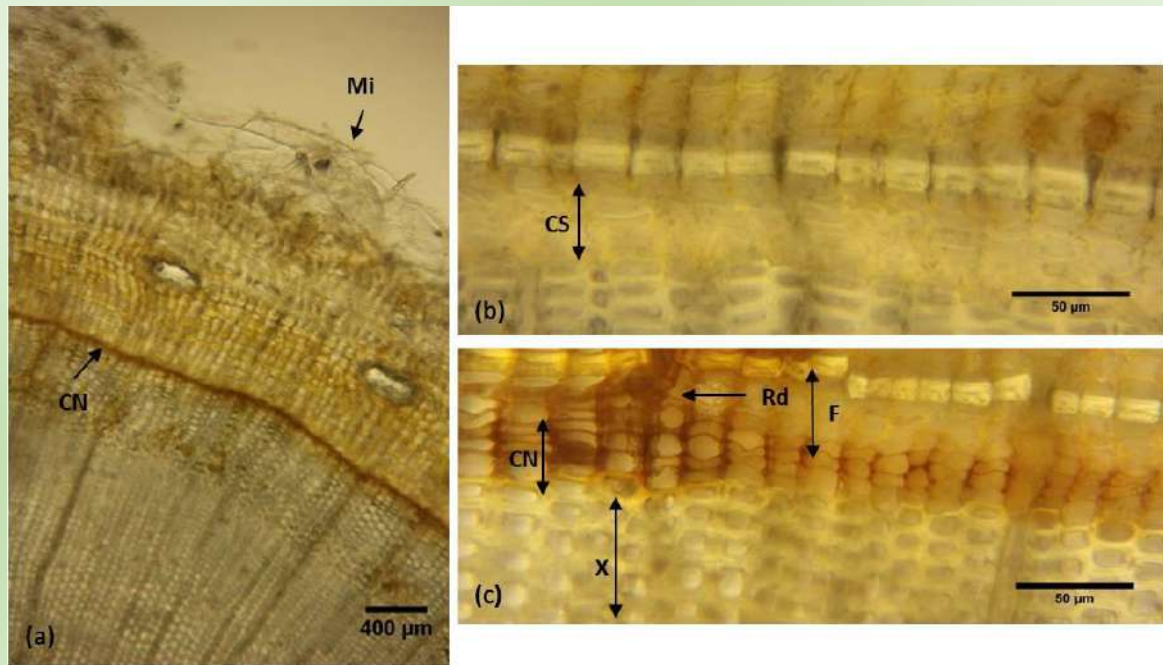


Figura 1. Sección transversal del tallo de planta de *Austrocedrus chilensis* de 8 años de edad, inoculada con *Phytophthora austrocedri* montaje en agua: (a) Necrosis generalizada del cambium vascular, caracterizada por su color marrón, se observa micelio sobre la zona de inoculación. (b) Detalle del cambium sano, con células de paredes amarillo hialina, rectangulares y turgentes. (c) Detalle del cambium afectado mostrando las paredes celulares necrosadas de color marrón y deformadas. También se observa el inicio de la necrosis sobre el tejido floemático, con un frente uniforme delimitado por los radios parenquimáticos (Rd). **Mi**=micelio; **CN**=cambium necrosado; **CS**=cambium sano; **F**=floema; **X**=xilema; **Rd**=rayos parenquimáticos.

Figure 1. Cross section of the 8-year-old *Austrocedrus chilensis* plant stem, inoculated with *Phytophthora austrocedri* mounting in water: (a) Generalized necrosis of the vascular cambium, characterized by its brown color, mycelium is observed over the inoculation area. (b) Detail of the healthy cambium, with cells with hyaline yellow, rectangular and turgid walls. (c) Detail of affected cambium showing deformed brown necrotic cell walls. The onset of necrosis is also observed on the phloem tissue, with a uniform front delimited by the parenchymal rays (Rd). **Mi** = mycelium; **CN** = necrotic cambium; **CS** = healthy cambium; **F** = phloem; **X** = xylem; **Rd** = parenchymal ray.

La reprogramación de las células cambiales origina canales resiníferos traumáticos, bolsones de resina en el floema, deformación de radios y traqueidas y producción de trabéculas en elementos conductores del xilema, como posibles mecanismos de defensa inducidos. Dentro de las modificaciones químicas se observó una mayor acumulación de compuestos fenólicos en células parenquimáticas y fibras del

floema, y una translocación y/o disminución del almidón en los radios xilemáticos y células subsidiarias de los canales resiníferos. La producción de resina fungistática de los canales resiníferos traumáticos es considerada también como una respuesta química del árbol frente al ataque del patógeno. Por otra parte se registró el mecanismo de desarrollo de *P. austrocedri* en ambos tejidos de conducción (Figura 2).

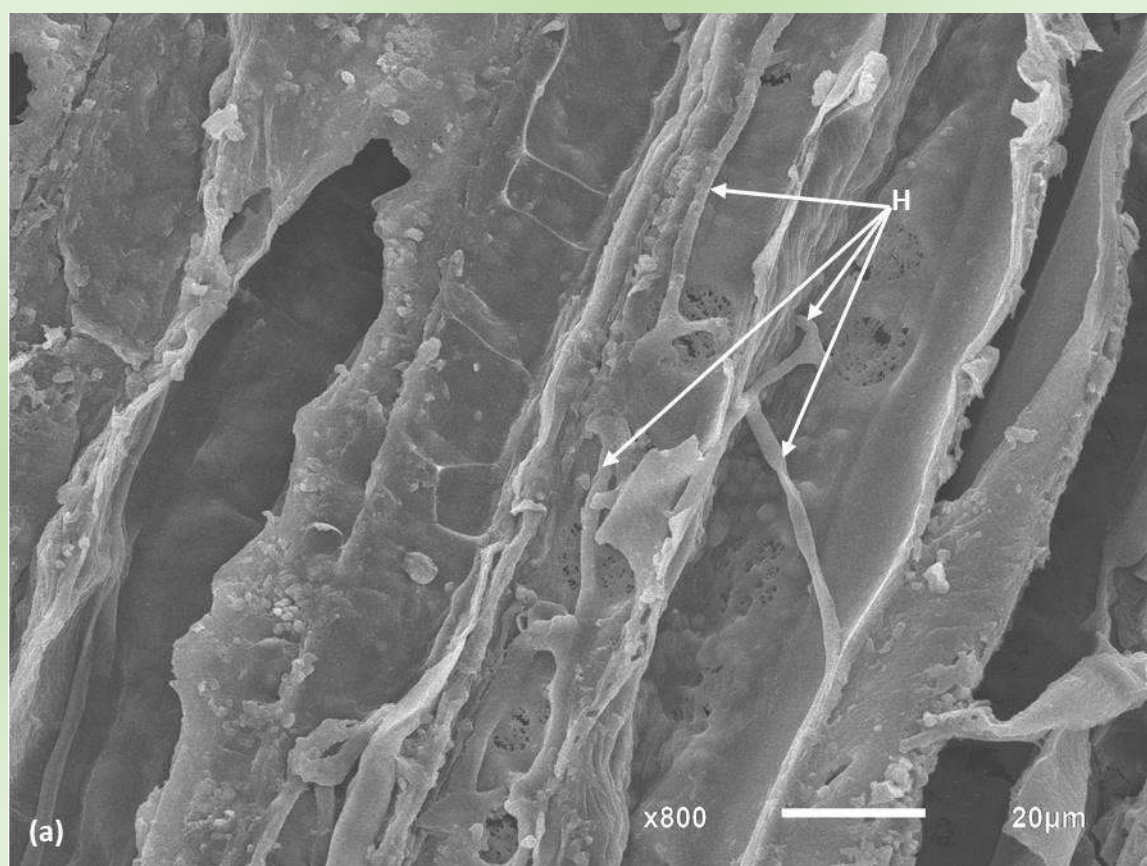


Figura 2. Sección longitudinal radial del floema de árbol adulto de *Austrocedrus chilensis* de 30cm de diámetro infectado naturalmente con *Phytophthora austrocedri*, técnica de splitting para MEB. Desarrollo de hifas de *P. austrocedri* en el tejido floemático. **(a)** Zona media de la lesión, desarrollo, ramificaciones y avance de *P. austrocedri* en sentido axial dentro de las células cribosas.

Figure 2. Radial section of the phloem of an adult *Austrocedrus chilensis* tree, 30cm in diameter, naturally infected with *Phytophthora austrocedri*, splitting technique for SEM. Development of hyphae of *P. austrocedri* in phloem tissue. **(a)** Middle zone of the lesion, development, ramifications and advance of *P. austrocedri* in an axial direction within the sieve cells.

Los resultados alcanzados en el presente estudio permitieron proponer el primer modelo histológico de la afección y desarrollo de *P. austrocedri* en los tejidos de conducción del ciprés y relacionarlo con la sintomatología de la enfermedad. A pesar de ello, los mecanismos por los cuales se desencadenan estas diferentes respuestas en los tejidos de conducción frente al ataque fúngico son aún

desconocidos. El modelo histológico aquí planteado será de gran utilidad para conocer y comprender estos mecanismos de defensa, y los de resistencia natural frente a este patógeno, y de esta forma avanzar en la formulación de productos y metodologías concretas para el control de la enfermedad.

PALABRAS CLAVE: Ciprés, Xilema, Floema, Histología, Phytophthora

PUBLICACIONES:

Troncoso, O., & Greslebin, A. (2018). Trabeculae in Patagonian mountain cypress (*Austrocedrus chilensis*) associated with *Phytophthora austrocedri* infection. IAWA journal, 39(2), 209-220.

Troncoso, O.; Greslebin A.G.; & Vélez M.L. (2014). Histopathology of *Phytophthora austrocedri* in *Austrocedrus chilensis*. The 7th Meeting of the International Union of Forest Research Organizations IUFRO Working Party 7.02.09. Phytophthora in Forests & Natural

Ecosystems 9th - 14th November, Esquel, Argentina

Troncoso, O.; Greslebin A. G.; Vélez M. L. y Galatti B. (2013). Alteración estructural del xilema de *Austrocedrus chilensis* afectado por *Phytophthora austrocedrae* XXXIV Jornadas Argentinas de Botánica, del 02 al 06 de septiembre. La Plata Buenos Aires.

Troncoso, O.; Greslebin A. G. Histopathology of *Austrocedrus chilensis* trees infected with *Phytophthora austrocedri* (En preparación).

Tesis de Doctorado

Búsqueda de metabolitos bioactivos con aplicación farmacéutica en *Undaria pinnatifida* (Alariaceae), un alga parda invasora de las costas patagónicas argentinas.

Search for bioactive metabolites with pharmaceutical application in *Undaria pinnatifida* (Alariaceae), an invasive brown algae from the patagonian coast of Argentina.

Tesista: Farm. Miriam Delma Escobar Daza.

Director: Dr. Osvaldo León Córdoba (Química Biológica II, FCNyCS, UNPSJB).

Codirector: Dra. María Luján Flores (Farmacognosia, FCNyCS, UNPSJB).

Tesis para obtener el título de: Doctor en Farmacia de la FCNyCS, UNPSJB.

Lugar de realización: Departamento de Farmacia, Farmacognosia, dependencias del Grupo de Investigación en Química, Bioactividad y Metabolismo de Recursos Naturales Patagónicos y del Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico Tecnológico (GQBMRNP- CREDECIT), de la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud (FCNyCS) de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB).

Lugar de presentación: FCNyCS, UNPSJB. Fecha de defensa: 6 de mayo 2019, calificación Sobresaliente 10 (diez). Número total de páginas de tesis: 334.

Palabras Claves: Undaria, Invasora, Patagonicas.

Undaria pinnatifida (Alariaceae) es un alga bentónicas, alóctona de la costa patagónica argentina, que pertenece a la Clase Phaeophyceae, División Heterokontophyta, Cromophyta o Chromista, es un género heteromórfico, alternando entre una fase gametofítica microscópica y una fase esporofítica macroscópica. Es marcadamente anual en su rango nativo de distribución (China,

Corea y Japón), aunque en algunas regiones donde ha invadido, como las costas del norte de la Patagonia Argentina o las de Nueva Zelanda, el ciclo parece ser menos definido, y el reclutamiento y posterior desarrollo de los esporofitos puede ocurrir durante todo el año.

En Argentina los primeros ejemplares macroscópicos se detectaron por primera vez en 1992 en el Golfo Nuevo (Chubut,

Patagonia Argentina), donde su ingreso fue atribuido al transporte por medio del agua de lastre de buques internacionales (Piriz y Casas, 1994). Desde su introducción en las costas patagónicas, *U. pinnatifida* se dispersó relativamente rápido dentro de los límites del Golfo Nuevo y las poblaciones aumentaron su densidad. Esto podría haber generado un área "donante" desde la cual la especie se pudiera propagar hacia el sur y norte del área de introducción. En la primavera de 2008 fue detectada en Comodoro Rivadavia, centro del Golfo San Jorge, a 439 km al sur del Golfo Nuevo, observándose los primeros ejemplares maduros, de escasa población (experiencia personal en investigaciones previas al trabajo de tesis).

La temperatura es uno de los factores ambientales que está relacionado con el desarrollo de las diferentes fases de su ciclo de vida, permitiendo en las costas de Argentina un reclutamiento constante a lo largo del año.

Las macroalgas se han utilizado desde la antigüedad en el tratamiento de diversas enfermedades y se han empleado como apósitos y ungüentos.

Estos organismos son abundantes en las zonas intermareales, habiendo desarrollado diferentes habilidades y capacidades adaptativas debido al estrés ambiental al que están sometidos

constantemente. En este contexto, los factores abióticos, adaptación a nuevos hábitats, interrelación entre especies, entre otros, determinan en gran parte la síntesis metabólica y por ende el crecimiento, reproducción y supervivencia de las macroalgas.

Durante la biosíntesis, se sintetizan metabolitos con importante actividad biológica los cuales tienen potencial terapéutico.

El objetivo principal de la Tesis de Doctorado fue demostrar el potencial de las frondas de *U. pinnatifida* mediante su estudio integral, ensayos de bioactividad y aplicación de los productos obtenidos a formulaciones farmacéuticas.

El estudio integral implicó la colecta de ejemplares de dos zonas del Golfo San Jorge, Bahía Bustamante durante la primavera del 2008 y en Comodoro Rivadavia colectado estacionalmente en las costas de Km 4, correspondientes a la región central del Golfo, durante la primavera del 2010 y verano, otoño e invierno del 2011, con registros en el Herbario Regional Patagónico (HRP) N° 7656 correspondiente a Bahía Bustamante y 7096, 7162, 7163, 7164 para la colecta estacional, respectivamente.

Las características macroscópicas permitieron establecer estructuras de la fase esporofítica como estipe, esporofilo (órgano reproductor), frondas pinnadas y

nervadura central, siendo las frondas la estructura principal de estudio.

Para el análisis preliminar se efectuó una extracción de las frondas secas molidas y tamizadas con etanol de 96° con posterior fraccionado mediante cambios de pH y partición con solventes de distinta polaridad.

El screening ficoquímico sobre el extracto total y las fracciones, mostraron la presencia en proporción importante, de péptidos y/o aminogrupos y compuestos fenólicos. Los alcaloides, si bien mostraron una menor proporción, su presencia debería ser considerada si se busca destinar el alga a la alimentación. El perfil lipídico reveló una complejidad de sus constituyentes, en las que se destacaron los ácidos grasos poliinsaturados y fosfatidilcolina (PC), marcador quimiotaxonómico, que confirmó la ubicación de *U. pinnatifida* dentro del orden Laminariales. Se destacó la presencia de fucoxantina, pigmento descrito con actividad antitumoral.

El ensayo de inhibición de crecimiento radicular que presume actividad antitumoral y la actividad antioxidante realizados sobre el extracto etanólico total, mostraron interesantes respuestas, las mismas atribuibles, al menos en parte, a la presencia de aminogrupos primarios y/o secundarios, compuestos fenólicos y fucoxantina.

Durante la colecta estacional se registraron los factores ambientales como la temperatura y salinidad que mostraron encontrarse dentro del rango de tolerancia de *U. pinnatifida*.

Mediante el análisis de microscopía óptica (MO), la presencia de pelos y cristales fueron caracteres morfológicos que constituyen un novedoso aporte al conocimiento integral de la especie que habita la región central del Golfo San Jorge.

El estudio histoquímico identificó y localizó los grupos químicos más relevantes como fenoles, lípidos y proteínas presentando variabilidad estacional y localización tisular.

La observación superficial mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), de fronda, esporofilo y nervadura de ejemplares colectados en primavera e invierno, contribuyó al conocimiento superficial de la especie.

Para el análisis exhaustivo se realizó una primera extracción, de las frondas secas, molidas y tamizadas, con etanol acuoso al 80 % v/v, a temperatura ambiente (EOH1), luego el marco fue sometido a una segunda extracción con el mismo solvente pero a 70 °C (EOH2) y con el marco remanente se realizó la extracción y purificación de alginato de sodio.

En el screening ficoquímico, los extractos EOH1 y EOH2, mostraron una importante

variación estacional y metodológica en cuanto a las proporciones de los metabolitos, entre los que se destacaron los polifenoles (fundamentalmente derivados del floroglucinol y quinonas), además de péptidos y/o aminogrupos 1° y 2°, esteroides, entre otros. Por cromatografía en capa delgada (TLC) se identificó la presencia de distintos pigmentos como fucoxantina y algunos metabolitos de grupos químicos destacados en el screening ficoquímico. La cuantificación de los grupos químicos mostró una variación estacional.

La obtención del NaAlg se efectuó usando una metodología práctica cuyo rendimiento mostró una variabilidad estacional con un mínimo de un 40 % en otoño y un máximo del 62 % en verano. La viscosidad aparente de las soluciones de alginato de las cuatro estaciones, mostraron valores interesantes desde el punto de vista de la conservación. La cuantificación mostró la presencia de grupos sulfatos y ácidos urónicos con variación estacional (mayor en verano), lo que se correlacionó con su peso molecular aparente (MWa). Las proteínas y los fenoles estuvieron presentes en todas las estaciones en bajas proporciones, siendo el producto de primavera y otoño el que presentó mayor purificación.

El perfil metabólico de los extractos EOH1 y EOH2 de primavera e invierno,

obtenido por ¹H-RMN determinó la presencia de manitol y alanina en todas las muestras en tanto que la glicina se detectó sólo en los extractos de invierno. El método analítico propuesto se puede considerar para identificar condiciones de estrés, tal como la deshidratación a la que está expuesta la especie en estudio.

La porción fibrilar de la pared celular de las frondas de verano e invierno determinó la presencia de hidratos de carbono, proteínas y compuestos fenólicos.

Las frondas de primavera se sometieron a una extracción con CO₂ supercrítico bajo distintas condiciones de presión, obteniendo extractos enriquecidos en fucosterol, además de 24-metilén colesterol y pigmentos. Se propone continuar su estudio para la obtención de fucosterol y fucoxantina por sus aplicaciones en la industria farmacéutica.

La microencapsulación de paracetamol mediante gelificación interna iónica con alginato de sodio de primavera y verano, en las condiciones llevadas a cabo, no fueron aptas para la formulación propuesta, debido en parte, a las características estructurales y/o de composición, dando como resultado bajos porcentajes de eficacia de encapsulación y contenido de principio activo.

La actividad citotóxica frente a *Artemia salina* fue importante de los extractos EOH1, EOH2 y NaAlg obtenidos

estacionalmente, por lo que se continuó con otros ensayos biológicos.

El ensayo de inhibición del crecimiento radicular de los extractos EOH1 y EOH2 al 0,5 % mostraron una actividad inhibitoria del crecimiento radicular, siendo de aproximadamente un 50 % en otoño. El alginato de sodio de primavera y verano, a ambas concentraciones de prueba, mostraron inhibición radicular. La mayor actividad de inhibición radicular lo produjo el NaAlg al 0,5 % de invierno cuyo valor fue del 82 %. De todas las muestras analizadas mediante el ensayo del metilgreen-ADN, el NaAlg de primavera fue el que presentó un posible mecanismo molecular de acción mediante la intercalación en el ADN. Los extractos EOH1, EOH2 y NaAlg de las cuatro estaciones no presentaron actividad antibacteriana ante las cepas ensayadas, en tanto que la actividad antioxidante fue moderada a baja frente al DPPH. Además el NaAlg de primavera no presentó actividad antileishmania pero a una concentración de 1 mg/ml, mostró una actividad antitumoral sobre líneas celulares MCF-7 del 75 %. Si bien la actividad antitumoral sobre líneas celulares Caco-2 fue del 61,6 % el NaAlg mostró una menor afinidad sobre Caco-2 en comparación con MCF-7. La actividad de cito y genotoxicidad mostraron citotoxicidad por inhibición mitótica de

las células meristemáticas de *Allium cepa* entre las fases G2/M y cambios en las células a nivel estructural y/o nuclear. La mayor concentración del EOH2 y NaAlg, ambos de primavera, mostraron los valores más altos de inhibición con valores del 79,09 y 77,11 % respectivamente, por lo que esta estación produjo un mayor efecto antitumoral comparado a las restantes estaciones. La presencia de fucoxantina, derivados del floroglucinol en el extracto etanólico (EOH1 y EOH2), muestra que estos metabolitos serían los responsables de la actividad antitumoral. En el caso del NaAlg la presencia de grupos sulfatos, explica al menos en parte, su propiedad antitumoral.

El ensayo alelopático del extracto EOH1 de primavera demostró que el uso con fines de cultivo debe ser previamente evaluado en cuanto a las especies y propósitos de su aplicación.

Se aplicó el NaAlg de primavera y verano a la formulación farmacéutica de microencapsulación de paracetamol. Si bien los resultados fueron bajos en cuanto al rendimiento, eficacia de microencapsulación y contenido de principio activo, no debe descartarse la posibilidad de continuar con la elaboración de otras formas farmacéuticas.

Con todos los resultados obtenidos se pudo demostrar que *U. pinnatifida* tiene la capacidad de desarrollar estrategias metabólicas, el cual presenta una amplia

variedad de de propiedades medicinales, incluyendo actividad antitumoral, por lo tanto, una gran potencialidad de la especie para el área de la salud.

Este trabajo de Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones:

- Marine pharmacognosy: brown seaweeds from Golfo San Jorge (Argentina) with potential application in health. Miriam D. Escobar Daza, Guillermo Ojeda, Diana Quezada, Elisabet Braidot, Mónica Becerra, Graciela Pinto Vitorino, Mauricio Reyna Jeldes, Caroline Weinstein-Oppenheimer, Osvaldo L. Córdoba, María L. Flores, International J. of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR), 2015, 170-171 (E-ISSN: 0975-8232; P-ISSN: 2320-5148).
- Estudio fitoquímico y actividad biológica in vitro de *Undaria pinnatifida*

(Harvey) Suringar (Alariaceae) colectada en el norte y centro del Golfo San Jorge. Miriam Delma Escobar Daza, Diana Paula Quezada, Elisabet Braidot, María Luján Flores, Osvaldo León Córdoba. Naturalia patagónica, 9: 61-75, 2016.

- Brown seaweed from the San Jorge Gulf, Patagonia Argentina, as potential sources of bioactive products. Flores ML, Becerra MB, Escobar Daza MD, Quezada DP, Pinto Vitorino G, Smirlis D, Kritsanida M, Grougnet R, Michel S, Córdoba OL. Drug Discovery for Neglected Diseases International Congress 2018. 4th Scientific Meeting of ResNet NPND, 2018, 111-112 (ISBN: 978-987-47034-0-8).

Bibliografía

Piriz, M. L; Casas, G. 1994. Occurrence of *Undaria pinnatifida* in Golfo Nuevo, Argentina. *Appl. Phycol Forum.*, **10**,3: 4.