

ISSN 2591-6653

Naturalia

patagónica

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

VOLUMEN 18 (2023)



NATURALIA PATAGONICA

Volumen 18 – 2023

**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

Editor

Dr. Osvaldo León Córdoba

Comité Editor

Dra. Graciela Pinto Vitorino
Dra. Miriam Delma Escobar Daza
Dr. Augusto Crespi-Abril
Dra. Adriana Alicia Gallardo
Dra. Daniela Beatriz Ureta
Dra. Nadia Soledad Arias
Mg. Raúl Paulo Henny
Esp. Néstor Andres Acosta
Oc. Guillermo Caile
Dra. Rosa María Manzo

Evaluadores

Dr. Martín A. Hernández
Dra. Elisa Petenatti
Dr. Carlos Arturo Stortz
Dra. Susana Gorzalczany
Dra. María Luján Flores
Dra. Nora M. Andrea Ponce

Dr. Martín D. Novoa
Dra. Nadia Arias
Dr. Osvaldo León Córdoba
Dra. Alicia Boraso
Dra. María Cristina Matulewicz
Dra. Adriana Broussalis

Editorial:
Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud
Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco
Ciudad Universitaria Km 4, 9005, Comodoro Rivadavia, Chubut

EDITORIAL

Estimados lectores

Con esta publicación se realiza la entrega del Volumen 18 de nuestra revista *Naturalia patagónica*, desde su relanzamiento en el año 2002. Este número incluye cuatro artículos originales y dos resúmenes de Tesis Doctorales realizados por docentes e investigadores de nuestra Facultad.

Diferentes motivos han demorado la publicación de este nuevo número, no siendo ajeno a ello la situación general del país.

Saludo particularmente a los nuevos integrantes del Comité Editor de la revista, el cual ya está trabajando en una serie de modificaciones y actualizaciones, como son una revisión de las instrucciones a los autores y una readecuación del histórico logo de la revista, que esperamos mostrar en el próximo número.

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.

Dr. Osvaldo León Córdoba - Director

CONTENIDO

ARTICULOS CIENTIFICOS

Automedicación en una población del sur de Argentina Self-medication in a town in southern Argentina. María Elizabeth Flores, Melisa Stephanie Schmidt, Graciela Pinto Vitorino, María Lujan Flores, Analía Verónica Uhrich, Susana Risso, Sandra Alcalde Bahamonde..... 01-13

Obtención y caracterización de proteasa alcalina en mejillón (*Mytilus edulis platensis*). Cecilia Crovetto, Vanesa Alvarez, Susana Risso, Martín Varisco..... 14-24

Comunidad fitobentónica en las floraciones de *Didymosphenia geminata* en la cuenca del río Futaleufú. Norma H Santinelli, Alicia V Sastre, Noelia M Uyua, Gabriela Ayestaran..... 25-47

Obtención y caracterización de gelatina de piel de merluza extraída del golfo San Jorge. María Cecilia Tiedemann, Cecilia Crovetto, Adelaida Ávila, Marisa Martinelli...48-66

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

Filogenia, reloj molecular y biogeografía del clado Chelidae (Testudines, Pleurodira). Tesista: Juan Alfredo Holley. Director: Dr. Néstor G. Basso. Co-directora: Dra. Juliana Sterli 67-68

Bases biológicas para el cultivo del picoroco *Austromegabalanus psittacus* (Molina, 1782) (Cirripedia: Thoracica) en la región patagónica de Argentina. Tesista: Paola Irina Lanas. Director: Dr. Daniel López Stefoni. Co-directora: Dra. Pamela Balzi. Asesora de estudios: Dra. Alicia Rico 69-72

CONTENTS

RESEARCH ARTICLES

Self-medication in a town in southern Argentina. María Elizabeth Flores, Melisa Stephanie Schmidt, Graciela Pinto Vitorino, María Lujan Flores, Analía Verónica Uhrich, Susana Risso, Sandra Alcalde Bahamonde 01-13

Characterization of alkaline protease from mussel (*Mytilus edulis platensis*). Cecilia Crovetto, Vanesa Alvarez, Susana Risso, Martin Varisco..... 14-24

Phytobenthic community in the blooms of *Didymosphenia geminata* in the Futaleufú river basin. Norma H Santinelli, Alicia V Sastre, Noelia M Uyua, Gabriela Aystaran 25-47

Obtention and characterization of gelatin from hake skin extracted from the San Jorge gulf. María Cecilia Tiedemann, Cecilia Crovetto, Adelaida Ávila, Marisa Martinelli 48-66

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

Filogenia, reloj molecular y biogeografía del clado Chelidae (Testudines, Pleurodira). Thesis: Juan Alfredo Holley. Director: Dr. Néstor G. Basso. Co-director: Dr. Juliana Sterli..... 67-68

Biological bases for the cultivation of the picoroco *Austromegabalanus psittacus* (Molina, 1782) (Cirripedia: Thoracica) in the Patagonian region of Argentina. Thesis: Paola Irina Lanas. Director: Dr. Daniel López Stefoni. Co-director: Dr. Pamela Balzi. Study advisor: Dr. Alicia Rico..... 69-72

Automedicación en una población del sur de Argentina

Self-medication in a town in southern Argentina

María Elizabeth Flores¹, Melisa Stephanie Schmidt², Graciela Pinto Vitorino³, María Luján Flores⁴ Analía Verónica Uhrich⁵, Susana Risso⁶, Sandra Alcalde Bahamonde^{5,7,*}

¹Estadística. ³Química Medicinal. ⁴Farmacognosia ⁵Farmacología II, ⁶Toxicología de Fármacos. ⁷Farmacología I. Departamento de Farmacia. Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico - Tecnológico (CRIDECIT). 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.

²Hospital Regional Comodoro Rivadavia. Av. Hipólito Irigoyen 950. Comodoro Rivadavia. Chubut Argentina.

*Sandra Alcalde Bahamonde: sandramarcelaalcalde@gmail.com

Resumen

La automedicación es la selección y el uso de los medicamentos por parte de las personas, con el propósito de prevenir, aliviar o tratar síntomas o enfermedades leves sin prescripción médica. El objetivo de este trabajo es conocer la situación de la automedicación en un sector de la población de Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina y contribuir en la información de esta práctica, con la finalidad de educar en la prevención de los riesgos de salud que ocasiona la misma. Se realizó un estudio de investigación de corte cuali-cuantitativo en 10 farmacias de la ciudad de Comodoro Rivadavia, para lo cual se utilizó una encuesta voluntaria y anónima que brindó información sociodemográfica y de automedicación. La automedicación es practicada preferentemente por adultos jóvenes y adultos, con acceso a servicios de salud. Los medicamentos más utilizados fueron analgésicos, antigripales, antiácidos/digestivos y antibióticos, entre otros. La mayoría de los encuestados cree que la automedicación es una práctica riesgosa y conoce las consecuencias de la automedicación. Si bien un gran porcentaje de la población encuestada se automedica en forma esporádica, y conoce las consecuencias y los riesgos de la automedicación, es importante la educación sanitaria sobre todo atendiendo aquellos grupos de fármacos que utilizan más frecuentemente.

Palabras clave: Automedicación, Población, Prevención.

Abstract

Self-medication is the selection and use of medications by people, with the purpose of preventing, relieving or treating mild symptoms or diseases without medical prescription. The objective of this work is to know the situation of self-medication in a sector of the population of Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina and contribute to the information of this practice in order to education to prevent the health risks caused by it. A qualitative and quantitative research study was carried out in pharmacies in the city of Comodoro Rivadavia, for which a voluntary and anonymous survey was used that provided sociodemographic information, coverage of the health system and self-medication. Self-medication is preferably practiced by young adults and adults, with access to health services. The most used medications were analgesics, anti-influenza, antacids/digestives and antibiotics among others. The majority of respondents believe that self medication is a risky practice and know the consequences of self-medication. Although the majority of the surveyed population rarely self-medicates, and knows the consequences and risks of self-medication, health education is important, especially attending to those groups of drugs that they use most frequently.

Keywords: Self-medication, Population, Prevention

Introducción

El uso racional de los medicamentos tiene implicancias sanitarias de gran importancia como es el autocuidado de las personas y la economía en los sistemas de salud. Como la automedicación está relacionada con el autocuidado es importante el uso adecuado de los medicamentos para satisfacer las necesidades en salud de la población.

La Automedicación es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “la selección y el uso de los medicamentos por parte de las personas, con el propósito de prevenir, aliviar o tratar síntomas o enfermedades leves que ellas mismas pueden identificar. Esta práctica se lleva a cabo con medicamentos de venta libre. Los medicamentos de venta libre son aquellos destinados a aliviar dolencias que no exigen en la práctica una intervención

médica y que, además, su uso, en la forma, condiciones y dosis previstas no entraña, por su amplio margen de seguridad, peligros para el consumidor” (WHO, 2000).

Si bien la automedicación se considera una práctica que tiene aspectos positivos, como por ejemplo: independencia, responsabilidad de la propia salud, descarga del sistema sanitario, utilización de formas de autocuidado más fiables, (Ruiz-Stenberg *et al.*, 2012; CIS, 2019) es importante prestar atención a los aspectos que podrían llevar a un hábito riesgoso generando gastos en la salud pública, produciendo un problema social ya que es practicado por un alto porcentaje de la población en todo el mundo.

Más del 50% de los medicamentos se prescriben y dispensan de forma inapropiada, pero la mitad de los pacientes no los toman correctamente. El uso excesivo, insuficiente o indebido de los medicamentos tiene efectos nocivos para el paciente y constituye un desperdicio de recursos. Más del 50% de los países no aplican políticas básicas para fomentar el uso racional de los medicamentos (OMS, 2022).

En Latinoamérica, como en diversos países del mundo, la automedicación

representa un hecho cotidiano con medicamentos conocidos o prescritos anteriormente por un médico (Lazcano, 2014; CIS, 2019).

La mitad de los argentinos adultos hace un mal uso de los medicamentos, lo que causa la muerte de más de 700 personas y alrededor de 100.000 internaciones hospitalarias al año en el país (COFyBCF, 2000). De acuerdo con otros datos, en Argentina la mitad de la población que consumieron medicamentos, lo hicieron sin indicación de un profesional de la salud. Los medicamentos de mayor consumo en el año 2018 por la población argentina fueron analgésicos/antiinflamatorios, antibióticos y antigripales (CIS, 2019). Teniendo en cuenta estos datos, los riesgos que suponen reacciones adversas, interacciones medicamentosas (generando falta de efectividad o efectos tóxicos), enmascaramiento de otro problema de salud más grave, desarrollo de resistencia a un antibiótico, dependencia hacia los medicamentos, es que se considera importante conocer más de esta práctica.

Si bien los estudios sobre esta temática han ido creciendo en los últimos años y dado que el problema se ha vuelto más preocupante en cuanto a los hallazgos que

produce esta conducta terapéutica (Figueras *et al.*, 2000), es primordial investigar si existen deficiencias de conocimientos sobre los riesgos de salud que puede ocasionar la automedicación en la población de estudio, ya que algunos trabajos manifiestan que no existe una verdadera concientización de las personas que la practican.

Debido al alto impacto que genera la automedicación en las personas que la practican y en los sistemas de salud a nivel mundial, se ha decidido determinar los factores asociados a la automedicación en una población de la Patagonia argentina. Como se desconoce la situación en ciertas regiones del país respecto a esta temática se ha resuelto analizar la práctica de la automedicación en la ciudad de Comodoro Rivadavia, Chubut, con el fin de promover el uso racional de los medicamentos, de manera tal que los pacientes reciban la medicación adecuada a sus necesidades clínicas en las dosis correspondientes durante un periodo de tiempo que así lo requieran, y al menor costo posible para ellos y la comunidad.

El objetivo de este trabajo, por lo tanto, es conocer la situación de la práctica de la Automedicación en la población de la ciudad de Comodoro Rivadavia y

contribuir en la información de esta temática con la finalidad de promover el uso racional de medicamentos.

Métodos

Se realizó un estudio de investigación de corte cuali-cuantitativo, para lo cual se utilizó una encuesta estructurada como instrumento recolector de información. La cuál se realizó entre los años 2014 a 2016, en forma presencial, anónima y voluntaria.

La toma de datos fue realizada en farmacias pertenecientes a tres zonas (norte, centro y sur) de la ciudad de Comodoro Rivadavia, provincia de Chubut, Argentina.

En todos los casos se contó con la autorización previa de los dueños y farmacéuticos de las farmacias.

Las preguntas del cuestionario (adaptado de Aguado *et al.*, 2005) fueron en su mayoría cerradas, con opciones múltiples de selección. Otras consultas como la de la edad, cuantas personas trabajan en su familia son de respuesta numérica simple. Se ordenó a las preguntas en los siguientes apartados: **datos personales** (sexo, ocupación, estado civil, nivel de estudios alcanzados, barrio de residencia, nivel de ingreso, seguro de salud u obra social), **automedicación** (frecuencia de

consumo, información previa, motivación, quien se lo aconseja, donde lo adquiere, tipo de medicamentos, efectos posteriores a la automedicación), **indicación con prescripción médica** (frecuencia de consumo) y **prevalencia** (conocimiento de automedicación y consecuencias).

Los datos obtenidos fueron ingresados en una hoja de cálculo formato Excel y luego procesados con software InfoStat. A las encuestas procesadas se les realizó un estudio descriptivo con medidas de porcentajes para las variables cualitativas. Se realizaron pruebas de Chi cuadrado para observar si existen diferencias estadísticamente significativas entre variables, para reforzar la discusión.

Resultados

Se procesaron 144 encuestas en 7 farmacias de la ciudad de Comodoro Rivadavia de las zonas: Centro, La Loma, San Cayetano, Prospero Palazzo,

presidente Ortiz, Pueyrredón, y Stándar y 3 en la ciudad de Rada Tilly, de las cuales el 100 % fueron contestadas. El nombre de la encuesta fue “Educar en la prevención de los riesgos de la automedicación”.

La franja etaria de la población encuestada fue entre 18 y 79 años. La mayoría de las personas que respondieron la encuesta fueron adultos jóvenes con edades menores de 26 años (51,22%), luego le sigue adultos (24,39%) y finalmente adultos mayores (12,19%).

El mayor porcentaje de los encuestados corresponden al sexo femenino (65%).

Respecto al estado civil se desprende que el 38,19% son casados, el 32,64% solteros 13,19% en pareja, el 2,78% divorciado, 1,39% separado, viudo 6,25%, y 5,56% no contestan.

En la **Figura 1** se observa la actividad laboral de los encuestados destacándose un 29,20 % de la actividad comercial y la industria en un 24,17%.

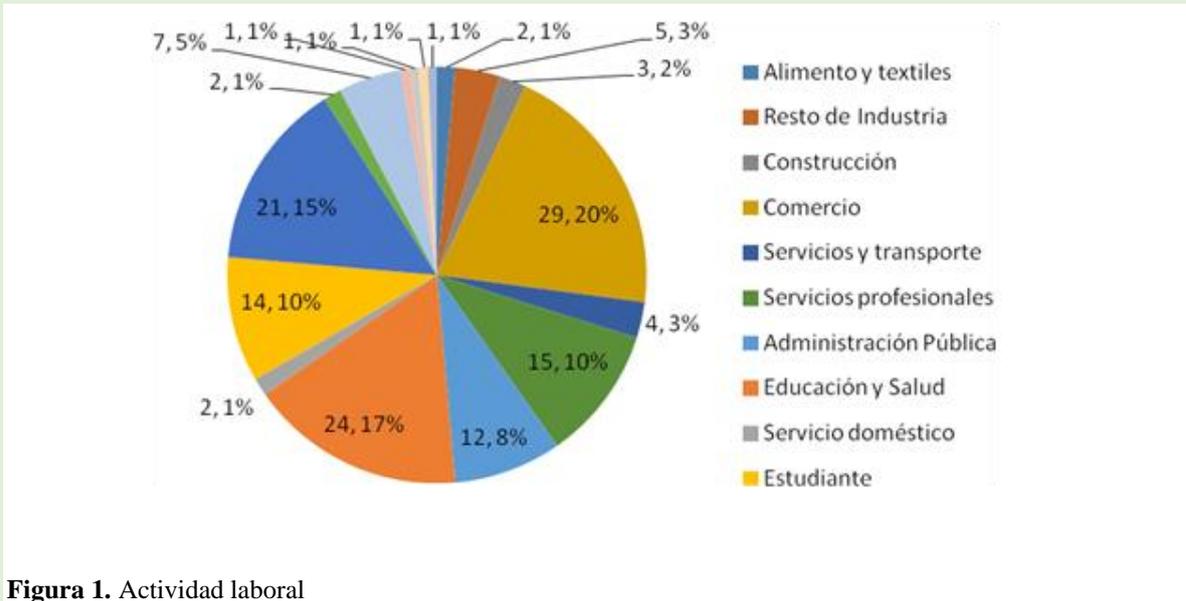


Figura 1. Actividad laboral
Figure 1. Work activity

Respecto al nivel de estudios alcanzados por los encuestados se obtuvieron los siguientes resultados: primario completo 13,89%, secundario completo 37,50%, secundario incompleto 7,64%, terciario completo 2,08%, universitario completo 19,44% y universitario incompleto 19,44%.

Ante la pregunta de ¿cuántas personas componen el grupo familiar?, se observa que la mayoría de las familias está compuesta por cuatro integrantes (27,78%). Se destaca que la mayoría de los encuestados componen un grupo familiar en el que dos personas trabajan (53,47%).

El 88% posee obra social, no posee obra social un 11% y un 1% no responde.

Respecto a la frecuencia de la automedicación, el 32% lo hace de manera habitual, el 54% rara vez y el 14% nunca.

La frecuencia de uso de medicamentos con prescripción médica corresponde al 42% habitualmente, el 52% rara vez y el 6% nunca.

El 73% se informa antes de realizar la práctica de la automedicación, el 20% no y el 7% no responde.

Ante la consulta: ¿Cuál es el principal motivo por el que decidió medicarse sin consulta médica?, el 29% informa porque el médico se lo había recetado antes y el 27% los síntomas no son tan serios como para acudir al médico, ver

Figura 2.

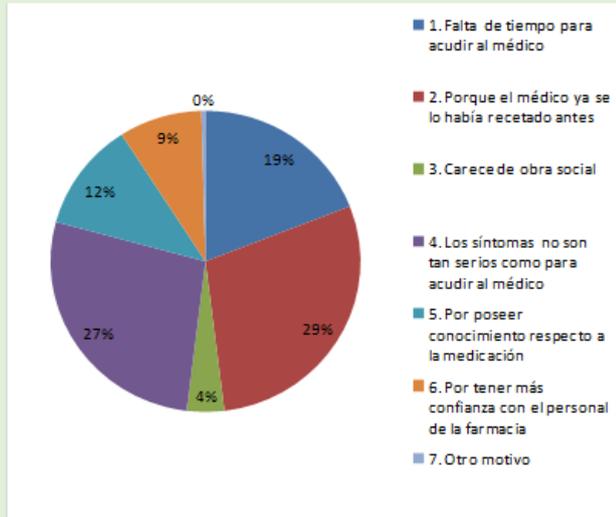


Figura 2. Motivos que llevan a la automedicación
Figure 2. Reasons that lead to self-medication

La fuente de información sobre medicamentos más comúnmente mencionada es el médico, con un porcentaje del 27%, seguido del farmacéutico en un 26%, familiares y amigos 24%, avisos publicitarios 13%, otros profesionales 5,4% e internet 4,60%.

La adquisición del medicamento sin prescripción médica se realiza en la farmacia en un 71%, en el botiquín

15,50%, en el quiosco 12%, el hospital 7% y en Internet 1%.

Las principales enfermedades o síntomas que motivaron la automedicación fueron dolores y síntomas gripales como los más destacados, ver **Figura 3**.

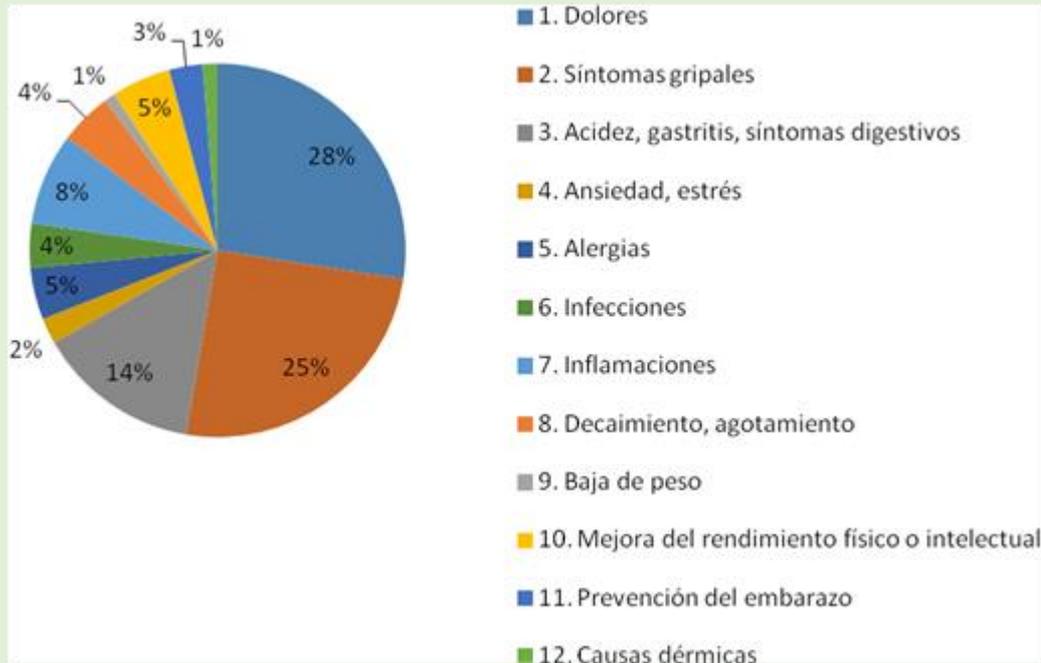


Figura 3. Síntomas que motivaron la automedicación
Figure 3. Symptoms that motivated self-medication

En relación al tipo de medicamentos empleados, los grupos de fármacos más frecuentemente utilizados fueron

analgésicos-antiinflamatorios y antigripales, ver **Figura 4.**

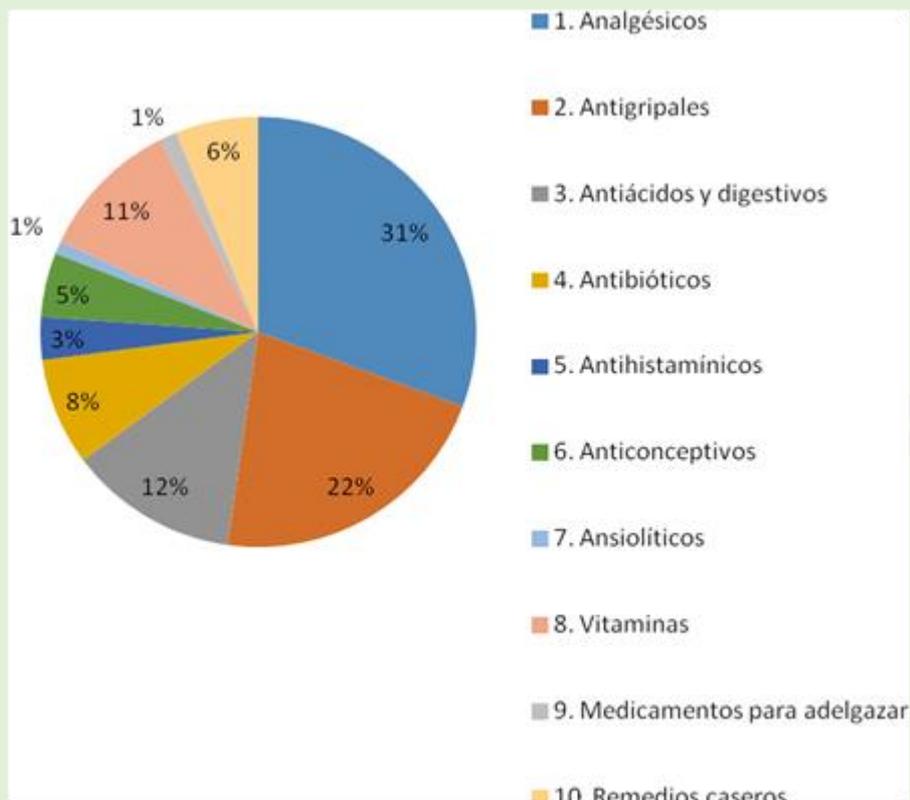


Figura 4. Medicamentos con los que se automedican
Figure 4. Medicines with which you self-medication

Respecto a la eficacia de la medicación empleada, el 86% obtuvo el efecto deseado, el 6,20% sufrió alguna reacción adversa, el 6,20% no tuvo efecto, el 3,10% dicen que aparecieron otros síntomas, y el 2,30% que empeoraron los síntomas.

El 90% de la población encuestada informa que la automedicación es una práctica riesgosa.

Análisis estadístico entre variables

Los estudios de asociación entre variables indican que:

En la población de personas que respondieron a la encuesta en las farmacias seleccionadas:

No se halló asociación entre la variable si dispone o prefiere la automedicación y la variable sexo (Test chi cuadrado de Pearson, pvalor=0,325).

No se halló asociación entre el nivel de estudios alcanzado y si dispone y prefiere

la automedicación (Test chi cuadrado de Pearson, p valor=0,92808).

No se halló asociación entre los barrios de residencia de Comodoro Rivadavia agrupados en zonas (Norte, Centro y Sur) y si dispone y prefiere la automedicación (Test chi cuadrado de Pearson, p valor=0,66788). Se tuvo en cuenta sólo las personas residentes en Comodoro Rivadavia y que respondieron a ambas preguntas.

No se halló asociación entre la variable dispone de seguro de salud u obra social y si dispone o prefiere la automedicación (Test de Fisher exacto, p valor=0,1279).

No se halló asociación entre la variable, si dispone o prefiere la automedicación y cree que la automedicación es una práctica riesgosa categorizada por si y no (Test de Fisher exacto, p valor=0,4184).

No se halló asociación entre la variable si dispone o prefiere la automedicación conoce las consecuencias de la automedicación (Test chi cuadrado de Pearson, p valor=0,1415).

Discusión

Se ha considerado para nuestro estudio el análisis de los factores más importantes que están relacionados con la automedicación en la población de estudio: socioeconómicos, relacionados al

paciente y a la práctica de la automedicación.

Se ha demostrado que la franja etaria que practica frecuentemente la automedicación corresponde a adultos jóvenes. En otros grupos estudiados, la relación entre edad y automedicación igualmente ha señalado que esta práctica disminuye con la edad (Rozenfeld, 2003; Rojas *et al.*, 2008; Uhrich *et al.*, 2018). El uso de medicamentos en personas adultos mayores es realizada bajo prescripción médica en su mayoría, pero no garantiza este hecho que sean bien utilizados.

Los resultados que correlacionan las variables sexo, nivel de estudios alcanzados, seguro de salud u obra social y si cree que la automedicación es una práctica riesgosa, no han demostrado asociación entre variables si prefiere la automedicación.

De acuerdo a otros estudios se ha encontrado que la automedicación es mayor en mujeres (López *et al.*, 2008; Quiroga *et al.*, 2015; Orueta *et al.*, 2018) y que a mayor nivel de estudios alcanzado tienden a utilizar más frecuentemente la automedicación, atribuidos al mayor conocimiento de los medicamentos, mayor nivel económico y autonomía personal (López *et al.*, 2008; Figueiras, 2000).

En nuestro estudio podemos destacar que algunas personas reconocen que han sufrido reacciones adversas y que aparecieron otros síntomas indeseables luego de la automedicación a diferencia de otras regiones de Argentina que desconocen los efectos adversos que pueden provocar los medicamentos (COFyBCE 2019).

Las enfermedades o síntomas más frecuentes que motivaron a la automedicación fueron dolores y síntomas gripales, seguidos por problemas digestivos como acidez y gastritis. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios (Oruela *et al.*, 2008; Cudas *et al.*, 2015; Real Aparicio *et al.*, 2020).

Entre los medicamentos más utilizados se destacan los analgésicos y antigripales; y en tercer lugar se encuentran los medicamentos para enfermedades digestivas. Estos resultados se relacionan con la sintomatología que presentan a la hora de adquirirlos. Existen coincidencias con varios estudios de investigación donde el grupo de medicamentos más consumido son los analgésicos (Gómez *et al.*, 2009; Aguilar *et al.*, 2015; Valencia *et al.*, 2019; Jesús, 2020). La automedicación con analgésicos es una práctica frecuente en todos los países del

mundo. Algunos de estos medicamentos son de venta libre en Argentina y ampliamente difundidos en las campañas publicitarias. La automedicación con analgésicos constituye en nuestro país un problema importante (Kegrar, 2005), forman parte de preparados que combinan otras sustancias para tratar diversas patologías y que pueden ser parte de una gran variedad de efectos adversos e interacciones (Grosser *et al.*, 2012). También se debe considerar el gasto en salud que conlleva al sector de la Salud Pública. La facilidad del uso y de la libre disposición de los medicamentos de venta libre puede provocar no sólo errores en su aplicación sino también en el abordaje global de la enfermedad a la cual van dirigidos (Kegrar, 2005).

En otros estudios los antibióticos suelen ser los medicamentos con los cuales más se automedican (Hérmendez Juyol *et al.*, 2002; López *et al.*, 2008; Martín Pérez *et al.*, 2015). Es importante señalar que en nuestro estudio la automedicación con antibióticos ocupó el cuarto lugar y con un bajo porcentaje.

El acceso y/o procedencia del medicamento estuvo centrado en la farmacia. Un bajo porcentaje procedió del botiquín doméstico, por lo cual el medicamento fue reutilizado, sobre todo

si el médico lo recetó anteriormente. Pero es importante destacar que, si bien hay un bajo porcentaje de adquisición en otros establecimientos fuera del ámbito de salud, esto es un punto a considerar para la educación de la población respecto a uso de los medicamentos.

La principal fuente de información para decidir automedicarse fue el médico y el farmacéutico, seguido del consejo de familiares. Teniendo en cuenta estos resultados se promovió un programa de 4 encuentros para la comunidad de la ciudad que llevaron los nombres: Riesgos de la Automedicación; Medicamentos de venta libre, riesgo/beneficio; Análisis e interpretaciones de prospectos; ¿Existe riesgo de intoxicación por medicamentos?

Conclusiones

Nuestro estudio señala que un porcentaje mayoritario de automedicación corresponde a adultos jóvenes. Los medicamentos más utilizados fueron analgésicos, antigripales y antiácidos. Cabe destacar también el uso de antibióticos y otros medicamentos que son venta bajo receta, por lo cual la educación sanitaria respecto a las buenas prácticas de automedicación es prioritaria con el fin de lograr el uso racional de

medicamentos. Se continúa con estudios semejantes en otros grupos de la población. Debido a la estrecha relación farmacéutico - paciente, se puede ejercer desde la farmacia y desde otros ámbitos un rol fundamental en la educación de la población.

Agradecimientos

Secretaría de Extensión de la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud (FCNyCS), Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco (UNPSJB).

Grupo de trabajo del Proyecto de extensión "Educar en los Riesgos de la Automedicación". Carrera de Farmacia. FCNyCS-UNPSJB. Año 2014-2016.

Bibliografía

- Aguado, M.I.; Núñez, M.B.; Dos Santos Antola, L.; Bregni, C. 2005. Automedicación en Estudiantes de Farmacia de la Universidad Nacional del Nordeste, Argentina. *Acta Farm. Bonaerense*, **24**(2):271-276.
- Aguilar, A.; Ascitelli, A.; Carosella, L.; Izurieta, M.; Perandones, M.; Soverchia, S. 2015. Prevalencia de automedicación de antiinflamatorios y analgésicos en la práctica ambulatoria. *Rev. argent. Reumatol*, **26** (3): 13-15.
- Anmat. Cuida tu salud: usa responsablemente los medicamentos. *Argentina.gob.ar*: Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/anmat/comunidad/uso-responsable-medicamentos>

- CIS. 2019. Informes de Opinión Pública CIS UADE-VOICES. La Salud y el Uso de Medicamentos. Centro de Investigaciones Sociales (CIS). Fundación UADE. *Voices! Research and Consultancy. ISSN 2618-2173.*
- Codas, M.; González, V.; Madrazo, C.; Benítez, G.; Chamorro, L.; Scott, C. 2015. Automedicación en Itapúa: nuestra realidad. *Rev. Nac. Itauguá*, **7**(1): 32-36.
- Colegio Oficial de Farmacéuticos y Bioquímicos de la Capital Federal. 2012. Una Sociedad sobremedicada. *COFyBCF*: Disponible en: https://www.cofybcf.org.ar/noticia_anterior.php?n=1132
- Figueiras, A.; Caamaño, F.; Gestal, O. 2000. Sociodemographic factors related to self-mediation in Spain. *Eur. J. Epidemiologic*, **16**(1):19-26.
- Gómez, O.; Leobardo, M.; Galar, M.; Téllez, L.; Carmona, Z.; Francisco, A.; Amaya, C. 2009. Estudio de automedicación en una farmacia comunitaria de la ciudad de Toluca *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **40** (1): 5-9.
- Grosser, T.; Smyth, E.; Fitzgerald, G.A. 2012. Antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos; Farmacoterapia de la gota. En; Goodman & Gilman: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 12ª ed. Mc Graw Hill: México: 959-1004.
- Jesús, M. 2020. Automedicación en el Adulto Mayor. Consultorio Médico de la Familia # 15. *Mas Vita. Rev. Cienc. Salud*, **2** (2):6.
- Kegrar, G.; Fillingner, E. 2005. ¿Qué se entiende por Automedicación? *Acta Farm. Bonaerense*, **24**:130-133.
- Lazcano, L.; Parra, E.; Umeres, L. 2014. Causas que inducen la automedicación en estudiantes de primer y quinto curso de la Facultad de Medicina. *Universidad Mayor Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca*. Disponible en: https://www.ecorfan.org/series/administracion/Topicos_Selectos_de_Administracion_4.pdf
- López Cabra Carrasco-Garrido, P.; Jiménez-García, R.; Barrera, V.H. Gil de Miguel, A. 2008. Predictive factors of self-medicated drug use among the Spanish adult population. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, **17** (2): 193-199.
- Orueta, R.; Gómez-Calcerraga, R.M.; Sánchez, A. 2008. Automedicación. *Semergen*, **34**(3): 133-137.
- Quiroga Gutiérrez D & Rodríguez Parodi D. 2015. Automedicación en pacientes del servicio de Farmacia de Consulta externa II del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen Lima Perú. *Universidad Wiener*. Disponible en: <https://www.studocu.com/pe/document/universidad-norbert-wiener/farmacia-y-bioquimica/010-tesis-farmacia-quiroya-rodriguezrevlb-finalizada/5457967>
- Real Aparicio, N.E.; Stilver Barrios, D.; Carvalho, F.; Silva, E. Lilian Acosta, L. 2020. Características clínicas de la automedicación en adultos de tres Unidades de Salud Familiar de Paraguay en 2019. *Rev. virtual Soc. Parag. Med. Int*, **7**(1): 77-85.
- Rojas, M.; Ruiz, I.; Carrasco, M.; Molina, Y. 2008. Caracterización de pacientes y de uso de medicamentos en un grupo de adultos mayores asistentes a una actividad promocional de geriatría. *Rev. Hosp. Clini. Uni. Chile*. **19**: 318-323.
- Rozenfeld, R. 2003. Prevalencia, proporción, factores asociados e mau uso de medicamentos entre os idosos: uma revisao. *Cad. Saude publica*, **19**(3): 717-724.

Ruiz, S.; Pérez, A. 2011. Automedicación y términos relacionados: una reflexión conceptual. *Rev. Cienc. Salud*, **9**(1): 83-97.

Uhrich, A.; Galarza, C.; Avila, R.; Casarrosa, M.; Pozzi, G.; Apestequia, A.; Schmidt, M.; Robles, M.; Pinto Vitorino, G.; Escobar Daza, M.; Becerra, M.; Flores, M.L.; Risso, S.; Alcalde Bahamonde S. 2018. Situación actual de la práctica de la Automedicación en un sector de la población universitaria de la UNPSJB. *Nat. Patagónica*, **11**: 73-83.

Valencia-Alanes, E.; Ayaviri, D.E.; Fernández-Zambrana, J.; Camera-Rech, N.J.; Santos, A. 2019. Características de la automedicación en el distrito 3 ciudad de Cochabamba. *Revista Científica de Salud UNITEPC*, **6** (1): 15-19.

World Health Organization (2000) "Guidelines for the Regulatory Assessment of Medicinal Products for Use in Self-Medication", Ginebra, Suiza.

Obtención y caracterización de proteasa alcalina en mejillón (*Mytilus edulis platensis*)

Characterization of alkaline protease from mussel (*Mytilus edulis platensis*)

*Cecilia Crovetto¹, Vanesa Alvarez¹, Susana Risso¹, Martin Varisco^{1,2}

¹Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, UNPSJB, Km4, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

²Instituto de Desarrollo Costero (IDC), Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

*cecicrove@gmail.com

Resumen

La tripsina es una endoproteasa digestiva, con máxima actividad catalítica a pH alcalino. La mayor parte de la tripsina comercial se obtiene del duodeno y/o del páncreas bovino. La tripsina de origen marino tiene gran interés debido a que exhibe mayor actividad catalítica que la de los mamíferos y retiene un alto grado de actividad a temperaturas elevadas, beneficioso para los procesos biotecnológicos. El objetivo del trabajo fue obtener proteasas alcalinas del hepatopáncreas del mejillón (*Mytilus edulis platensis*) y realizar su caracterización bioquímica como paso primordial para evaluar a posteriori las posibilidades de aprovechamiento de su hepatopáncreas en la industria.

Los mejillones fueron recolectados manualmente en Caleta del Fondo, Golfo San Jorge, Argentina. Se obtuvo el homogenato multienzimático a partir del hepatopáncreas. Se cuantificaron proteínas totales solubles mediante la técnica de Lowry. El extracto multienzimático se separó por electroforesis SDS-PAGE y se identificó la actividad proteásica mediante zimografía a pH 9 utilizando gelatina co-polimerizada como sustrato. En la fracción proteica se detectó la presencia de una banda correspondiente a 24 kDa, compatible con masa molecular aparente de tripsina. La temperatura óptima de actividad enzimática fue a 60 °C y el pH 9, determinados utilizando BAPNA como sustrato. La tripsina aislada mostró termorresistencia lo que la convierte en una enzima de interés para potenciales aplicaciones tecnológicas. Su caracterización parcial ha sido un paso primordial para evaluar *a posteriori* las posibilidades de aprovechamiento del hepatopáncreas del mejillón *Mytilus edulis*.

Palabras clave: Hepatopáncreas, mejillón, proteasa, tripsina

Abstract

Trypsin is a digestive endoprotease, with maximum catalytic activity at alkaline pH. Most commercial trypsin is obtained from bovine duodenum and/or pancreas. The trypsin of marine origin is of great interest because it exhibits greater catalytic activity than that of mammals and retains a high degree of activity at high temperatures, beneficial for biotechnological processes. The objective of the work was to obtain alkaline proteases from the digestive gland of the blue mussel (*Mytilus edulis platensis*) and to carry out its biochemical characterization as a fundamental step to evaluate a posteriori the possibilities of using its hepatopancreas in the industry.

The mussels were collected manually in Caleta del Fondo, San Jorge Gulf, Argentina. The multienzyme homogenate was obtained from the digestive gland (hepatopancreas). Total soluble proteins were quantified using the Lowry technique. The multi-enzyme extract was separated by SDS-PAGE electrophoresis and protease activity was identified by zymography at pH 9 using co-polymerized gelatin as substrate. In the protein fraction, the presence of a band corresponding to 24 kDa was detected, compatible with the apparent molecular mass of trypsin. The optimal temperature of enzymatic activity was at 60 °C and pH 9, determined using BAPNA as a substrate. The isolated trypsin showed thermoresistance, which makes it an interesting enzyme for potential technological applications. Its partial characterization has been a fundamental step to evaluate *a posteriori* the possibilities of using the hepatopancreas of the mussel *Mytilus edulis*.

Keywords: hepatopancreas, mussel, protease, trypsin.

Introducción

El mejillón (*Mytilus edulis platensis*) es un molusco bivalvo sujeto a explotación comercial en el golfo San Jorge, Argentina. La especie es también objeto de varias experiencias e iniciativas de maricultura en la región patagónica. Debido al interés comercial de la especie, se han estudiado su composición química y calidad nutricional (Colombo et al.

2016). Los mejillones poseen una hepatopáncreas como glándula digestiva que cumple a la vez las funciones de hígado y páncreas, por lo que es productor de una gran cantidad de proteasas digestivas, de las cuales, no se han reportado estudios bioquímicos hasta el momento.

La tripsina (EC 3.4.21.4) es una enzima miembro de la familia de las serin-

proteasas que hidroliza específicamente proteínas y péptidos del extremo Carboxilo terminal, entre los residuos arginina y lisina, cumpliendo un rol importante en procesos biológicos (Cao et al. 2000). Posee máxima actividad catalítica a pH alcalino y se utiliza en la industria para el servicio de lavandería, alisado de cueros, elaboración de cerveza, ablandamiento de carnes y en la industria farmacéutica entre otras.

Al presente, la mayor parte de la tripsina comercial es de origen bovino obteniéndola del duodeno y/o del páncreas. Sin embargo, países con alto desarrollo de la pesca han realizado estudios de aislamiento y caracterización de estas enzimas a partir de vísceras de peces como: atún rojo (*Thunnus thynnus*) (Essed, 2002), tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Bezerra et al, 2005), Sardina monterrey (*S.sagax cearula*) (Castillo Yañez et al., 2005), atún amarillo (*Thunnus albacores*) (Klomklao et al 2006), atún (*Katsuwonus pelamos*) (Klomklao et al. 2007) pez bonito (*Sarda sarda*) (Klomklao et al. 2007), Sardinella (*Sardinella aurita*) (Khaled et al. 2008), lubina japonesa (*Lateolabrax japonicus*) (Cai et al., 2011). En la Argentina se ha aislado y caracterizado la tripsina de merluza (*Merluccius hubbsi*) (Lamas,

2015) y de anchoíta *Engraulis anchoita* (Lamas et al., 2017).

El aislamiento y estudio de las enzimas proteolíticas de invertebrados han revelado la presencia de enzimas a pH neutro o alcalino (Dumitru, 1978). La tripsina de crustáceos fue aislada y caracterizada por primera vez de la glándula digestiva del langostino *Penaeus setiferus* (Gates, 1969). En Chile, se aisló la enzima de glándula digestiva de *Lithodes santolla* (Molina, 1782) y *Cancer edwardsii* (Bell, 1835) (Buñuelos-Vargas et al., 2018). En el caso de los moluscos, a pesar de ser uno de los phyla de invertebrados más abundantes, los estudios de este tipo son escasos. En particular, no se han reportado estudios sobre la actividad de proteasas alcalinas aisladas de la glándula digestiva del mejillón *Mytilus edulis platensis*.

Debido a esto, el objetivo de este trabajo fue obtener proteasas alcalinas del hepatopáncreas del mejillón (*Mytilus edulis platensis*) y realizar su caracterización bioquímica como paso primordial para evaluar *a posteriori* las posibilidades de aprovechamiento de su hepatopáncreas en la industria.

Materiales y métodos

Obtención del extracto multienzimático a partir del hepatopáncreas de mejillón

Para la obtención del material biológico se utilizaron 50 mejillones recolectados manualmente en Caleta del Fondo en el Golfo San Jorge, en la provincia de Santa Cruz, Argentina (46°01'S, 67°35'O). Los hepatopáncreas fueron pesados, y homogeneizados a 4 °C, en buffer fosfato 40 mM pH 7,4 con el fin de obtener el extracto multienzimático. El mismo se mantuvo a -20°C hasta su análisis.

Cuantificación de proteínas solubles

Para la determinación de la concentración de proteína soluble de cada muestra, se utilizó la técnica de Lowry (Lowry, 1951). Todas las medidas se realizaron por triplicado a 750 nm. La recta patrón se construyó con una solución estándar de albúmina bovina 1 mg/ml.

Determinación de la masa molecular mediante Electroforesis SDS-PAGE

Con el fin de analizar los extractos proteicos multienzimáticos y evidenciar la presencia de proteasas alcalinas y su masa molecular aparente, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) según el método de Shagger y von Jagow (1987). Se utilizó un equipo Mini-Protean II de

BioRad en un sistema discontinuo de acuerdo con la metodología descrita por Laemmli (1970). Se sembraron 5 ul de Marcador de peso molecular Rainbow Marker (Full Range) y 5 ul y 10 ul del extracto multienzimático del hepatopáncreas.

Determinación de actividad de proteasa alcalina

La actividad de proteasa alcalina se analizó por el método propuesto por Erlanger (1961), usando BAPNA 1 mM (N- α -Benzoilo-DL-arginina-4-nitroanilida) en Tris HCl 50 mM pH 8, 20 mM CaCl₂ como sustrato para la enzima tripsina, donde la unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 umol de p-nitroanilida liberada por minuto, el cual se midió por espectrofotometría a 410 nm. Se determinó la temperatura óptima de actividad enzimática ensayando la reacción a 4, 37 y 60 °C (Jesús-Ramirez, 2017). La actividad proteolítica se expresó en U/mg %. Se determinó el pH óptimo de actividad enzimática realizando la reacción a pH entre 4 y 11 utilizando un buffer universal (Stauffer, 1989) en función del tiempo de incubación. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Determinación de Actividad proteásica mediante Zimografía

Esta técnica electroforética simple, sensible y cuantificable se utilizó para el análisis de la actividad proteolítica. Se basa en el uso de un gel de poliacrilamida co-polimerizado con un sustrato proteico, en particular gelatina, caseína o fibrina (García- Carreño, 1992; Merino-Contreras, 2018).

Se realizó un tipo de zimografía que utiliza gelatina como sustrato, ampliamente utilizada para evidenciar actividad de gelatinasas (Lockwoods et al. 1987). La gelatina soluble (colágeno desnaturalizado) es co-polimerizada con poliacrilamida para formar el gel. Se utilizan condiciones suaves de desnaturalización (sin agentes reductores) para evitar la pérdida definitiva de la actividad de las enzimas estudiadas. La electroforesis se realizó en buffer Tris-glicina-SDS a 75 mV (por gel) a voltaje constante y en frío, durante 2,5 horas. El gel se lavó con 50 mL de TritonX-100 al 2.5% durante 20-30 min en agitación continua por tres veces consecutivas. Luego se incubó en 50 mL de buffer Tris-HCl a pH 9,0 a 4°C durante 12 h. Una vez desarrolladas las áreas para la detección de la actividad enzimática, se tiñeron con

azul de Coomassie R-250 0,1 % p/v por 12 h. y se destiñó con solución decolorante que contiene metanol, ácido acético y agua (3:1:6). Se utilizó un marcador de peso molecular PB-L Productos Bio-Lógicos (Low Range): Lisozima 14.000 Da, Inhibidor de tripsina soja 21.000 Da, Anhidrasa carbónica 29.000 Da, Ovoalbúmina 45.000 Da, Albúmina sérica bovina 66.000 Da y Fosforilasa B 94.000 Da.

Resultados

Cuantificación de proteínas totales en homogenato

La concentración de proteínas totales solubles en homogenatos del hepatopáncreas fue de: $0,16 \pm 0,03$ g/100 g carne. Para el cálculo se utilizó una curva de calibración con Seroalbúmina Bovina como patrón.

Determinación de la masa molecular mediante Electroforesis SDS-PAGE

La fracción proteica detectada en el extracto crudo del hepatopáncreas de mejillón mostró un rango de 6 a 100 kDa. Se observa en la calle 2 y 3 la presencia de una banda correspondiente a 24 kDa, que sería compatible con la masa molecular aparente de la tripsina (Figura 1).

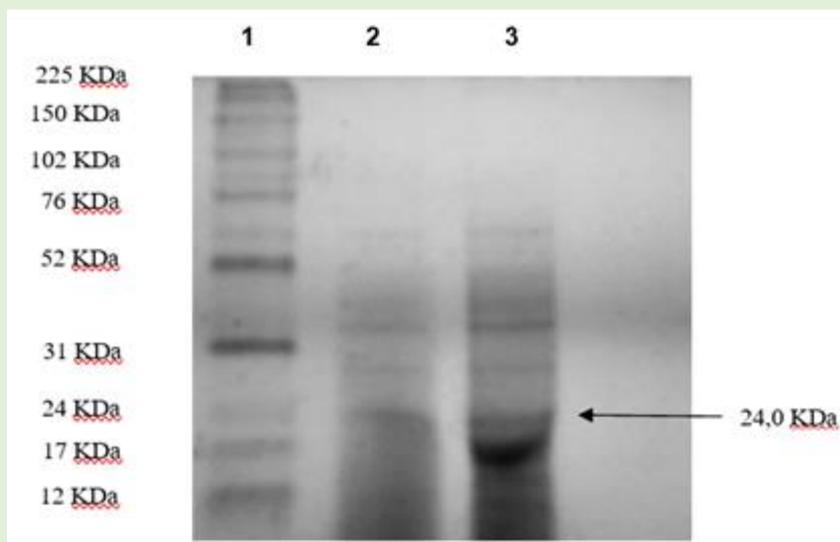


Figura 1: SDS-PAGE de hepatopáncreas de mejillón. Calle 1: Marcador de peso molecular Rainbow Marker (Full Range) (con proteínas de 12, 17, 24, 31, 52, 76, 102, 150 y 225 kDa). Calles 2 y 3: homogenato de hepatopáncreas de mejillón (5 y 10 ul de muestra respectivamente).

Figure 1: SDS-PAGE of mussel hepatopancreas. Lane 1: Rainbow Marker (Full Range) (with proteins of 12, 17, 24, 31, 52, 76, 102, 150 y 225 kDa). Lane 2 and 3: mussel hepatopancreas homogenate (5 and 10 ul respectively).

Determinación de actividad de proteasa alcalina

Se observó actividad de proteasa alcalina a las temperaturas ensayadas de 4, 37 y 60 °C utilizando BAPNA como sustrato para evidenciar tripsina, hasta los 60 minutos

de incubación, evidenciando una disminución de la actividad luego de los 30 minutos de incubación. La mayor actividad se observó a 60 °C y a los 20 minutos de incubación (Figura 2).

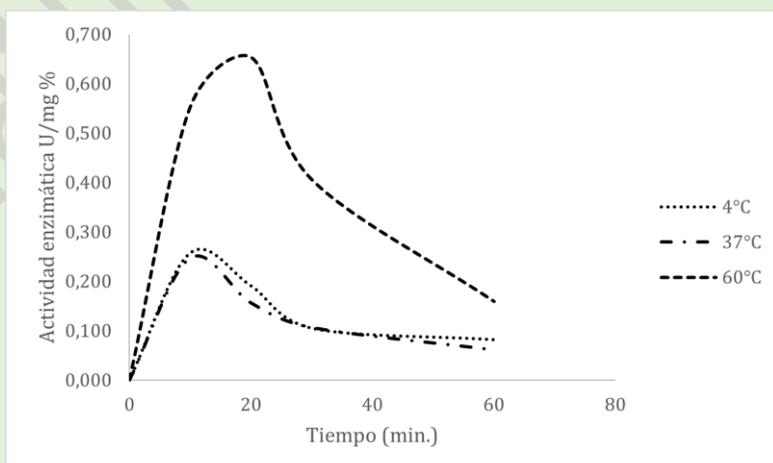


Figura 2: Actividad proteolítica (U/mg%) a diferentes temperaturas en función del tiempo de incubación.
Figure 2: Proteolytic activity (U/mg%) at different temperatures as a function of incubation time.

En la figura 3 se observa la actividad enzimática del hepatopáncreas de mejillón a 60 °C, a diferentes pH ensayados entre 4

y 11. La actividad es máxima a pH 9 y decae notoriamente a pH 10.

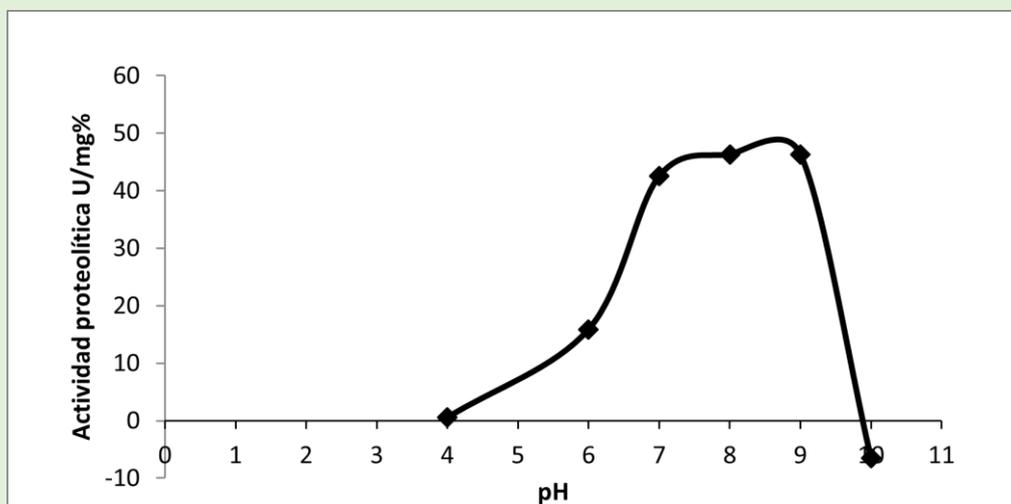


Figura 3: Efecto del pH sobre la Actividad proteolítica (U/mg%).
Figure 3: Effect of pH on proteolytic activity (U/mg%).

Determinación de Actividad proteásica mediante Zimografía

Luego de teñir el gel con azul de Coomassie se observó una zona clara, con degradación de sustrato, correspondiente a

la digestión con proteasa. Esta banda de digestión de gelatina en condiciones alcalinas (pH 9), coincide con masa molecular aparente de 24 kDa (Figura 4).

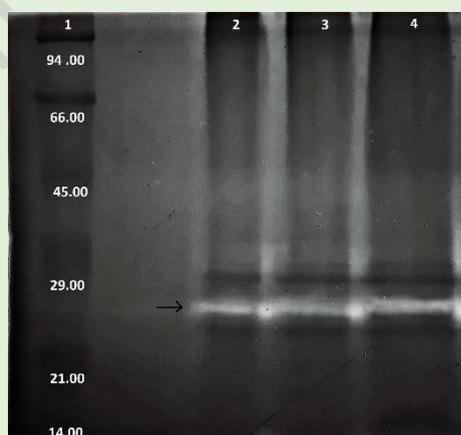


Figura 4: Zimografía de hepatopáncreas de mejillón a pH 9. Calle 1: Marcador de peso molecular (PB-L (Low Range) con proteínas de: 14.000 Da, 21.000 Da, 29.000 Da, 45.000 Da, 66.000 Da, y 94.000 Da. Calles 2, 3 y 4: homogenato de hepatopáncreas de mejillón.

Figure 4: Zymography of mussel hepatopancreas at pH 9. Lane 1: Molecular weight marker (PB-L (Low Range) with proteins of: 14,000 Da, 21,000 Da, 29,000 Da, 45,000 Da, 66,000 Da and 94,000 Da. Lanes 2, 3 and 4: mussel hepatopancreas homogenate.

Discusión

Los resultados obtenidos demuestran, en los homogenatos del hepatopáncreas de mejillón (*Mytilus edulis platensis*), la presencia de una proteína con actividad proteolítica en medio alcalino. Esta actividad fue evidenciada mediante el ensayo que utiliza BAPNA como sustrato para tripsina (Erlanger et al., 1961), así como en la zimografía, tratándose de una proteína de masa molecular aparente de 24 kDa determinada por SDS-PAGE (Laemmli, 1970). La banda proteica obtenida se localiza dentro del rango (de 21 a 30 kDa) de otras tripsinas purificadas en especies marinas: 25,0 kDa la tripsina de anchoíta *Engraulis anchoita* (Lamas et al., 2017), 21,5 kDa la de lubina japonesa *Lateolabrax japonicus* (Cai et al., 2011), 25,0 kDa la de sardina *Sardina pilchardus* (Simpson et al., 2000, Castro-Ceseña, 2012), 25,0 kDa la tripsina de merluza *Merluccius hubbsi* (Lamas et al., 2015), 24 kDa en vísceras de atún (*Katsuwonus pelamos*) (Klomklao et al., 2007) y 22,5 kDa la de chucumite (*Centropomus parallelus*) (Jesús-Ramirez et al., 2017).

Se ha detectado que las proteasas digestivas alcalinas son altamente termorresistentes, pues soportan temperaturas desde 45 °C hasta 65 °C

(Essed et al., 2002). Las proteasas digestivas alcalinas de los crustáceos (*Lithodes santolla*) (Molina, 1782) y *Cancer edwardsii* (Bell, 1835) presentaron actividad óptima a 60 °C (Bañuelos-Vargas et al., 2018) y en el intestino de los peces chucumite (*Centropomus parallelus*) (Jesús-Ramirez et al., 2017), sargo (*Archosargus probatocephalus*) (Merino-Contreras et al., 2018) y tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Bezerra et al., 2005) que muestran una temperatura óptima de 55 °C.

En consecuencia, la proteasa aislada del hepatopáncreas de mejillón presentó mayor actividad a 60 °C y pH 9, a los 20 minutos de incubación. Resultados similares se reportaron para especies como chucumite (*Centropomus parallelus*) (Jesús-Ramirez et al., 2017), para la lubina japonesa *Lateolabrax japonicus* (Cai et al., 2011) y para el pez sargo (*Archosargus probatocephalus*) (Merino-Contreras et al., 2018), entre otros, con un pH de máxima actividad entre 9 y 10.

Cabe destacar que los valores óptimos de temperatura y la estabilidad térmica de las actividades de las proteasas son solo parámetros operativos de las enzimas, y no corresponden a parámetros fisiológicos de las especies, sino a la afinidad de la

enzima con su sustrato a una determinada temperatura al alcanzar la máxima catálisis.

En la zimografía se evidencia la presencia de una banda clara, de digestión de la gelatina, correspondiente al peso molecular aparente de la tripsina, que coincidiría con la actividad de esta proteasa alcalina. Esta metodología, utilizada por varios autores, entre ellos Jesús -Ramírez (2017), Bañuelos-Vargas (2018) y Merino-Contreras (2018) nos permite determinar la actividad proteolítica en medio alcalino. De esta manera, con los datos obtenidos sobre la actividad a pH alcalino, podríamos confirmar la presencia de esta enzima en el hepatopáncreas de mejillón, su relevante termorresistencia y su potencial utilización en aplicaciones tecnológicas.

El mejillón *M. edulis platensis* es un molusco bivalvo con una amplia distribución en el Mar Argentino y dominante en muchos ambientes submareales someros. Además, la especie es de interés pesquero y para la acuicultura, las principales iniciativas de maricultura tienen como objeto esta especie. Las iniciativas de cultivo en el país son escasas y están limitadas a unas pocas localidades del litoral argentino como Camarones, C. Rivadavia y Ushuaia (Isola, 2019). Este trabajo aporta los

primeros datos la actividad proteolítica en esta especie y revela que las proteasas de la especie presentan rasgos de interés para su aplicación biotecnológica. Los mejillones son comercializados enteros, (hepatopáncreas incluido). Sin embargo, el cultivo del mejillón genera toneladas de subproducto en todo el mundo, considerándose el 27% de la cosecha como material de rechazo, lo cual ha conducido a la búsqueda de alternativas que permitan el aprovechamiento integral de la producción y contribuir positivamente a la economía circular (Naik et al. 2019, 2020).

Conclusión

Los resultados obtenidos demuestran, en los homogenatos del hepatopáncreas de mejillón (*Mytilus edulis platensis*), la presencia de una proteasa con actividad proteolítica óptima a pH 9,0 y a 60 °C, evidenciada mediante zimografía, tratándose de una proteína de 24 kDa determinada por SDS-PAGE.

Bibliografía

Bañuelos-Vargas, I., Cárdenas-Chávez, F., Paschke, K., Román-Reyes, J., Salazar-Leyva, J. & Martínez-Montaña, E. 2018. Caracterización bioquímica parcial de proteasas digestivas presentes en los jugos gástricos de dos crustáceos chilenos, *Lithodes santolla* (Molina, 1782) y *Cancer edwardsii* (Bell, 1835). *Lat. A.m. J. Aquat.*

- Res., **46**: 289-300.
- Bezerra, R.S., Lins, E.J.F., Alencar, R.B., Paiva, P.M.G., Chaves, M.E.C., Coelho, L.C.B. & Carvalho, L.B. 2005. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Process Biochem.*, **40**: 1829-1834.
- Blanco, M., Simpson, B.K., Perez-Martín, R.I. & Sotelo G.C. 2014. Isolation and partial and characterization of trypsin from pancreas of small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). *J. Food Biochem.*, **38**: 196-206.
- Cai, Q.F., Jiang, Y.K., Zhou, L.G., Sun, L.C., Liu, G.M., Osatomi, K. & Cao, M.J. 2011. Biochemical characterization of trypsins from the hepatopáncreas of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*). *Comp. Biochem. Fisiol.*, **159** (B): 183-189.
- Castillo-Yañez, F. J., Pacheco-Aguilar, R., García-Carreño, F.L. & Navarrete-Del Toro, M.A. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **140** (B): 91-98.
- Castro-Ceseña, A.B., Sánchez Saavedra, M.P. & Márquez Rocha F.J. 2012. Characterisation and parcial purification of proteolytic enzymes from sardine by-products to obtain concentrated hydrolysates. *Food Chemistry*, **135**: 583-589.
- Colombo, J., Crovetto, C., Varisco, M. & Risso, S. 2016. Composición química proximal y perfil de ácidos grasos del mejillón (*Mytilus edulis*) provenientes de cultivos y bancos naturales en el Golfo San Jorge, Argentina. *Rev. biol. mar. oceanogr.* **51** (2): 12-19.
- Erlanger, B. F., Kokorsky, N. & Cohen, W. 1961. The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **96**: 271-278.
- Essed, Z., Fernández, I., Alarcón, J.F. & Moyano, F.J. 2002. Caracterización de la actividad proteasa digestiva de atún rojo *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758). *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, **18** (1-4): 99-107.
- García-Carreño, F.L. 1992. The digestive proteases of langostilla (*Pleuroncodes planipes*, decapoda): their partial characterization, and the effect of feed on their composition. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103** (b): 575-578.
- García-Carreño, F.L., Dimes, L. & Haard, N. 1993. Substrate-Gel Electrophoresis for composition and Molecular Weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical Biochemistry*, **214**: 65-69.
- Gates, B. J. & Travis, J. 1969. Isolation and comparative properties of shrimp trypsin (*Penaeus setiferus*). *Biochemistry*, **8**: 4483-4489.
- Isola, T. E. 2019. Aspectos tecnológicos y bioecológicos del asentamiento de mejillón, *Mytilus edulis platensis*, sobre colectores artificiales. Tesis doctoral Universidad Nacional del Sur. 169 pp.
- Jesús-Ramírez, F., Álvarez-González, C.A., Nolasco-Soria, H.G., Peña, E., Martínez-García, R., Camarillo-Coop, S., Conway, K. & Pohlenz, C. 2017. Caracterización parcial de proteasas digestivas del chucumite (*Centropomus parallelus*). *Hidrobiológica*, **27** (3): 419-427.
- Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpson, B. K. & Saeki H. 2006. Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification and characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **144** (B): 47-56.
- Lamas, D., Yeannes, M.I. & Massa, A.E. 2017. Alkaline trypsin from the viscera and heads of *Engraulis anchoita*: partial purification and characterization. *Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*, **98** (2): 103-112.

- Lamas, D., Yeannes, M.I. & Massa, A.E. 2015. Partial purification of proteolytic enzymes and characterization of trypsin from *Merluccius hubbsi* by products. *International Journal of food and nutritional sciences*, **4** (5):121-130.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- Lowry, O., Rosebrough, N.J., Lewis Farr, A. & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Lockwoods, B., North, M., Scott, K., Bremner, A. & Coombs, G. 1987. The use of highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **24**: 89-95.
- Merino-Contreras, M.L., Sánchez-Morales, F., Jiménez-Badillo, M.L., Peña-Marín, E.S., & Alvarez-González, C.A. 2018. Partial characterization of digestive proteases in sheepshead, *Archosargus probatocephalus* (Spariformes: Sparidae). *Neotropical Ichthyology*, **16** (4): e180020: 1-11.
- Naik, A.S.; Hayes, M. 2019. Bioprocessing of mussel by-products for value added ingredients. *Trends Food Sci. Technol.*, **92**: 111–121.
- Naik, A. S., Mora, L., & Hayes, M. 2020. Characterisation of seasonal *Mytilus edulis* by-products and generation of bioactive hydrolysates. *Applied Sciences*, **10** (19): 6892.
- Schägger, H. & von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**: 368-379.
- Simpson, B. K. 2000. Digestive Proteases from Marine Animals. En N.F. Haard y B.K Simpson (eds), *Seafood Enzymes*. 191- 213.
- Stauffer, C. 1989. Enzyme Assays for Food Scientists. Van Nostand Reinhold. Nueva York. 317 p.

Comunidad fitobentónica en las floraciones de *Didymosphenia geminata* en la cuenca del río Futaleufú

Phytobenthic community in the blooms of *Didymosphenia geminata* in the Futaleufú river basin

Norma H Santinelli^{1*}, Alicia V Sastre¹, Noelia M Uyua¹, Gabriela Ayestaran¹

¹Instituto de Investigación de Hidrobiología, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Gales 48. Trelew, Chubut, Argentina.

* normasn@hotmail.com

Resumen

Didymosphenia geminata (Lyngbye) M. Schmidt es una diatomea de agua dulce, originaria del hemisferio norte, que genera proliferaciones mucilaginosas en aguas oligotróficas. *D. geminata* se ha expandido rápidamente con éxito fuera de su rango de distribución nativo en la última década, invadiendo ríos y lagos de Nueva Zelanda, Argentina y Chile. En el caso de Argentina todas las cuencas invadidas son de gran importancia recreativa, y en la mayoría de los casos pertenecen a Áreas Protegidas. La primera cuenca invadida en Argentina fue la del río Futaleufú. El objetivo de este estudio fue analizar la composición de la comunidad durante el período comprendido entre el mes de julio 2010 y noviembre de 2013 y evaluar el efecto de la presencia de *D. geminata* en la composición de la comunidad fitobentónica y especies de hábitat fitoplanctónico presentes. Se identificaron 59 taxa de Bacillariophyta, 10 taxa de Chlorophyta, 6 taxa de Charophyta, 2 taxa de Euglenozoa, 1 taxón de Miozoa, 2 taxa de Ochrophyta, y 6 taxa de Cyanobacteria. Durante la presencia de floraciones de *D. geminata*, se observa una disminución en la presencia de Divisiones Algales. Se destaca en este trabajo la detección de floraciones de la diatomea bentónica *Gomphoneis patagoniana* en sitios específicos del tramo inferior del río y la coexistencia de estas floraciones cuando se produce la invasión de *D. geminata*. En cuanto a la riqueza específica y al índice de diversidad de Shannon-Wiener, la comunidad presenta una menor riqueza en especies y una disminución del índice de diversidad durante el periodo en los que ya está instalada la invasión de didymo. Este trabajo constituye el primer reporte de la composición del fitobentos en este tramo del río antes de su ingreso a territorio chileno.

Palabras Clave: Fitobentos, *Didymosphenia geminata*, *Gomphoneis patagoniana*, Patagonia, cuenca río Futaleufú, invasión

Abstract

Didymosphenia geminata (Lyngbye) M. Schmidt is a freshwater diatom, native to the northern hemisphere, that generates mucilaginous proliferations in oligotrophic waters. It has rapidly expanded successfully outside its native range in the last decade, invading rivers and lakes in New Zealand, Argentina, and Chile. In Argentina, all the invaded basins are of great recreational importance, and in most cases they belong to Protected Areas. The first basin invaded in Argentina belongs to the Futaleufú River. The objective of this study was to analyze the composition of the microalgae community, between July 2010 and November 2013 and to evaluate the effect of the presence of *D. geminata* on the community of microalgae. 59 Bacillariophyta taxa, 10 Chlorophyta taxa, 6 Charophyta taxa, 2 Euglenozoa taxa, 1 Dinzoa taxón, 2 Ochrophyta taxa, and 6 Cyanobacteria taxa were identified. During the presence of *D. geminata* blooms, a decrease in the presence of Algal Divisions is observed in terms of the structure of the benthic microalgae community, with only diatoms and some chlorophyte represented. The detection of the benthic diatom *Gomphoneis patagoniana* blooms and the coexistence of these blooms when the invasion of *D. geminata* occurs is highlighted in this work. Regarding the specific richness and the Shannon-Wiener diversity index of the community, they show lower species richness and a decrease in the diversity index during the period in which the invasion is already installed. This study constitutes the first report of the composition of the microalgae community for this section of the river, before moving to Chilean territory.

Keywords: Phytobentos, *Didymosphenia geminata*, *Gomphoneis patagoniana* Patagonia, Futaleufú river basin, invasion

Introducción

Didymosphenia geminata (Lyngbye) M. Schmidt es una diatomea de agua dulce, originaria del hemisferio norte, que genera proliferaciones mucilaginosas en aguas oligotróficas (Kilroy y Novis, 2018). *D. geminata* se ha expandido rápidamente con éxito fuera de su rango de distribución nativo en la última década, invadiendo ríos y lagos de Nueva Zelanda, Argentina y Chile (Reid *et al.*, 2012). Los sistemas

invadidos tienen agua transparente y fría con concentraciones de nutrientes reducidos y bajos o medios niveles de intervención antropogénica en la Patagonia. Todas las cuencas invadidas son de gran importancia recreativa, muchas de ellas se encuentran dentro de áreas protegidas como los Parques Nacionales Los Alerces, Lago Puelo, Nahuel Huapi, y Lanín, (Lamaro *et al.*, 2018) y más recientemente del Parque

Nacional Los Glaciares (Uyua *et al.*, 2020). La dispersión de esta diatomea se asocia principalmente con el transporte humano por el uso de equipos de pesca recreativa y deportiva, mientras que el desarrollo de un gran número de pedúnculos se ha asociado principalmente con fósforo reactivo soluble en concentraciones por debajo de 2 ppb (Kunza *et al.*, 2018). Sin embargo, durante las últimas dos décadas, grandes floraciones de *D. geminata* fueron confirmadas para una amplia gama de ambientes prístinos, pero también de alta concentración de nutrientes en cientos de ríos en Europa, América del Norte y del Sur, India y Nueva Zelanda (Gillis *et al.*, 2018; Kawecka y Sanecki, 2003; Reid *et al.*, 2012; Bothwell *et al.*, 2014). La proliferación consiste en el desarrollo masivo de pedúnculos mucilaginosos de células de *D. geminata*, que cubren extensas áreas de sustrato bentónico. En consecuencia, favorece la creación de hábitats más homogéneos con bajos niveles de hidráulica en el que surgen tensiones que promueven el intercambio de solutos y favorecen la proliferación y expansión de las masas mucilaginosas (Bray *et al.*, 2017 a y b). Los cambios en el hábitat físico pueden desplazar o favorecer ciertas especies del bentos (Figueroa *et al.*, 2018), modificando la estructura trófica del ecosistema acuático,

alterando los patrones de diversidad alfa y beta en diferentes escalas espaciales (Gillis & Chalifour, 2010). En la actualidad la presencia de *D. geminata* está confirmada desde los 38° a los 56° Latitud Sur y desde los 73° a los 67° Longitud Oeste, lo que no significa que su distribución no pueda ser más amplia (Lamaro *et al.*, 2019).

Para comprender el proceso de invasión de *D. geminata* es crucial comprender sus efectos en las comunidades bentónicas y el hábitat fluvial, y así dilucidar sus impactos en la integridad de los ecosistemas de agua dulce. *D. geminata* ha sido descrita como la única diatomea de agua dulce que produce grandes cantidades de material mucilaginoso (Blanco & Ector, 2009), lo que puede alterar las condiciones físicas y biológicas de los sistemas acuáticos (Spaulding & Elwell, 2007). Este claro impacto negativo de *D. geminata* sobre la salud de los ecosistemas y, por lo tanto, la sustentabilidad ambiental de la cuenca, tiene implicancias ecológicas, económicas, sociales y estéticas (Kilroy *et al.*, 2005; Kilroy & Dale, 2006; Campbell, 2005; Branson, 2006; Cullis *et al.*, 2012). Dentro de los estudios realizados en la cuenca del Futaleufú, referidos a comunidades fitoplanctónicas se pueden mencionar a Pizzolon *et al.* (1995) y Santinelli *et al.* (1998). Con posterioridad a estos trabajos no se han realizado

estudios referidos a microalgas, hidroquímica y zooplancton en esta cuenca.

El objetivo de este estudio fue analizar la composición de la comunidad de fitobentos, durante el período comprendido entre el mes de julio 2010, es decir, desde la detección de la floración de *D. geminata* en el río Espolón en Chile y la posterior invasión en el tramo inferior del río Futaleufú en Argentina, y evaluar el efecto de la presencia de *D. geminata* en la comunidad fitobentónica.

Materiales y métodos

Área de estudio

Las cabeceras del río Futaleufú son alimentadas por glaciares. Una gran cantidad de afluentes fluyen a través de una serie de lagos conectados que regulan el régimen del río. Los flujos aumentan durante la primavera debido a la lluvia al

comienzo del invierno y al derretimiento de nieve en primavera.

El río Futaleufú o río Grande, regulado por la presa de Futaleufú, es el final de este sistema que fluye hacia el sureste desde el extremo sur del embalse Amutui Quimey hacia su desembocadura al Océano Pacífico (IGN, 2018).

A lo largo de su curso recibe, desde la izquierda, la afluencia del río Corintos y algunos arroyos como el Baggilt y el Blanco, todos ellos en territorio argentino. Luego, continúa a lo largo de un amplio valle, cruza la frontera argentino-chilena, recibe como afluente al río Espolón y finalmente vierte sus aguas en el lago Yelcho, ya en territorio chileno (Sastre *et al.*, 2013).

El siguiente mapa (Figura 1) muestra el río Futaleufú y sus tributarios con los sitios de muestreo.

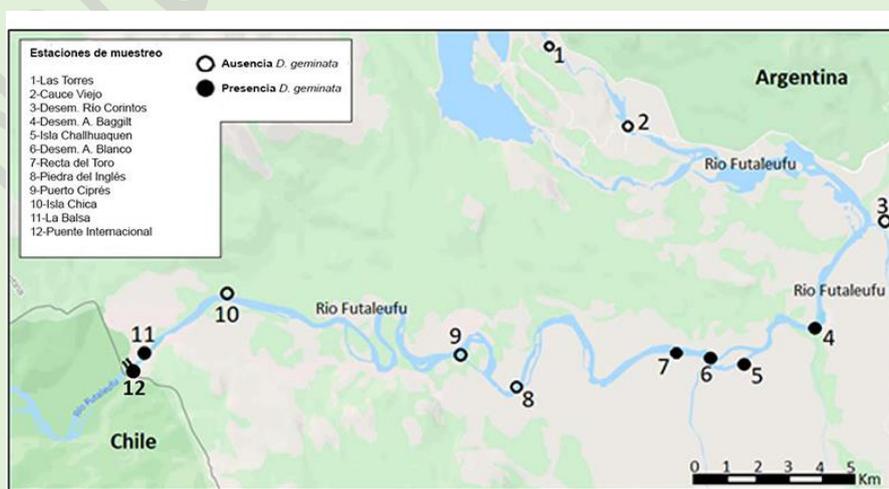


Figura 1: Estaciones de muestreo, ubicadas en el río Futaleufú.

Figure 1: Sampling stations, located on the Futaleufú river.

Se analizaron 110 muestras correspondientes a campañas realizadas en el marco del Programa de Monitoreo de la Diatomea Invasora *D. geminata* en la Provincia de Chubut.

En cada ambiente, se procedió a la toma de las muestras de fitobentos, comenzando desde aguas arriba hacia aguas abajo, evitando de esta manera transportar diferentes organismos desde aguas abajo hacia aguas arriba en un mismo ambiente. En cada sitio se realizó primeramente una exploración visual en busca de floraciones algales que pudieran corresponder a *D. geminata*. Luego se procedió a la toma de muestras epifíticas (raspado de sustrato vegetal) y/o epilíticas (raspado de sustrato rocoso). Se realizó un registro fotográfico y de georreferenciación de todos los sitios.

Al cambiar de ambiente se procedió a la desinfección de los equipos empleados en los muestreos (botas, waders, guantes y los elementos utilizados para la toma de la muestra), con una solución hipersalina (10%) de cloruro de sodio. Los elementos utilizados para la obtención de las muestras (embudos, cepillos etc.) fueron lavados con una solución de hipoclorito de sodio al 10% para evitar la contaminación en muestreos posteriores.

Las muestras obtenidas fueron colocadas en envases plásticos, fijadas con formol al 5% y rotuladas.

En laboratorio, las muestras fueron tratadas para eliminar la materia orgánica siguiendo el método descrito en Hasle y Fryxell (1970). Las destinadas a microscopía óptica (MO) se montaron en Naphrax® entre porta y cubreobjeto; y para microscopía electrónica de barrido (MEB) se montaron en tacos de vidrio y se recubrieron con oro-paladio.

Para la observación e identificación de las especies se utilizó un MO Olympus CX41 con contraste de fases. De cada muestra se analizaron tres submuestras. Para la posterior identificación de especies pertenecientes a las demás divisiones algales, se realizaron distintos tratamientos, siguiendo los protocolos descritos en Alveal *et al.* (1995). Para realizar el cálculo de abundancia relativa de las especies presentes se identificaron hasta 200 individuos en cada muestra con un microscopio óptico de 400X y 1000X (Bate y Newall 1998) por triplicado para dar un rango de abundancia relativa. Se registraron todas las especies presentes en las muestras, identificando las de hábitat bentónico como así también las de hábitat planctónico.

Las especies que presentaron dificultades en su identificación

taxonómica, fueron observadas con MEB Jeol JSM-6360LV en el Servicio de Microscopía Electrónica del Museo de La Plata. Las identificaciones taxonómicas se realizaron siguiendo a Ayestarán y Sastre (1995), Echenique & Guerrero (2003), Ferrario (1975), Ferrario *et al.* (1989), Gómez (1991), Gómez (1999), Hakkansson & King (1990), Krammer & Lange Bertalot (1991), Parra *et al* (1982a), Parra *et al* (1982b), Parra *et al* (1982c), Patrick & Reimer (1966), Patrick & Reimer (1975), <https://diatoms.org>.

La nomenclatura taxonómica siguió la página web <https://www.algaebase.org/>.

La especie que primeramente había sido identificada como *Gomphoneis minuta* (Sastre, 2010) es renombrada en este trabajo como *G. patagoniana* (Kociolek *et al.*, 2017).

Como parámetros de descripción de las comunidades, se utilizó la composición de las divisiones algales, calculando la abundancia relativa de cada división a la comunidad de microalgas bentónicas y especies fitoplanctónicas que aparecieron en las muestras. Se determinó la riqueza en especies y el índice de diversidad de Shannon-Wiener. Se calculó el % de frecuencia de las taxa presentes para cada una de las campañas realizadas. Se realizó un test no paramétrico de Kruskal Wallis para estimar si existían diferencias significativas en la riqueza en especies, en los sitios colonizados por *D.geminata* y los no colonizados.

Resultados

La Tabla I muestra los taxa identificados

Tabla I: Taxa identificadas en el río Futaleufú y tributarios
Table I: Taxa identified in the Futaleufú river and tributaries

BACILLARIOPHYTA

Discostella stelligera (Cleve & Grunow) Houk & Klee
Melosira varians C.Agardh
Urosolenia eriensis (H.L.Smith) Round & R.M.Crawford
Stephanodiscus sp. Ehrenberg
Asterionella formosa Hassall
Diatoma anceps (Ehrenberg) Kirchner
Diatoma elongata (Lyngbye) C.Agardh
Diatoma vulgare Bory
Fragilaria crotonensis Kitton
Fragilaria construens (Ehrenberg) Grunow
Fragilariforma bicapitata (A.Mayer) D.M.Williams & Round
Eunotia glacialis F.Meister
Hannaea arcus (Ehrenberg) R.M.Patrick
Meridion circulare var constrictum (Ralfs) Van Heurck
Ulnaria acus (Kützing) Aboal
Ulnaria ulna (Nitzsch) Compère
Tabellaria flocculosa (Roth) Kützing
Cocconeis placentula Ehrenberg
Cymbella affinis Kützing
Cymbella cistula (Ehrenberg) O.Kirchner

Cymbella cymbiformis C.Agardh
Encyonema leibleinii (C.Agardh) W.J.Silva, R.Jahn, T.A.V.Ludwig, & M.Menezes

Encyonema ventricosum (C.Agardh) Grunow
Encyonema minutum (Hilse) D.G.Mann

Amphora ovalis (Kützing) Kützing
Diploneis ovalis (Hilse) Cleve

Diploneis elliptica (Kützing) Cleve
Frustulia romboides (Ehrenberg) De Toni
Frustulia vulgaris (Thwaites) De Toni
Brachysira serians var. acuta (Hustedt) Vyverman

Gomphonema olivacea (Hornemann) Rabenhorst
Gomphonema pseudotenellum Lange-Bertalot
Gomphonema truncatum Ehrenberg

Gomphonema gibba J.H.Wallace
Gomphonema sp.
Gomphoneis patagoniana Kociolek & S.E.Sala
Gyrosigma acuminatum (Kützing) Rabenhorst
Achnanthes sp.
Navicula capitatoradiata H.Germain e Gasse
Navicula peregrina (Ehrenberg) Kützing

Navicula tripunctata (O.F.Müller) Bory
Navicula walkeri Sovereign
Navicula cryptocephala Kützing
Navicula sp. Bory
Pinnularia sp. Ehrenberg
Rhoicosphenia abbreviata (C.Agardh) Lange-Bertalot
Epithemia adnata (Kützing) Brébisson
Epithemia sorex Kützing
Rhopalodia gibba (Ehrenberg) O.Müller
Rhopalodia gibberula var. vanheurckii O.Müller
Nitzschia acicularis (Kützing) W.Smith
Nitzschia vermicularis (Kützing) Hantzsch
Nitzschia linearis W.Smith
Nitzschia sp.
Surirella librile (Ehrenberg) Ehrenberg
Surirella splendida (Ehrenberg) Ehrenberg

Surirella sp Turpin
Pennadas n/i
CHLOROPHYTA
Actinastrum sp. Lagerheim
Cladophora sp. Kützing
Microscopora sp. Thuret
Pandorina morum (O.F.Müller) Bory
Pediastrum sp.Meyen
Planktosphaeria gelatinosa G.M.Smith
Scenedesmus sp. Meyen
Stigoeclonium sp. Kützing
Clorofíceas Oedogoniales
Clorofíceas Ulotrichales
CHAROPHYTA
Closterium ehrenbergii Meneghini ex Ralfs

Se identificaron un total de 59 Bacillariophyta (diatomeas), 10 Chlorophyta (clorofitas), 6 Charophyta (carofitas), 2 Euglenozoa (euglenozoa), 1 Miozoa (dinoflagelado), 2 Ochrophyta (ocrofitas) y 6 Cyanobacteria (cianobacterias).

Composición de la comunidad

La fig. 2 agrupa los resultados obtenidos referidos a la composición de la comunidad de en el río Futaleufú A) Julio 2010, B) Setiembre 2010, C) Diciembre 2010, D) Agosto 2011, E) Abril 2012 y F) Noviembre 2013.

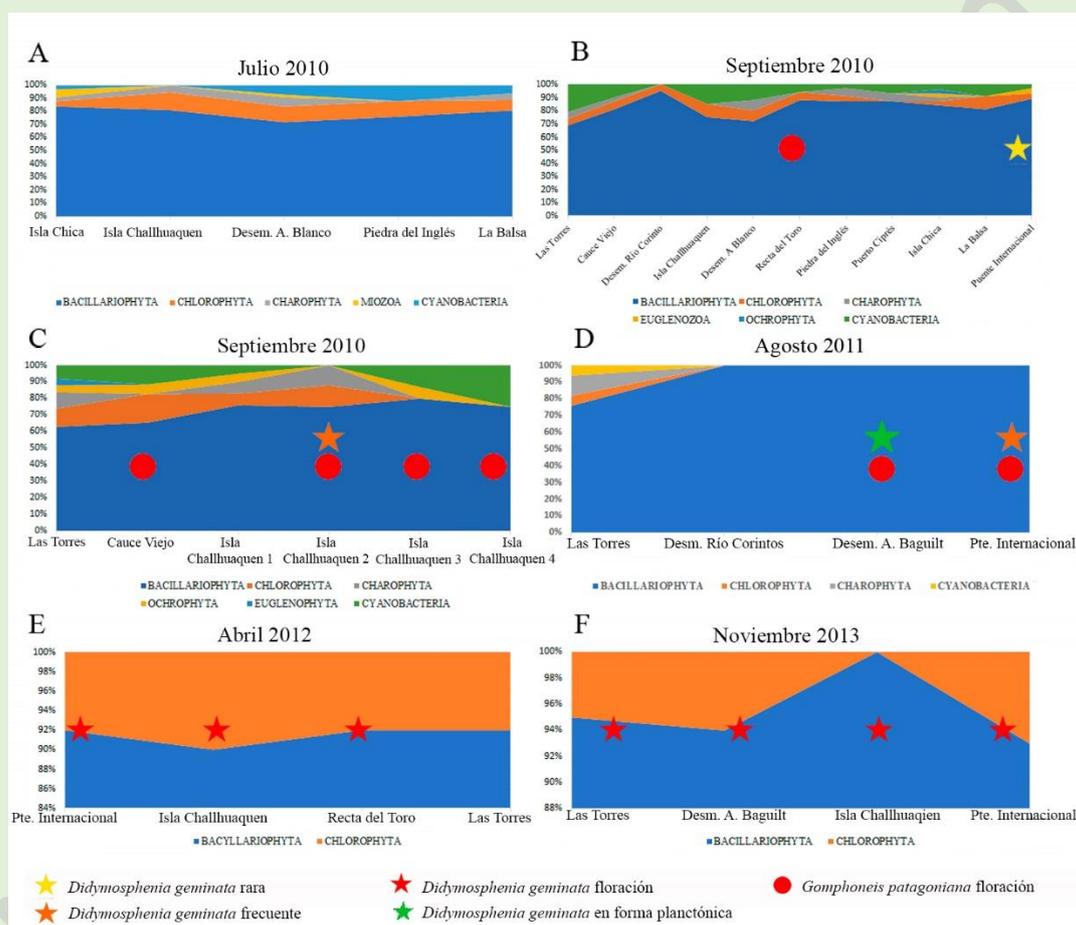


Figura 2: Porcentaje de especies y/o taxa de la comunidad de fitobentós y especies de hábitat fitoplanctónico, presentes en el tramo inferior del río Futaleufú.
Figure 2: Percentage of species and/or taxa of the phyto-benthic community and species of phytoplankton habitat present in the lower section of the Futaleufú river.

Durante el muestreo realizado en el mes de julio de 2010, antes del inicio de la invasión, la comunidad fitobentónica estuvo dominada por diatomeas y en menor proporción se registró la

presencia de clorofitas, charofitas, dinoflagelados y cianobacterias (Fig. 2A). La estación Isla Challhuaquen fue tenida especialmente en cuenta, dado que se observaron rocas cubiertas por

matas mucilaginosas que, macroscópicamente, mostraban tener un aspecto que hacía sospechar de la probable presencia de la diatomea *D. geminata*. Sin embargo, observadas microscópicamente, se constató que la cubierta macroscópica estaba formada por otra diatomea epilítica del género *Gomphoneis*, identificada como *G.*

patagoniana. La Fig.3 muestra el aspecto macroscópico de las floraciones y microfotografías de las células de ambas especies al MO y al MEB. Pueden observarse, en ambas especies, los pedúnculos de mucílago secretados por las células que les permiten adherirse a los diferentes sustratos.

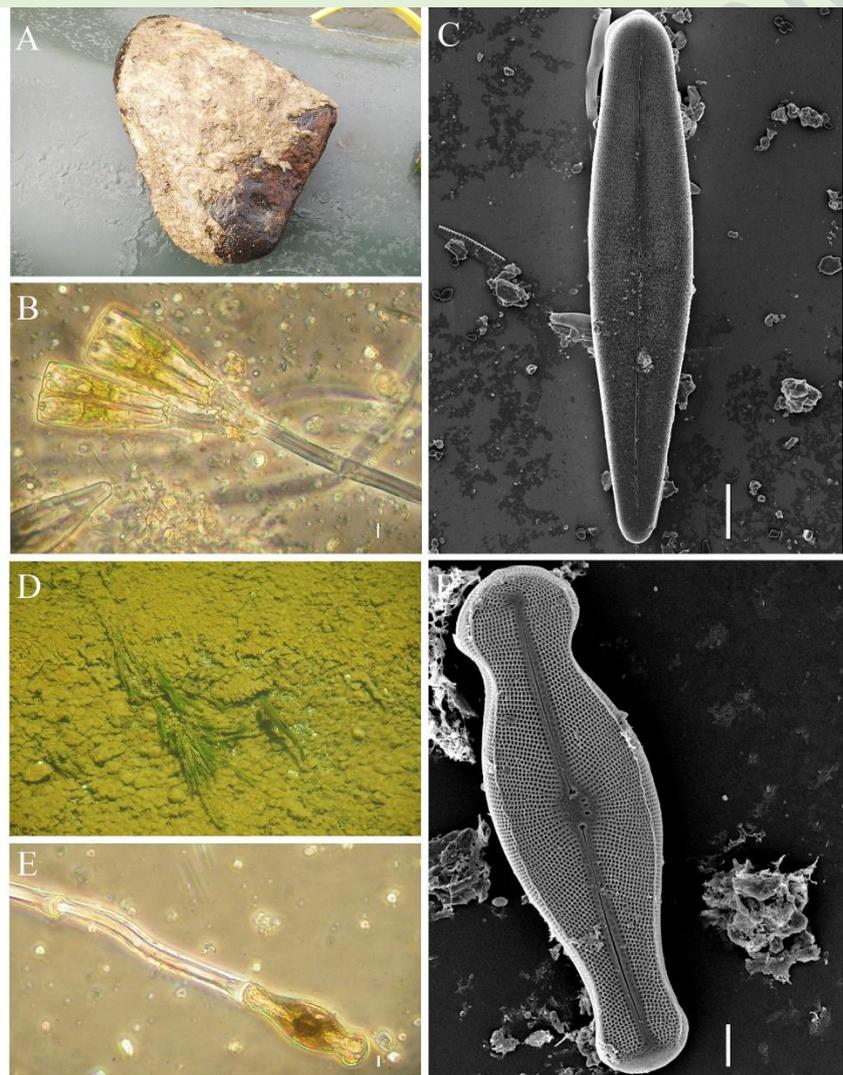


Figura 3: *Gomphoneis patagoniana*. A: aspecto macroscópico de la floración, B: fotomicrografía MO y C: fotomicrografía MEB (Escala 10 μ m) y *Didymosphenia geminata* (D: aspecto macroscópico de la floración, E: fotomicrografía MO y F: fotomicrografía MEB (Escala 10 μ m).

Figure 3: *Gomphoneis patagoniana*. A: macroscopic appearance of the bloom, B: photomicrography LM and C: photomicrography SEM (Scale bar 10 μ m) and *Didymosphenia geminata* (D: macroscopic appearance of the bloom, E: photomicrography LM and F: photomicrography SEM (Scale bar 10 μ m).

En esta campaña se registró el mayor número de taxa, con el máximo en la estación Desemb. Arroyo Blanco, con un total de 39, de las cuales 4 corresponden a clorofitas, 3 a carofitas y 3 a cianobacterias, el resto fueron diatomeas.

La campaña del mes de setiembre de 2010 (Fig.2B) abarcó un tramo mayor, llegando hasta el límite internacional sobre el puente del río Futaleufú. Las microalgas representadas fueron, en mayor proporción, las diatomeas, seguidas por clorofitas, carofitas y cianobacterias, una euglenozoa en Puente Internacional y en Isla Chica y una ocofita sólo en esta última estación. Las muestras con mayor cantidad de taxa, fueron las correspondientes a las estaciones Isla Chica y Cauce Viejo con 31 y 30 respectivamente y la que presentó menor cantidad coincidentemente con la floración de *G. patagoniana*, fue Recta del Toro con sólo 14. Se señala la detección de *D. geminata* en la estación Puente Internacional y la floración de *G. patagoniana* en la estación Recta del Toro (Fig.2B).

Las especies que se presentaron en las muestras con un % de ocurrencia > del 60%, fueron 20 taxa de diatomeas, entre ellas, *D. anceps*, *D. elongatum*, *D. vulgare*, *U. ulna*, *T. flocculosa*, *G.*

patagoniana, *N. capitatoradiata*, *N. peregrina*, *E. adnata* y *E. sorex*, que se mantuvieron presentes a lo largo del curso inferior del río, algunas clorofitas y carofitas como *P. gelatinosa* y *Cosmarium* sp. y la cianobacteria *Oscillatoria* sp. (Tabla II).

La campaña del mes de diciembre de 2010, abarcó la cuenca baja del río Futaleufú desde Las Torres a la Isla Challhuaquen. En general las muestras estuvieron dominadas por diatomeas, clorofitas y carofitas. También se observaron en menor proporción las ocofitas, euglenozos y cianobacterias (Fig.2C).

La muestra con mayor riqueza específica fue la correspondiente a Las Torres con 21 taxa y la de menor riqueza específica fue una de las de la Isla Challhuaquen con 8 especies. En esta oportunidad la especie que produce floraciones prácticamente alrededor de toda la isla es *G. patagoniana*, comenzando *D. geminata* a hacerse frecuente en la mayoría de las estaciones, cubriendo el sector oeste de la isla. Las especies que fueron características en la mayoría de las estaciones fueron *G. patagoniana*, *D. geminata*, *C. placentula*, *U. ulna* con un % de presencia mayor del 80% (Tabla 2). En el mes de agosto de 2011 se tomaron muestras bentónicas en cinco sitios del río, desde las Torres hasta el Puente

Internacional (Fig. 2D). Las diatomeas son las más abundantes seguidas por las carofitas, clorofitas y las cianobacterias. No se observaron otras clases algales. La desembocadura del arroyo Baggilt, presentó el mayor número de especies, *D. anceps*, *D. elongatum*, *D. vulgare*, *U. ulna* y *G. patagoniana* fueron las especies con un % de presencia > del 80%. *D. geminata* se presentó con un 30% (Tabla II).

En abril del 2012 se tomaron cuatro muestras sobre el río Futaleufú en el sector que abarcó la floración de *D. geminata*, entre Las Torres y Puente Internacional (Fig. 2E). En esta oportunidad se detectaron 11 especies de

diatomeas y 1 clorofita. La composición fue del 92% de diatomeas y 8% de clorofitas. La flora acompañante durante la época de floración se observa en la tabla 2. En el mes de noviembre de 2013 con la invasión ya instalada sobre el río, se realizó un muestreo en sitios ocupados por las matas de *D. geminata* (Fig. 2F). La composición de la comunidad fue entre el 93 y el 100 % de diatomeas y un porcentaje que no superó el 5% de clorofitas. La cantidad de taxa registradas en esta oportunidad fue de 20, el máximo en Las Torres y 15 en Isla Challhualquen. La tabla 2 muestra las especies que coexistieron con las matas de *D. geminata*.

Tabla II: Especies y/o taxa con % de ocurrencia > del 60%, en los muestreos realizados en el río Futaleufú
Table II: Species and / or taxa with% occurrence> 60%, in the samplings carried out in the Futaleufú river

Taxa	julio-10 (n:5)	sep-10 (n:11)	dic-10 (n:6)	ago-11 (n:4)	abr-12 (n:4)	nov-13 (n:4)
<i>Melosira varians</i>	A					
<i>Odontidium anceps</i>					A	
<i>Diatoma elongata</i>					A	A
<i>Diatoma vulgare</i>			A		A	
<i>Ulnaria ulna</i>					A	
<i>Tabellaria flocculosa</i>			A			
<i>Tabellaria fenestrata</i>	A	A	A		A	
<i>Hannaea arcus</i>			A	A	A	
<i>Cocconeis placentula</i>					A	
<i>Encyonema leibleinii</i>			A	A	A	A
<i>Cymbella affinis</i>	A		A	A	A	A
<i>Cymbella cymbiformis</i>				A		A
<i>Frustulia vulgaris</i>			A		A	A
<i>Gomphonema pseudotenellum</i>	A				A	A
<i>Gomphonema truncatum</i>	A	A	A	A		A
<i>Gomphonema olivaceum</i>			A		A	
<i>Gomphoneis patagoniana</i>						
<i>Didymosphenia geminata</i>	A					
<i>Amphipleura</i> sp.	A			A	A	A
<i>Navicula capitatoradiata</i>			A			
<i>Navicula peregrina</i>			A			A
<i>Epithemia adnata</i>					A	
<i>Epithemia sorex</i>					A	
<i>Rhopalodia gibba</i>						A
<i>Nitzschia acicularis</i>					A	A
<i>Nitzschia vermicularis</i>					A	A
<i>Surirella minuta</i>			A	A	A	A
<i>Surirella splendida</i>			A		A	A
<i>Surirella ovalis</i>	A		A		A	
<i>Surirella</i> sp.	A	A		A	A	A
<i>Cymatopleura solea</i>	A				A	A
<i>Cosmarium</i> sp.				A	A	A
<i>Planktosphaeria gelatinosa</i>		A		A	A	A
<i>Spirogyra</i> sp.	A	A		A	A	A
Cloroficeas Ulotrichales						
<i>Dinobryon divergens</i>	A	A		A	A	A
<i>Oscillatoria</i> sp.	A				A	A

Referencias : 100-80 % Ocurrencia 80-60 % de ocurrencia < 60 % Ocurrencia A Ausente *Didymosphenia geminata*

Tributarios del río Futaleufú

En el mes de julio de 2011 se realizó un muestreo en el arroyo Baggilt, tributario del río Futaleufú, y en instalaciones de la piscicultura provincial ubicada en el mismo cuerpo de agua. La composición de las Divisiones Algaes para todos los tributarios analizados se muestra en la

Fig. 4A, en la que se observa la mayor proporción de diatomeas en relación a las otras divisiones, pero el aporte de las clorofitas y carofitas es interesante en este período y la persistencia de las cianobacterias a lo largo de todas las estaciones de muestreo.

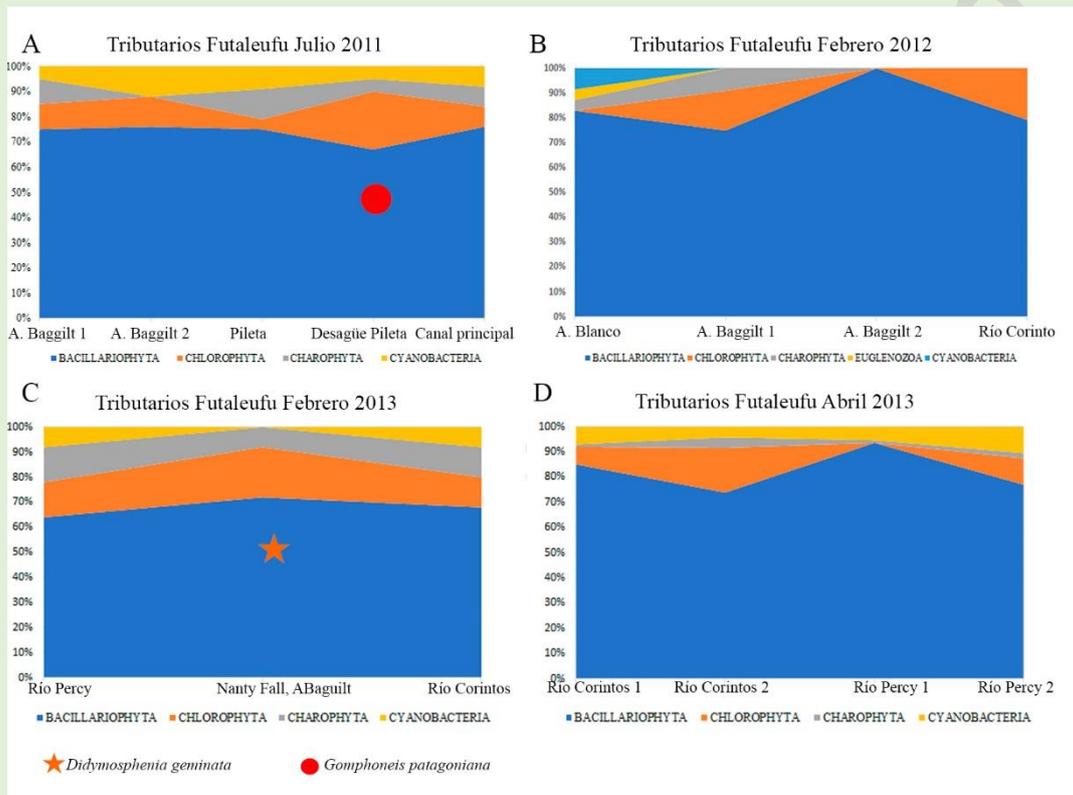


Figura 4: Porcentaje de especies y/o taxa de comunidad de fitobentos y especies de hábitat fitoplanctónico presentes en los Tributarios del Río Futaleufu (Río Percy-Corintos, Arroyo Blanco, Arroyo Bagguilt)

Figure 4: Percentage of species and/or taxa of the phytoplanktonic community and species of phytoplankton present in the Tributaries Río Futaleufu (Río Percy-Corintos, Arroyo Blanco, Arroyo Bagguilt)

El Canal Principal y la Pileta de Engorde tienen la mayor cantidad de taxa registradas, con un total de 24 y el arroyo Baggilt, la menor, con 17. En la tabla 3 se registran las especies con una frecuencia de aparición mayor del 60%

en todo el muestreo: *M. varians*, *D. elongatum*, *D. hiemale*, *H. arcus*, *U. ulna*, *C. placentula*, *C. cymbiformis*, *F. vulgaris*, *G. patagoniana*, *N. radiosa*, *E. adnata* y *R. gibba*.

Tabla III: Especies y/o taxa con % de ocurrencia > del 60%, en los muestreos realizados, en los tributarios del río Futaleufú

Table III: Species and / or taxa with % occurrence > 60%, in the samplings carried out, in the tributaries of the Futaleufú river

Taxa	A° Baguilt (abr 2011)	A° Blanco-Baguilt (feb 2012)	Rios Percy-Corinto (feb 2012)	Cascada Nant y Fall (feb 2013)	Rios Percy-Corinto (abr 2013)
<i>Stephanodiscus</i> sp.	A	A	A	A	●
<i>Melosira varians</i>	●	●	●	●	●
<i>Diatoma anceps</i>	A	●	A	●	●
<i>Diatoma elongatum</i>	●	●	●	A	A
<i>Diatoma hiemale</i>	●	A	●	A	A
<i>Diatoma vulgare</i>	A	●	A	●	●
<i>Ulnaria ulna</i>	●	●	●	●	●
<i>Hannaea arcus</i>	●	●	●	A	A
<i>Cocconeis placentula</i>	●	●	●	●	●
<i>Cymbella cymbiformis</i>	●	●	●	A	●
<i>Frustulia vulgaris</i>	●	A	A	A	A
<i>Gomphonema olivaceum</i>	A	●	A	●	A
<i>Gomphoneis patagoniana</i>	●	●	●	●	●
<i>Didymosphenia geminata</i>	A	A	A	★	A
<i>Amphipleura</i> sp.	A	A	A	A	A
<i>Navicula capitatoradiata</i>	●	●	A	●	●
<i>Navicula peregrina</i>	A	A	A	A	A
<i>Navicula radiosa</i>	●	A	A	●	A
<i>Epithemia adnata</i>	●	●	●	●	●
<i>Epithemia sorex</i>	A	A	A	●	●
<i>Rhopalodia gibba</i>	●	●	●	●	●
<i>Nitzschia vermicularis</i>	A	●	A	●	●
<i>Nitzschia sigmoidea</i>	A	A	A	●	●
<i>Surirella</i> sp.	A	●	A	A	●
<i>Cymatopleura solea</i>	A	●	A	●	●
<i>Cosmarium</i> sp.	●	●	A	●	●
<i>Spirogyra</i> sp.	●	●	●	●	●
Cloroficeas Ulotrichales	●	●	●	A	A
<i>Euglena</i> sp.	A	●	A	A	A
<i>Oscillatoria</i> sp.	●	●	A	●	●

Referencias: ● 100-80 % Ocurrencia; ● 80-60 % de ocurrencia; ● < 60 % Ocurrencia; "A" Ausente; ★ *Didymosphenia geminata*

En el mes de febrero de 2012, se realizó un muestreo en los principales tributarios, comprendiendo los arroyos Blanco y Baguilt y el río Corintos. La fig.4B muestra dominancia de especies

de diatomeas seguidas por clorofitas y carofitas. En los arroyos se registró la presencia de euglenozoa. Las cianobacterias están presentes en la mayoría de los sitios de muestreo, siendo

más abundantes en el río Corintos. En cuanto a los taxa identificados, la máxima cantidad se registra en el Arroyo Blanco con 21 y las mínimas en el Arroyo Baggilt con 12.

Las especies con % de ocurrencia > al 60% fueron *M. varians*, *U. ulna* y *H. arcus* (Tabla III).

En el mes de febrero de 2013, se registra la presencia de *D. geminata* en el río Nant y Fall, afluente del río Corintos, pero no se evidenció colonización en el sitio.

En el mes de abril de 2013 se realizó un muestreo sobre el sistema Río Corintos-Río Percy. La figura 4 muestra la estructura de la comunidad, que estuvo representada por diatomeas entre el 71% en el río Corintos y el 89% en el río Percy (fig. 4D). Las clorofitas aportan un porcentaje importante del 25% en el río

Corintos, mientras que el valor más elevado de cianobacterias se presenta en el río Percy, con *Anabaena* sp. y *Oscillatoria* sp.

La tabla III muestra las especies con una ocurrencia > del 60% en esta campaña, siendo las especies características *M. varians*, *U. ulna*, *T. flocculosa*., *C. placentula*, *G. patagoniana*, *N. capitatoradiata*, *N. radiosa*, *E. adnata*, *E. sorex*, *R. gibba*, *N. vermicularis*, *N. sigmoidea* y *Spyrogira* sp.

En la figura 5 se muestran fotomicrografías de algunas de las especies que presentaron un mayor porcentaje de ocurrencia durante todo el estudio, tanto en el río Futaleufú como en sus tributarios, y otras especies características de estos ambientes como el género *Dynobryon*.



Figura 5: Microalgas características del área de estudio. A: *Dinobryon divergens*, B: *Cymbella cymbiformis*, C: *Tabellaria fenestrata*, D: *Melosira varians* (Escala 10 μm).

Figure 5: Characteristic microalgae of study area. A: *Dinobryon divergens*, B: *Cymbella cymbiformis*, C: *Tabellaria fenestrata*, D: *Melosira varians* (Scale bar 10 μm).

El análisis de parámetros comunitarios mostró que el índice de diversidad de Shannon-Wiener fue más alto antes de que *D. geminata* generara las floraciones (Sh-W 4.954 en setiembre de 2010 contra Sh-W 3.322 en abril de 2012), al igual que la riqueza en especies de la

comunidad de microalgas en los sitios analizados en el río Futaleufú. La figura 6 muestra la riqueza específica en muestras con presencia de *D. geminata* (D+) y muestras sin *D. geminata* (D-) y las medias y sus desvíos respectivos para los dos grupos analizados.

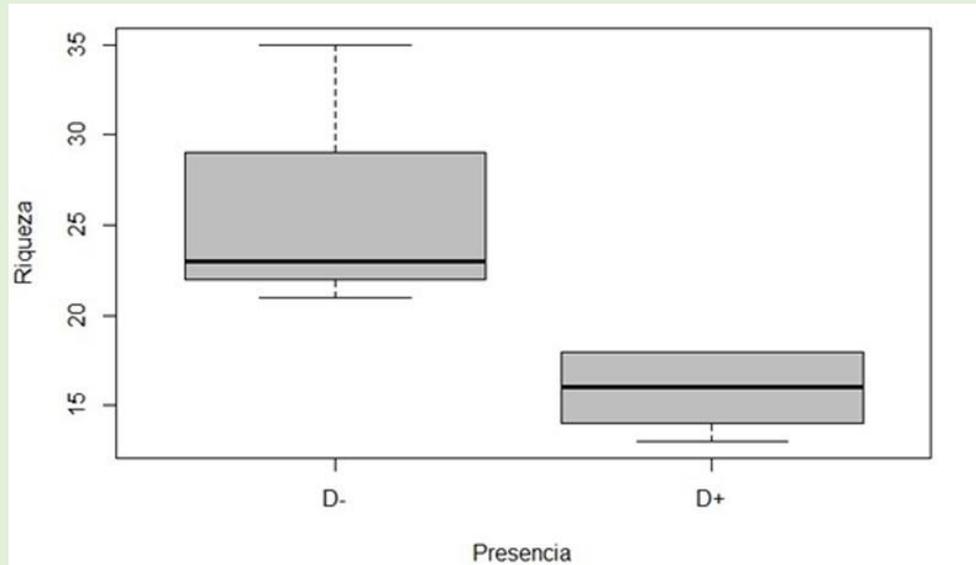


Figura 6: Riqueza específica, medias y desvíos en muestras con presencia de *D. geminata* (D+) y muestras sin *D. geminata* (D-).

Figure 6: Specific richness, means and deviations in samples with the presence of *D. geminata* D + and samples without *D. geminata* (D-).

En cuanto a la riqueza específica entre el grupo de muestras sin *D. geminata* y con *D. geminata*, se encontraron diferencias significativas, arrojando un $p = 0,024$ ($X^2 = 5.06$).

Discusión

Dentro de la flora diatomológica identificada se encuentran especies con capacidad de formar crecimientos conspicuos en las corrientes, en el caso del río Futaleufú, podemos mencionar a *G. patagoniana*, taxón recientemente designado para los cuerpos andino patagónicos, y la invasora mundialmente reconocida *D. geminata*; esta especie se ha convertido rápidamente en ambientes prístinos tanto del sur de Argentina como Chile en una especie invasora con una alta capacidad de dispersión. Dentro de

las especies de *Gomphoneis*, citadas para la Patagonia Argentina, *G. minuta* fue señalada en Argentina por primera vez entre los años 1989 y 1990 en el curso inferior del río Chubut en Patagonia (Ayestarán y Sastre, 1995). Bahls (2007), reconoce a las siguientes especies con capacidad de formar desarrollos masivos que cubren diferentes tipos de sustratos como *G. minuta* (Stone) Kociolek & Stoermer, *G. eriense* (Grunow) Skvortsov & K.I. Meyer, *G. herculeana* (Ehrenberg) Cleve, *D. geminata* (Lyngbye) M. Schmidt, *Cymbella janischii* (A. Schmidt) De Toni y *C. mexicana* (Ehrenberg) Cleve. Nuestros resultados muestran que también *G. patagoniana* (recientemente identificada por Kociolek *et al.* (2017) para ambientes

chubutenses) tiene la misma capacidad de formar floraciones macroscópicas que crecen en las rocas sumergidas.

En ríos chilenos los principales efectos de *D. geminata* incluyen aumento de biomasa de algas, captura de sedimentos y alteración de procesos hidrodinámicos y biogeoquímicos (Reid & Torres, 2014). Los estudios sobre el efecto de *Didymo* han arrojado diversos resultados, sin embargo, la mayoría de éstos indican que la colonización de *D. geminata* produce un fuerte impacto sobre las comunidades biológicas (Larson, 2007; Wyatt *et al.*, 2008), Spaulding *et al.*, 2010, Falasco & Bona, 2013). Por ejemplo, se ha reportado menor diversidad y equitatividad de diatomeas en sitios impactados por blooms de *D. geminata* (Larson y Carreiro, 2008), mientras que en otro estudio se indica que no hay un impacto significativo en la composición o diversidad del ensamble de diatomeas (Beltrami *et al.*, 2008). Sin embargo, otros estudios señalan cambios en la biomasa y estructura comunitaria de perifiton (Kilroy *et al.*, 2009; Gillis & Lavoie, 2014). El aumento en el material mucilaginoso proporcionaría un hábitat para muchas diatomeas pequeñas y otros microorganismos (Domozych *et al.*, 2010) y favorecería la colonización de diatomeas cosmopolitas (Kilroy *et al.*,

2009). De esta forma, *D. geminata* modificaría la estructura del ensamble y aumentaría la diversidad de diatomeas, sin embargo se requieren más muestreos para hacer análisis de mayor robustez (Gillis & Lavoie, 2014).

Los resultados obtenidos en este trabajo, evidencian una reducción en la estructura de la comunidad que tiende a la homogeneidad en las épocas de la instalación de la invasión entre abril 2012 y noviembre 2013. En el río Futaleufú, los sitios con floraciones de *D. geminata* se asociaron significativamente con valores más altos de biomasa de perifiton y clorofila a (Brand & Grech, 2020).

Bray (2014) informó, para ríos de Nueva Zelanda, cambios en la composición de las comunidades de algas y macroinvertebrados, mostrando un aumento local en la diversidad, mientras que la β diversidad evidencio una disminución global de la diversidad, que conduce a la homogeneización de la comunidad (Sax & Gaines, 2003). En este trabajo, se analiza la comunidad de microalgas en un solo tramo de la cuenca del río Futaleufú y se evidencia una disminución de la riqueza en especies y del índice de diversidad de Shannon-Wiener, si bien los resultados obtenidos se basan en datos cualitativos y de presencia-ausencia

Conclusiones

La invasión de *Didymosphenia geminata* es una de las invasiones biológicas más recientemente documentadas en la Patagonia. Durante la presencia de floraciones de *D. geminata*, en el tramo analizado del río Futaleufú, se observa en cuanto a la composición de la comunidad fitobentónica, una disminución en la presencia de Divisiones Algales, quedando representadas sólo las Bacillariophyta y algunas Chlorophyta y Charophyta. La estructura de la comunidad durante el año 2010, en el curso inferior del río estuvo representada por la mayoría de las divisiones algales, Bacillariophyta, Chlorophyta, Charophyta, Miozoa, Eulenzoozoa, Ochrophyta y Cianobacteria, llegando a su máxima riqueza en especies durante la primavera-verano. Composición similar se encontró en los tributarios del río Futaleufú, río Corintos-Percy, arroyo Blanco, arroyo Baggilt. Las especies que estuvieron presentes en los tributarios del río Futaleufú, con un porcentaje de presencia importante, fueron *M. varians*, *U. ulna*, *G. patagoniana*, *E. sorex*, *R. gibba*. No se detectaron *T. fenestrata*, *T. flocculosa*, *E. leibleinii*, *C. affinis*, *G. pseudotenellum* ni *N. acicularis*. En los tributarios se detectan floraciones de *G.*

patagoniana en el invierno 2011 en el Arroyo Baggilt, en el sitio donde se encuentra la piscicultura de salmónidos. Se destaca en este trabajo la detección en sitios específicos del tramo inferior del río, de floraciones de la diatomea bentónica *G. patagoniana* y la coexistencia de estas floraciones con floraciones de *D. geminata* cuando se produce la invasión de esta última especie. En cuanto a la riqueza específica de la comunidad, en particular de las diatomeas bentónicas, es menor en los períodos de la invasión.

Con posterioridad al período analizado en este trabajo, hasta fines de 2015, en ciertos sectores del río las floraciones persistían durante todo el año independientemente de los caudales del río, aunque la superficie que cubrían entre los meses de mayo y agosto era más pequeña. La mayoría de las floraciones se mantienen a lo largo del año y solo algunas disminuyen su tamaño, cubriendo menos metros cuadrados en invierno.

Agradecimientos

Este estudio fue realizado en el marco del Plan de Prevención y Monitoreo de *Didymosphenia geminata* del Ministerio de Ambiente y Control del Desarrollo

Sustentable de la provincia del Chubut y el PI Dinámica y distribución del alga invasora

Didymosphenia geminata en la región andino-patagónica de Argentina Res. 617/16 de la UNPSJB. Queremos agradecer a la Dra Silvia Sala de la División de Ficología de la Universidad Nacional de la Plata, por las determinaciones taxonómicas con el SEM y al Lic. Gabriel Bauer, por todo el apoyo logístico realizado durante los muestreos.

Bibliografía

- Alveal K., Ferrario, M.E., Oliveira, E.C. & Sar, E. 1995. Manual de Métodos Ficológicos. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. 863 p.
- Ayestarán, M.G. & Sastre, A.V. 1995. Diatomeas del curso inferior del río Chubut (Patagonia Argentina). Pennales I: Naviculaceae. *Bol. Soc. Argent. Bot.* **31**(1-2): 57-68.
- Bahls, L.L. 2007. *Cymbella janischii* - Giant endemic diatom of the Pacific Northwest: morphology, ecology and distribution compared to *Cymbella mexicana*. *Northwest Science*, **81**: 284-292.
- Blanco, S., & Ector, L. 2008. Distribution, ecology and nuisance effects of the freshwater invasive diatom *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt: a literature review. *Nova Hedwigia* **88** (3-4): 347-422, <http://dx.doi.org/10.1127/0029-5035/2009/0088-0347>
- Bothwell, M., Taylor, B.W. & Kilroy, C. 2014. The *Didymo* story: the role of low dissolved phosphorus in the formation of *Didymosphenia geminata* blooms. *Diatom Res.* **29** (3):229-236. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2014.889041>
- Brand, C. & Grech, M. 2020. Recent invasion of *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt in a Patagonian regulated river promotes changes in composition and density of macroinvertebrate community. *Biol. Invasions* <https://doi.org/10.1007/s10530-020-02230-8>.
- Branson, J. 2006. *Didymosphenia geminata* economic impact assessment: Wellington, New Zealand, New Zealand. Institute of Economic Research Report: 1-22
- Bate N, Newall P. Técnicas para el uso de diatomeas en la evaluación de la calidad del agua: ¿cuántas válvulas?. Simposio de diatomeas; 1998. pág. 153-8.
- Beltrami, M. E., Blanco, S., Ciutti, F., Cappelletti, C., Monauni, C., Pozzi, S. & Ector, L. (2008). Distribution and ecology of *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) M. Schmidt (Bacillariophyta) in Trentino watercourses (Northern Italy). *Cryptogamie Algologie*, **29**, 141-160.
- Bray, J. 2014. The invasion ecology of *Didymosphenia geminata* in New Zealand. PhD Thesis. University of Canterbury.
- Bray, J., Kilroy, C. Gerbeaux, P. & Harding, J.S. 2017a. Ecological eustress? Nutrient supply, bloom stimulation and competition determine dominance of the diatom *Didymosphenia geminata*. *Freshw. Biol.*, **62**(8):1433-42.
- Bray, J., O'Brien, J. & Harding, J.S. 2017b. Production of phosphatase and extracellular stalks as adaptations to phosphorus limitation in *Didymosphenia geminata* (Bacillariophyceae). *Hydrobiologia*, **784**(1):51-63.
- Campbell, M. L. 2005. Organism impact assessment (OIA) for potential impacts of

- Didymosphenia geminata*: Blairgowrie, Victoria, Australia. All Oceans Ecology: 1-92.
- Cullis, J. D.S., Gillis, C. A., Bothwell, M. L., Kilroy, C., Packman, A. & Hassan, M. 2012. A conceptual model for the blooming behavior & persistence of the benthic mat-forming diatom *Didymosphenia geminata* in oligotrophic streams. J Geophys Res-Bioge. 117.
- Diatoms of North America [https:// diatoms.org/](https://diatoms.org/) apoyando a los taxónomos, conectando comunidades. Investigación de diatomeas 36 (4): 291-304. doi:10.1080/0269249X.2021.2006790
- Domozych, D., Toso, M. & A. Snyder. 2010. Biofilm dynamics of the nuisance diatom, *Didymosphenia geminata* (Bacillariophyceae) Vol.136; 249-259. Nova Hedwigia, Beihefte DO I - 10.1127/1438-9134/2010/0136-0249
- Echenique, R.O. & Guerrero, J. M.. 2003. Las algas del Sistema del río Limay (Argentina). III Chrysophyta, Bacillariophyceae. 1: Centrales. Bol. Soc. Argent. Bot. 38 (1-2): 149-163.
- Ferrario, M. E. 1975. Diatomeas del lago Puelo (Prov. del Chubut, Argentina), I. Darwiniana T. 19, No. 2/4 (Mayo 1975), pp. 207-284 (78 pages). Instituto de Botánica Darwinion.
- Ferrario, M. E.; Codina, R. G. & Damborena M. C. 1989. Sobre algunos taxa de Diatomeas Centrales continentales para Argentina. Iheringia Sér. Bot., Porto Alegre. 39: 55-67.
- Figuerola, F., Pedreros, P., Cruces, F., Abdala-Díaz R, Hernández, V., Becerra J, & Urrutia, R. 2018. Effect of *Didymosphenia geminata* coverage on the phytobenthic community in an Andean basin of Chile. Rev Chil Hist Nat., 91(1):10. <https://doi.org/10.1186/s40693-018-0080-y>.
- Gillis, C. A. & Chalifour, M. 2010. Changes in the macrobenthic community structure following the introduction of the invasive algae *Didymosphenia geminata* in the Matapedia River (Québec, Canada). Hydrobiologia, 647:63-70
- Gillis, C. A., Dugdale, S. J., & Bergeron, N. E. 2018. Effect of discharge and habitat type on the occurrence and severity of *Didymosphenia geminata* mats in the Restigouche River, eastern Canada. Ecohydrology, 11: 959.
- Gómez, N. 1991. Flora diatomológica del Embalse Río III (Prov. Córdoba, Argentina) I. Centrales. Gayana, Bot. 48 (1-4): 3-9.
- Gómez, N. 1999. Epipellic diatoms from the Matanza-Riachuelo river (Argentina), a highly polluted basin from the pampean plain: biotic indices and multivariate analysis. Aquat. Ecosyst. Health Managem. 2: 301-309.
- Hakkansson, H. & H. King. 1990. The current status of some very small freshwater diatoms of the genera *Stephanodiscus* and *Cyclostephanos*. Diatom Research. 5 (2): 273-287.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot. H. 1991. Bacillariophyceae 3 Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In Ettl, H., J. Gerloff, Heynig & D. Mollenhauer (eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa 2/3: 1-576, G. Fischer, Stuttgart.
- Hasle, G. & Fryxell, G. 1970. Diatomeas: limpieza y montaje para microscopía óptica y electrónica. Sociedad Trans Am Microsc. 89:469-74.
- Guiry, G.M. in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 15 July 2022. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>
- Instituto Geográfico Nacional (IGN). 2018. Hidrografía y Oceanografía: Aguas continentales. [http:// www.ign.gob.ar](http://www.ign.gob.ar)
- Kawecka, B. & Sanecki, J. 2003. *Didymosphenia geminata* in running waters of southern Poland: Symptoms of change in water quality? Hydrobiologia, 495:193-201

- Kilroy, C., Biggs, B., Blair, N., Lambert, P., Jarvie, B., Dey, K., Robinson, K. & Smale, D. 2005. Ecological studies on *Didymosphenia geminata*. National Institute of Water & Atmospheric Research Ltd, Christchurch, New Zealand. Client Report: CHC2005-123. 79p.
- Kilroy, C. & Dale, M. 2006. Biosecurity New Zealand A comparison of sampling methods for the detection of the invasive alga *Didymosphenia geminata* in New Zealand rivers. NIWA, New Zealand.
- Kilroy, C. & Novis, P. 2018. Is *Didymosphenia geminata* an introduced species in New Zealand? Evidence from trends in water chemistry, and chloroplast DNA. *Ecol Evol*, **8**:904–19
- Kociolek, J. P. & Stoermer, E. F. 1988. Taxonomy, ultrastructure and distribution of *Gomphoneis herculeana*, *G. eriense* and closely related species. (Naviculales: Gomphonemataceae) Proc. Acad. Nat. Sci. Phila. 140: 24-97.
- Kociolek, J. P., Uyua, N. M., Sala, S. E., Santinelli, N. H. & Cefarelli, A. 2017. New species, new taxon report and biogeography of the diatom genus *Gomphoneis* Cleve (Bacillariophyceae) in Patagonia, Chubut Province, Argentina. *Diatom Research*. DOI: 10.1080/0269249X.2017.1393009
- Kunza, L.A., Gillis, C.A., Haueter, J.Z., Murdock, J. N., & O'brien, J. M. 2018. Declining phosphorus as a potential driver for the onset of *Didymosphenia geminata* mats in north American rivers. *River. Res. Appl.*, **34**(8):1105–10.
- Lamaro, A. A., Pisonero, J., Uyua, N., Sastre, V., Santinelli, N., Muñoz Saavedra, J., & Sala, S.E. 2019. Distribución de la diatomea invasora *Didymosphenia geminata* (Bacillariophyceae) en cuerpos de agua patagónicos de Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 54:169.
- Larson, A. M. & Carreiro, J. 2008. Relationship between nuisance blooms of *Didymosphenia geminata* and measures of aquatic community composition in Rapid Creek, South Dakota. In Bothwell, M. L. & S. A. Spaulding (eds), Proceedings of the 2007 International Workshop on *Didymosphenia geminata*. Canadian Technical Report on Fisheries and Aquatic Sciences 2795: 45–49.
- Parra, O, González, M, Dellarossa, V, Rivera & P, Orellana, M. 1982a. Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile. I: Cianofíceas. Concepción, Editorial Universidad de Concepción; mil novecientos ochenta y dos.
- Parra, O., González, M., Dellarossa, V., Rivera, P. & Orellana, M. 1982b. Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales con especial referencia al fitoplancton de Chile, III: Cryptophyceae, Dínophyceae y Euglenophyceae. Concepción, Editorial Universidad de Concepción
- Parra, O., González, M., Dellarossa, V., Rivera, P. & Orellana, M. 1982c. Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales: con especial referencia al fitoplancton de Chile. V: Chlorophyceae, Parte 1: Volvocales, Tetrasporales, Chlorococcales y Ulothricales. Concepción, Editorial Universidad de Concepción.
- Patrick, R. & Reimer, C. W. 1966. The Diatom of the United States (exclusive of Alaska and Hawaii). I. Monogr. Acad. Nat. Sci. Phila. 13: 1-688.
- Patrick, R. & Reimer, C. W.. 1975. The Diatom of the United States (exclusive of Alaska and Hawaii). II. Monogr. Acad. Nat. Sci. Phila. 13: 1-213.
- Pizzolon, L.; Santinelli, N.; Marinone, M.C. & Menu-Marque S.A. 1995. Plancton e

- hidroquímica del lago Futalaufquen (Patagonia, Argentina) durante la temporada de crecimiento. *Hydrobiologia*. 316 (1): 63-73
- Reid, B.L., Hernández, K. L., Frangópulos, M., Bauer, G., Lorca, M., Kilroy, C. & Spaulding, S. 2012. The invasion of the freshwater diatom *Didymosphenia geminata* in Patagonia: prospects, strategies, and implications for biosecurity of invasive microorganisms in continental waters. *Conserv Lett.*, **5**:432–40.
- Reid, B. & Torres, R. 2014. *Didymosphenia geminata* invasion in South America: ecosystem impacts and potential biogeochemical state change in Patagonian rivers. *Acta Oecol.*, **54**:101–9.
- Santinelli N. H., Otaño S. H. & Pizzolon L. (1998) Phytoplankton periodicity and spatial distribution in Futalaufquen Lake, Patagonia, Argentina, *SIL Proceedings*, 1922-2010, 26:4, 1772-1776, DOI: 10.1080/03680770.1995.11901042.
- Sastre, A.V., Santinelli, N. H., Bauer, G. A., Ayestarán M. G. & Uyua, N. M. 2013. First record of the invasive diatom *Didymosphenia geminata* (Lyngbye) Schmidt in a Patagonian Andean river of Argentina. *BioInvasions Records*, **2**: 11-17.
- Sax, D.F., & Gaines, S. D. 2003. Species diversity: from global decreases to local increases. *Trends Ecol. Evol.* **18**:561–566.
- Spaulding, S. A., & Elwell, L. 2007. Increase in nuisance blooms and geographic expansion of the freshwater diatom *Didymosphenia geminata*: recommendations for response. White Paper. Joint Publication of the Federation of Fly Fishers and the United States Environmental Protection Agency, Denver, Colorado, USA, 33 pp.
- Uyua, N. M., Sala, S. E., Santinelli, N. H., Sastre, A. V., Cortes, J. I., Rogel, B & De Carli, P. 2020. Valve morphology of *Didymosphenia geminata* (Bacillariophyceae) from Santa Cruz and Tierra del Fuego provinces, Patagonia, Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* **55**(4): 1-11. Versión en línea. DOI:10.31055/1851.2372.v55.n4.29634.
- Wyatt, K. H., F. R. Hauer & G. F. Pessoney, 2008. Benthic algal response to hyporheic–surface water exchange in an alluvial river. *Hydrobiologia* 607: 151–161.

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GELATINA DE PIEL DE MERLUZA EXTRAÍDA DEL GOLFO SAN JORGE

OBTENTION AND CHARACTERIZATION OF GELATIN FROM HAKE SKIN EXTRACTED FROM THE SAN JORGE GULF

María Cecilia Tiedemann¹, Cecilia Crovetto² Adelaida Ávila¹, Marisa Martinelli³.

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

²Departamento Bioquímica, Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Ruta 1 s/n, Km 4, CP 9000, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

³Laboratorio de Materiales Poliméricos (LaMaP). Dpto. de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA). CONICET. Córdoba, Argentina.

mc_tiede@yahoo.com.ar

Resumen

La utilización de subproductos de la pesca para la obtención de gelatina ha ganado interés como alternativa a la gelatina de mamíferos. El objetivo de este trabajo fue optimizar el método de extracción y caracterizar la gelatina obtenida a partir de piel de merluza común (*Merluccius hubbsi*) extraída del Golfo San Jorge. La metodología empleada para la obtención de la gelatina fue optimizada utilizando un diseño factorial replicado 2³ con un punto central empleando el programa Minitab19. Asimismo, se estudió el efecto de la concentración de hidróxido de sodio, temperatura y tiempo de extracción sobre la variable de respuesta (rendimiento). Los rendimientos encontrados en esta experiencia varían en el rango de 11 a 22 % demostrándose que las variables tiempo, temperatura y concentración de NaOH utilizadas afectan el rendimiento de gelatina obtenida. Una vez encontrada las condiciones óptimas para la obtención de la gelatina que son: pretratamiento químico con NaOH 0,1M y tratamiento térmico a 60°C durante 150 minutos, con un rendimiento máximo de 21,74 %, se procedió a caracterizarla mediante distintas metodologías: espectroscopia FTIR, dicroísmo circular, determinación de punto isoeléctrico, punto de fusión, composición de aminoácidos mediante HPLC y su distribución de masas molares por electroforesis en gel de poliacrilamida. La gelatina obtenida presenta un punto isoeléctrico de 4,6, un punto de fusión de 17,5±0,7°C y masa molar con bandas definidas (202 KDa, 154KDa y 98 KDa). Los tres aminoácidos predominantes son glicina, prolina e hidroxiprolina, y la estructura secundaria predominante a 45°C es la *random coil*.

Palabras clave: caracterización- diseño factorial-gelatina- merluza-piel.

Abstract

The use of fishery by-products to obtain gelatin has gained interest as an alternative to mammalian gelatin. The objective of this work was to optimize the extraction method and to characterize the gelatin obtained from common hake (*Merluccius hubbsi*) skin extracted from the San Jorge Gulf. The methodology used to obtain the gelatin was optimized using a replicated factorial design with a central point using the Minitab19 program. The effect of sodium hydroxide concentration, temperature and extraction time on the response variable (yield) was also studied. The yields found in this experience varied in the range of 11 to 22 %, demonstrating that the variables time, temperature and NaOH concentration used affect the gelatin yield obtained. Once the optimal conditions for obtaining gelatin were found, which are: chemical pretreatment with NaOH 0.1M and heat treatment at 60 ° for 150 minutes, with a maximum yield of 21,74%, it was characterized by means of different methodologies: FTIR spectroscopy, circular dichroism, determination of isoelectric point, melting point, amino acid composition by HPLC and its molar mass distribution by electrophoresis in polyacrylamide gel. The gelatin obtained has an isoelectric point of 4.6, a melting point of $17.5 \pm 0.7^\circ\text{C}$ and molar mass with defined bands (202 KDa, 154KDa and 98 KDa). The three predominant amino acids are glycine, proline and hydroxyproline, and the predominant secondary structure at 45°C is *random coil*.

Keywords: characterization- factorial design-gelatin- skin hake.

Introducción

La gelatina o colágeno hidrolizado, se obtiene de un pretratamiento químico con posterior tratamiento térmico del colágeno proveniente de subproductos de animales como piel de cerdo (46 %), pieles de bovinos (29 %), huesos (23 %) y otras fuentes (Mano *et al.*, 2014). En la actualidad, se buscan nuevas fuentes para la extracción de gelatina como la piel de pescado. Las fuentes alternativas de gelatina, presentan ciertas ventajas frente a las obtenidas de mamíferos, debido a que

no están asociadas con la transmisión de enfermedades como la encefalopatía esponjiforme bovina o la fiebre aftosa, así como también no posee restricciones culturales o religiosas (el judaísmo y el islam prohíben el consumo de productos provenientes del cerdo, mientras que los hindúes del ganado bovino). Por otro lado, el aprovechamiento de subproductos de la pesca que actualmente son descartados reduciría la contaminación ambiental, permitiendo aprovechar un recurso renovable rico en colágeno. Después de

fileteado, alrededor del 30 % del pescado correspondiente a huesos y piel que tienen un alto contenido en colágeno, son eliminados (Gómez-Guillen *et al.*, 2002). La piel de pescado representa entre el 4.5 y 10 % del peso corporal del pez, siendo un recurso cuantitativamente significativo (Souza *et al.*, 2004).

El proceso de extracción de la gelatina consiste en convertir el colágeno insoluble en gelatina soluble. El pretratamiento químico, rompe los enlaces no covalentes desorganizando la estructura, permitiendo así el hinchamiento y posterior solubilización del mismo (Stainsby, 1987). El posterior tratamiento térmico, modifica los enlaces covalentes y puentes de hidrógeno que desestabilizan la triple hélice, lo que origina el desenredo de la cadena (la hélice cambia a la forma espiral) y la disociación de las cadenas polipeptídicas en componentes más pequeños, produciendo la conversión del colágeno insoluble a gelatina soluble de forma irreversible (Gómez-Guillen *et al.*, 2002).

Existen diversas metodologías de extracción consecuencia de la diversidad de fuentes a partir de las cuales se puede obtener gelatina (Karim *et al.*, 2009). Dependiendo del pretratamiento empleado, se pueden obtener dos gelatinas comerciales: Gelatina tipo A (punto isoeléctrico 8-9, procedente de la piel de

cerdo) y gelatina tipo B (punto isoeléctrico 4-5, derivada de piel de bovino). La aplicación del tipo de pretratamiento químico dependerá del grado de reticulación del colágeno en la materia prima (Gómez Guillen *et al.*, 2011). Entre los factores que influyen sobre el rendimiento de extracción del colágeno se puede mencionar el tipo de especie empleada, el acondicionamiento previo a la extracción (concentración de ácido o álcali) y las condiciones de extracción empleadas (tiempo y temperaturas) (Karim *et al.*, 2009).

En el presente trabajo, se optimizó el método de extracción y se caracterizó la gelatina obtenida a partir de piel de merluza común (*Merluccius hubbsi*) extraída del Golfo San Jorge. Para optimizar el proceso de extracción, con el objetivo de alcanzar los mejores rendimientos en la obtención de gelatina a partir de piel de merluza, se propuso el empleo del diseño de experimentos (DOE). Esta metodología representa una herramienta que permite investigar los efectos de las variables de entrada (factores) sobre una variable de salida (respuesta) al mismo tiempo. Estos experimentos consisten en una serie de pruebas en las que se realizan cambios intencionales en las variables de entrada. El DOE se emplea para identificar las condiciones del proceso que afectan la

variable de salida, para posteriormente determinar la configuración de factores que optimiza el resultado (Gutiérrez Pulido *et al.*, 2008).

Materiales y métodos

Muestras: Para la obtención de gelatina se emplearon pieles de merluza común (*Merluccius hubbsi*) del Golfo San Jorge, obtenidas de pesqueras de la zona inmediatamente después del fileteado. Posteriormente se procedió a la limpieza (separación del tejido muscular) y descamación manual. Finalmente, las pieles fueron almacenadas a -18°C hasta su procesamiento.

Extracción de la gelatina: Las pieles (100 g) se lavaron con agua potable y se cortaron en cuadrados de 1cm² aproximadamente, se sometieron a un pretratamiento con NaOH 0,05, 0,1 o 0,15 M según el número de experimento, en una relación piel: solución 1:3 (p/v) a 10°C por 48 horas. Posteriormente, se lavaron con agua destilada y se neutralizaron con

HCl 0,05N. En la etapa de extracción, se colocó piel en agua destilada en una relación piel: solución 1:4 (p/v) y se agitó en forma constante a 50, 60 o 70 °C durante 60, 120 o 240 minutos según el número de experimento. Posteriormente, se filtró y la solución se congeló por 24 horas. El agua excedente se separó por descongelado a 20 °C y se filtró nuevamente. Las soluciones de gelatina fueron colocadas en placas de Petri y se secaron a 30 °C por 48 horas. (Miano *et al.*, 2014).

Las películas de gelatina secas fueron molidas con molinillo. La gelatina en partículas, fue pesada y conservada en frascos de vidrio y almacenada para su posterior análisis.

El rendimiento de la gelatina extraída, se determinó teniendo en cuenta la masa de gelatina en polvo obtenida por cada 100 g de piel húmeda, el resultado fue expresado en porcentaje de acuerdo a la siguiente fórmula (Binsi *et al.*, 2009):

$$\text{Rendimiento de gelatina (\%)} = \frac{\text{masa de gelatina en polvo (g)}}{\text{masa de piel húmeda (g)}} \times 100$$

Diseño experimental: Se estudió la influencia de la concentración de NaOH, el tiempo y la temperatura sobre la variable de respuesta (rendimiento), estableciéndose dos niveles para cada

factor. Se empleó un diseño factorial replicado 2³ con un punto central. En este tipo de diseño, el comportamiento de la respuesta Y puede describirse mediante el modelo de efectos dado por:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_1 + \beta_3 X + \beta_{12} X_{12} + \beta_{13} X_{13} + \beta_{23} X_{23} \gamma_i + \beta_{123} X_{123} + \varepsilon$$

Dónde ε es el error aleatorio; β_1 , β_2 y β_3 representan el coeficiente de los factores concentración de NaOH ([NaOH]), tiempo (t) y temperatura (T); β_{12} , β_{13} y β_{23} representan los coeficientes de las interacciones [NaOH]*T, [NaOH]*t y T*t; β_{123} es la interacción de los tres factores [NaOH]*t* T. Para realizar el DOE y analizar los resultados se utilizó el programa Minitab19.

Caracterización de la gelatina: La gelatina en polvo obtenida con el tratamiento que presentó mayor rendimiento (pretratamiento químico con NaOH 0,1M y tratamiento térmico a 60°C durante 150 minutos) fue caracterizada usando distintas metodologías:

Espectroscopia infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR): Se utilizó FTIR para caracterizar los grupos funcionales. Los espectros se registraron utilizando un Microscopio Infrarrojo Nicolet iN10 Thermo Scientific. Los interferogramas de Reflectancia Total Atenuada por Transformada de Fourier (ATR-FTIR) fueron adquiridos utilizando el accesorio multi bounce con cristal ZnSe empleando un equipo iZ10 acoplado al microscopio IR.

Determinación del punto isoelectrico (pI): Para la determinación del pI de la gelatina se prepararon 50 ml de una

solución acuosa 0,5% p/v y se le añadieron dos gotas de NaOH 0,5 M. Luego de agitar hasta su total disolución se midió el pH. Se completó una bureta de 25 ml con ácido acético 0,5 M y se midió el pH de la solución cada 0,1 ml de ácido agregado hasta la aparición de turbidez. Se graficó el pH en función del volumen de ácido acético añadido. La primera derivada del gráfico obtenido, corresponde al punto isoelectrico de la gelatina (mínimo o máximo).

Determinación del punto de fusión: El punto de fusión se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Choi *et al.*, 2000. Se preparó una solución de gelatina con una concentración de 6,67% (p/v), y se transfirieron alícuotas de 5 ml a tubos de ensayo. Los tubos fueron calentados a baño María a 60°C por 15 minutos, seguidamente fueron enfriados en baño de hielo y madurados a 10 °C por 16 a 18 horas. Luego, se adicionaron cinco gotas de una mezcla de 75% de cloroformo y 25% del colorante violeta de metilo sobre el gel. Posteriormente, el gel fue colocado en baño termostático a 10 °C y calentado a 1°C por minuto. El punto de fusión se determinó en el momento en que las gotas coloreadas empezaron a moverse hacia el interior del gel.

Distribución de masas molares por electroforesis en gel de poliacrilamida:

El análisis de la distribución de masa molares, se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se trabajó con la técnica de geles discontinuos, en la cual se usaron dos tipos de geles. El primero llamado de siembra, estaqueo o *stacking*, gel de baja concentración (4%) de poro grande, preparado en *buffer* Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, permitiendo que la muestra se concentre y llegue al segundo gel llamado separador, corrida o *running* preparado con *buffer* Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8.

El SDS-PAGE se realizó por el método de Schagger y Von Jagow, 1987, en un equipo Mini-Protean IV de Bio Rad. La concentración del monómero fue de 10% (p/v) en el gel de corrida. Se utilizó un marcador de peso molecular *Broad Range* de BioRad (5 µl). Se sembraron 20 µL de una solución de gelatina de concentración 0,1%. La electroforesis se realizó a 40 V hasta concentrar muestra, luego a 60 V por 10 min, y luego a 100 V hasta completar la corrida. Una vez concluida la electroforesis, se analizó el gel por coloración con *coomasie blue* y plata.

Dicroísmo circular: Los análisis por dicroísmo circular se realizaron a 45°C en una celda conectada a un baño de agua con control termostático y sometida a flujo de nitrógeno en un espectropolarímetro Jasco

J-810. Se registraron espectros en un intervalo de longitudes de onda entre 190-250 nm en una celda rectangular con paso óptico de 1 cm. Los espectros obtenidos fueron el promedio de tres *scanner* con un ancho de banda de 1 nm y fueron reportados en términos de elipticidad [q]. La concentración empleada para la gelatina B (GB) fue de 10 mg/l y la de gelatina de pescado (GP) de 7 mg/l.

Composición de aminoácidos por HPLC: Se realizó la determinación del contenido en aminoácidos presentes en la muestra por cromatografía líquida de alta performance con detección UV con arreglo de diodos (HPLC-PDA) previa hidrólisis y derivatización química de los aminoácidos (Marino *et al.*, 2017).

La identificación y cuantificación de cada aminoácido se realizó usando patrones puros y soluciones de origen comercial. Cisteína y triptófano no se determinaron por ser estos degradados en el proceso de hidrólisis.

Bajo las condiciones de ensayo, la resolución cromatografía de valina y metionina no es lo suficiente como para la determinación individual, por tal motivo se informan como la sumatoria de ambos aminoácidos.

Los resultados se informan como porcentaje de cada aminoácido sobre el total de aminoácidos determinados.

Resultados y discusión:

En el presente trabajo, se estudió la influencia de las variables tiempo, temperatura y concentración de NaOH empleadas en la extracción de la gelatina sobre la variable de respuesta (rendimiento). El análisis estadístico (ANOVA) del diseño experimental permite evaluar los efectos de los factores sobre la variable de respuesta. Los efectos son estadísticamente significativos cuando sus valores *p* en la tabla de coeficientes codificados son menores al nivel de significancia (α). Si se toma un nivel de confianza de 95%, por lo tanto, un nivel de significancia (α) predeterminado de 0,05, se observa que todos los efectos principales (concentración de NaOH, temperatura y tiempo) son significativos.

A partir de los valores de F (Tabla I), se observa que el efecto principal más significativo es la temperatura empleada en la extracción, seguido del tiempo. La combinación tiempo-temperatura es el efecto de interacción para dos factores más significativos, seguido de la interacción tiempo- concentración. En la Figura 1 se representa el diagrama de Pareto, empleado para evaluar el efecto de la concentración de NaOH, tiempo y temperatura utilizadas en la extracción sobre el rendimiento. Se observa que los efectos tiempo*temperatura, temperatura, tiempo*concentración de NaOH, tiempo y concentración de NaOH son significativos dado que se extienden más allá de la línea de referencia.

Tabla I: Análisis de Varianza.
Table I: Analysis of Variance.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	202,027	25,2533	24,06	0,000
Lineal	3	53,186	17,7286	16,89	0,000
t	1	16,322	16,3216	15,55	0,003
T	1	29,052	29,0521	27,68	0,001
C	1	7,812	7,8120	7,44	0,023
Interacciones de 2 términos	3	116,753	38,9176	37,08	0,000
t*T	1	83,631	83,6310	79,68	0,000
t*C	1	28,837	28,8369	27,47	0,001
T*C	1	4,285	4,2849	4,08	0,074
Interacciones de 3 términos	1	0,970	0,9702	0,92	0,361
t*T*C	1	0,970	0,9702	0,92	0,361
Curvatura	1	31,118	31,1178	29,65	0,000
Error	9	9,447	1,0496		
Total	17	211,473			

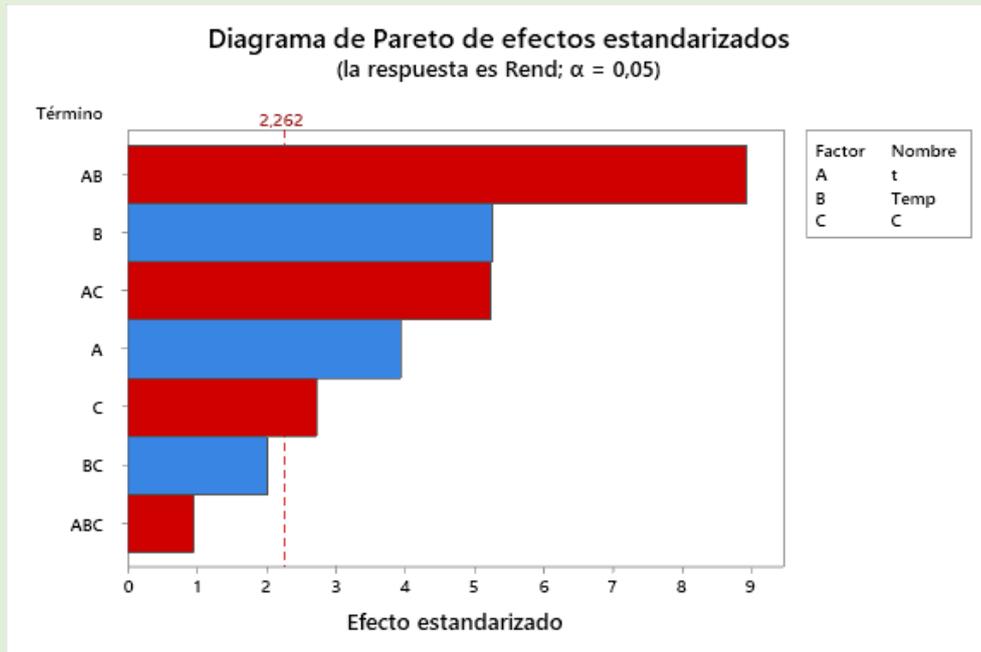


Figura 1: Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.
Figure 1: Pareto diagram of standardized effects.

En las gráficas de interacción (Figura 2) se representa en el eje vertical la variable de respuesta y en el eje horizontal los factores con sus diferentes niveles. Cuando existe interacción las líneas obtenidas tienen una pendiente muy diferente, y si no existe interacción las líneas tienen pendientes similares, que son aproximadamente paralelas. Se observa, en dichas gráficas, el efecto importante en el rendimiento que

posee la interacción tiempo*temperatura, y tiempo*concentración de NaOH. El tratamiento con tiempos y temperaturas más altas de extracción, produce mayor desnaturalización de la proteína disminuyendo el rendimiento. Un comportamiento similar ocurre al emplear altas concentraciones de NaOH en el pretratamiento y utilizar tiempos de extracción más largos.

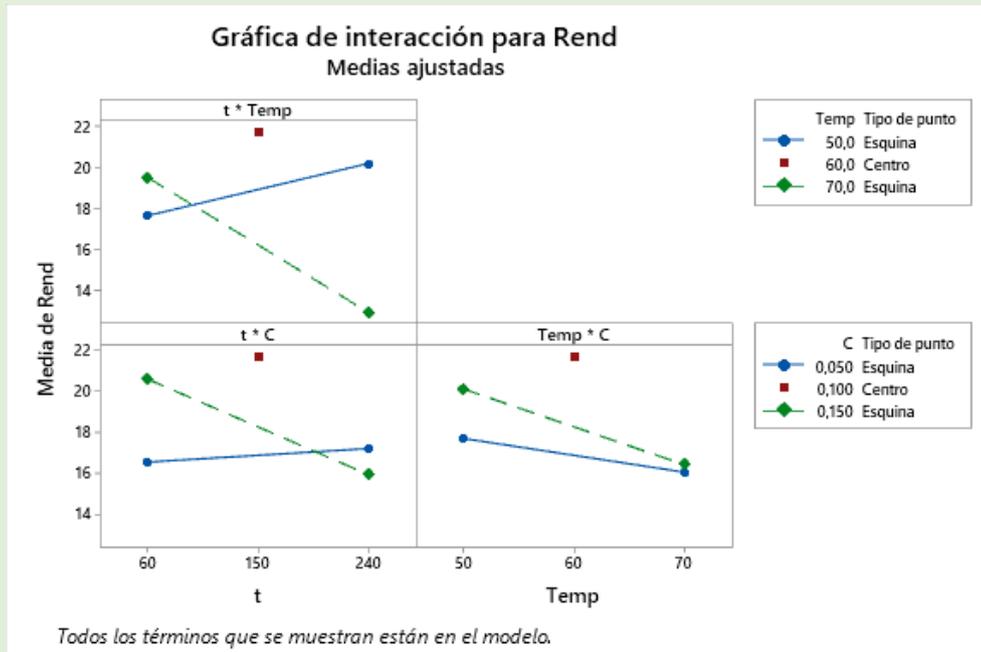


Figura 2: Gráfica de efectos de interacción para el rendimiento.
Figura 2: Graph of interaction effects for performance.

Los diseños factoriales 2^k con puntos centrales, permite detectar la presencia de curvatura en el comportamiento de la variable de respuesta y hacer un análisis más detallado de los factores, ya que al detectar la curvatura permite ajustar el error en la predicción de nuevas observaciones. Por otro lado, aporta grados de libertad para desarrollar un ANOVA con diseños no replicados. En las gráficas de efectos principales (Figura 3), se representa en el eje horizontal los niveles de cada factor y en el eje vertical

la media de la respuesta observada en los correspondientes niveles. Puede observarse, que el punto central se encuentra fuera de la recta, indicando una curvatura significativa. El comportamiento de la variable de respuesta deja de tener un comportamiento lineal, por lo que el componente cuadrático es significativo. Por lo tanto, debería usarse un diseño de composición central para ajustar el modelo (Gutiérrez Pulido *et al.*, 2008).

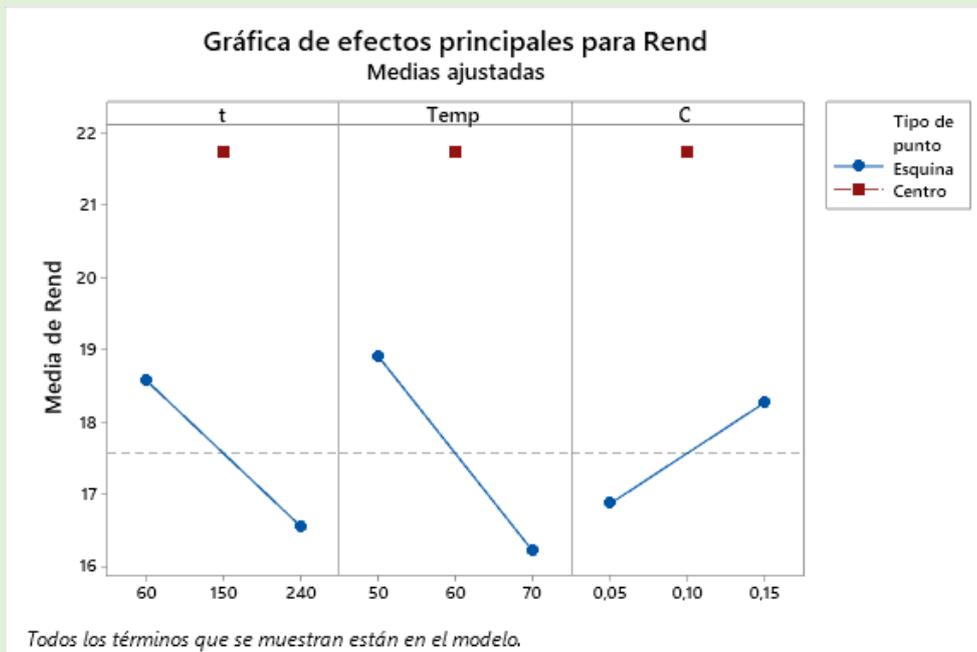


Figura 3: Gráfica de efectos principales para el rendimiento.

Figure 3: Main effects graph for performance.

Puede observarse en la gráfica de cubos (Figura 4) que el rendimiento promedio más alto (21,74 %) se obtuvo empleando las condiciones del punto central (pretratamiento químico con NaOH 0,1M y tratamiento térmico a 60°C durante 150 minutos). Se caracterizó la gelatina obtenida empleando dichas condiciones. Por el contrario, se aprecia en la misma

gráfica, que al emplear las condiciones extremas (pretratamiento químico con NaOH 0,15M y tratamiento térmico a 70°C durante 240 minutos) se obtiene el rendimiento más bajo, la mitad que el obtenido utilizando las condiciones del punto central. La disminución en el rendimiento, puede deberse a la menor estabilidad térmica de la gelatina de piel de merluza como consecuencia del menor contenido en prolina e hidroxiprolina.

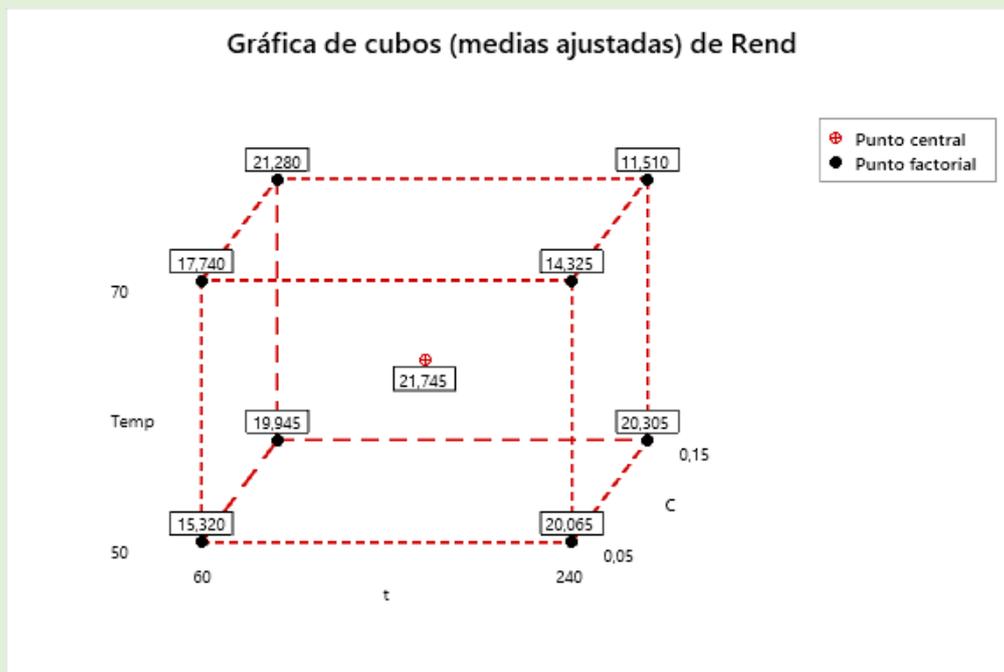


Figura 4: Gráfica de cubos para el rendimiento (medias ajustadas).

Figure 4: Cube plot for performance (adjusted means).

Los diferentes procedimientos ensayados en el proceso de optimización para la obtención de gelatina de pescado a partir de la piel de merluza, permitieron alcanzar rendimientos que oscilan entre 11 a 22 % demostrándose que las variables tiempo, temperatura y concentración de NaOH utilizadas afectan el rendimiento de gelatina obtenida. Gómez-Guillén *et al.*, 2011, obtuvieron menores rendimientos (6,5%) en la extracción de gelatina a partir de piel de merluza empleando ácido acético 0,05M en el pretratamiento químico y menores temperaturas (40°C) durante el tratamiento térmico. Esto demuestra, que la concentración y tipo de agente empleado en el pretratamiento químico, así como la temperatura utilizada en el tratamiento térmico, son variables

importantes que afectan el rendimiento en la extracción de la gelatina. Martínez *et al.*, 2011 y Irwandi *et al.*, 2009 reportaron rendimientos de gelatina que van de un mínimo de 5,51% a partir de trucha a un máximo de 68,47% a partir de kerapu. Es evidente que, el rendimiento en la obtención de gelatina no sólo depende del método de extracción utilizado y las condiciones específicas empleadas; sino también, de las propiedades intrínsecas de cada especie (Rahman *et al.*, 2009).

Las diferentes especies poseen un contenido en colágeno diferente en la composición de la piel (Gómez Guillen *et al.*, 2002). Takahashi & Yokoyama (1954) indicaron que, el colágeno derivado de peces de aguas frías posee menor contenido en hidroxiprolina y muestra menor estabilidad térmica que el colágeno

obtenido de especies que viven en ambientes cálidos. Esto se debe a que la hidroxiprolina forma enlaces puente hidrógeno intercatenarios estabilizando la estructura. Esto llevaría a un menor rendimiento en el proceso de extracción de gelatina a partir de piel de peces de agua fría como es la piel de merluza común del Golfo San Jorge. Este hecho se observa en las gráficas de interacción tiempo-temperatura (Figura 1) donde se observan como disminuye el rendimiento al aumentar la temperatura y tiempo de extracción. Lo contrario ocurre con la menor temperatura empleada (50 ° C) donde al aumentar el tiempo de extracción aumenta el rendimiento.

Estudios realizados en la optimización de la extracción de gelatina a partir de pieles de bacalao (Gudmundsson *et al.*, 1997) demostraron que los agentes usados para la extracción de gelatina afectan directamente el rendimiento y calidad de la gelatina obtenida. Los autores reportaron que, al utilizar concentraciones altas de ácidos y base (concentración de H₂SO₄ e NaOH > 0,2% p/v), obtenían gelatinas de baja calidad (menor viscosidad y fuerza de gel) y menores rendimientos. Esto se debe a que la capacidad de formación de gel de gelatina

es sensible a la hidrólisis ácida y alcalina, puesto que ambas afectan la reticulación del colágeno (Johnston-Banks, 1990). Esto explicaría los bajos rendimientos obtenidos cuando se utilizó la concentración 0,15 M de NaOH.

Los espectros IR de la gelatina de pescado y gelatina tipo B se muestran en la Figura 5. Puede apreciarse que el patrón de bandas de ambos espectros es semejante y coincide con el correspondiente a la gelatina (Muyonga *et al.*, 2004). En la figura se destacan las bandas características de la gelatina, las cuales corresponden a la de un polipéptido. De este modo, se observa la banda amida I aproximadamente a 1600 cm⁻¹, debida al estiramiento del grupo C=O; amida II alrededor de 1500 cm⁻¹, consecuencia del estiramiento C-N y vibración de deformación N-H; amida III alrededor de 1200 cm⁻¹ representando a los modos de vibración de deformación del grupo N-H y estiramiento del grupo C-N fuera del plano; y una banda ancha entre 3300-3600 cm⁻¹, correspondiente a la vibración del enlace N-H de los grupos amino, superpuesta con la vibración O-H de los grupos hidroxilo del agua, que interaccionan con los grupos amino de la gelatina (enlace hidrógeno).

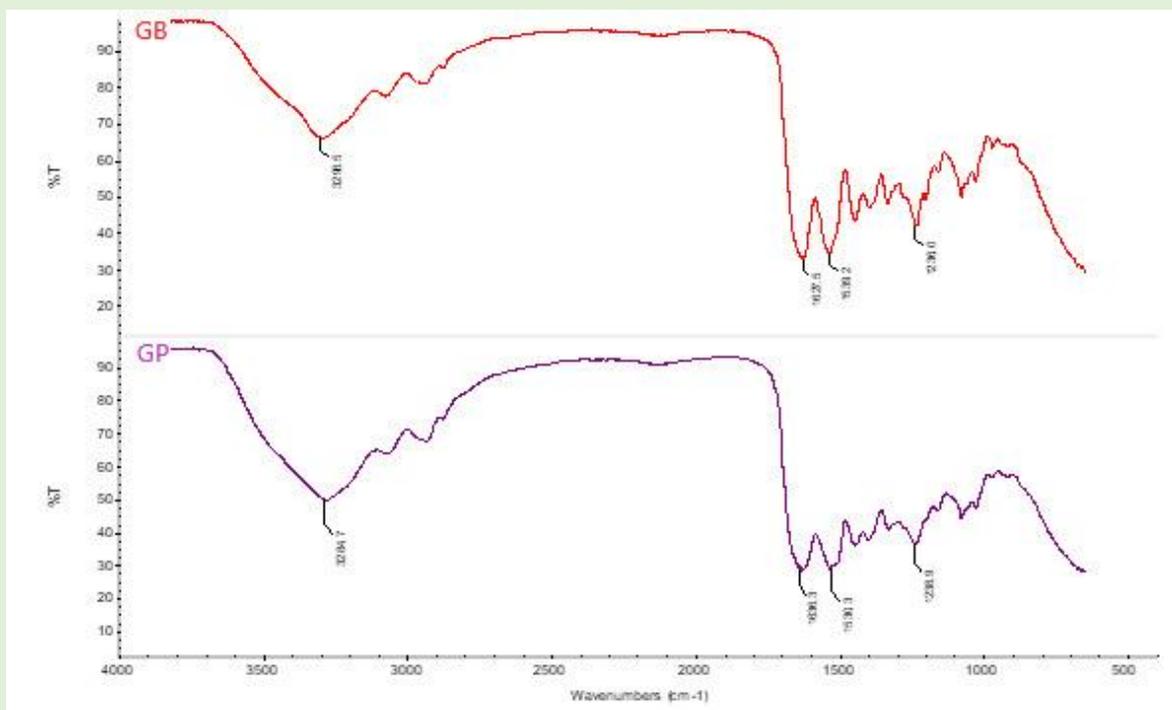


Figura 5: Espectro IR de la gelatina de pescado (GP) y la gelatina tipo B (GB).

Figure 5: IR spectra of fish gelatin (GP) and type B gelatin (GB).

La gelatina está compuesta de proteínas solubles obtenidas de un pretratamiento químico (Johnston-Banks, 1990) con posterior tratamiento térmico (Poppe, 1992) del colágeno proveniente de subproductos generados en el procesamiento de animales. Debido a la hidrólisis del colágeno, la gelatina se encuentra constituida por una mezcla de cadenas polipeptídicas de masas moleculares inferiores y de igual perfil de aminoácidos que el colágeno nativo (Gómez-Guillen *et al.*, 2002). Cadenas α (polímero de cadena simple), cadenas β (dos cadenas α enlazadas covalentemente) y cadenas γ (tres cadenas α enlazadas covalentemente) constituyen la gelatina,

además de mezclas de cadenas desplegadas simples y dobles de carácter hidrófilo (Papon *et al.*, 2007). Las masas molares de las cadenas varían de acuerdo a la especie y proceso de extracción empleado, siendo de 80 a 125 KDa, 160 a 250 KDa, 240 a 375 KDa para las cadenas α , β y γ respectivamente (Abby *et al.*, 2019). El análisis del gel (Figura 6) muestra que la gelatina de pescado presenta perfiles electroforéticos con las tres bandas características de la gelatina que correspondería a las cadenas α , β y γ . La banda 3 que correspondería a la cadena α presenta un peso molecular dentro del citado en la bibliografía, mientras que la banda 1 que correspondería a la cadena γ

presenta un peso molecular inferior al citado en la bibliografía. La banda 2 que correspondería a la cadena β posee un peso molecular dentro del rango informado en la bibliografía. Estas diferencias, pueden deberse al tipo de proceso de extracción y a la fuente del cual fueron extraídos (Karim *et al.*, 2009). Gómez-Guillen *et al.* (2002), señalaron que las masas

moleculares de las gelatinas varían entre 10 a 300 kDa, el cual depende de la especie y proceso de extracción. En la GB solo se observa una banda que correspondería a la cadena γ . Según Gómez Guillen *et al.* (2002) se pueden producir pérdidas parciales o daños de las cadenas durante el proceso de extracción.

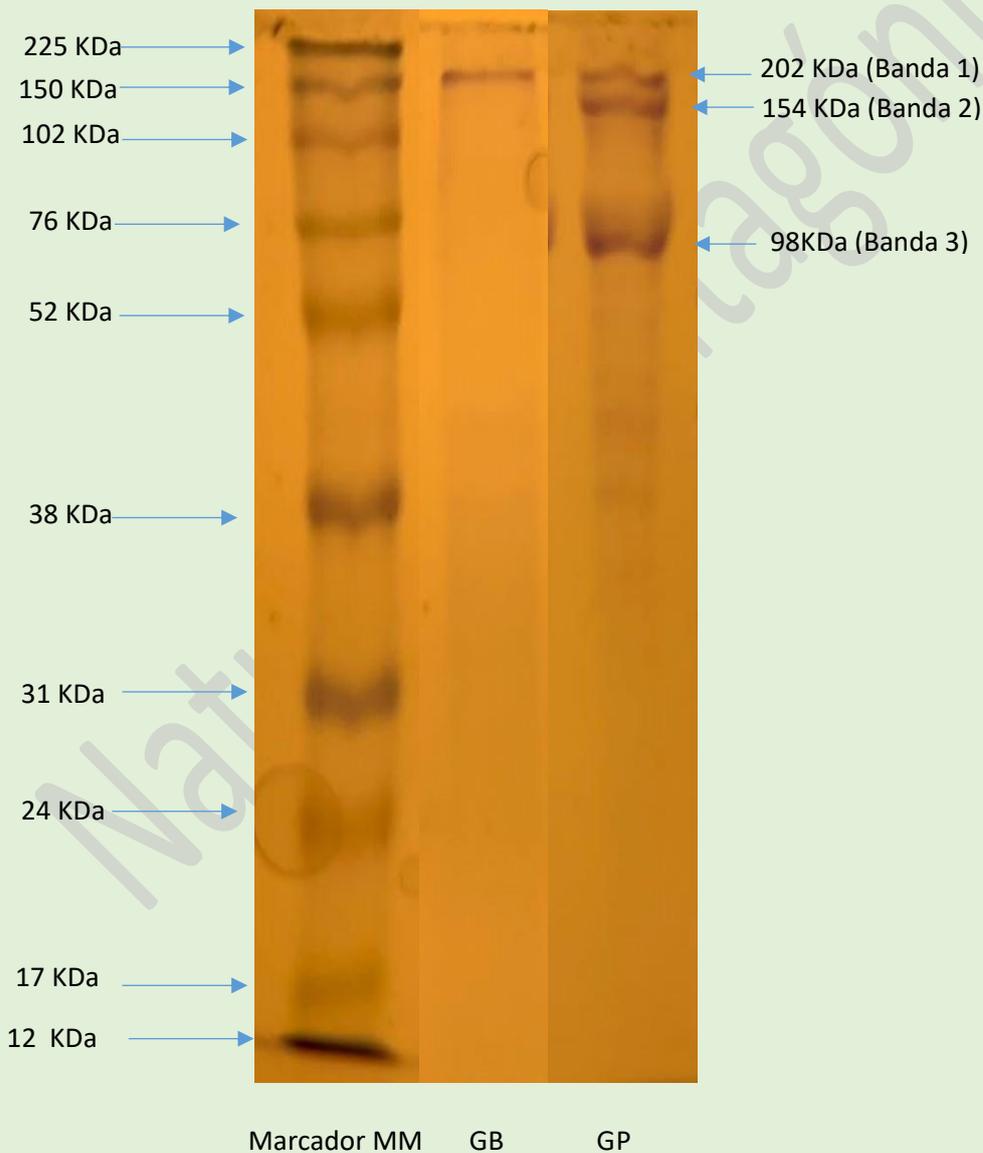


Figura 6: Electroforesis en gel de poliacrilamida (10%) de gelatina de tipo B (GB) y gelatina de pescado (GP)
Figure 6: Polyacrylamide gel electrophoresis (10%) of gelatin type B (GB) and fish gelatin (GP).

La composición de aminoácidos de GP y GB se observan en la Tabla II. Puede apreciarse, que en los dos tipos de gelatina los tres aminoácidos predominantes son glicina, prolina e hidroxiprolina. La estructura de triple hélice se debe a una repetición casi continua de la secuencia glicina-prolina-hidroxiprolina (Abby *et al.*, 2019). La gelatina con altos niveles de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) tiende a tener mayor fuerza de gel, propiedades viscoelásticas y punto de fusión (Rawdkuen *et al.*, 2013). El contenido de iminoácidos es de 30,24% y 22,06 en la GB y GP respectivamente. Se cree que la hidroxiprolina desempeña un papel en la estabilización de la triple hélice debido a su capacidad de formar puente hidrógeno a través de su grupo hidroxilo (Mizuno *et al.*, 2003). El punto de fusión de la gelatina de piel de merluza es $17,5 \pm 0,7$ °C. Este bajo punto de fusión, se

correlaciona con el menor contenido de hidroxiprolina respecto a GB. Las gelatinas de origen acuático presentan un amplio rango de temperaturas de fusión (16 a 28 °C), comparadas con las gelatinas de origen bovino y porcino cuyo punto de fusión está en el rango de 28 a 31 °C. La gran diversidad de especies de origen acuático de las cuales se obtienen la gelatina, hace que tenga un rango más amplio de temperaturas de fusión que la gelatina de mamíferos. Glisenan *et al.*, (2000) indicaron que el punto de fusión de las gelatinas se correlaciona con la proporción de aminoácidos, prolina e hidroxiprolina presentes en el colágeno nativo. Gómez-Guillen *et al.* (2011) reportaron bajas temperaturas de fusión (< 17°C) en peces de aguas frías, similares a los encontrados en la gelatina extraída de la piel de merluza.

Tabla II: Composición de aminoácidos (%) de la gelatina tipo B y gelatina de pescado.
Table II: Amino acid composition (%) of gelatin type B and fish gelatin.

%AA		
Aminoácidos	Gelatina tipo B	Gelatina de pescado
Ac. Glutámico	9,07	8,86
Ac. Aspártico	5,23	5,36
Alanina	0,08	0,08
Histidina	0,61	1,15
Arginina	6,67	7,02
Tirosina	16,11	18,99
Leucina	2,45	2,00
Fenilalanina	1,05	1,68
Isoleucina	0,99	1,07
Lisina	3,60	4,80
Serina	2,43	3,20
Treonina	0,92	2,12
Valina-Metionina	1,00	1,41
Prolina	16,91	13,96
Glicina	19,53	20,20
Hidroxiprolina	13,33	8,10

El proceso de extracción alcalina dió como resultado una gelatina cuyo punto isoeléctrico (pI) fue 4,6. Dicho valor, es similar al pI de la gelatina comercial de tipo B, ambas obtenidas por extracción alcalina.

El análisis por Dicroísmo Circular (DC), permite estimar el contenido de estructuras secundarias (α -hélice, lamina β paralela, al azar, entre otras), midiendo la capacidad de las moléculas de absorber

diferencialmente la luz polarizada circularmente a izquierda y a derecha. La rotación del plano y la diferente absorción de los componentes circularmente polarizados (dicroísmo circular) varían de acuerdo con la longitud de onda, pudiéndose obtener espectros, es decir gráficas de la rotación o elipticidad contra la longitud de onda. Los espectros de DC se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 a 350 nm) y

lejano (180 a 250 nm) de la radiación electromagnética. El resultado es que los diferentes elementos estructurales tienen espectros DC característicos. Por ejemplo, las proteínas alfa-helicoidal tienen picos negativos en 222 nm y 208 nm y un pico positivo a 193 nm. Las proteínas con láminas beta antiparalelas plegadas (β -hélices) tienen picos negativos en 218 nm y picos positivos a 195 nm, mientras que las proteínas desordenadas tienen muy baja elipticidad por encima de 210 nm y

picos negativos cerca de 195 nm (Greenfield, 2006). Los espectros de DC (Figura 7) obtenidos a 45 °C de GB y GP, son muy similares. Ambos muestran un amplio pico negativo alrededor de 200 nm. Este pico puede ser atribuido a la conformación de tipo *random coil*. Gómez-Estaca *et al.* (2017), obtuvieron espectros de DC a 45°C para la GB que mostraron solo un amplio pico negativo alrededor de 200 nm.

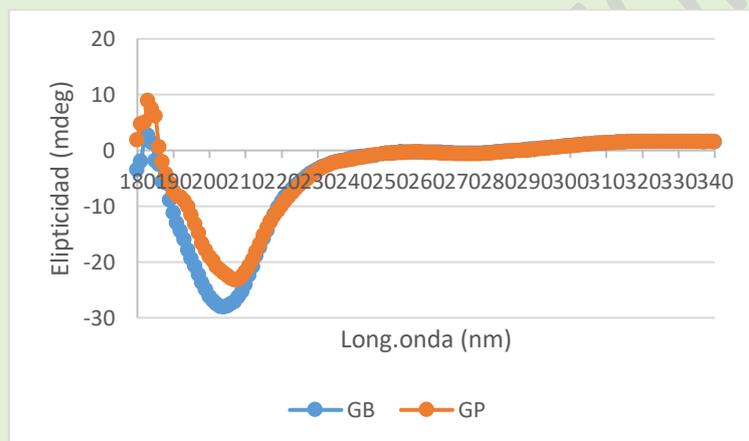


Figura 7: Espectro de dicroísmo circular para la gelatina tipo B y gelatina de pescado a 45°C.
Figure 7: Circular dichroism spectrum for gelatin type B and fish gelatin at 45 °C.

Conclusiones:

Se llevó a cabo la optimización del proceso de extracción de gelatina a partir de piel de merluza, donde se evaluó el efecto del tiempo, temperatura y concentración del álcali, buscando obtener los mejores rendimientos. Se determinó el impacto de cada una de las variables sobre el rendimiento, llevando a cabo un análisis de diseño de experimentos (DOE). La

gelatina obtenida con mejor rendimiento fue caracterizada y los resultados fueron comparados con los correspondientes a gelatina comercial tipo B. Se destacan los puntos más relevantes del trabajo realizado:

Los factores tiempo, temperatura y concentración de NaOH afectan la variable de respuesta (rendimiento) siendo la temperatura el efecto principal más

importante, seguido del tiempo de extracción.

Las condiciones de extracción tiempo*temperatura es el efecto de interacción más importante.

Las condiciones óptimas de extracción son: pretratamiento químico con NaOH 0,1M y tratamiento térmico a 60°C durante 150 minutos, obteniéndose un rendimiento máximo promedio fue de 21,74 %.

La gelatina extraída de piel de merluza posee un pI de 4,6, un punto de fusión de 17,5±0,7°C, menor contenido en iminoácidos que la gelatina comercial tipo B y perfiles electroforéticos con las tres bandas características de la gelatina que correspondería a las cadenas α , β y γ . El tipo de estructura secundaria que prevalece a 45°C es *random coil*.

Agradecimientos:

Se agradece a la Dra. Rosmarí López por sus contribuciones en la realización de este trabajo.

Bibliografía:

Abby Bravo, J.D., Rafael Vela, T. A., Alenguer, A. & Tello, F. 2019. Gelatina de piel de Doncella (*Pseudoplatystoma fasciatum*) y su uso como material encapsulante. *Tecnia*, **29**: 5-11.

Binsi, P.K., Shamasundar, B.A., Dileep, A.O., Badil, F. & Howell, N. K. 2009. Rheological and functional properties of gelatin from the skin of Bigeye snapper (*Priacanthus hamrur*) fish

influence of gel on the gel forming ability of fish mince. *Food Hydrocolloids*, **23**: 132 – 145.

Choi, S.S. & Regenstein, J.M. 2000. Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. *Journal of Food Science*, **65**:194-199.

Duhoanimana, E., Karangwa, E., Lai, L., Xu, X., Yu, J., Xia, S., Zhang, X., Muhoza, B. & Habinshuti, I. 2016. Effect of sodium carboxymethyl cellulose on complex coacervates formation with gelatin: Coacervates characterization, stabilization and formation mechanism. *Food Hydrocolloids*, **69**:11-120.

Gilsenan, P.M. & Ross-Murphy, S.B. 2000. Rheological characterization of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, **14** :191-195.

Gómez-Guillén, M.C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A. & Montero, P.2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, **16**: 25-34.

Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-caballero, M.E. & Montero, M.P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, **25**:1813–1827.

Greenfield, N. J. 2006. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, **6**: 2876- 2890.

Gudmundsson, M. & Hafsteinsson, H. 1997. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *Journal of Food Science*, **62**:37–39

Gutiérrez Pulido, H. & De La Vara Salazar, R. Análisis y diseño de experimentos. McGraw-Hill/Interamericana, México D.F., 564 pp.

Irwandi, J., Faridayanti, S., Mohamed, E.S.M., Hamzah, M.S., Torla, H.H. & Che Man, Y.B. 2009. Extraction and characterization of gelatin

- from different marine fish species in Malaysia. *Food Research Journal*, **16**: 381–389.
- Johnston-Banks, F.A. 1990. Food Gels, P. Harris (Ed.). Elsevier Applied Food Science Series, London, 467 pp.
- Karim, A. A. & Bhat, R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, **23**:563-576.
- Marino, B., Casado, C., Villarroel, P. & Turco, M. 2017. Determinación de aminoácidos por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) con derivatización pre columna. IX Congreso Argentino de Química Analítica. Río Cuarto, Argentina.
- Martínez, G., Uresti, R., Ramírez, J. & Velazquez, G. 2011. Extracción y Caracterización de algunas propiedades fisicoquímicas de gelatina de piel de Trucha. *Revista Ciencia UAQ*, **4**: 26-34.
- Miano, A., Rojas, C. & Barraza, G. 2014. Influencia de la temperatura y tiempo de extracción en la fuerza de gel y rendimiento de gelatina obtenida a partir de piel de tollo (*Mustelus mento*). *Scientia Agropecuaria*, **5**: 140 -147.
- Mizuno, K., Hayashi, T., & Bächinger, H. P. 2003. Hydroxylation-induced stabilization of the collagen triple helix: Further characterization of peptides with 4 (R)-hydroxyproline in the Xaa position. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 373-379.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B. & Duodu, K.G. 2004. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, **86**:325–332
- Papon, P., Leblon, J. & Meijer, P.H.E. 2007. The physics of phase transitions. Berlin: Springer, pp. 22-2
- Poppe, J. 1992. Gelatin. Thickening and gelling agents for food, A. Imeson (Eds.), pp. 98-123.
- Rahman, M.S. & Al-Mahrouqi, A.L. 2009. Instrumental texture profile analysis of gelatin gel extracted from grouper skin and commercial (bovine and porcine) gelatin gels. *Int J Food Res J.*, **16**: 229-242.
- Rawdkuen, S., Thitipramote, N. & Benjakul, S. 2013. Preparation and functional characterisation of fish skin gelatin and comparison with commercial gelatin. *International Journal of Food Science and Technology*, **48**: 1093–1102
- Souza, M.L.R. 2004. Tecnología para procesamiento das peles de peixe. Eduem, Coleção Fundamentum. Maringá. 59 pp.
- Stainsby, G. 1987. Gelatin gels. In A. M. Pearson, T. R. Dutson, A. J. Bailey (Eds.), *Advances in meat research, collagen as a food*. **4**: 209- 222.
- Takahashi, T., & Yokoyama, W. (1954). Physico-chemical studies on the skin and leather of marine animals — XII. The content of hydroxyproline in the collagen of different fish skins. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **20**: 525–529.

Filogenia, reloj molecular y biogeografía del clado Chelidae (Testudines, Pleurodira)

Phylogeny, molecular clock and biogeography of the clade Chelidae (Testudines, Pleurodira)

Juan Alfredo Holley^{1,2}

¹Laboratorio de Identificación Genética (IdeGen) - Instituto de Diversidad y Evolución Austral (IDEAus-CONICET), Blvd. Alte. Brown 2915, Puerto Madryn, Chubut, Argentina.

²Cátedra de Estadística, Facultad de Cs. Naturales y Cs. de la Salud, UNPSJB, sede Trelew, Inmigrantes 58, Trelew, Chubut, Argentina.

Director: Dr. Néstor G. Basso. Co-directora: Dra. Juliana Sterli

Carrera de Doctorado en Biología. Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue.

Tesis defendida el 6 de octubre de 2021 Número total de páginas: 166.

Resumen

El orden Testudines está integrado por dos subórdenes: Cryptodira, tortugas que retraen el cuello en un plano vertical, y Pleurodira, tortugas que retraen el cuello en un plano horizontal. A su vez, Pleurodira está integrado por dos clados: la hiperfamilia Pelomedusoides y el clado Chelidae. Este último es un grupo con distribución actual restringida al hemisferio Sur, con presencia en Sudamérica y Australasia (Australia y Nueva Guinea). Ambos grupos geográficos de Chelidae presentan dos morfotipos característicos: los quélidos de cuello largo y los quélidos de cuello corto.

Actualmente las relaciones evolutivas del clado Chelidae se encuentran en debate, ya que históricamente los análisis basados en datos morfológicos han producido topologías que agrupan a los quélidos de cuello largo (tanto sudamericanos como australasiáticos) en un clado, en tanto que los análisis basados en datos moleculares recuperan como grupos monofiléticos al clado sudamericano y al clado australasiático, ambos compuestos por géneros de cuello corto y géneros de cuello largo.

En el presente trabajo de tesis se planteó afrontar este conflicto desde una

perspectiva filogenética de evidencia total, integrando datos morfológicos y moleculares, incorporando a los análisis especies actuales y extintas, y complementando los mismos con un marco temporal a través de la estimación de tiempos de divergencia, así como la interpretación de toda la información en un contexto paleobiogeográfico, de modo de poder arribar a conclusiones integrales, soportadas por múltiples enfoques y fuentes de información.

A este efecto, se produjeron nuevas secuencias de ADN, nuevos caracteres morfológicos y se realizaron nuevas descripciones anatómicas, que sirvieron de base para dar cuenta de posibles fuentes de variación con potencial cladístico. Las secuencias de ADN y los datos morfológicos fueron integrados en matrices de datos preexistentes, que se analizaron individualmente y de manera combinada bajo diferentes métodos de inferencia filogenética y de estimación de tiempos de divergencia. Además, todos los resultados obtenidos en diferentes etapas de análisis, se evaluaron estadísticamente a fin de corroborar la robustez de las conclusiones resultantes.

Los resultados en el contexto de evidencia total sugieren que: **i)** se soporta la estructura del clado Chelidae como un grupo monofilético, integrado por un clado sudamericano y un clado

australasiático, el cual habría tenido su origen a mediados del Cretácico Temprano (123,2 millones de años antes del presente [maap]); **ii)** la presencia del grupo de quélidos sudamericanos extintos de cuello corto, en posición basal respecto del clado Chelidae y la mayor antigüedad del clado sudamericano (109,7 maap) respecto del australasiático (101,7 maap), sugieren que el grupo se habría originado en Sudamérica; **iii)** el cuello largo habría surgido independientemente en el clado sudamericano durante el Cretácico Tardío (93,2 maap) y en el clado australasiático a comienzos del Paleógeno (65,26 maap); **iv)** las diversificaciones más recientes que dieron origen a las especies que integran los géneros actuales, en ambos grupos geográficos, se habrían producido posteriormente a la ruptura final del sur de Gondwana (50—35 maap).

Bases biológicas para el cultivo del picoroco *Austromegabalanus psittacus* (Molina, 1782) (Cirripedia: Thoracica) en la región patagónica de Argentina.

Biological bases for the cultivation of the picoroco *Austromegabalanus psittacus* (Molina, 1782) (Cirripedia: Thoracica) in the Patagonian region of Argentina.

Tesista: Paola Irina Lanas

Director: Dr. Daniel López Stefoni. Co-directora: Dra. Pamela Balzi. Asesora de estudios: Dra. Alicia Rico.

Carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco Sede Comodoro Rivadavia. Tesis defendida el 29 de junio de 2021. Número total de páginas: 174.

Palabras clave: autóctono, balanomorfo, golfo San Jorge, maricultura.

Resumen:

El cirripedio *Austromegabalanus psittacus* (Molina, 1788) el picoroco, es un crustáceo submareal sésil que se distribuye desde el sur de Perú, a lo largo del litoral chileno y en el sur de Argentina, se cultiva experimentalmente en Chile donde es además un recurso de la pesquería artesanal. Ha sido poco estudiado en la costa argentina. Con el objetivo de sentar las bases de su eventual aprovechamiento, se realizaron estudios dirigidos a determinar su distribución y aspectos de su biología como crecimiento inicial, ciclo de vida, alimentación, y con ello poder diseñar tecnologías de cultivo.

En cinco playas comprendidas a lo largo de casi 50 km de costa, desde Playa de Km 3 (45° 82` S 67°27` O) hasta la playa lindera a playa El Boyero (46° 04` S 67°37` O) en provincia de Santa Cruz, el picoroco se encontró en el ambiente natural distribuido en tres categorías diferentes: sobre pozas de marea en el nivel intermareal medio e inferior; sobre la restinga formando agrupaciones o aisladamente en el nivel intermareal inferior y por último, provenientes de arribazones.

Las tallas de los ejemplares variaron según el tipo de ambientes y categorías en que se encontraron y según la estación del año. El crecimiento inicial en el ambiente natural

fue rápido (0,3 mm por día), semejante al crecimiento en colectores artificiales (0,27 mm por día) y comparable a los crecimientos registrados en Chile. El modelo de crecimiento de Von Bertalanffy resultó adecuado para relacionar talla y edad. El rendimiento en carne de los individuos de la población en el ambiente natural osciló entre $14,66\% \pm 12,43$.

La anatomía del sistema reproductor masculino y femenino presentó la estructura básica descrita para la especie en Chile. El estudio histológico de la gónada femenina permitió diferenciar cuatro estadios de maduración. La frecuencia de estos estadios gonadales en la población mostró diferencias respecto de las estaciones del año, siendo significativamente más frecuente la vitelogenénesis inicial en el invierno, la atresia gonadal en primavera y la gónada en reposo durante el otoño.

El estudio de la embriogénesis permitió describir ocho estadios de desarrollo, desde el huevo centrolecito fecundado hasta el estadio de prenauplio.

Los individuos de las tallas medias fueron los que se encontraron más frecuentemente incubando, es decir, con presencia de lamelas ovígeras. Los ejemplares más pequeños donde pudo observarse madurez sexual tanto del sistema reproductor femenino como del masculino tuvieron tallas de 0,70 y 0,22

cm de largo carino-rostral respectivamente.

Se observó un máximo de individuos incubando durante los meses de verano (50%), siendo el porcentaje de incubación bajo durante la mayor parte del año y nulo a fines de otoño y durante el invierno. El Índice Gonadosomático (IGS) promedio mensual fluctuó entre valores del 11% al 20%. El Índice de Condición promedio registró dos máximos: el mayor en agosto, con valores del 76%, y en los meses de enero y febrero con valores del 46 % ambos.

El análisis de la variación mensual de la fecundidad mostró diferencias significativas, registrándose los valores más altos de fecundidad en diciembre, siendo los meses de verano en general los que presentaron mayores valores comparados con el resto del año. En cuanto a la relación entre el tamaño de los organismos y la fecundidad, para el parámetro número de huevos por gramo de lamela ovígera (NGL), la relación fue negativa. Los individuos pequeños y las tallas medias presentaron los más altos valores de NGL. Mientras que para el parámetro número de huevos por lamela (NHL) esta relación fue positiva.

El reclutamiento en los colectores artificiales fue marcadamente estacional y ocurrió durante los meses de verano, tanto a los 2 metros como a los 4 metros de

profundidad. Los diferentes tipos de colectores también evidenciaron diferencias en la densidad del reclutamiento.

El sistema de alimentación presentó la estructura típica de los balanomorfos. La anatomía de los cirros presentó variaciones asociadas al tamaño de los ejemplares, y esto fue más notorio en el caso de los cirros manipuladores. La longitud de los cirros captadores y manipuladores se asoció a la variación del largo carino-rostral (LCR) mediante funciones potenciales que explicaron alrededor del 50% de la variación de la longitud cirral. Lo mismo ocurrió con el número de artejos de los cirros manipuladores, siendo esta relación más débil en el caso de los cirros captadores.

La relación entre estos parámetros y la altura carinal (AC) fue diferente. La longitud de los cirros manipuladores no se asoció a esta variable de talla, mientras que los cirros captadores lo hicieron débilmente. El parámetro que se asoció más fuertemente a la AC fue el número de artejos por cirro, y fue mayor en los cirros captadores (alrededor del 65% de la variación encontrada), que en el caso de los manipuladores (alrededor del 30%).

El estudio de la alimentación natural permite señalar que el picoroco es una especie oportunista, pero con algún grado de selectividad. Es omnívora, pero

preferentemente herbívora, dado que se determinó una mayor proporción de contenido algal que animal en la dieta. La fracción animal está constituida principalmente por microfauna bentónica que persiste por poco tiempo como meroplancton en la columna de agua. La composición de la dieta indica una alimentación preferentemente planctófaga.

Se propone para la especie un tipo de cultivo semiintensivo, que aproveche su ciclo de vida, con captación de semilla y crecimiento en los mismos colectores. La captación de semilla debe hacerse a fines de la primavera y comienzos del verano, preferentemente en un fondeo individual con línea madre vertical.

Siguiendo el modelo de Von Bertalanffy para relacionar talla y edad, se estimó que a los 100 días de crecimiento en los colectores los individuos alcanzan la madurez sexual, a los 200 días alcanzan la talla comercial para Japón y a los 400 días, alcanzan los 2 cm de LCR. En este período la población debería estar reproductiva todo un año y abasteciendo los bancos naturales de semilla.

El picoroco es una especie con alta potencialidad de cultivo en el golfo San Jorge, debido a que es biológicamente fácil de cultivar, las tecnologías utilizadas para ello son sencillas y de bajo costo.

Publicaciones científicas derivadas de la

Tesis:

Lanas P., Riera M., Kowal R., López B. y López D. (2011) "Alimentación natural de *Austromegabalanus psittacus* (Molina, 1782) (Cirripedia: Balanidae) en el Golfo San Jorge (Chubut, Argentina)" *BioScriba*.4(1)38:43. Bahía Blanca. Argentina.

Naturalia Patagónica