



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud
Departamento de Farmacia

BUSQUEDA DE METABOLITOS BIOACTIVOS CON
APLICACION FARMACEUTICA EN *UNDARIA
PINNATIFIDA* (ALARIACEAE), UN ALGA PARDA
INVASORA DE LAS COSTAS PATAGONICAS
ARGENTINAS

Autor

Miriam Delma Escobar Daza

Director de Tesis

Dr. Osvaldo León Córdoba

Co-Director de Tesis

Dra. María Luján Flores

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN FARMACIA

Lugares de Trabajo: **Farmacognosia y GQBMRNP-CRIDECIT,**

FCNyCS, UNPSJB

2018



Dedicatoria

A mis padres Miriam y José
A Lorenzo, Guadalupe, Ángeles y Francisco
A mis hermanas y hermanos
A Norberto

Agradecimientos

Al Dr. Osvaldo León Córdoba, Director de esta Tesis, por tus conocimientos cedidos, por guiarme durante estos años, por confiar en mí, por tu gran paciencia, por los momentos compartidos, por todo tu tiempo brindado. Muchas gracias.

A la Dra. María Luján Flores, Co-Director de esta Tesis, por ensañarme, acompañarme y guiarme durante todo el desarrollo de esta tesis, por los momentos compartidos, por tu amistad, por tus palabras y consejos, por tu tiempo. Gracias querida amiga.

Agradezco también:

A la Dra. Alicia Boraso y Dr. Héctor Zaixso (Q.E.P.D.), por su colaboración en la identificación taxonómica de la especie que se estudió en la presente tesis.

A la Dra. Mónica Becerra, por tu compañerismo, paciencia, amistad, por los buenos momentos de relajación, por tu apoyo y consejos, por cederme el tiempo necesario en la cátedra para continuar con la tesis, por llevar mis muestras a Paris y Grecia, muchas gracias.

A la Dra. Graciela Pinto Vitorino, por tu constante apoyo, sus palabras de aliento y siempre estar presente en los buenos y no tan buenos momentos, por tu amistad.

A la Dra. Sandra Alcalde, por tu alegría, tu amistad, por cederme el tiempo necesario para continuar con la tesis, muchas gracias.

A la Dra. Analía Uhrich, por estar siempre pendiente del avance de mi tesis, tu apoyo, por las charlas que reconfortaron mi ánimo, por tu amistad.

A la Dra. Susana Riso, por todas las gestiones realizadas en su función como secretaria académica y sus palabras de aliento y su calidez.

A la Dra. Mari Arce, por su tiempo brindado durante el herborizado de las muestras, su buena predisposición a responder a mis consultas.

A la Dra. Caroline Weinstein-Oppenheimer y al Dr. Mauricio Reyna Jeldes de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaiso, Chile, por los estudios de actividad sobre líneas celulares neoplásicas humanas realizados.

Al Dr. Choi, por darme la oportunidad de trabajar en los laboratorios de la Universidad de Leiden, Holanda.

A la Farm. Ileana Toledo, Bioqca. Natalia Jones, Dra. Andrea Ponce y Ángela García, por su amistad y que pese a la distancia siempre estuvieron presentes a lo largo de esta tesis.

A la Farm. Elisabet Braidot, por tu compañía, tu amistad, por ayudarme con las cuantificaciones y siempre estar dispuesta a colaborar, por apoyarme en la cátedra para continuar con la tesis, muchas gracias.

A la Farm. Ana María Cangiano, por tus palabras de apoyo, por los momentos compartidos, por apoyarme en la cátedra para continuar con la tesis, muchas gracias.

A la Farm. Diana Quezada, por los momentos compartidos, por apoyarme en la cátedra para continuar con la tesis, muchas gracias.

Al Tonka y Beba Mijoc, por su amistad, por creer en mí y por estar presentes en cada etapa de la tesis.

A Mariela Zamora y Laura Soto, por su amistad, por comprenderme cuando no podía compartir con ustedes momentos importantes.

A todas las personas que seleccionaron durante un año los mejores ejemplares de *Allium cepa*.

A mis hijos Lorenzo, Guadalupe y Francisco, por el día a día, por sus caricias, por su comprensión, por darme fortalezas en los momentos difíciles, por ser la razón de mi vida, los Amo.

PROLOGO

Las algas constituyen el punto de partida de cada vez más estudios en relación a la Salud y el Medio Ambiente. Esto cobra aún mayor importancia en aquellos lugares en donde el mar forma parte de la vida cotidiana, como ocurre en nuestra ciudad de Comodoro Rivadavia en donde se emplaza la Sede de la FCNyCS, UNPSJB, en que se desarrolló este trabajo de tesis.

Desde la antigüedad, las algas marinas han sido utilizadas por el hombre para el tratamiento de enfermedades y como alimento. Desde una perspectiva industrial, biosintetizan compuestos gelificantes utilizados en alimentos, medicamentos, cosméticos, productos químicos. Actualmente los usos se han expandido hacia los sectores agropecuarios y en la restauración medioambiental.

La importancia de las algas en Salud se relaciona con los metabolitos que biosintetizan, los cuales ejercen diversas actividades biológicas. La biosíntesis guarda relación con factores internos (especie, ciclo de vida) y externos (estación del año, momento del día de la colecta, condiciones ambientales, ecosistema). De esta forma, estos recursos naturales constituyen fuentes potenciales de productos con distintas aplicaciones, destacándose las farmacéuticas como antioxidantes, antitumorales, antivirales, antiparasitarios, entre otras.

Las costas del Golfo San Jorge (Patagonia Argentina) y en particular las que conforman la región central del golfo, destacan una gran biodiversidad algal. De las algas pardas nativas, en nuestro grupo de investigación se han estudiado *Adenocystis utricularis* (Adenocystaceae), *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonaceae) y *Lessonia vadosa* (Lessoniaceae).

En la presente Tesis de Doctorado se planteó demostrar el potencial de una especie alóctona de alga marina parda de origen oriental, altamente invasora de diversas costas del mundo, incluyendo las costas patagónicas argentinas, *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae), Laminariales, conocida como “wakame”. Para ello se planificó y realizó un estudio que integró aspectos farmacognósticos y bioquímicos aplicados, priorizando la investigación de metabolitos con posible aplicación farmacéutica.

En nuestro país, esta especie se detectó por primera vez en 1992 en las costas de Puerto Madryn (Chubut), donde su ingreso fue atribuido al transporte por medio del agua de lastre de buques internacionales. Con el correr del tiempo se instaló y creció en forma indiscriminada en el Golfo Nuevo, generando cambios progresivos importantes en el ecosistema marino, continuando su dispersión a otras localidades portuarias hacia el sur de la provincia de Chubut, habiendo alcanzado Comodoro Rivadavia y otras playas del Golfo San Jorge (de Chubut y Santa Cruz).

Teniendo en cuenta tales aspectos, como investigadores en el área de la Salud, consideramos de interés desarrollar una investigación de los metabolitos de *Undaria pinnatifida* colectada en el Golfo San Jorge, con vista a una posible aplicación farmacéutica. Para ello se planificó esta propuesta de Tesis de Doctorado en Farmacia, a fin de lograr un recurso humano altamente calificado y con grado académico máximo en la temática de estudio.

Desde el punto de visto ambiental, dadas las respuestas ecológicas que desencadenan las especies invasoras como el alga en estudio, y considerando que la erradicación resulta inviable, es de esperar que futuras aplicaciones sobre la base de un conocimiento científico sólido, permitan contribuir a la disminución de su propagación sin perjudicar el ecosistema marino autóctono.

La hipótesis planteada en esta tesis fue clara: las algas marinas pardas, grupo al que pertenece *Undaria pinnatifida*, son una fuente potencial de metabolitos que nativos y/o modificados poseen una notable acción biológica y que por lo tanto pueden ser aprovechados para la obtención de productos de alto valor agregado, destacándose nuevas formulaciones farmacéuticas. A partir de ello, el control de la dispersión y el crecimiento debería ser una consecuencia de la explotación.

En este contexto, se alcanzaron y superaron los Objetivos propuestos:

- se efectuó un estudio integral de *Undaria pinnatifida* colectada en la región central del Golfo San Jorge, abarcando aspectos farmacognósticos y bioquímicos, incluyendo macro y microscopía, histoquímica, metodologías extractivas, análisis químicos cuali y cuantitativos, perfiles cromatográficos.

- Se caracterizaron los principales grupos químicos a partir de la optimización de metodologías de extracción, purificación y análisis de los metabolitos, determinación de perfiles metabólicos mediante ^1H -RMN, empleo de FSC y cromatografía instrumental.
- Se efectuaron los primeros estudios de la porción fibrilar de la pared celular, optimizando su obtención, extracción, fraccionamiento y análisis, obteniéndose resultados inéditos para la especie.
- Se investigó la potencialidad terapéutica de la especie, mediante ensayos de actividad biofarmacológica, especialmente citotoxicidad, antitumoral, líneas celulares tumorales, antioxidante, antileishmania, antimicrobiana; estudios de toxicidad mediante el test del *Allium cepa* (siendo esto novedoso para estudios con algas) y estudios de alelopatía.
- Se aplicaron productos obtenidos del alga a formulaciones farmacéuticas, particularmente a la preparación de micropartículas.

Además, cabe destacar la importancia de la formación de nuevos recursos humanos capacitados en el estudio de recursos naturales regionales de las costas del Golfo San Jorge, Patagonia Argentina. Así, la formación alcanzada por la tesista, continúa la línea de trabajo del Dr. Osvaldo León Córdoba, Director de este trabajo de tesis y la Dra. María Luján Flores, Codirectora de esta tesis, constituyendo un nuevo logro en el marco del grupo, área y centro de investigación involucrado, GQBMRNP, AAI – CRIDECIT (FCNyCS, UNPSJB).

INDICE

PARTE I. INTRODUCCION	1
CAPITULO 1. ASPECTOS TAXONOMICOS.....	2
1.1. Algas	3
1.1.1. Características generales	3
1.1.2. Sistemas de Clasificación	3
1.1.3. Árbol filogenético	5
1.2. Algas pardas.....	8
1.2.1. Sobre el género <i>Undaria</i>	10
1.2.2. Sobre la especie <i>Undaria pinnatifida</i>	11
1.2.3. Variaciones morfológicas	12
1.2.4. Ciclo de vida	14
1.2.5. Hábitat y ecología	16
1.3. Clasificación taxonómica	21
1.4. Bibliografía.....	23
CAPITULO 2. METABOLITOS DE ALGAS MARINAS.....	32
2.1. Introducción	33
2.2. Polisacáridos de algas pardas.....	34
2.2.1. Laminarano / laminarina	34
2.2.2. Alginatos.....	35
2.2.3. Fucanos / fucoïdanos	39
2.3. Hidratos de carbono de bajo peso molecular.....	41
2.4. Aminoácidos, péptidos y proteínas	42
2.5. Fenoles.....	43
2.6. Lípidos	46
2.7. Esteroles.....	47
2.8. Pigmentos.....	48
2.9. Bibliografía.....	51

CAPITULO 3. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS Y APLICACIONES	62
3.1. Algas marinas y su contribución hacia nuevos fármacos	63
3.2. Actividades biológicas	65
3.2.1. Test de la <i>Artemia</i> salina (BST = Brine Shrimp Test)	66
3.2.2. Ensayo de inhibición de la elongación de las raíces de las semillas de trigo, <i>Triticum aestivum</i> (Poaceae)	68
3.2.3. Actividad antibacteriana	70
3.2.4. Actividad antioxidante.....	71
3.2.5. Ensayo del Metil Green-ADN (MG-ADN)	72
3.2.6. Actividad antileishmania	73
3.2.7. Actividad sobre líneas celulares tumorales	75
3.2.8. Test del <i>Allium cepa</i>	77
3.2.9. Ensayo alelopático	78
3.3. Aplicaciones farmacéuticas – Microencapsulación.....	80
3.3.1. Clasificación de las micropartículas.....	82
3.3.2. Condiciones de Gelificación	83
3.3.3. Mecanismos de Gelificación iónica con alginato	83
3.3.3.1. Gelificación externa	85
3.3.3.2. Gelificación interna.....	85
3.3.4. Características morfológicas, tamaño de partícula y estructura interna	87
3.3.5. Bibliografía.....	89
PARTE II. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	102
CAPITULO 4. ESTUDIOS BIOLÓGICOS Y QUÍMICOS.....	103
4.1. Colecta de los ejemplares.....	104
4.2. Conservación y molienda	107
4.3. Caracterización morfológica	108
4.3.1. Evaluación organoléptica y Macroscopía	108
4.3.2. Microscopía.....	108
4.3.3. Histoquímica	108

4.3.3.1. Tinción con Lugol	109
4.3.3.2. Tinción con Sudán III	109
4.3.3.3. Tinción con FeCl ₃ al 1 %	109
4.3.3.4. Tinción con Ninhidrina	110
4.4. Extracción y fraccionamiento	110
4.4.1. Extracción preliminar	111
4.4.2. Extracción exhaustiva	112
4.5. Extracciones específicas.....	113
4.5.1. Extracción de lípidos.....	113
4.5.2. Extracción y purificación de alginato.....	114
4.5.3. Extracción de péptidos.....	115
4.6. Screening fitoquímico	116
4.6.1. Reacciones de identificación en FABB, EOH1 y EOH2.....	116
4.6.2. Reacciones de identificación en FBBB, EOH1 y EOH2.....	117
4.6.3. Reacciones de identificación en FCBB, EOH1 y EOH2.....	118
4.6.4. Reacciones de identificación en FDBB.....	119
4.6.5. Reacciones directas	119
4.7. Determinación de perfiles cromatográficos.....	120
4.7.1. Sistemas cromatográficos para lípidos.....	120
4.7.1.1. Sistema cromatográfico planar analítico bidimensional	121
4.7.1.2. Sistema cromatográfico planar analítico unidimensional.....	121
4.7.2. Sistema cromatográfico para hidratos de carbono	122
4.7.3. Sistema cromatográfico para fenoles	123
4.7.4. Sistema cromatográfico para fucoxantina	123
4.7.5. Análisis de péptidos por HPLC	124
4.8. Determinaciones cuantitativas	124
4.8.1. Hidratos de carbono totales.....	125
4.8.2. Ácidos urónicos totales	126
4.8.3. Proteínas totales	126
4.8.4. Sulfato total.....	127
4.8.5. Fenoles totales	128
4.9. Determinación del peso molecular promedio.....	129

4.10. Determinación de la viscosidad	130
4.11. Estudio particular de la porción fibrilar de las paredes celulares	130
4.11.1. Obtención de la pared celular fibrilar	131
4.11.2. Fraccionamiento de los constituyentes de la pared celular fibrilar	132
4.11.3. Análisis cuantitativo de los constituyentes de la pared celular fibrilar	134
4.12. Extracción de fucosterol y fucoxantina	134
4.12.1. Extracción con ciclohexano	135
4.12.2. Fraccionamiento mediante una resina de adsorción	135
4.12.3. Extracción con Fluido Súper Crítico (FSC)	136
4.12.3.1. Extracción de esteroides a menor presión.....	137
4.12.3.2. Extracción de pigmentos a alta presión con la adición de un co- solvente.....	138
4.12.4. Análisis de los productos	139
4.12.5. Otros estudios	139
4.13. Perfil metabólico por ¹ H-RMN.....	139
4.14. Bibliografía.....	141
CAPITULO 5. ESTUDIOS BIOLÓGICOS Y APLICACIÓN	144
5.1. Test de la <i>Artemia salina</i> (BST= Brine Shrimp Assay)	145
5.2. Ensayo de inhibición de la elongación de las raíces de semillas de trigo	146
5.3. Actividad antibacteriana	147
5.3.1. Preparación de medios de cultivo	147
5.3.2. Preparación del inóculo	147
5.3.3. Preparación de las placas	148
5.3.4. Preparación de las muestras	148
5.4. Actividad antioxidante.....	148
5.4.1. Cuantificación de la actividad antioxidante	149
5.5. Prueba del Metilgreen-ADN (MG-ADN)	150
5.5.1. Preparación de la muestra y del control	151
5.5.1.1. Preparación de muestras	151

5.5.1.2. Preparación del control positivo	151
5.5.1.3. Preparación de blanco de reactivo.....	152
5.5.2. Procedimiento.....	152
5.6. Ensayo de citotoxicidad in vitro con líneas celulares	153
5.7. Actividad antileishmania	153
5.7.1. Mantenimiento de cultivos celulares y parásitos	154
5.7.2. Actividad antipromastigote	154
5.7.7. Actividad anti-amastigote.....	155
5.8. Test del <i>Allium cepa</i>	155
5.8.1. Lugar de estudio	155
5.8.2. Materiales y reactivos.....	156
5.8.2.1. Colorante	156
5.8.2.2. Preparación de las muestras	156
5.8.2.3. Preparación del patrón	157
5.8.3. Procedimiento.....	157
5.8.4. Análisis de microscopía.....	158
5.8.4.1. Tinción y squash	158
5.8.4.2. Índice mitótico (IM).....	159
5.8.4.3. Lectura de la prueba de genotoxicidad	159
5.9. Ensayo Alelopático.....	159
5.10. Preparación de micropartículas	160
5.10.1. Gelificación iónica	160
5.10.2. Caracterización de las micropartículas.....	161
5.10.3 Características morfológicas y tamaño de partícula	161
5.10.4. Rendimiento de la producción (% Ren)	161
5.10.5. Eficacia de la encapsulación (% EE)	162
5.10.6. Contenido de principio activo (% Cpa)	162
5.11. Bibliografía.....	163

PARTE III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	164
CAPITULO 6. ESTUDIO GENERAL DE <i>Undaria pinnatifida</i> COLECTADA EN BAHÍA BUSTAMANTE Y EN COMODORO RIVADAVIA	165
6.1. Hábitat y ecología de <i>Undaria pinnatifida</i>	166
6.2. Estudio preliminar de ejemplares de Bahía Bustamante	167
6.2.1. Características macroscópicas y organolépticas	167
6.2.2. Estudios químicos	170
6.2.2.1. Extracción, fraccionamiento, rendimiento y screening fitoquímico	171
6.2.2.2. Otros estudios	176
6.2.2.2.1. Lípidos	176
6.2.2.2.2. Pigmentos	180
6.3. Estudio general de la especie colectada en Comodoro Rivadavia	181
6.3.1. Hábitat y ecología de la zona de colecta	181
6.3.2. Colecta, herborizado, conservación y molienda	184
6.3.3. Aspectos macroscópicos y organolépticos	184
6.3.4. Aspectos microscópicos	186
6.3.4.1. Microscopía óptica	186
6.3.4.2. Histoquímica	190
6.3.4.3. Microscopía electrónica de barrido	192
6.3.5. Obtención de extractos crudos alcohólicos	193
6.3.6. Screening fitoquímico	194
6.3.7. Estudios mediante cromatografía planar	199
6.3.7.1. Lípidos	199
6.3.7.2. Fenoles	201
6.3.7.3. Hidratos de carbono	205
6.3.7.4. Cromatografía de pigmentos, esteroides y polifenoles	206
6.3.8. Cuantificación de los principales grupos químicos presentes en los extractos etanólicos	215
6.4. Conclusiones	218
6.4. Bibliografía	221

CAPÍTULO 7. ESTUDIO PARTICULAR DE METABOLITOS DE	
<i>Undaria pinnatifida</i>	236
7.1. Alginato de sodio	237
7.1.1. Obtención de alginato de sodio purificado	237
7.2. Análisis de los productos	239
7.2.1. Rendimiento y viscosidad	239
7.3. Péptidos	244
7.3.1. Extracción y determinación de péptidos por RP-HPLC	244
7.4. Análisis del perfil metabólico por ¹ H-RMN.....	246
7.4.1. Metabolómica: empleo de la espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	248
7.5. Pared celular fibrilar	252
7.6. Extracción de fucosterol y fucoxantina de <i>Undaria pinnatifida</i> mediante Fluido Supercrítico (FSC)	255
7.6.2. Etapa 1: extracción de esteroles	256
7.6.2. Etapa 2: extracción de fucoxantina con un codisolvente a partir del residuo de la etapa 1	256
7.6.3. Caracterización preliminar de las fracciones obtenidas por cromatografía en capa delgada.....	258
7.7. Conclusiones.....	261
7.8. Bibliografía.....	263
 CAPITULO 8. ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y APLICACIONES	 273
8.1. <i>Undaria pinnatifida</i> colectada en Bahía Bustamante.....	274
8.1.1. Actividad antioxidante.....	274
8.1.2. Actividad inhibitoria del desarrollo radicular	274
8.2. <i>Undaria pinnatifida</i> colectada en Comodoro Rivadavia.....	276
8.2.1. Ensayos de bioactividad primaria y secundaria	276
8.2.1.1. Test de la <i>Artemia salina</i>	276
8.2.1.2. Ensayo de inhibición de la elongación de las raíces de las semillas de trigo.....	279

8.2.1.3. Ensayo del metilgreen-ADN.....	281
8.2.1.4. Actividad antibacteriana	282
8.2.1.5. Actividad antioxidante.....	283
8.2.1.6. Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> con líneas celulares	285
8.2.1.7. Actividad antileishmania	288
8.2.1.8. Test del <i>Allium cepa</i>	289
8.2.1.9. Ensayo alelopático preliminar.....	301
8.3. Obtención y caracterización de micropartículas a partir de alginato de sodio.....	303
8.3.1. Análisis del alginato mediante Difracción de Rayos X.....	304
8.3.2. Descripción morfológica y tamaño de partícula.....	307
8.3.3. Conclusión general de las micropartículas obtenidas a partir de alginato de sodio de <i>Undaria pinnatifida</i>	308
8.4. Conclusiones.....	311
8.5. Bibliografía.....	314
RESUMEN	320

PARTE I

INTRODUCCION

CAPITULO 1

ASPECTOS TAXONOMICOS

1.1. Algas

1.1.1. Características generales

Las algas comprenden organismos microscópicos que van de 10 hasta 100 μm (microalgas) que forman parte del fitoplancton, y macroscópicos de 100 μm hasta metros (macroalgas). Incluyen representantes procariotas y eucariotas y una importante diversidad de niveles de organización, abarcando desde formas unicelulares hasta talos constituidos por verdaderos tejidos (Senties, 2011).

Las microalgas realizan la mayor parte de la fotosíntesis siendo el primer eslabón de las cadenas tróficas y viven libres en la masa de agua. En cambio, las macroalgas viven fijadas a un sustrato (algas bentónicas) por lo que su distribución queda limitada por la extensión de la plataforma continental y desempeñan funciones ecológicas de importancia dentro del ecosistema costero. Por ejemplo, las macroalgas pardas, además de cumplir la función de amortiguar el oleaje en la línea de costa, sirven frecuentemente como hábitat, zona de asentamiento larval y refugio contra la depredación para diversos invertebrados (esponjas, hidrozooos y briozoos de vida sésil y otros móviles, poliquetos, moluscos, crustáceos y equinodermos), así como algunos tunicados y peces (Llera-González y Álvarez-Raboso 2007). Las macroalgas están condicionadas por su hábitat, en donde los factores abióticos ejercen un efecto importante. La luz solar, es un factor esencial en su vida y no todas las macroalgas necesitan la misma intensidad lumínica, ya que esto depende de los pigmentos que posean. Así, las macroalgas verdes, capaces de absorber mucha energía lumínica, abundan en los primeros tramos de la costa, mientras que a profundidades mayores, donde la penetración de la luz es menor, predominan las macroalgas rojas y pardas (Mendoza, 1991).

1.1.2. Sistemas de Clasificación

La observación y colecta de macroalgas presentes en su hábitat es el primer paso para su conocimiento; si los ejemplares se conservan en óptimas condiciones

pueden aportar información científica en cuanto a estudios taxonómicos, sistemáticos, evolutivos, ecológicos, biogeográficos, moleculares, entre otros. Por tal motivo se constituyen las colecciones biológicas, y suponen en sí mismas, un registro permanente de la biodiversidad (Florez et al., 2010).

En 1836 Harvey fue el primero en clasificar a las macroalgas empíricamente sobre la base del color del talo, agrupándolas en tres grandes grupos: Chlorophyta (algas verdes), Phaeophyta (algas pardas) y Rhodophyta (algas rojas) (citado en Etcheverry, 1973).

En 1965, Carl R. Woese dejó atrás las comparaciones anatómicas o fisiológicas y desde entonces sus investigaciones se centraron en el estudio del material genético, sobre todo en los ARN ribosomales (16S rARN o 16S rADN) de organismos procariotas y eucariotas. A partir de allí, la comparación de las secuencias de 16S rARN se ha convertido en un medio para reconstruir árboles filogenéticos y reflejar relaciones evolutivas entre organismos, ya que pueden hacerse ensayos cuantitativos a partir de cambios discretos entre secuencias homólogas alineadas, esto es entre las secuencias que comparten un mismo ancestro (Boraso, 2013).

En la actualidad la clasificación de las especies varía de acuerdo al autor citado de referencia. En forma sintética, para clasificar a las algas bentónicas se presentan dos propuestas actuales para un sistema de seis reinos, considerando este número como la solución más simple para los hallazgos sistemáticos más recientes: una, derivada de los trabajos de Carl Woese (1990), y la otra, propuesta de Cavalier-Smith (2013) en la que divide al Reino Protista en Reino Protozoa y Reino Chromista. Sin embargo, ninguna de las propuestas ha sido descartada completamente por los ficólogos. La **Figura 1.1** resume ambas propuestas.

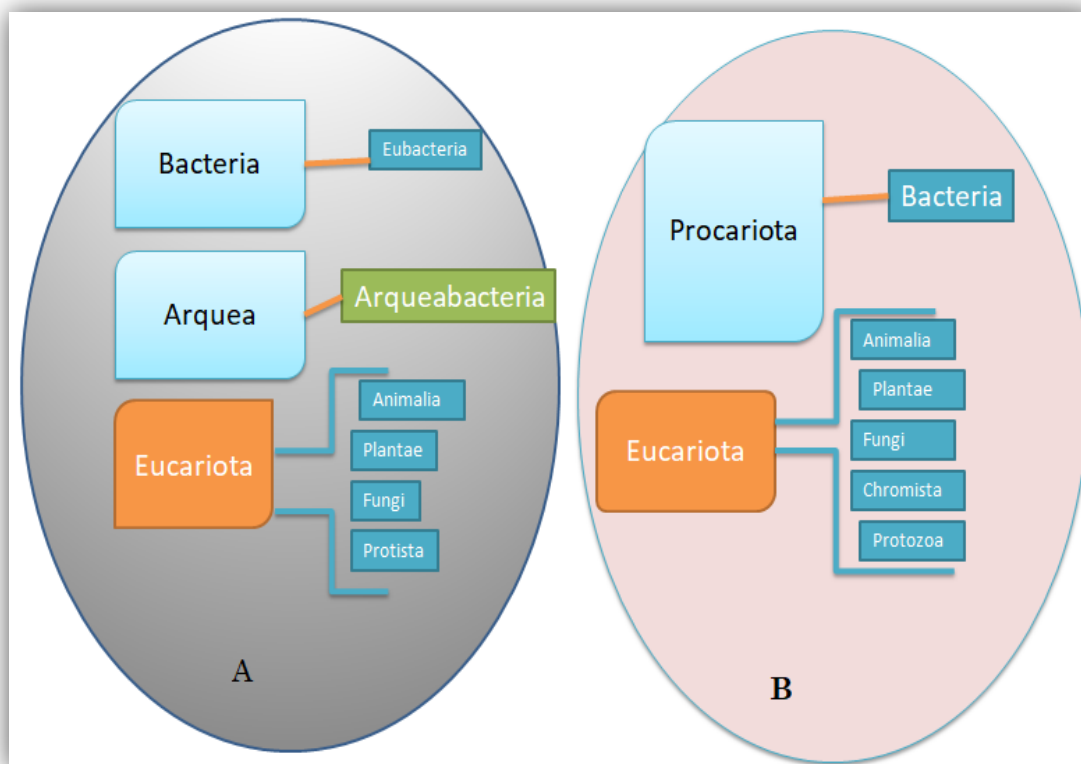


Figura 1.1. Comparación de dos propuestas para un sistema de 6 reinos. **A**, basada en los trabajos de Woese (1999); **B**, derivada de los trabajos de Cavalier-Smith (2013).

1.1.3. Árbol filogenético

El árbol filogenético propuesto por Cavalier-Smith (**Figura 1.2**), se basa en la evidencia molecular; es una clasificación taxonómica más reciente en donde dicho árbol coloca a las macroalgas en ramas evolutivas separadas. Se puede observar que las algas verdes (*Chlorophyta*) y las algas rojas (*Rhodophyta*) se encuentran en la misma rama evolutiva que las plantas terrestres debido a que se consideran grupos que fueron ancestros de las plantas; en cambio las algas pardas (*Phaeophyta*) se encuentran en otra rama evolutiva y pertenecen al grupo de los *Heterokontophyta*, *Cromophyta* o *Chromista*, que junto con los Alveolados constituyen el subgrupo de Cromalveolados. El grupo es extremadamente diverso conformado por organismos fotosintéticos y no fotosintéticos, parásitos, protistas de vida libres y hongos.

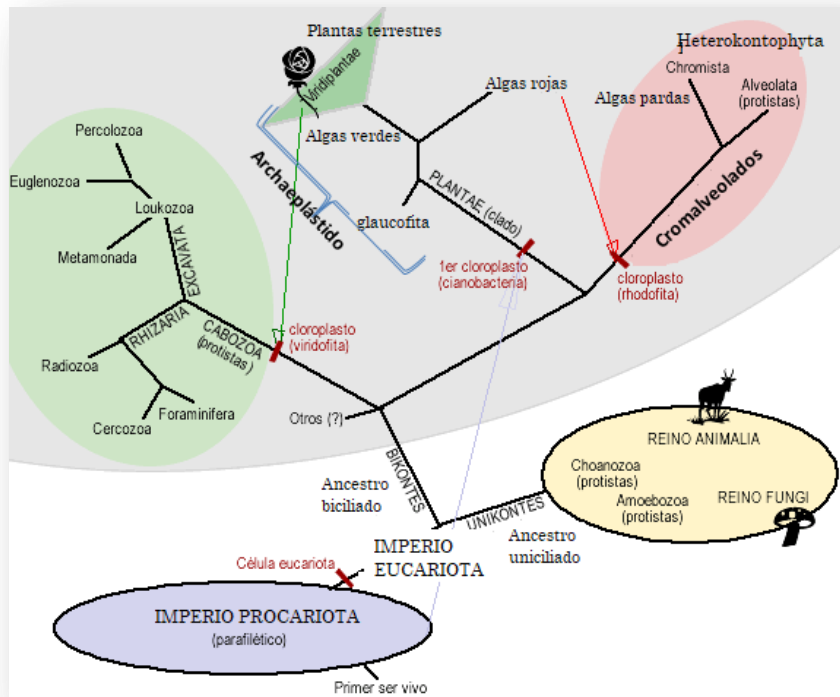


Figura 1.2. Árbol filogenético propuesto por Cavalier-Smith (2010a, 2010b, 2009), en donde se destaca la ubicación de las macroalgas (Fuente: Cavalier-Smith 2009).

Las algas con cloroplastos derivan de un proceso de endosimbiosis (**Figura 1.3**) entre un hospedador eucariota y una cianobacteria, generándose una unión estable que dio lugar a la aparición de los plástidos (Keeling, 2010). Por lo tanto la endosimbiosis primaria marcó el origen de los primeros organismos eucariotas fotosintéticos (Leliaert et al., 2012), también conocidos como Archaeplástido. La subsecuente diversificación de estos eucariotas con plástidos dio origen a tres linajes: algas verdes, algas rojas y glaucófitas.

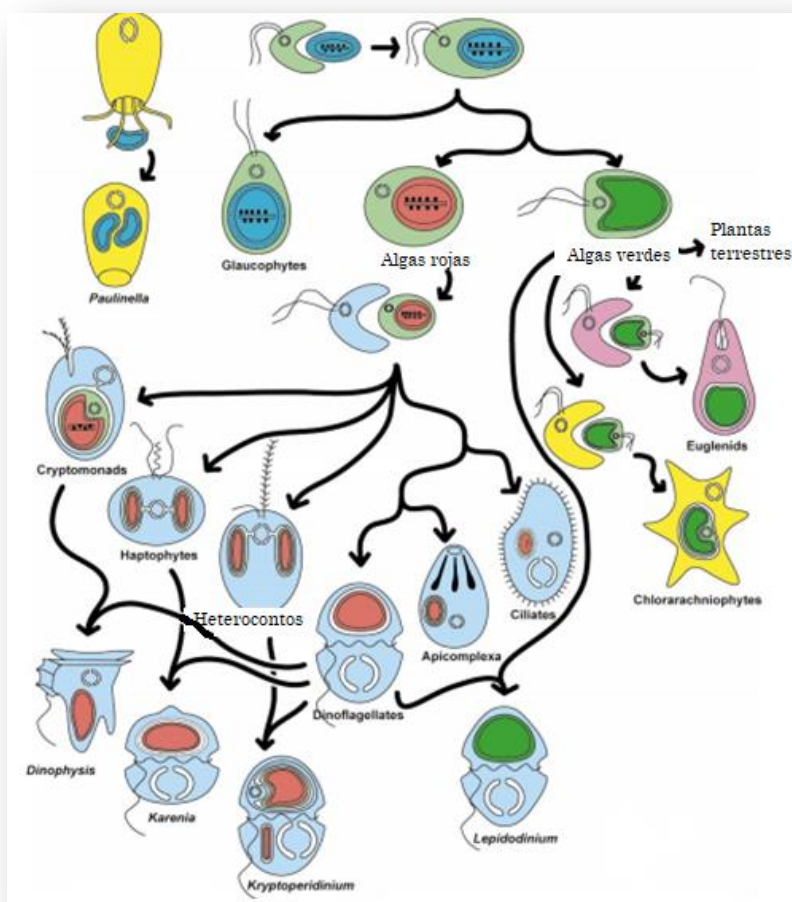


Figura 1.3. Sucesivos procesos de endosimbiosis que ocurrieron en la diversificación de los distintos grupos de algas (Fuente: Keeling, 2010).

Una vez establecidos, los plástidos primarios se distribuyeron en otros eucariotas mediante nuevos fenómenos de endosimbiosis secundarias y terciarias, los cuales implicaron la incorporación de algas verdes y rojas en el interior de protistas no fotosintéticos (Keeling, 2010).

Estos eventos contribuyeron a generar la gran diversidad actual de organismos que contienen plástidos en su interior.

Gran parte de esto ha sido revelado por análisis genómicos, pero algunos puntos particulares siguen aún sin resolver, en particular los relacionados con plástidos rojos secundarios de los cromalveolados, especialmente de las Cryptophyta, quienes son capaces de obtener energía metabólica tanto de la fotosíntesis como de otros seres vivos (Keeling, 2013).

1.2. Algas pardas

Las algas pardas bentónicas pertenecen a la Clase Phaeophyceae, División Heterokontophyta, Cromophyta o Chromista según Cavalier-Smith (2009).

Agrupada a unas 2000 especies, en 265 géneros (Van den Hoek et al., 1995).

Este grupo se caracteriza por la presencia de clorofilas *a*, *c1* y *c2*, β -caroteno, violaxantina, diatoxantina y grandes cantidades de fucoxantina, así como de sustancias de reserva, fundamentalmente laminarina y manitol (Pueschel y Stein, 1983; Boraso, 2013). También pueden acumular compuestos polifenólicos en vesículas dentro de los cloroplastos; estas vesículas son expulsadas del feoplasto y permanecen en el citoplasma para formar los cuerpos llamados fisodes, muy visibles en algunos géneros (Borasó, 2013).

Los cloroplastos se caracterizan principalmente por su forma y número, por su posición parietal o axial en la célula, por el grado y tipo de agregación y por la presencia y tipo de pirenoide (Borasó, 2013).

La pared celular está formada por un esqueleto fibrilar, constituido principalmente por celulosa, el cual se encuentra inmerso en una matriz amorfa de ácido algínico o sus sales, junto con polisacáridos sulfatados llamados fucanos o fucoïdanos (Davis et al., 2003; Ponce, 2007).

Poseen uno o varios cloroplastos por célula los que además pueden presentar varias formas, estrellados, cilíndricos o denticulados. El número de ellos que se encuentran en el interior de las células, es utilizado como criterio de clasificación dentro del grupo (Mansilla y Alveal, 2004).

Los tipos de células flageladas en las Phaeophyceae comprenden zoosporas asexuales, isogametas, anisogametas y espermatozoides. Comúnmente poseen dos flagelos heterocontas, uno anterior con pelos y uno posterior liso. La mayoría lleva una mancha ocular y un engrosamiento asociado a la base del flagelo posterior. El cuerpo basal flagelar está conectado con el núcleo y asociado espacialmente al feoplasto. Cuando las gametas poseen varios feoplastos, el estigma y la conexión a la base del flagelo se observan en uno solo o en ninguno de ellos (Borasó, 2013).

La organización del talo puede ser filamentosas, pseudoparenquimatosa o parenquimatosa (Mansilla y Alveal, 2004).

Las algas pardas muestran una gran plasticidad morfológica, respondiendo a restricciones ambientales específicas, como las corrientes marinas, la disponibilidad reducida de luz, la desecación y la exposición a los rayos UV (Charrier et al., 2012).

La ausencia de daño oxidativo en los componentes estructurales de las algas y la estabilidad que presentan estos organismos frente a condiciones tan adversas como el entorno marino, se deben, entre otras razones, a la presencia de metabolitos antioxidantes efectivos (Burritt et al., 2002).

Entre las algas pardas, existen géneros de marcado interés industrial considerando los metabolitos que biosintetizan y que determinan aplicaciones en salud, alimentación, entre otras. Se destacan extractos de *Sargassum* sp., *Dictyota* sp. y *Laurencia* sp. que por su alto contenido de compuestos antioxidantes, pueden aportar una nueva fuente natural de antioxidantes a la industria tanto alimentaria como farmacéutica (Echavarría et al., 2009). Además metabolitos aislados de diversas especies han demostrado un potencial importante para su aplicación en la industria farmacéutica; la **Tabla 1.1** presenta algunos ejemplos.

Tabla 1.1. Algunas especies de algas pardas que biosintetizan metabolitos bioactivos.

Alga	Metabolitos	Bioactividad	Referencia
<i>Fucus vesiculosus</i>	fucoidano florotaninos	En dermatitis atópica Anticoagulante	Fitton et al., 2015
<i>Undaria pinnatifida</i>	Fucoidano	En dermatitis atópica	
<i>Adenocystis utricularis</i>	galactofucanos	Inhibición del Herpes virus simplex	Ponce, 2007

1.2.1. Sobre el género *Undaria*

El género *Undaria* (Alariaceae, Orden Laminariales) incluye tres especies: *U. pinnatifida* (Harvey) Suringar, *U. undarioides* (Yendo) Okamura y *U. peterseniana* (Kjellman) Okamura (**Figura 1.4**; Uwai et al., 2007). Estudios genéticos de las mitocondrias sugieren que las tres podrían ser variaciones morfológicas de una misma especie (Uwai et al., 2007).

Este género es nativo de las regiones templadas de Japón, China y Corea en el noroeste del Pacífico (Ohno y Matsuoka, 1993). Todas las especies se utilizan frescas o secas para la alimentación en Asia (Saito, 1975).



Figura 1.4. Especies de *Undaria*: 1. *U. pinnatifida*, 2. *U. undarioides*, 3. *U. peterseniana* (Uwai et al., 2007).

U. pinnatifida es la especie más abundante del género y la de mayor valor comercial (Saito, 1975). Su hábitat nativo es a lo largo de las costas de Japón, China, Corea y sureste de Rusia (Kim y Lee 1995; Kitayama et al., 1995), y es la única que se ha dispersado a otras regiones constituyéndose en una especie altamente invasora a nivel mundial (Akiyama y Kurogi, 1982).

1.2.2. Sobre la especie *Undaria pinnatifida*

Nombres comunes

Chino: qun dai cai.

Inglés: sea mustard, precious sea grass, wakame.

Japonés: wakame.

Koreano: miyok, miyeouk.

Undaria pinnatifida es un alga de tamaño importante, cuyo esporofito puede medir hasta 30 m de longitud (Plana et al., 2007). Habita en aguas cuyas temperaturas van desde los 3,5 a los 24 °C (Zhang, 1984; Sanderson, 1990).

Se fija en general sobre fondos rocosos entre 6 a 20 m de profundidad, formando densos bosques submareales (Zertuche et al., 1995). Estos bosques son importantes en el ecosistema marino ya que constituyen hábitat, refugio y alimento de gran diversidad de especies de invertebrados y peces; también son sustrato de otras especies de algas (Plana et al., 2007).

El talo consta de un rizoide o grampón, que se adhiere al sustrato duro (generalmente rocas, aunque también puede adherirse a valvas de moluscos y a casi cualquier sustrato duro artificial); un estipe que separa al grampón de la lámina y en el cual se desarrollan los esporofilos al alcanzar la madurez reproductiva. La lámina posee una nervadura central que es la continuación del estipe y lóbulos laterales que se proyectan en el mismo plano de la lámina (Zertuche et al., 1995).

La **Figura 1.5** muestra un ejemplar del alga destacando las principales partes; la fotografía fue tomada luego de una de las colectas efectuadas durante este trabajo de tesis.



Figura 1.5. Ejemplar de *Undaria pinnatifida* en donde se distinguen las partes fundamentales.

1.2.3. Variaciones morfológicas

Para describir la gran variación morfológica que los esporofitos de *U. pinnatifida* muestran a lo largo de su desarrollo, se toma como referencia la clasificación de Cremades-Ugarte et al. (2006).

En la **Tabla 1.2** y en la **Figura 1.6** se presentan las características de cada uno de los individuos agrupados para su clasificación.

Tabla 1.2. Clasificación de las variaciones morfológicas de los esporofitos de *U. pinnatifida* a lo largo de su desarrollo (Cremades-Ugarte, 2006).

Clasificación	Características generales
Clase 1	Lámina entera, nervio medio solo definido en la base de la lámina, menor a 1 g en peso húmedo.
Clase 2	Lámina entera o algo lobulada en el tercio inferior y con nervio medio solo claramente definido en su mitad basal, entre 1 y 5 g.
Clase 3	Láminas lobuladas en su mitad inferior y con nítido nervio medio en toda la lámina, entre 5 y 10 g.
Clase 4	Ejemplares claramente pinnatífidos en todo su contorno y que empiezan a manifestar el desarrollo de los futuros esporofilos, entre 10 y 50 g.
Clase 5	Ejemplares que ya muestran claramente el desarrollo de los esporofilos, entre 50 y 100 g.

Una vez alcanzada la madurez, las láminas de los ejemplares empiezan a degradarse apicalmente a la vez que concentran sus energías en el desarrollo y maduración de los esporofilos, hasta desaparecer casi totalmente en los meses de verano, época en que esta especie se refugia en el infralitoral a mayor profundidad (hasta 25 m), donde se pueden encontrar esporofitos durante todo el año (Cremades et al., 1997).

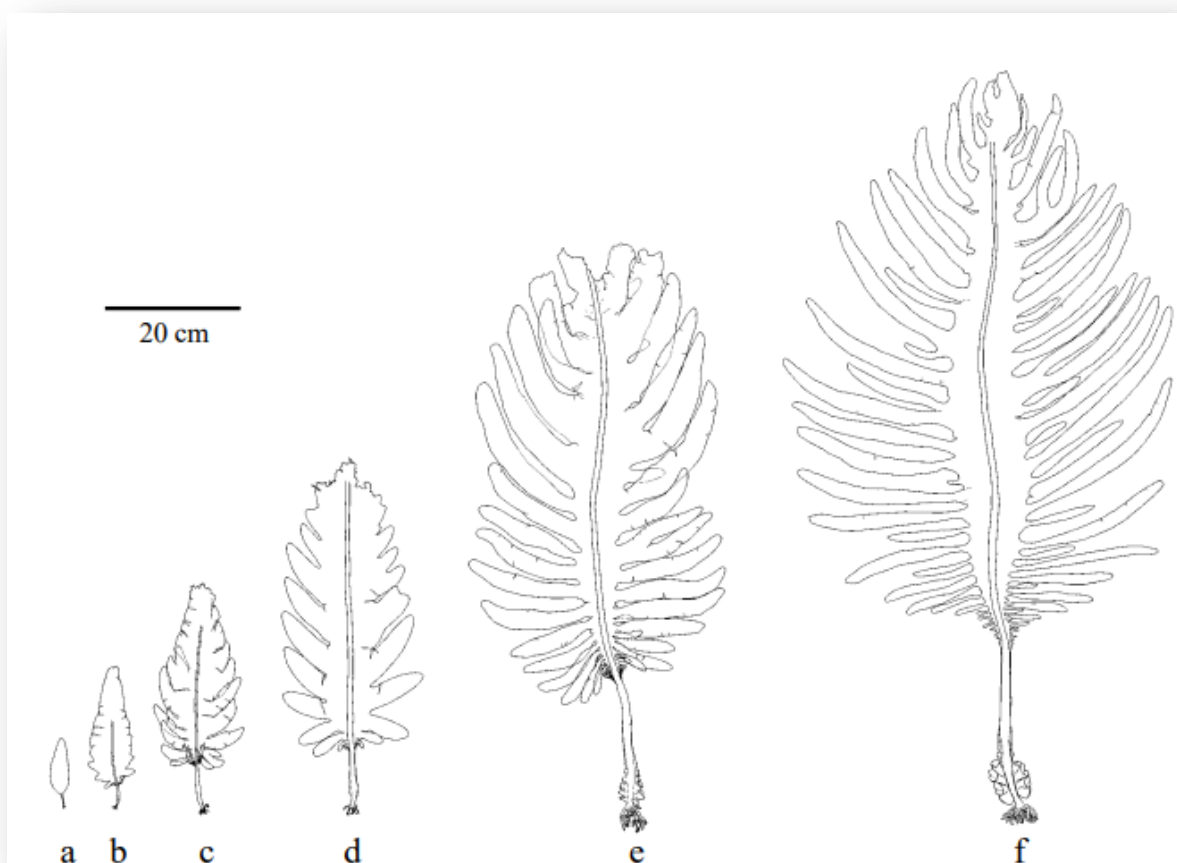


Figura 1.6. Representación gráfica de los esporofitos de *Undaria pinnatifida* a lo largo de su desarrollo: **a-f**, clases 1-6, respectivamente. (Fuente: Cremades-Ugarte et al., 2006).

Aunque las diferentes formas tienen una base genética (Saito, 1975), la expresión de estas diferencias genéticas puede estar fuertemente modulada por factores ambientales como el grado de exposición a la hidrodinámica (Taniguchi et al., 1981; Nanba et al., 2010), o por factores endógenos, como la tasa de crecimiento (Stuart et al. 1999).

1.2.4. Ciclo de vida

U. pinnatifida es un género heteromórfico, alternando entre una fase gametofítica microscópica y una fase esporofítica macroscópica (**Figura 1.7**). Es

marcadamente anual en su rango nativo de distribución (Akiyama y Kurogi 1982), aunque en algunas regiones donde ha invadido, como las costas del norte de la Patagonia Argentina o las de Nueva Zelanda, el ciclo parece ser menos definido, y el reclutamiento y posterior desarrollo de los esporofitos puede ocurrir durante todo el año (Stuart et al., 1999; Casas et al., 2008).

Los esporofitos maduros liberan zoosporas móviles, que se asientan y se convierten en gametofitos microscópicos (**Figura 1.7**). La etapa de gametofito de esta especie puede tener un período de latencia mientras se esperan condiciones óptimas para madurar (Thornber et al., 2004; Hewitt et al., 2005). El desarrollo de gametofitos ocurre una vez que la temperatura del agua disminuye por debajo de 20 °C, con un rango óptimo entre 10 y 15 °C (Morita et al., 2003a). Los gametofitos maduros se reproducen sexualmente para producir esporofitos embrionarios, los que posteriormente se convierten en individuos macroscópicos (**Figura 1.7**). Se ha informado que los gametofitos microscópicos pueden sobrevivir a una temperatura que varía de -1 a 30 °C (Saito, 1975). El rango total óptimo para el desarrollo de esporofitos se encuentra entre 4-5 y 25 °C (Akiyama y Kurogi, 1982; Morita et al., 2003b).

En el Golfo Nuevo (Chubut, Patagonia Argentina), aunque el reclutamiento ocurre durante todo el año (Casas, 2005; Casas et al., 2008), el ciclo de crecimiento es claramente estacional, al igual que en la Ría de Puerto Deseado (Santa Cruz, Patagonia Argentina; Martin y Bastida, 2008).

Los esporofitos comienzan a crecer en períodos de invierno y se desarrollan durante los meses más fríos (junio-julio), madurando durante la primavera.

A medida que aumenta la temperatura del mar, la actividad fotosintética disminuye y las frondas comienzan a deteriorarse. Este proceso se inicia a fines de primavera y ocurre primero en zonas menos profundas y luego a mayores profundidades. A fines del verano, los esporofitos se desintegran casi por completo, permaneciendo en algunos casos los grampones y parte del esporofilo y el estipe (Irigoyen, 2010).

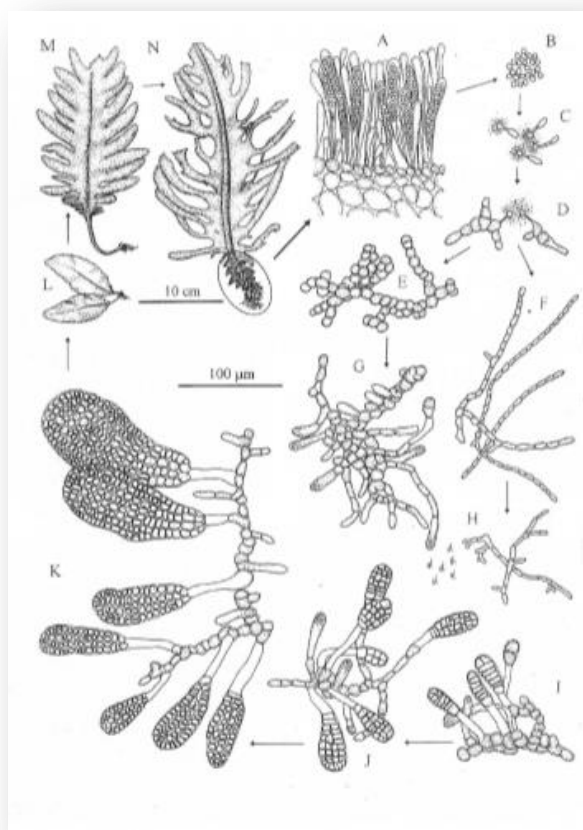


Figura 1.7. Desarrollo del ciclo digenético de *Undaria pinnatifida*. **A**, sección transversal en un soro, en el que se observan numerosos esporocistos y paráfisis; **B**, grupo de zoosporas maduras; **C**, esporas germinando y fijándose a microcristales de fosfato de calcio; **D**, gametofitos jóvenes; **E**, gametofito femenino maduro; **F**, gametofito masculino maduro; **G**, gametofito femenino reproducido; **H**, gametofitos masculinos liberando gametas; **I-K**, crecimiento de plántulas viviendo a expensas del gametofito; **L y M**, secuencia del desarrollo de esporofitos independizados del gametofito; **N**, esporofito maduro con esporofilo. (Fuente: Pérez-Cirera, 1997).

1.2.5. Hábitat y ecología

La **Figura 1.8** muestra como a partir de la década de 1970, *U. pinnatifida* ha invadido con éxito zonas costeras de todo el mundo (Baez et al., 2010), excepto los continentes de África y la Antártida (CABI, 2018), encontrándose actualmente en

las costas francesas del Mediterráneo (Floc'h et al., 1991; Castric-Fey et al., 1993), costas del Atlántico de España (Peteiro y Freire, 2011), Inglaterra (Fletcher y Manfredi, 1995), costas australianas (Campbell et al., 1999; James et al., 2014), costas del Pacífico Norte, Estados Unidos y México, (Aguilar-Rosas et al., 2004) y costas del Atlántico sur de Argentina (Casas y Piriz, 1996).



Figura 1.8. Países en la que *U. pinnatifida* ha colonizado sus costas desde su hábitat nativo (círculo amarillo), destacando los años del inicio de su invasión en los países del continente americano (Fuente: modificado de CABI, 2018).

Los posibles vectores responsables de la introducción y dispersión accidental los constituyen los cultivos de ostras importadas de Japón (Ohno y Matsuoka, 1993), el agua de lastre, la contaminación de buques de carga o de pesca provenientes principalmente de Japón y Corea (Piriz y Casas, 1994), el tráfico marítimo ((Martin y Bastida, 2008), entre otros.

La capacidad de las especies invasoras para competir con comunidades nativas y expandirse a lo largo de las costas, depende de la interacción de su ciclo de vida con factores ambientales locales. Es decir, la consolidación del ciclo y el desarrollo de nuevas poblaciones está condicionada en primer término por sus límites de tolerancia fisiológica a parámetros ambientales como temperatura, salinidad, intensidad y régimen lumínico, corrientes y grado de exposición al oleaje de su nuevo hábitat (Epstein y Smale, 2017).

Los estudios realizados por Thornber et al. (2004) en California, sugieren que las temperaturas por debajo de los 15 °C pueden aumentar el potencial de *U. pinnatifida* para formar poblaciones con reclutamiento continuo y generaciones superpuestas, como se ha observado previamente en Nueva Zelanda (Hay y Villouta, 1993) y Argentina (Martín y Bastida, 2008). Es decir, los factores físicos locales pueden influir en la fenología y la demografía de esta especie.

En Argentina fue detectada por primera vez en 1992 en el Golfo Nuevo (Chubut, Patagonia Argentina), donde su ingreso fue atribuido al transporte por medio del agua de lastre de buques internacionales (Piriz y Casas, 1994).

Desde el momento de su introducción en las costas patagónicas, *U. pinnatifida* se dispersó relativamente rápido a una velocidad de expansión natural del orden de 0,5-1,5 km/año, magnitud señalada por Piriz y Casas (2001), recorriendo 172 km en diez años (Casas y Schwindt, 2008). Paralelamente a su dispersión dentro de los límites del Golfo Nuevo, las poblaciones aumentaron su densidad y esto podría haber generado un área 'donante' desde la cual la especie se pudiera propagar (Casas y Schwindt, 2008) a otras localidades portuarias hacia el sur y norte del área de introducción (**Figura 1.9**). Para fines del año 2000 se informó su aparición en Bahía Camarones (Casas, 2005). Posteriormente llegó a Puerto Deseado en la provincia de Santa Cruz, distante unos 760 km hacia el sur (Martin y Cuevas, 2006), y en la primavera de 2008 fue detectada en Comodoro Rivadavia, centro del Golfo San Jorge, a 439 km al sur del Golfo Nuevo, observándose los primeros ejemplares maduros, de escasa población (experiencia personal en investigaciones previas al trabajo de tesis).

También se registró un desplazamiento hacia el norte de la zona de introducción, como el Golfo San José (Casas y Schwindt, 2008) y costas de Mar del Plata, en la provincia de Buenos Aires, a 1300 km hacia el norte del Golfo Nuevo (Meretta et al., 2012).



Figura 1.9. Expansión progresiva de *U. pinnatifida* en la costa atlántica de Argentina, destacando los años y localidades en donde fueron detectados los primeros ejemplares macroscópicos desde su invasión.

La temperatura es uno de los factores ambientales que está relacionado con el desarrollo de las diferentes fases de su ciclo de vida. En Japón, *U. pinnatifida* se desarrolla entre 4 y 25 °C (Akiyama y Kurogi, 1982; Morita et al., 2003b); este amplio rango hace que la especie presente un comportamiento estrictamente anual, con una marcada estacionalidad en el reclutamiento de ejemplares jóvenes. Fuera de su área nativa, los estudios sobre la ecología del alga han mostrado que si bien hay desarrollo a temperaturas bajas de 0 a 27 °C (Hay, 1990; Castric-Fey et al., 1999), el óptimo ocurre entre 10 y 15 °C (Morita et al., 2003a).

Las temperaturas registradas a lo largo de las costas de Argentina (**Tabla 1.3**) indican que la especie presenta un reclutamiento constante a lo largo del año (Martin y Bastida, 2008; Casas, 2005), sugiriendo que a diferencia de lo que ocurre en Japón, incluso en los meses más fríos del año podría haber esporas viables en la columna de agua (Casas y Schwindt, 2008).

Tabla 1.3. Rango de temperatura del agua de mar en las distintas localidades habitadas por *Undaria pinnatifida*, a lo largo de las costas de Argentina.

Localización	Rango de temperatura (°C)	Referencia
Golfo Nuevo	8,7–18	Casas y Piriz, 1996
Golfo San Jorge	8,39–9,76	Fernández et al., 2007
Puerto Deseado	4,5–13,5	Martin y Bastida, 2008
Mar del Plata	7–21	Meretta et al., 2012

Con respecto al impacto ambiental en el Golfo Nuevo, Casas et al. (2004) encontraron que la presencia de *U. pinnatifida* generó un impacto negativo en la biodiversidad de las algas nativas, mientras que Irigoyen et al. (2011) observaron una mayor riqueza y diversidad de invertebrados bentónicos.

En el Golfo San Jorge sin embargo, se deben continuar con investigaciones para comprender la evolución de la invasión y evaluar el impacto en la comunidad bentónica nativa.

A lo largo de este trabajo de tesis, se abordarán aspectos relacionados con la potencialidad de la especie a fin de contribuir, a partir de un conocimiento integral, a la comprensión de los efectos ambientales actuales y posibles, a pesar de que no existan investigaciones previas que permitan una comparación con aspectos ecológicos previos a la invasión del alga.

1.3. Clasificación taxonómica

La **Figura 1.10** presenta la ubicación taxonómica de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar 1873 (Alariaceae) según Cavalier-Smith (2009).



Figura 1.10. Esquema de la clasificación taxonómica de *Undaria pinnatifida*, según Cavalier-Smith, 2009.

En la actualidad, algunos estudios se han centrado en la aplicación y la transcripción de genomas de plástidos; esto llevó al estudio del genoma completo de *U. pinnatifida*. De tal estudio se pudo concluir que en la clase Phaeophyceae de la división Heterokontophyta, *U. pinnatifida* muestra una relación estrecha con *Fucus vesiculosus*, lo cual es consistente con el análisis colineal de sus genes (**Figura 1.11**; Zhang et al., 2015).

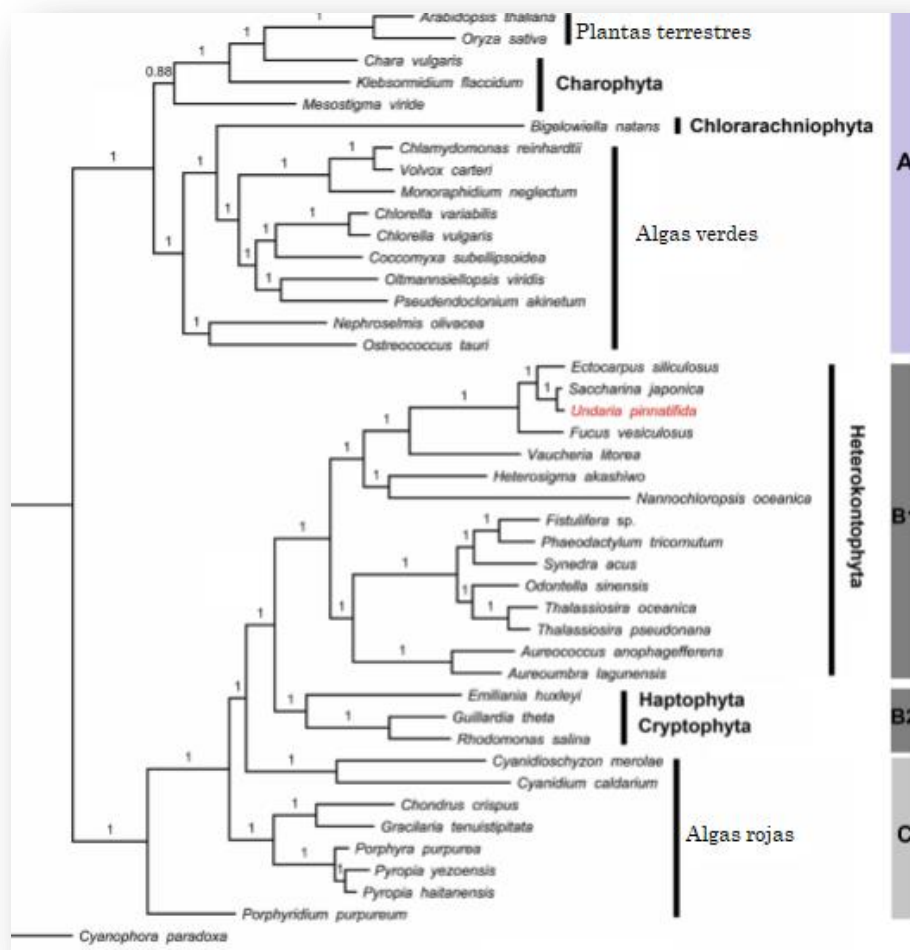


Figura 1.11. Árbol filogenético de plástidos mitocondriales de *Undaria pinnatifida*. (Fuente: Zhang et al., 2015).

En el árbol, la rama **A** incluye plantas terrestres, Charophyta, Chlorarachniophyta y algas verdes. Las ramas **B** y **C** formaron los otros clados principales. Todas las algas rojas se agruparon en la rama **C**.

Por otra parte, la rama **B** comprende a los clados B1, Heterokontophyta, en donde se ubica *Undaria pinnatifida*, y B2, correspondiente a algas marinas unicelulares Haptophyta y Cryptophyta.

1.4. Bibliografía

Aguilar-Rosas R, Aguilar-Rosas, L. E.; Avila-Serrano, G.; Marcos-Ramirez, R. First record of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Laminariales, Phaeophyta) on the pacific coast of Mexico. *Bot. Mar.* **2004**, *47*, 255–258.

Akiyama, K.; Kurogi, M. Cultivation of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, the decrease in crops from natural plants following crop increase from cultivation. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.* **1982**, *44*, 91–100.

Baez, J. C.; Olivero, J.; Peteiro, C.; Ferri-Yanez, F.; Garcia-Soto, C., Rea, I. R. Macro-environmental modelling of the current distribution of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Ochrophyta) in northern Iberia. *Biol. Invasions.* **2010**, *12*, 2131–2139.

Boraso, A. Algas Verdes. *Elementos para el estudio de las macroalgas de Argentina*, 1er ed.; Universitaria de la Patagonia EDUPA: Comodoro Rivadavia, 2013, pp 27–61.

Burritt, D.; Rkindale, J.; Hurd, C. L. Antioxidant metabolism in the intertidal red seaweed *Stictosiphonia arbuscula* following desiccation. *Planta.* **2002**, *215*, 5, 829–838.

CABI. Invasive Species Compendium: *Undaria pinnatifida* (Asian kelp). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/59979#AD8470D6-9DE3-4C6F-9038-7B9E2E4474B2>. Acceso 20 Marzo, 2018.

Campbell, S. J.; Bite, J. S.; Burrridge, T. R. Seasonal patterns in photosynthetic capacity, tissue pigment and nutrient content developmental stages of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta: Laminariales) in Port Phillip Bay, South Eastern Australia. *Bot. Mar.* **1999**, *42*, 3, 231–241.

Casas, G.; Piriz, M. L.; Parodi, E. R. Population features of the invasive kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae: Laminariales) in Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *J. Mar. Boil. Assoc. United Kingdom*. **2008**, *88*, 1, 21–28.

Casas, G.; Schwindt, E. Un alga japonesa en la costa patagónica. *Ciencia Hoy*. **2008**, *18*, 107, 31–39.

Casas, G. N. Biología y ecología de *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae) en el Golfo Nuevo, Argentina. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Argentina, 2005.

Casas, G. N.; Piriz, M. L. Surveys of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Golfo Nuevo, Argentina. *Hydrobiologia*. **1996**, *326*, 27, 213–215.

Casas, G. N.; Scrosati, R.; Piriz, M. L. The invasive kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) reduces native seaweed diversity in Nuevo Gulf (Patagonia, Argentina). *Biol. Invasions*. **2004**, *6*, 411–416.

Castric-Fey, A.; Beaupoil, C.; Bouchain, J.; Pradier, E.; L'Hardy-Halos, M. T. The introduced alga *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Alariaceae) in the rocky shore ecosystem of the St. Malo area: growth rate and longevity of the sporophyte. *Bot. Mar.* **1999**, *42*, 83–96.

Castric-Fey, A.; Girard, A.; L'Hardy-Halos, M. T. The distribution of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) on the Coast of St Malo (Brittany, France). *Bot. Mar.* **1993**, *36*, 351–358.

Cavalier-Smith, T. Megaphylogeny, cell body plans, adaptive zones: causes and timing of eukaryote basal radiations. *Eukaryot. Microbiol.* **2009**, *56*, 1, 26–33.

Cavalier-Smith, T. Deep phylogeny, ancestral groups and the four ages of life. *Phil. Trans. R. Soc. B*. **2010**, *365*, 111–132.

Cavalier-Smith, T. Kingdoms protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol. Lett.* [Online acceso libre] **2010**, *6*, 342–345. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0948>. Publicado Online: 23 Diciembre, 2009. Acceso 10 Diciembre, 2017.

Cavalier-Smith, T. Only six kingdoms of life. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **2004**, *271*, 1251–1262.

Charrier, B.; Le Bail, A.; De Reviers, B. Plant Proteus: drown algal morphological plasticity and underlying developmental mechanisms. *Rev. Trends in plant science.* **2012**, *17*, 8, 468–477.

Cremades, J.; Salinas, J. M.; Granja, A.; Bárbara, I.; Veiga, A. J.; Pérez- Cirera, J. L.; Fuertes, C. Factores que influyen en la viabilidad y crecimiento de *Undaria pinnatifida* en cultivo: fouling, tamaño de plántula y períodos de aclimatación presiembra. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología).* **1997**, *7*, 29–40.

Cremades-Ugarte, J.; Freire-Gago, O. y Peteiro-García, C. Biología, distribución e integración del alga alóctona *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) en las comunidades bentónicas de las costas de Galicia (NW de la Península Ibérica). *Anal. Jard. Bot. Madrid.* **2006**, *63*, 2, 169–187.

Davis, T.; Volesky B.; Mucci A. *A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by Brown algae.* *Rev. Water Res.* **2003**, *37*, 4311–4330.

Echavarría, B.; Franco, A.; Martínez, A. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *Vitae.* **2009**, *16*, 1, 126–131.

Epstein, G.; Smale, D. A. *Undaria pinnatifida*: A case study to highlight challenges in marine invasion ecology and management. *Rev. Ecolog. Evol.*

[Online acceso libre] 2017, 7, 8624–8642.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ece3.3430>. Publicado Online: 22 Septiembre, 2017. Acceso 19 Febrero, 2018.

Etcheverry, H. Nomenclatura y sistemas de las Algas. *Rev. Biol. Mar.* **1973**, *3*, 3, 215–225.

Fernández, M.; Cucchi-Colleoni, D.; Roux, A.; Marcos, A.; Fernández, E. Caracterización físico-química del sistema bentónico en el sector sur del Golfo San Jorge, Argentina. *Rev. Biol. Mar. Oceanografía.* **2007**, *42*, 2, 177–192.

Fitton, J. H.; Dell'Acqua, G.; Gardiner, V. A.; Karpiniec, S. S.; Stringer, D. N.; Davis, E. Topical Benefits of Two Fucoidan-Rich Extracts from Marine Macroalgae. *Cosmetics.* **2015**, *2*, 66–81.

Fletcher, R. L.; Manfredi, C. The Occurrence of *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) on the south coast of England. *Bot. Mar.* **1995**, *38*, 355–358.

Floc'h, J. Y.; Pagot, R.; Wallentinus, I. The Japanese brown alga *Undaria pinnatifida* on the coast of France and its possible establishment in European waters. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* **1991**, *47*, 379–390.

Florez-Leiva, L.; Gavio, B.; Díaz-Ruiz, M.; Camacho, O.; Díaz-Pulido, G. Recolección y preservación de Macroalgas Marinas: Una Guía para estudios Ficológicos. *Rev. Int.ROP. Ica.* **2010**, *5*, 97–103.

Guiry, M. D.; Guiry, G. M. Algae Base. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. [Online acceso libre] 2017. <http://www.algaebase.org>. Acceso 22 Octubre, 2017.

Hay, C. H. The dispersal of sporophytes of *Undaria pinnatifida* by coastal shipping in New Zealand, and implications for further dispersal of *Undaria* in France. *J. British Phyc.* **1990**, *25*, 301–31.

Hay, C. H.; Villouta, E. Seasonality of the adventive Asian kelp *Undaria pinnatifida* in New Zealand. *Bot. Mar.* **1993**, *36*, 461–476.

Hewitt, C. L.; Campbell, M. L.; McEnnulty, F.; Moore, K. M., Murfet, N. B.; Robertson, B.; Schaffelke, B. Efficacy of physical removal of a marine pest: the introduced kelp *Undaria pinnatifida* in a Tasmanian marine reserve. *Biol. Invasions.* **2005**, *7*, 251–263.

Irigoyen, A.; Trobbiani, G.; Sgarlatta, M.; Raffo, M. Effects of the alien algae *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae, Laminariales) on the diversity and abundance of benthic macrofauna in Golfo Nuevo (Patagonia, Argentina): potential implications for local food webs. *Biol. Invasions.* **2011**, *13*, 7, 1521–1532.

Irigoyen, A.J. Efecto del alga invasora *Undaria pinnatifida* sobre la comunidad de peces de arrecife en los golfos Norpatagónicos, Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Comahue. Bariloche. 2010.

James, K.; Middleton, I.; Middleton, C.; Shears, N. T. Discovery of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, 1873 in northern New Zealand indicates increased invasion threat in subtropical regions. *Bioinvasions Rec.* **2014**, *3*, 1, 21–24.

Keeling, P. J. Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *Am. J. Bot.* **2004**, *91*, 10, 1481–1493.

Keeling, P. J. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Rev. Philos. Trans. R. Soc. B.* **2010**, *365*, 729–748.

Keeling, P. J. The number, Speed, and Impact of Plastid Endosymbioses in Eukaryotic Evolution. *Annual review of Plant Biology*. [Online acceso libre] **2013**, *64*, 583–607. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120144>. Acceso 22 Octubre, 2017.

Kim, K. Y.; Lee, I. K. Community structure of subtidal macroalgae around Neobdo Island on the west-southern coast of Korea. *J. Plant. Biol.* **1995**, *38*, 153–158.

Kitayama, T.; Dai, H.P.; Han, J.X. Brown algae from Zhoushan Islands, Zhejiang Province, China. *Bull. Nat. Sci. Mus. Ser. B. (Bot)*. **1995**, *21*, 169–178.

Leliaert, F.; Smith, D.R.; Moreau, H.; Herron, M.D.; Heroen Verbruggen, H.; Delwiche, C.F. y De Clerck, O. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*. **2012**, *31*, 1–46.

Mansilla, A.; Alveal, K. Generalidades sobre las macroalgas. En: *Biología Marina y Oceanografía: Conceptos y Procesos*; Consejo Nacional del Libro y la Lectura Universidad de Concepción. Trama Impresores S.A: Chile, 2004; pp 352 –353.

Martin, J. P.; Bastida, R. El alga invasora *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar en la Ría Deseado (Patagonia austral, Argentina): ciclo del esporofito y factores ambientales determinantes de su distribución. *Rev. Biol. Mar. Oceanografía*. **2008**, *43*, 2, 335–344.

Martin, J. P.; Cuevas, M. First record of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Southern Patagonia, Argentina. *Biol. Invasions*. **2006**, *8*, 1399–1402.

Mendoza, M. L. Las algas marinas bentónicas de la Argentina. *Ciencia Hoy*. **1999**, *9*, 50, 91–98.

Meretta, P. E.; Matula, C. V.; Casas, G. Occurrence of the alien kelp *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyceae) in Mar del Plata, Argentina. *BioInvasions Records*. [Online acceso libre] **2012**, *1*, 1, 59–63. https://www.researchgate.net/profile/Graciela_Casas/publication/233933896_Occurrence_of_the_alien_kelp_Undaria_pinnatifida_Laminariales_Phaeophyceae_in_Mar_del_Plata_Argentina/links/09e41511e2c7716549000000/Occurrence-of-the-alien-kelp-Undaria-pinnatifida-Laminariales-Phaeophyceae-in-Mar-del-Plata-Argentina.pdf. . Publicado Online: 15 Febrero, 2012. Acceso 5 Octubre, 2016.

Morita, T.; Kurashima, A.; Maegawa, M. Temperature requirements for the growth of young sporophytes of *Undaria pinnatifida* and *Undaria undarioides* (Laminariales, Phaeophyceae). *Phycol. Res.* **2003b**, *51*, 265–270.

Nanba, N.; Fujiwara, T.; Kuwano, K.; Ishikawa, Y.; Ogawa, H.; Kado, R. Effect of water flow velocity on growth and morphology of cultured *Undaria pinnatifida* sporophytes (Laminariales, Phaeophyceae) in Okirai Bay on the Sanriku coast, Northeast Japan. *J. Appl. Phyco.* **2010**, *23*, 6 1023–1030.

Ohno, M.; Matsuoka, M. *Undaria* cultivation “Wakame”. En: *Seaweed Cultivation and Marine Ranching*; International Cooperation Agency Japan: Yokosuka, Japan, 1993; pp 41–50.

Pérez-Cirera, J. L.; Salinas, J. M.; Cremades, J.; Bárbara, I.; Granja, A.; Veiga, A. J.; Fuertes, C. Cultivo de *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Pheophyta) en Galicia. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*. **1997**, *7*, 3–28.

Peteiro, C.; Freire, O. Effect of water motion on the cultivation of the commercial seaweed *Undaria pinnatifida* in a coastal bay of Galicia, Northwest Spain. *Aquaculture*. **2011**, *314*, 269.

Piriz, M. L.; Casas, G. Occurrence of *Undaria pinnatifida* in Golfo Nuevo, Argentina. *Forum Appl. Phycol.* **1994**, *10*, 4.

Piriz, M. L.; Casas, G. Introducción de especies y su impacto en la biodiversidad. El caso *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta, Laminariales). En: *Sustentabilidad de la biodiversidad*. Universidad de Concepción, Concepción, Chile, 2001; pp 679–692.

Plana, J.; Mansilla, A.; Palacios, M.; Navarro, N. P. Estudio poblacional de *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh (Laminariales: Phaeophyta) en ambientes protegido y expuesto al oleaje en Tierra del Fuego. *Gayana*. 2007, 71, 66–75.

Ponce, N. M. A. Estudio del sistema de polisacáridos de *Adenocystis utricularis*, un alga parda de las costas patagónicas argentinas de posible utilización farmacológica e industrial. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Dpto. de Farmacia. Argentina. 2007.

Pueschel, C. M., Stein, J. R. Ultrastructure of a freshwater brown alga from western Canada. *J. Phycol.* 1983, 19, 209-215.

Saito, Y. *Undaria*. En: *Advance of Phycology in Japan*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1975; pp 304–320.

Sanderson, J. A preliminary survey of the introduced macroalga, *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar on the east coast of Tasmania, Australia. *Bot. Mar.* 1990, 33, 153–157.

Senties, A.; Dreckmann, K. D. Reino Vegetal. Diversidad de especies: Macroalgas en la biodiversidad en Campeche: Estudio de Estado. 1ed. CONABIO, UA de Campeche, ECOSUR. México, 2011; pp. 198–201.

Stuart, M. D.; Hurd, C. L. y Brown, M. T. Effects of seasonal growth rate on morphological variation of *Undaria pinnatifida* (Alariaceae, Phaeophyceae). *Hydrobiologia*. 1999, 398, 399, 191–199.

Taniguchi, K.; Kito, H.; Akiyama, K. Morphological variation of *Undaria pinnatifida* (Harvey Suringar). On the difference of growth and morphological characteristics of two types at Matsushima Bay, Japan. Bulletin of Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory. 1981, 42, 1–9.

Thornber, C. S.; Kinlan, B. P.; Graham, M. H.; Stachowicz, J. J. Population ecology of the invasive kelp *Undaria pinnatifida* in California: environmental and biological controls on demography. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2004**, *268*, 69–80.

Uwai, S.; Arai, S.; Morita, T.; Kawai, H. Genetic distinctness and phylogenetic relationships among *Undaria* species (Laminariales, Phaeophyceae) based on mitochondrial *cox3* gene sequences. *Phycol. Res.* **2007**, *55*, 263–271.

Van den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H. M. *Algae. An introduction to phycology.* Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K. 1995.

Woese, C.R. On the evolution of the genetic code. *PNAS*, 1965, 1546-1552.

Zertuche, G.; Pacheco, I.; González, J. Macroalgas. En: Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca: Pacífico Centro-Oriental. Vol. I. Plantas e Invertebrados. Rome, Italy: U.N. Food and Agriculture Organization. 1995, pp 9–82.

Zhang, D. M.; Miao, G. R.; Pei, L. Q. Studies on *Undaria pinnatifida*. Proceedings of the International Seaweed Symposium. **1984**, 11, 263–265.

Zhang, L.; Wang, X.; Liu, T.; Wang, G.; Chi, S.; Liu, C.; Wang, H. Complete Plastid Genome Sequence of the Brown Alga *Undaria pinnatifida*. [Online acceso libre] PLOS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139366>. Publicado Online: 1 Octubre, 2015. Acceso 18 Enero, 2018.

CAPITULO 2

METABOLITOS

DE

ALGAS MARINAS

2.1. Introducción

Las especies de algas bentónicas habitan en zonas donde existe una gran diversidad de organismos; esto genera competencia por nutrientes, espacio y luz, a la vez que desencadena en cada organismo una serie de estrategias químicas que le aseguren su propio desarrollo (Blunt et al., 2006). Tal situación no sólo sucede con especies propias del lugar, sino también con organismos invasores que presentan una gran capacidad de colonización y asentamiento (Uhrich et al., 2016).

Para las algas pardas se han informado como responsables de parte de tales estrategias, a los hidratos de carbono, fundamentalmente alginatos, laminaranos, fucoidanos y manitol (Casas, 2009). Tanto el manitol como los laminaranos constituyen metabolitos de reserva, mientras que el resto son polisacáridos estructurales que forman parte de la pared celular típica de estas algas, la cual consiste en al menos dos regiones diferentes, esto es un esqueleto fibrilar, “*inner core*”, que le brinda rigidez y una matriz amorfa que se proyecta embebiendo además los espacios intercelulares. El polisacárido fibrilar más abundante es de tipo celulosa, constituyendo alrededor del 5 % del peso seco, mientras que en la región matricial, el constituyente dominante es el ácido algínico, y en una menor proporción, polisacáridos sulfatados como los fucoidanos (Davis, 2003; Lodeiro et al., 2006).

El contenido de lípidos en las algas es bajo, entre 1 a 5 % de su peso seco (Jurkovic et al., 1995). Sin embargo, éstos tienen una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en comparación con las plantas terrestres (Jiménez-Escrig y Goñi-Cambrodon, 1999).

La actividad antioxidante evidenciada por las algas pardas puede deberse a la presencia de diferentes metabolitos, destacándose fucoxantina, aminoácidos, carotenoides, terpenos, polifenoles, florotaninos y flavonoides (Cornish y Garbary, 2010).

2.2. Polisacáridos de algas pardas

2.2.1. Laminarano / laminarina

Es el principal polisacárido de reserva de las algas pardas, representa hasta un 35 % calculado con respecto al peso seco del alga (O'Sullivan et al., 2010). Presenta una estructura principalmente lineal, constituida por 25 a 50 unidades de glucosa unidas por enlaces glicosídicos β -(1 \rightarrow 3), tal como se muestra en la **Figura 2.1**, conteniendo en algunos casos enlaces glicosídicos β -(1 \rightarrow 6) a modo de ramificaciones (Chizhov et al., 1998; Rioux et al., 2007).

Se encuentra en especies del orden Laminariales, entre ellas en los géneros *Laminaria* y *Undaria*; también en especies del orden Fucales, en géneros tales como *Fucus* y *Ascophyllum* (Holdat y Kraan, 2011).

Los laminaranos tienen un peso molecular promedio de 5 kDa, pero pueden diferir en el extremo reductor terminal correspondiente a un residuo de glucosa en el laminarano de tipo G, y a un residuo de manitol en el laminarano de tipo M (Chizhov et al., 1998; Rioux et al., 2007). Por lo tanto, las proporciones de los dos tipos de laminaranos, junto con sus configuraciones estructurales, son variables que dependen de la especie de donde fueron aislados, así como de los factores ambientales, lo cual puede afectar directamente las propiedades biológicas del polisacárido (Chizhov et al., 1998; Rioux et al., 2009).

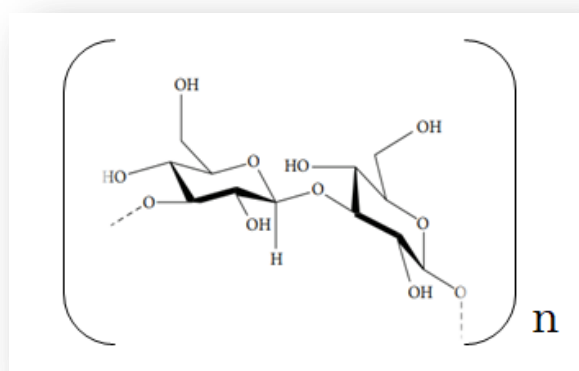


Figura 2.1. Estructura química de la secuencia lineal del laminarano.

Los laminaranos se sintetizan durante la fotosíntesis y exhiben una gran actividad antiviral y baja toxicidad *in vivo* (O'Doherty et al., 2010).

2.2.2. Alginatos

El término "alginato" generalmente es usado para las sales de ácido algínico, pero también puede referirse aunque incorrectamente, a distintos derivados del ácido algínico y al ácido algínico en sí mismo (McHugh, 2003).

En el presente trabajo de tesis se empleará, tal como corresponde, el término alginato para referirse a las sales del ácido algínico. Este último es un polisacárido aniónico lineal que se encuentra mayoritariamente en las paredes celulares de algas pardas (Phaeophyceae), como se mencionó en párrafos anteriores, y como exopolisacárido de algunas bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Azotobacter vinelandii* (Draget y Taylor, 2011).

En su estado natural, el ácido algínico se encuentra localizado en la matriz amorfa de la pared celular y a nivel intercelular formando geles con iones Ca^{+2} , Na^{+} , Mg^{+2} , Sr^{+2} y Ba^{+2} (Haug, 1964).

El alginato es en parte responsable de la flexibilidad de las algas pardas. En consecuencia, las algas que crecen en condiciones más turbulentas suelen tener un contenido de alginato más alto que aquellas que habitan en aguas tranquilas. Si bien cualquier alga parda podría usarse como fuente de alginato, la estructura química del polisacárido varía de un género a otro, e incluso entre los diferentes tejidos del mismo ejemplar (McHugh, 2003).

Comercialmente, a nivel mundial se extrae de especies como *Ascophyllum nodosum*, *Undaria pinnatifida*, *Fucus vesiculosus*, *Laminaria* sp, *Sargassum* sp, entre otras, pudiendo alcanzar entre 40 y 47 % del peso seco. Estos rendimientos sufren variaciones a lo largo del año y de la estación, alcanzando en general valores máximos en primavera y mínimos en invierno (Holdt y Kraan, 2011).

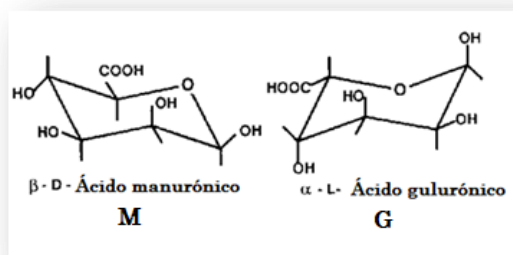
Con respecto al contenido de alginatos de *Undaria pinnatifida*, colectada en Rusia, varía estacionalmente entre 35 y 45 % (Skriptsova et al., 2004) lo cual sugiere que la especie tiene un buen potencial para la extracción comercial de estos compuestos.

El alginato está compuesto por bloques de ácido β -D-manurónico (M) y su epímero (C-5), el ácido α -L-gulurónico (G) (**Figura 2.2.a**). Estos se agrupan en bloques de secuencias homopoliméricas (MM, GG) y heteropoliméricas (MG), unidos los ácidos manurónicos por enlaces glicosídicos β -(1 \rightarrow 4) y los ácidos gulurónicos por enlaces glicosídicos α -(1 \rightarrow 4) (Espín et al., 2000).

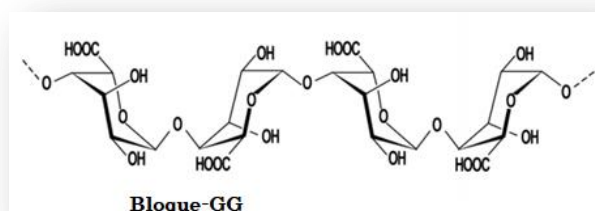
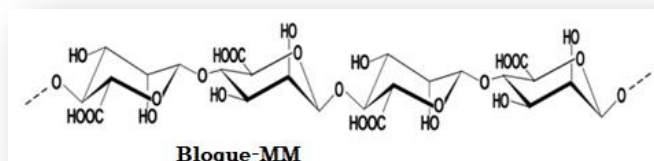
Los bloques MM, GG y MG coexisten, mostrando la cantidad relativa de los monómeros, así como su disposición secuencial a lo largo de la cadena del polímero, amplias variaciones dependiendo del origen del alginato. En los bloques MM, los residuos de ácido manurónico se enlazan mediante enlace ecuatorial formando una estructura plana tipo cinta, mientras que en los bloques GG, los enlaces entre dos unidades de ácido gulurónico se dan en forma axial y por lo tanto son más cortos, generando una estructura más unida y menos flexible (**Figura 2.2.b**). En cambio, los bloques MG contienen ambos enlaces ecuatorial-axial y axial-ecuatorial; con ellos obtienen una mayor flexibilidad (**Figura 2.2.c**). De esta forma, la rigidez en los bloques de la cadena del polisacárido va en incremento en el orden $MG < MM < GG$ (Morch, 2008).

Cuando dos cadenas de bloques GG se alinean lado a lado, se genera un hueco en forma de diamante, el cual tiene la dimensión ideal para acomodar en su interior un ión calcio, formándose una estructura dimérica. Este modelo denominado "caja de huevos", fue propuesto por Grant en 1973 para explicar las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales de calcio. La fuerza de los geles de los alginatos dependen del número de enlaces cruzados formados, del tipo de reticulación iónica y de la longitud y la rigidez de los bloques entre los enlaces (Mancini et al., 1999).

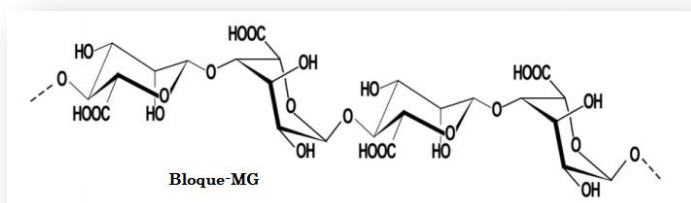
La **Figura 2.3** presenta el modelo descripto.



a



b



c

Figura 2.2. Estructura química del alginato. **a**, fórmulas de los dos monómeros, M (ácido β -D-manurónico) y G (ácido α -L-gularónico); **b**, estructura de los bloques homopoliméricos; **c**, bloque heteropolimérico.

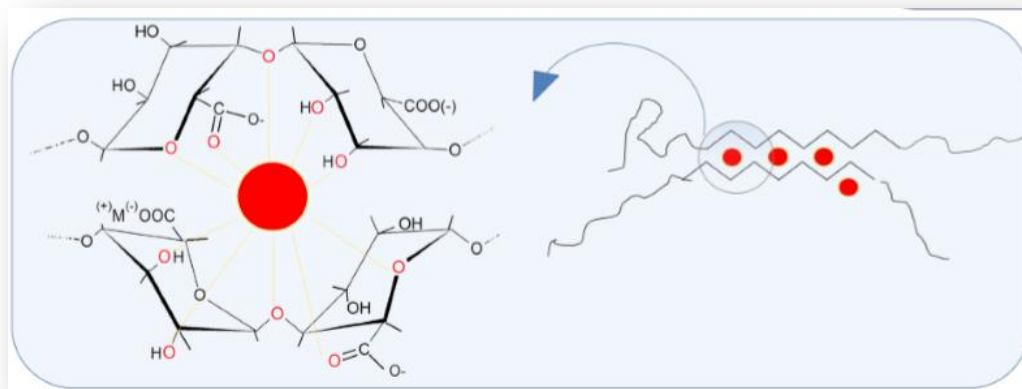


Figura 2.3. Modelo de “caja de huevos” que explica la interacción entre unidades GG y un catión metálico divalente representado en rojo. (Fuente: Fernández-d’Arlas, 2015).

Por otra parte, la solubilidad del alginato en un medio ácido depende de una mayor proporción de los bloques MG presentes en el polímero. En este sentido, según las proporciones de regiones de bloques GG y MM, que varían según la especie, serán las características de los geles de alginatos, siendo el índice M/G un parámetro comúnmente utilizado para conocer la naturaleza de los geles formados (Haug et al., 1967).

En general, alginatos con un índice M/G bajo forman geles más fuertes y rígidos, mientras que alginatos con un alto índice M/G forman geles más elásticos y blandos (Draget et al., 2006; Becerra, 2016).

Este índice no sólo varía con las especies sino también con la edad, momento en el ciclo de vida y la estación del año (Haug et al., 1976).

Entre las sales de alginato más empleadas se destaca la de sodio debido a su alta solubilidad en agua fría y a la transición característica sol-gel de forma instantánea e irreversible ante el ión calcio (Funami et al., 2009). También, se han desarrollado alginatos modificados químicamente tales como el alginato de propilenglicol, derivados de la sal de amonio cuaternario y de acrilato caracterizados por la obtención de geles fuertes y altamente deformables (Draget et al., 1997; Helgerud et al., 2010). En contraste con la mayoría de los polisacáridos, el alginato forma geles prácticamente independientes de la

temperatura. Sin embargo, la exposición prolongada a tratamientos de calor y variaciones extremas de pH degrada al polímero, presentando como consecuencia pérdidas en las propiedades del gel (Mancini et al., 1999; Soares et al., 2004).

A medida que se cuenta con nueva tecnología aplicada al desarrollo industrial, se descubren más usos para estos compuestos. De esta forma, la mayoría de los estudios recientes sobre los alginatos se ha concentrado en nuevas aplicaciones tales como transportadores de proteínas (Coppi et al., 2001), micro encapsulación (Schuldt y Hunkeler, 2007; González-Cuello et al., 2015; Becerra, 2016), absorción de radiación ultravioleta (Tavares, 2007), entre otras.

2.2.3. Fucanos / fucoidanos

Los fucanos o fucoidanos consisten en un grupo de heteropolisacáridos sulfatados que se encuentra comúnmente en las algas pardas.

Están compuestos principalmente por restos de α -L-fucosa y grupos sulfato con cantidades variables de D-galactosa, D-manosa, D-xilosa, D-glucosa, ácidos urónicos y D-ramnosa (Ponce et al., 2003).

Algunos estudios han demostrado la existencia de una correlación entre el contenido de fucoidanos y la profundidad a la que se encuentran las algas, resultando que mientras más cercanas estén a la superficie, éstas contienen una mayor cantidad de polisacáridos sulfatados. Estos polisacáridos juegan también un rol en la organización de la pared celular, y pueden estar relacionados con la vinculación entre alginatos y celulosa, además de encontrarse relacionados con la morfogénesis del embrión de las algas (Berteau y Mulloy, 2003).

En este sentido, Lee et al. (2006) estudiaron el contenido y composición del fucoidano de tres variaciones morfológicas de *Undaria pinnatifida* colectadas al sur, norte y este de Corea. La extracción se realizó a pH ácido durante 24 h a temperatura ambiente. Este estudio demostró que tanto la composición como la cantidad de los monosacáridos del fucoidano, eran variables según las formas de *U. pinnatifida* (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Monosacáridos constituyentes del fucoidano extraído en medio ácido de tres variaciones morfológicas de *Undaria pinnatifida* colectadas en diferentes puntos cardinales de Corea.

Especie	Método de extracción	Puntos cardinales del crecimiento	Monosacáridos constituyentes del fucoidano (% molar)	Referencia
<i>Undaria pinnatifida</i>	HCl 0,1 M, por 24 h a temperatura ambiente	Este	Fuc (62,7) Gal (32,9) Glc (4,4)	Lee et al., 2006
		Norte	Fuc (87,4) Gal (12,6)	
		Sur	Fuc (83,5) Gal (16,5)	

Otro punto a tener en cuenta es el método de extracción de los polisacáridos, pues de él podrá depender la actividad biológica específica (Marcel et al., 2011; Ponce et al., 2003).

Las principales técnicas de extracción suelen ser mediante el uso de agua caliente y a temperatura ambiente, digestión enzimática, fermentación, hidrólisis ácida, o la combinación de algunos de estos tratamientos.

La bioactividad y las propiedades de los fucoidanos dependen de la especie, la composición química del polisacárido, las uniones de los sulfatos y la purificación del compuesto (Marcel et al., 2011). Ponce et al. (2003) han observado que, mediante la desulfatación del polisacárido y posterior metilación, se puede obtener mayor información acerca de la posición de la unión glicosídica y del éster sulfato presentes en los fucoidanos.

La composición química varía de acuerdo al proceso de extracción (Ponce et al., 2003), la estación en que el alga es colectada, el estadio en el ciclo de vida y las condiciones ambientales de crecimiento (Berteau y Mulloy, 2003).

El interés más reciente en estos polisacáridos sulfatados se centra en el beneficio de su potencial bioactivo en seres humanos como antitumorales,

antiinflamatorios, antivirales, antitrombóticos, anticoagulantes y antioxidantes (Marcel et al., 2011).

Estudios realizados en ratones demostraron que el fucoidano extraído del esporofilo de *Undaria pinnatifida* suprime las capacidades de crecimiento, adhesión, invasión y metástasis de la línea celular de hepatocarcinoma de ratón y que estas funciones están mediadas a través del mecanismo que implica la inactivación de la ruta del factor de transcripción nuclear-KB (Wang et al., 2014).

2.3. Hidratos de carbono de bajo peso molecular

Las macroalgas deben sintetizar metabolitos para contrarrestar efectos externos, por ej. el efecto osmótico, a fin de establecer y mantener una presión de turgencia positiva para desarrollarse en un medio como es el agua de mar (Raven y Reed, 1989). En esta regulación osmótica participan, entre otros metabolitos, hidratos de carbono de bajo peso molecular, por ejemplo sacarosa descrita en el alga verde *Enteromorpha intestinalis* (Edwards et al., 1987), manitol en algas pardas como *Laminaria digitata* (Davison y Reed, 1985). En general, los niveles intracelulares de estas sustancias que están involucradas en el mantenimiento de la presión de turgencia celular, se ajustan en respuesta a la variación de salinidad (Reed, 1990), demostrando que la síntesis y la degradación están bajo estricto control metabólico.

Las algas pardas sintetizan uno o más alditoles que actúan como sustancias de reserva y cumplen el rol de reguladores osmóticos, siendo el D-manitol (**Figura 2.4**) el principal compuesto en muchas especies (Davison y Reed, 1985).

Ponce et al. (2004) demostraron que el D-manitol fue el metabolito mayoritario en el extracto alcohólico a temperatura ambiente de *Adenocystis utricularis*, alga parda que también habita en el Golfo San Jorge.

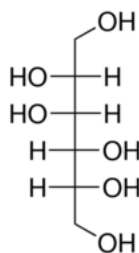


Figura 2.4. Estructura química del D-manitol.

2.4. Aminoácidos, péptidos y proteínas

El valor nutricional de las algas se debe en gran parte al contenido en aminoácidos esenciales, como por ejemplo, isoleucina, treonina, valina, entre otros (Jiménez y Goñi, 1999; Fleurence, 1999; Peinado, 2014).

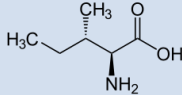
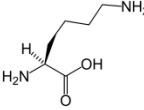
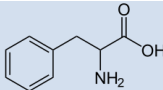
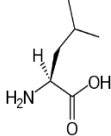
El contenido de proteínas en las algas marinas puede variar de acuerdo a la especie; en general en las algas verdes y rojas es del 10 al 47 % respecto al peso seco y en las pardas del 5 al 15 %. No obstante, para *Undaria pinnatifida* se ha informado que puede contener hasta un 24 % (Fleurence, 1999).

En las algas, tal como ocurre con otros metabolitos, el contenido de proteínas, péptidos y aminoácidos también se ve influenciado por diversos factores, especialmente por variaciones estacionales (Holdt y Kraan, 2011). Por ejemplo se ha visto que el contenido proteico en algas pardas de los géneros *Saccharina* y *Laminaria*, muestra un máximo durante la primavera (Holdt y Kraan, 2011).

Han sido obtenidos también diferentes compuestos de naturaleza peptídica que presentan efectos farmacológicos. Dentro de éstos, se han descrito en *Undaria pinnatifida*, el efecto antihipertensivo de cuatro tetrapéptidos que contienen al menos un aminoácido esencial (**Tabla 2.2**; Suetsuna et al., 2004).

Otros estudios han revelado que las ficobiliproteínas extraídas de las algas pardas (ficocianina) y de las rojas (ficoeritrina), podrían ser beneficiosas en la prevención o tratamiento de enfermedades neuro-degenerativas causadas por el estrés oxidativo (Alzheimer y Parkinson), debido a sus efectos antioxidantes (González et al., 1999).

Tabla 2.2. Secuencia de aminoácidos de los tetrapéptidos con actividad antihipertensiva (CI₅₀) presentes en el extracto acuoso de *U. pinnatifida* (Suetsuna et al., 2004).

Muestra	Tetrapéptido	CI ₅₀ (μM)	Aminoácido esencial
Extracto acuoso de <i>U. pinnatifida</i>	Ala-Ile-Tyr-Lys	213	 Isoleucina (Ile)
	Tyr-Lys-Tyr-Tyr	64,2	 Lisina (Lys)
	Lys-Phe-Tyr-Gly	90,5	 Fenilalanina (Phe)
	Tyr-Asn-Lys-Leu	21	 Leucina (Leu)

2.5. Fenoles

En particular, los compuestos fenólicos se consideran como una de las clases más importantes de antioxidantes, de allí la búsqueda de estas sustancias en fuentes naturales. Sus moléculas están formadas por uno o más anillos aromáticos y uno o más grupos hidroxilos fenólicos libres o sustituidos. Químicamente, los polifenoles se pueden dividir en varias clases, destacándose fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, chalconas, auronas, catequinas, antocianinas), isoflavonoides, estilbenos, lignanos y polímeros fenólicos como los taninos condensados, los taninos hidrolizables y los florotaninos (Trease y Evans, 1989; Manach et al., 2004).

En general, su función principal en las plantas es la protección contra la radiación ultravioleta y organismos patógenos (Manach et al., 2004). También

están involucrados en la pigmentación, la reproducción, la polinización y el crecimiento vegetal (Zern y Fernández, 2005).

Se han descubierto polifenoles de varias especies de algas pardas como *Laminaria setchellii*, *Macrocystis pyrifera*, *Nereocystis luetkeana* (Yuan y Walsh, 2006) cuyas estructuras corresponden a florotaninos los cuales están constituidos por unidades de floroglucinol (**Figura 2.5**), unidas por enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno, caracterizados por el esqueleto dibenzo-1,4-dioxina (Shin et al., 2006). De acuerdo al enlace estructural que resulta del proceso de polimerización y al número de grupos hidroxilos, se dividen en seis categorías principales: fucoles, floretoles, fucofloretoles, fuhaloles, isofuhaloles y ecoles (Targett y Arnold, 1998). Ejemplos de ellos son el eckol, 8,8'-bieckol, 8,4'''-dieckol y florofucofuroeckol A (**Figura 2.6**), aislados del extracto acuoso de *Ecklonia cava*, con actividad antioxidante y potencial terapéutico en el tratamiento de la artritis a través de resultados provenientes de experimentos *in vitro* (Shin et al., 2006). Otros resultados indican que la actividad antitumoral del extracto del alga parda *Laminaria japonica* está asociada con el contenido total de florotaninos (Yang et al., 2010).

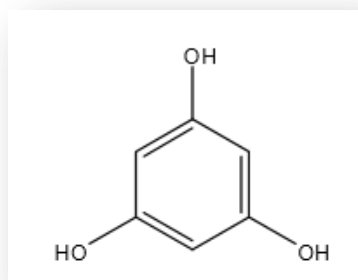


Figura 2.5. Estructura química del floroglucinol, unidad constituyente de los florotaninos.

Los fenoles son componentes estructurales de las paredes celulares, pero también cumplen otras funciones ecológicas secundarias, como son la protección contra la radiación UV, reproducción, mecanismo de protección contra factores bióticos.

Además resultan de mucho interés por sus propiedades terapéuticas, destacándose actividades anticancerígena, antioxidante, antibacteriana, antialérgica, antidiabética, antiinflamatoria y antiviral frente al virus del SIDA, entre otros (Li et al., 2011; Thomas et al., 2011).

En *U. pinnatifida* se ha detectado la presencia de flavonoides, sobre todo rutina, quercitrina y morina, además de catequinas que constituyen también taninos condensados (Yoshie- Stark et al., 2003).

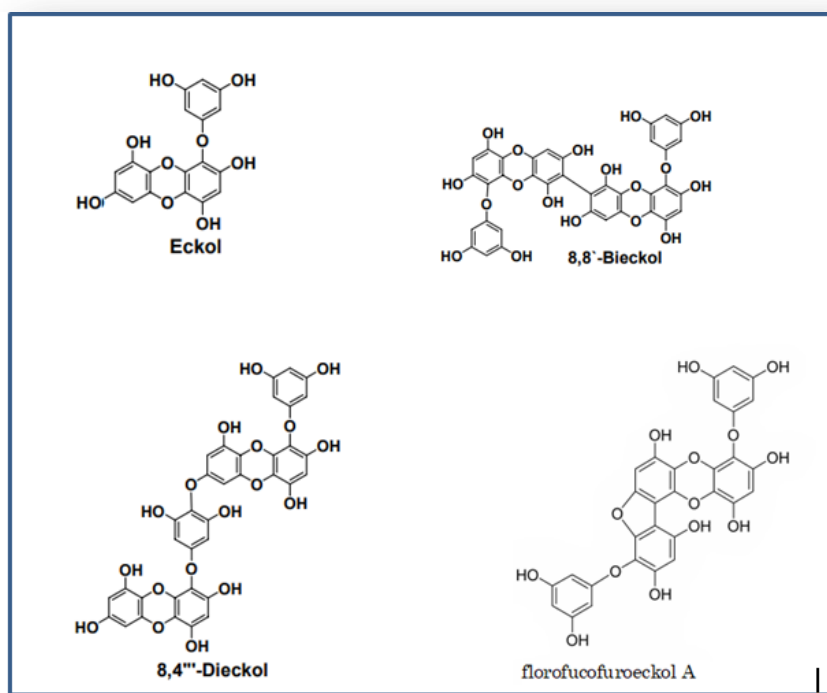


Figura 2.6. Estructuras químicas de florotaninos aislados de *Ecklonia cava* (Modificado a partir de Shin et al., 2006).

El contenido de compuestos fenólicos en las algas es también variado, dependiendo como ocurre con otros metabolitos, de la especie, estado fisiológico, origen geográfico o área de cultivo y diversas variaciones ambientales (Marinho-Soriano et al., 2006).

Por otra parte, el tipo de solvente y las condiciones de la extracción también tienen un efecto decisivo en el contenido total de fenoles, y por ende en actividades biológicas directamente relacionadas, principalmente en la actividad

antioxidante. López et al. (2011) prepararon extractos con etanol, metanol, metanol acuoso y agua del alga parda *Stypocaulon scoparium* para comparar la actividad antioxidante. Pudieron observar que los extractos contenían distintas cantidades de fenoles totales, y de ellos, el extracto acuoso mostraba mayor porcentaje y mayor capacidad antioxidante.

2.6. Lípidos

El contenido lipídico en las algas es bajo (< 5 % respecto al peso de alga seca) lo cual le otorga a estos organismos la potencialidad como alimentos de bajo contenido calórico. Al igual que ocurre con otros componentes, el contenido en ácidos grasos varía de acuerdo a la especie, el estadio en el ciclo de vida, la estación y otros factores medioambientales (Holdt y Kraan, 2011).

Sánchez-Machado et al. (2004) determinaron el contenido de lípidos totales y ácidos grasos de algas pardas y rojas. Para *Undaria pinnatifida*, en todas las muestras analizadas, los lípidos totales variaron de $0,70 \pm 0,09$ a $1,80 \pm 0,14$ g / 100 g de peso seco de alga. Los ácidos grasos más abundantes fueron C16, C18:1 ω 9, C20:4 ω 6 y C20:5 ω 3. Los ácidos grasos insaturados predominaron en todas las algas pardas estudiadas, y en las algas rojas, los saturados, pero ambos grupos resultaron ser fuentes equilibradas de ácidos ω 3 y ω 6, siendo consideradas estas algas marinas de alto valor nutricional.

La composición y el perfil de ácidos grasos de los lípidos de las diferentes especies dependen de factores endógenos (propios del individuo), pero además influyen las condiciones ambientales, estación del año (Dembitsky, 1991; Bocanegra et al., 2009b), momento de la colección (Yoshie et al., 1994).

Dentro del grupo de ácidos grasos saturados, las algas son más ricas en ácido palmítico, margárico (ácido heptadecanoico) y esteárico. En cuanto al grupo de los monoinsaturados, prevalece el ácido oleico que difiere mucho en cuanto a su cantidad, en un rango entre 21,9 y 41,45 % en algunas especies de algas pardas.

Respecto de los ácidos grasos poliinsaturados, se destacan los ácidos linoleico y el α -linolénico. Estos contribuyen a disminuir los niveles de colesterol en sangre, fortalecen las membranas celulares, reparan células y tejidos dañados y actúan

frente a células cancerígenas. También son destacables sus propiedades antivirales, antimutagénica y cardioprotectora (Syad et al., 2013). Es por ello que el interés de la fracción lipídica de las algas se debe fundamentalmente a su contenido en ácidos grasos poliinsaturados, algunos de los cuales están presentes en mayores cantidades que en los vegetales terrestres (Sánchez-Machado et al., 2004).

Por otra parte, los lípidos constituyen metabolitos de interés quimiosistemático. Entre ellos, la fosfatidolcolina diferencia a las algas pardas en un grupo que contiene este fosfolípido y otro grupo que no. Así, las Scytosiphonales (*Scytosiphon lomentaria*) y las Laminariales (*Lessonia vadosa* y *Undaria pinnatifida*) pertenecen al primer grupo, mientras que las Fucales (*Fucus vesiculosus*) no lo evidencian, al menos en proporciones importantes (Vaskovsky et al., 1996).

2.7. Esteroles

La presencia de esteroides en las algas fue establecida por primera vez por Heilbron et al. (1935) y posteriormente por Tsuda et al. (1957). Se ha observado que pueden variar entre divisiones y en algunos casos también dentro de las divisiones (Mahendran et al., 1980).

En las algas pardas, el fucosterol (**Figura 2.7. a**) es el esteroide dominante (Bhakuni y Rawat, 2005), representando hasta un 97 % del contenido total de esteroides con respecto al peso seco del alga (Kumar et al., 2009).

La mayoría de las Phaeophyta también contienen trazas de colesterol y precursores biosintéticos de fucosterol, entre ellos el sargasterol y el fucosterol que son isómeros. El colesterol (**Figura 2.7.b**), el 24-metil-colesterol (**Figura 2.7. c**) y el saringosterol (**Figura 2.7.d**) también se encuentran en estas algas, pero en pequeñas cantidades (Mahendran et al., 1980).

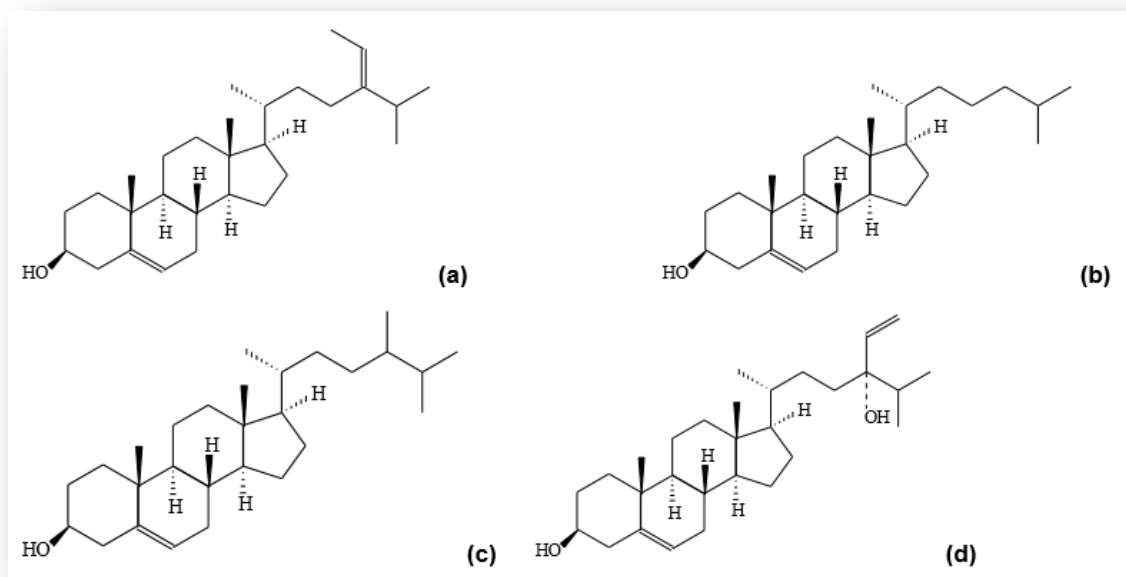


Figura 2.7. Principales esteroides aislados de algas pardas: **(a)** fucosterol, **(b)** colesterol, **(c)** 24-metil-colesterol, **(d)** saringosterol. (Fuentes: Bhakuni y Rawat, 2005; Mahendran et al., 1980).

El colesterol y el fucosterol se obtienen generalmente de las fracciones no polares de los extractos de algas pardas. La investigación de la bioactividad de estos metabolitos se ha enfocado generalmente en sus propiedades antioxidantes, antidiabéticas y hepatoprotectoras (Yoon et al., 2008).

Estudios recientes han demostrado que el fucosterol presente en *Lessonia vadosa*, colectado en las costas patagónicas, en la región central del Golfo San Jorge, presenta importante actividad antileishmania frente a la forma amastigote intracelular en comparación con el promastigote extracelular de *Leishmania amazonensis* y *L. infantum*. Estos resultados son prometedores, haciendo de este metabolito, una molécula valiosa para la farmacomodulación (Becerra et al., 2015).

2.8. Pigmentos

Las algas marinas, como organismos fotosintéticos, están expuestas a una combinación de luz y altas concentraciones de oxígeno, lo cual permite la

Otros pigmentos importantes son las clorofilas *a*, *c1* y *c2* que además de estar implicadas en la fotosíntesis, juegan un rol importante en la definición del color de las macroalgas. Estudios realizados en *U. pinnatifida* han demostrado que el bajo contenido de nutrientes en el agua de mar, la disminución de la temperatura y una elevada radiación producen cambios en distintas proporciones de las clorofilas. Además este estudio demostró que el efecto positivo del enriquecimiento de nutrientes fue antagonizado por la disminución de la temperatura. Estos resultados sugieren que la especie puede decolorarse en condiciones de bajo contenido de nutrientes y temperatura invernal, entre otros factores (Endo et al., 2017). El color es uno de los factores importantes que determinan el valor comercial de las macroalgas marinas cultivadas, como lo es *Undaria pinnatifida* en Japón.

2.9. Bibliografía

Becerra, M.; Boutefnouchet, S.; Córdoba, O.; Pinto Vitorino, G.; Brehu, L.; Lamour, I.; Laimay, F.; Efstathiou, A.; Smirlis, D.; Michel, S.; Kritsanida, M.; Flores, M. L.; Grougnet, R. Antileishmanial activity of fucosterol recovered from *Lessonia vadose* Searles (Lessoniaceae) by SFE, PSE and CPC. *Phytochemistry Letters*. **2015**, *11*, 418-423.

Berteau, O.; B. Mulloy. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharida. *Glycobiology*. **2003**, *13*, 6, 29–40.

Bhakuni, D. S.; Rawat, D. S. Bioactive Marine Natural Products. Anamaya Publishers, New Delhi. 2005, pp 382.

Blunt, J.; Copp, B.; Munro, M.; Northcote, P. y Prinsep, M. Marine natural products. *J. Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 26–78.

Bocanegra, A.; Bastida, S.; Benedí, J.; Ródenas, S.; Sánchez-Muniz, F. J. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J. Med. Food*. **2009b**, *12*, 236–258.

Carté, B.K. Biomedical potential of marine natural products. *Biosci. J.* **1996**, *46*, 271–286.

Casas, V. M. El alga marina *Sargassum* sp. (Sargassaceae). En: *Recursos marinos y servicios ambientales en el desarrollo regional*. La Paz, Baja California, México. 2009; pp 139.

Chizhov, A. O.; Dell, A.; Morris, H. R.; Reason, A. J.; Haslam, S. M.; McDowell, R. A.; Chizhov, O. S.; Usov, A. I. Structural analysis of laminarans by MALDI and FAB mass spectrometry. *Carbohydr. Res.* **1998**, *310*, 3, 203–210.

Cornish, M. L.; Garbary, D. J. Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. *Algae*. **2010**, *25*, 4, 155–71.

Davison, I. R.; Reed, R. H. The physiological significance of mannitol accumulation in brown algae: the role of mannitol as a compatible cytoplasmic solute. *Phycol.* **1985**, *24*, 449–457.

Dembitsky, V. M.; Pechenkina-Shubina, E.; Rozantsvet, O. A. Glycolipids and fatty acids of some seaweeds and marine grasses from the black sea. *Phytochem.* **1991**, *30*, 2279–2283.

Draget, K.; Skjak-Braek, G.; Stokke, B. Similarities and differences between alginic acid gels and ionically crosslinked alginate gels. *Food Hydrocolloids*. **2006**, *20*, 170–175.

Draget, K.I. Alginates. In *Handbook of hydrocolloids*. Cambridge, England: Woodhead Publishing Limited - Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC. 2000, pp 379–395.

Draget, K.I.; Skjåk-Bræk, G.; Smidsrød, O. Alginate based new materials. *Inter. J. Biol. Macromolec.* **1997**, *21*, 2, 47–55.

Draget, Kurt I. and Taylor, Catherine. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids*. **2011**, *25*, 2, 251–256.

Edwards, D. M.; Reed, R. H.; Chudek, J. A.; Foster, R.; Stewart, W. D. P. Organic solute accumulation in osmotically-stressed *Enteromorpha intestinalis*. *Mar. Biol.* **1987**, *95*, 583–592.

Endo, H.; Okumura, Y.; Sato, Y.; Agatsuma, Y. Interactive effects of nutrient availability, temperature and irradiance on photosynthetic pigments and color of the brown alga *Undaria pinnatifida*. *J. Appl. Phycol.* **2017**, *29*, 3, 1683–1693.

Espín, G.; Castañeda, M.; Guzmán, J.; Moreno, S. The GacS Sensor Kinase Regulates Alginate and Poly- β -Hydroxybutyrate Production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* **2000**, *182*, 2624–2628.

Fernández-d'Arlas, B.; Castro, C.; Eceiza, A. Obtención de fibras de alginato mediante hilado por coagulación con sulfatos de metales multivalentes. *Rev. Latin. Am. Metal. Mat.* **2015**, *35*, 2, 189–200.

Fleurence, J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, *10*, 1, 25–28.

Funami, T.; Fang, Y.; Noda, S.; Ishihara, S.; Nakauma, M.; Draget, K. I. Nishinari, K.; Phillips, G. O. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocolloids.* **2009**, *23*, 7, 1746–1756.

González, R.; Rodríguez, S.; Romay, C.; Ancheta, O.; González, A.; Armesta, J.; Ramírez, D.; Merino, N. Anti-inflammatory activity of phycocyanin extract in acid-induced colitis in rats. *Pharmacological research.* **1999**, *39*, 1, 55–59.

González-Cuello, R. E.; Pérez-Mendoza, J.; Morón-Alcázar, L. B. Efecto de la Microencapsulación sobre la Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a Jugos Gástricos Simulados. *Inform. Tecnol.* **2015**, *26*, 5, 11–16.

Haug, A.; Larsen, B. y Smidsrød, O. Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Ac. Chem. Scandinavica.* **1967**, *21*, 691–704.

Haug, A.; Larsen, B.; Smidsrød, O. Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydr. Res.* **1976**, *32*, 217–225.

Heilbron, I. M.; Parry, E. G.; Phipers, R. The algae. *Biochem J.* **1935**, *29*, 1376–1381.

Helgerud, T.; Gåserød, O.; Fjæreide, T.; Andersen, P. O.; Larsen, C. K. Alginates. En: *Food stabilizers, thickeners and gelling agents*. Wiley Black well, United Kingdom: 2010, pp 50–72.

Holdt, S. L.; Kraan, S. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 3, 543–597.

Jeon, Y.; Jee, Y.; Lee, J. Anticoagulant activity of sulfated polysaccharidae isolated from fermented brown seaweed *Sargassum fulvellum*. *J Appl Phycol*, **2008**, *20*, 67–74.

Jiménez-Escrig, A.; Goñi, C. Nutritional evaluation and physiological effects of edible seaweeds. *Arch. Latinoam. Nutr.* **1999**, *49*, 114–120.

Jurkovic, N.; Kolb, N.; Colic, I. Nutritive value of marine algae *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Molec. Nutr.* **1995**, *39*, 1, 63–66.

Kirst, G.O. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1990**, *41*, 1, 21–53.

Kloareg, B.; Quatrano, R. S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **1988**, *26*, 259–315.

Kumar, S. S.; Kumar, Y.; Khan, M. S. Y.; Anbu, J.; De Clercq, E. Antihistaminic, anticholinergic and antiviral activities of fucosterol from *Turbinaria conoides* (J. Agardh) Kutzing. *Pharmacology online*. **2009**, *1*, 1104–1112.

Lee, Y. K.; Lim, D. J.; Lee, Y. H.; Park, Y. I. Variations in fucoidan contents and monosaccharide compositions of Korean *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Phaeophyta). *Algae*, **2006**, *21*, 157–160.

Li, L.; Fang, Y.; Vreeker, R.; Appelqvist, I. Reexamining the egg-box model in calcium-alginate gels with X-ray diffraction. *Biomacromolec.* **2007**, *8*, 2, 464–468.

Li, Y. X.; Wijesekara, I.; Li, Y.; Kim, S. K. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Proc. Biochem.* **2011**, *46*, 2219–2224.

Lodeiro, P.; Barriada, J. L.; Herrero, R.; Sastre de Vicente, M. E. The marine macroalga *Cystoseira baccata* as biosorbent for cadmium (II) and lead (II) removal: Kinetic and equilibrium studies. *Environmental Pollution*. **2006**, *142*, 264–273.

López, A.; Rico, M.; Rivero, A.; Suárez de Tangil, M. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food. Chem.* **2011**, *125*, 1104–1109.

Maeda, H.; Takayuki, T.; Sashima, T.; Hosokawa, M.; Miyashita, K. Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as a multi-functional nutrient. *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* **2008**, *17*, S1, 196–199.

Mahendran, M.; Sirisena, D. M.; Morisaki, M.; Sano, F.; Ikekawa, N.; Sivapalan, A. Sterols of some Sri Lankan marine algae. *J. Nat. Sci. Cun. Sri Lanka*. **1980**, *1*, 69–74.

Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727–747.

Mancini, Marco; Moresi, Mauro and Rancini, Roberto. Mechanical properties of alginate gels: empirical characterisation. *J. Food Engineering.* **1999**, *39*, 4, 369–378.

Marcel, A.; Jorn, M.; Meyer, A. Important Determinant for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Marine Drugs.* **2011**, *9*, 2106–2130.

Marinho-Soriano, E.; Fonseca, P. C.; Carneiro, M. A. A.; Moreira, W. S. C. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 2402–2406.

McHugh, D. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical paper 441. Rome, FAO. 2003.

Miyashita, K.; Nishikawa, S.; Beppu, S.; Tsukui, T.; Abe, M.; Hosokawa, M. The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds. *J. Sci. Food. Agric.* **2011**, *91*, 1166–1174.

Moghadamtousi, S. Z.; Karimian, H.; Khanabdali, R.; Razavi, M.; Firoozinia, M.; Zandi, K.; Kadir, H. A. Anticancer and antitumor potential of fucoidan and fucoxanthin, two main metabolites isolated from brown algae. Review *Sci. World. J.* [Online acceso libre] 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/768323>. Publicado Online: 2 Junio, 2014. Acceso 7 Febrero, 2017.

Murillo-Álvarez, J.I.; Hernández-Carmona, G. Monomer Composition and Sequence of Sodium Alginate Extracted at Pilot Plant Scales from three Commercially Important Seaweeds from México. *J. Appl. Phycol.* **2007**, *19*, 5, 545–548.

Nguyen, V. T.; Qian, Z. J.; Lee, B.; Heo, S. J.; Kim, K. N.; Jeon, Y. J.; Park, W. S.; Choi, I. W.; Jang, C. H.; Ko, S. C.; Park, S. J.; Kim, Y. T.; Kim, G.; Lee, D. S.; Yim, M. J.; Je, J. Y.; Jung, W. K. Fucoxanthin derivatives from *Sargassum siliquastrum* inhibit matrix metalloproteinases by suppressing NF- κ B and MAPKs in human fibrosarcoma cells. *Algae*. **2014**, *29*, 4, 355–366.

O'Doherty, J. V.; Dillon, S.; Figat, S.; Callan, J. J.; Sweeney, T. The effects of lactose inclusion and seaweed extract derived from *Laminaria* sp. on performance, digestibility of diet components and microbial populations in newly weaned pigs. *Animal Feed Sci. Technol.* **2010**, *157*, 3–4, 173–180.

O'Sullivan, L.; Murphy, B.; McLoughlin, P.; Duggan, P.; Lawlor, P.G.; Hughes, H.; Gardiner, G.E. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. *Mar. Drugs*. **2010**, *8*, 2038–2064.

Ponce, N. M.; Pujol, C. A.; Damonte, E. B.; Flores, M. L.; Stortz, C. A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: Extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 153–165.

Ponce, N. M. A.; Uhrich, A. V.; Flores, M. L.; Stortz, C. A. Extracción secuencial de los polisacáridos del alga parda *Adenocystis utricularis*. *Rev. Química*. **2004**, 7–10.

Raven, J. A. y Reed, R. H. Water relations of algae. *Br. Phycol. J.* **1989**, *24*, 297–298.

Reed, R.H. Solute accumulation and osmotic adjustment. En *Biology of the Red Algae*, Cole, K.M. y Sheath, R.G., ed., Cambridge University Press, Cambridge. 1990; pp 147–169.

Rioux, L. E.; Turgeon, S. L.; Beaulieu, M. Effect of season on the composition of bioactive polysaccharides from the brown seaweed *Saccharina longicruris*. *Phytochemistry*. **2009**, *70*, 8, 1069–1075.

Rioux, L. E.; Turgeon, S. L.; Beaulieu, M. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *69*, 530–537.

Sánchez- Machado, D. I.; López- Cervantes, J.; López- Hernández, J.; Paseiro- Losada, P. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem.* **2004**, *85*, 439–444.

Schuldt, U.; Hunkeler, D. Alginate-Cellulose Sulphate-Oligocation Microcapsules: Optimization of Mass Transport and Mechanical Properties. *J. Microencapsulation*. **2007**, *24*, 1, 1–10.

Shin, H. C.; Hwang, H. J.; Kang, K. J.; Lee, B. H. An antioxidative and antiinflammatory agent for potential treatment of osteoarthritis from *Ecklonia cava*. *Arch Pharm Res.* **2006**, *29*, 2, 165–171.

Skriptsova, A. V, Khomenko, V.; Isakov, V. Seasonal changes in growth rate, morphology and alginate content in *Undaria pinnatifida* at the northern limit in the Sea of Japan (Russia). *J. Appl. Phycol.* **2004**, *16*, 17–21.

Smidsrod, O.; Draget, K.I. Chemistry and Physical properties of alginates. *Carbohydrate in Europe*. **1996**, *14*, 6–13.

Soares, J. P.; Santos, J. E.; Chierice, G. O.; Cavalheiro, E. T. G. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química*. **2004**, *29*, 2, 57–63.

Suetsuna, K.; Maekawa, K.; Chen, J. R. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem.* **2004**, *15*, 267–272.

Sugiura, Y.; Matsuda, K.; Okamoto, T.; Kakinawa, M.; Amano, H. Anti-allergic effects of the brown alga *Eisenia arborea* on Brown Norway rats. *Fish. Sci.* **2008**, *74*, 180–186.

Syad, A. N.; Shunmugiah, K. P.; Kasi, P. D. Seaweeds as nutritional supplements: Analysis of nutritional profile, physicochemical properties and proximate composition of *G. acerosa* and *S.wightii*. *Biomedic. Prevent. Nutri.* **2013**, *3*, 139–144.

Targett, N.; Arnold, T. Predicting the effects on brown algal phlorotannins on marine herbivores in tropical and temperate oceans. *J. Phycol.* **1998**, *34*, 195–205.

Tavares-Salgado, L.; Tomazetto, R.; Paes-Cinelli, L.; Farina, M.; Menezes-Amado-Filho, G. The Influence of brown algae alginates on phenolic compounds capability of ultraviolet radiation absorption *in Vitro*. *Brazilian J. Oceanog.* **2007**, *55*, 2, 145–154.

Thomas A. Davis, T. A, Bohumil Volesky, Alfonso Mucci. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae; *Water Res.* **2003**, *37*, 4311–4330.

Thomas, N. V.; Kim, S. K. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivates from marine brown algae. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2011**, *32*, 325–335.

Trease, G.E. y Evans, W.C. Pharmacognsy. 11 th ed. Brailliar Tiridel, Macmillian publishers, London, 1989.

Tsuda, K.; Akagi, S.; Kishida, Y. Discovery of colesterol in some red algae. *Science.* **1957**, *126*, 927-928.

Uhrich, A.; Córdoba, O. L.; Flores, M. L. Especies de *Ulva* del Golfo San Jorge, Patagonia Argentina: variaciones bioquímicas estacionales- espaciales y su relación con la producción de metabolitos bioactivos. *ARS Pharmaceutica*. **2016**, *57*, 2, 67–75.

Wang, P.; Liu, Z.; Liu, X.; Teng, H.; Zhang, C.; Hou, L.; Zou, X. Anti-Metastasis Effect of Fucoidan from *Undaria pinnatifida* Sporophylls in Mouse Hepatocarcinoma Hca-F Cells. *PLoS ONE*. [Online acceso libre] **2014**, *9*, 8, 223–229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106071>. Publicado Online: 24 Agosto, 2014. Acceso 14 Enero, 2017.

Yang, H.; Zeng, M.; Dong, S.; Liu, Z.; Li, R. Anti-proliferative activity of phlorotannin extracts from brown algae *Laminaria japonica* Aresch. *Chinese J. Ocean. Limnology*. **2010**, *28*, 1, 122–130.

Yoon, N. Y.; Kim, H. R.; Chung, H. Y.; Choi, J. S. Anti-hyperlipidemic effect of an edible brown algae, *Ecklonia stolonifera*, and its constituents on poloxamer 407-induced hyperlipidemic and cholesterol-fed rats. *Arch. Pharm. Res*. **2008**, *31*, 1564–1571.

Yoshie, Y.; Suzuki, T.; Shirai, T.; Hirano, T. Changes in the contents of dietary fibres, minerals, free amino acids, and fatty acids during processing of dry Nori. *Nippon Suisan Gakk*. **1994**, *60*, 117–123.

Yoshie-Stark, Y.; Hsieh, Y.; Suzuki, T. Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. *J. Tokyo Univ. Fish*. **2003**, *89*, 1–6.

You, S. G.; Yang, C.; Lee, H. Y.; Lee, B. Y. Molecular characteristics of partially hydrolyzed fucoidans from sporophyll of *Undaria Pinnatifida* and their in vitro anticancer activity. *Food Chem*. **2010**, *119*, 554–559.

Yuan, Y. V.; Walsh, N. A. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 7, 1144–1150.

Zern, T. L.; Fernandez, M. L. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2291–2294.

CAPITULO 3

ACTIVIDAD BIOLOGICA

Y

APLICACIONES

3.1. Algas marinas y su contribución hacia nuevos fármacos

Las macroalgas se han utilizado desde la antigüedad como alimento especialmente en China y Japón, en el tratamiento de diversas enfermedades asociadas a la deficiencia de yodo, en trastornos intestinales, como vermífugas, hipocolesteromiantes e hipoglucemiantes (El Gamal, 2010). Además se han empleado como apósitos y ungüentos (Treasse and Evans, 1996).

Estos organismos son abundantes en las zonas intermareales (Kumar y Zi-rong, 2004), habiendo desarrollado diferentes habilidades y capacidades adaptativas debido al estrés ambiental al que están sometidos constantemente. En este contexto, los factores abióticos, tales como cantidad de luz disponible, temperatura, salinidad, nutrientes, adaptación a nuevos hábitats, interrelación entre especies, entre otros, como comentáramos en el Capítulo 2 de este trabajo de tesis, determinan en gran parte la síntesis metabólica y por ende el crecimiento, reproducción y supervivencia de las macroalgas (Harrison y Hurd, 2001; Blunt et al., 2011).

Durante la biosíntesis, se sintetizan metabolitos con importante actividad biológica los cuales tienen potencial terapéutico (Zheng et al., 2011; Payyavula et al., 2012). Por ejemplo, se ha observado que la macroalga *Gracillaria conferta* es capaz de resistir la invasión de bacterias epífitas. Las bacterias al colonizar la superficie del alga degradan el agar de la pared celular y forman oligosacáridos. El alga responde a concentraciones nanomolares del oligosacárido e incrementa su proceso respiratorio produciendo especies reactivas de oxígeno que en 15 minutos eliminan a las bacterias epífitas (Lee, 2008). Evidencias como el ejemplo anterior sugieren que los organismos marinos son fuentes promisorias de moléculas bioactivas.

En bibliografía existen varios ejemplos de metabolitos aislados de diversas algas marinas que exhiben bioactividades de interés. En la **Tabla 3.1** se muestran algunos ejemplos.

Tabla 3.1. Ejemplos de algas pardas que han demostrado actividades biológicas relevantes.

Especie	Producto	Actividad biológica	Referencia
<i>Eisenia bicyclis</i>	polifenoles	antioxidante	Shibata et al., 2002; Heo et al., 2005
<i>Adenocystis utricularis</i>	fucooidanos	Antiviral	Ponce et al., 2003
<i>Sargassum vulgare</i>	alginato	antitumoral	Sousa et al., 2007
<i>Undaria pinnatifida</i>	extracto	antiinflamatoria	Khan et al., 2008
<i>Undaria pinnatifida</i>	fucoxantina	antiobesidad	Grasa-López et al., 2016
<i>Lessonia vadosa</i>	fucoesterol	antileishmania	Becerra et al., 2015

Dentro de las macroalgas, las algas pardas (Phaeophyceae) se han estudiado ampliamente debido a su composición rica en pigmentos, esteroides, florotaninos, ácidos grasos poliinsaturados, hidratos de carbono como polisacáridos (alginatos, laminaranos, fucooidanos) y manitol, los que han mostrado efectos beneficiosos en la salud humana (Stengel et al., 2011).

Los ensayos *in vitro* e *in vivo* con extractos y con metabolitos obtenidos de algas pardas, han mostrado actividades biológicas interesantes (Ponce et al., 2003; Nguyen et al., 2014; Becerra et al., 2015), las cuales están relacionadas con la estructura molecular y la concentración de la molécula bioactiva presente en la muestra analizada. A su vez, la obtención de tales sustancias dependerá de la parte morfológica del alga utilizada y del solvente empleado (Fung et al., 2013; Wang, et al., 2014).

Se ha demostrado que los extractos orgánicos de algas pardas presentan potente actividad antioxidante en ensayos *in vitro* (Miyashita et al., 2012). Entre los compuestos responsables de esta actividad se destaca el carotenoide más abundante de la familia de las xantófilas, la fucoxantina, pigmento responsable de la coloración de las algas pardas (Nguyen et al., 2014).

Los polisacáridos como alginatos, fucooidanos, laminaranos, entre otros, son capaces de reducir la absorción de colesterol en el intestino, produciendo

respuestas hipocolesterolemiantes e hipolipemiantes en el organismo (Panlasigui et al., 2003).

Por otro lado, la capacidad anticoagulante de los polisacáridos sulfatados de las algas ha sido una de las propiedades más estudiadas, con el fin de encontrar sustitutos para la heparina. Dicha capacidad va a depender de muchos factores como el peso molecular, la composición de hidratos de carbono, grado y distribución de grupos sulfato en la molécula, entre otros (Jiao et al., 2011).

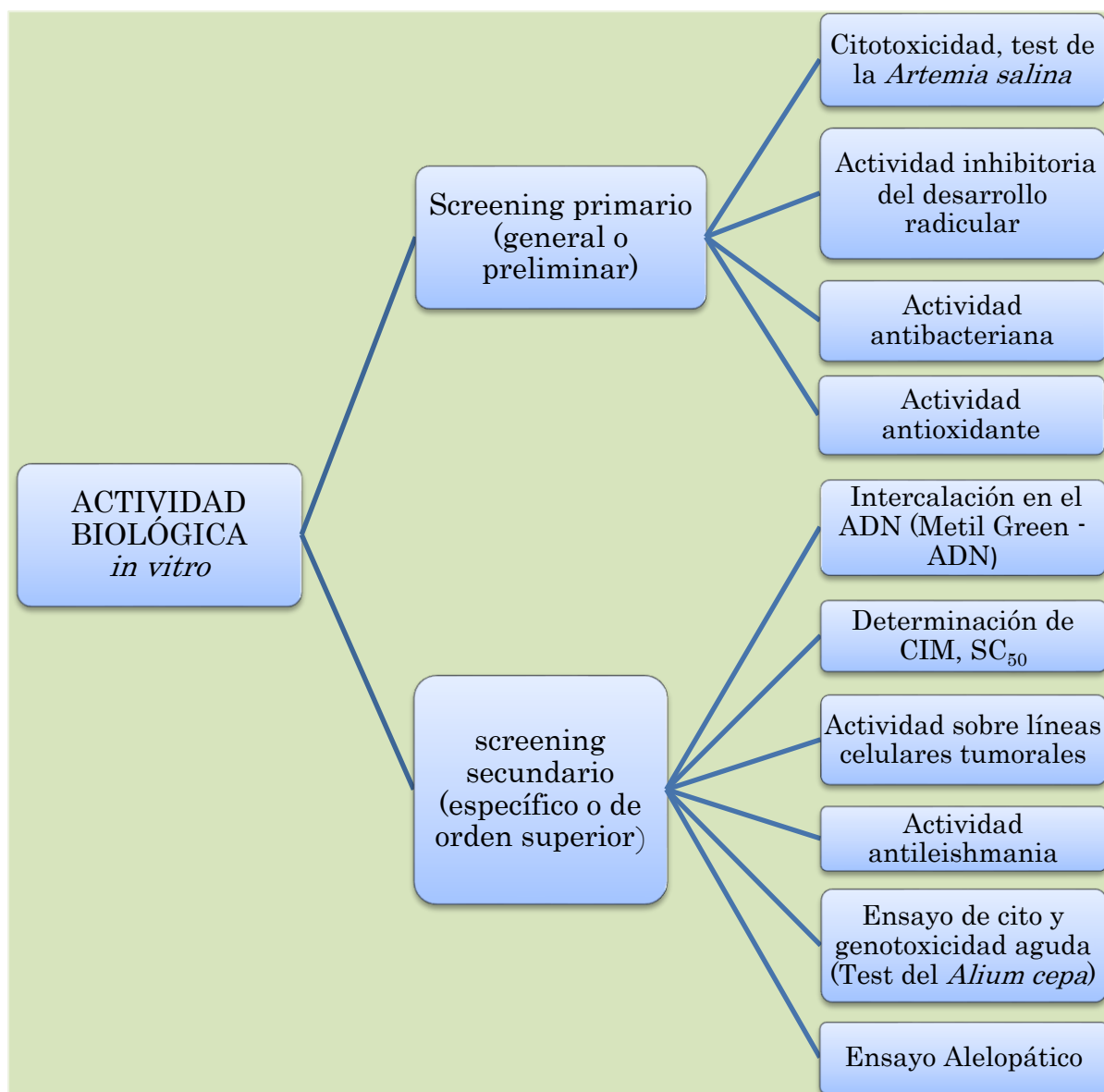
3.2. Actividades biológicas

Por lo expuesto en párrafos anteriores, la búsqueda continua de metabolitos con actividad biológica es uno de los principales objetivos en el área de la salud. Los estudios comprenden distintos ensayos *in vitro* y/o *in vivo* y son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y/o químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas (Cañas y López, 2001).

Los ensayos de actividad biológica comprenden dos etapas, un screening primario (general o preliminar) y un screening secundario (específico o de orden superior). Cada una de estas etapas implica la realización de uno o más bioensayos y se aplican sobre los extractos y sobre los productos purificados. Los extractos que posean actividad biológica marcada en el screening primario pasan a ser analizados en el secundario, que emplea bioensayos más específicos, de respuesta más lenta y tienen mayor complejidad y costo que los primarios.

En la **Tabla 3.2** se destacan los ensayos de screening primario y secundario, utilizados en la presente tesis.

Tabla 3.2. Ensayos preliminares y específicos empleados en la investigación de la actividad biológica de extractos y fracciones obtenidas de *Undaria pinnatifida* (Alariaceae) durante el desarrollo de la tesis.



3.2.1. Test de la *Artemia salina* (BST = Brine Shrimp Test)

Meyer et al. (1982) fueron los primeros en introducir el uso de *Artemia* sp. en remplazo de animales superiores durante la evaluación de extractos vegetales para el descubrimiento de compuestos con actividad antitumoral y citotóxica.

Este ensayo permite la evaluación rápida y conveniente de extractos crudos, fracciones y compuestos puros tanto de origen natural como sintético (Pino-Pérez y Jorge-Lazo, 2010).

Además se determinó que existe una correlación positiva entre la mortalidad de *Artemia* sp. y la citotoxicidad frente a las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) y la línea celular 3PS (P388), leucemia (McLaughlin et al., 1998).

Este bioensayo de letalidad frente a *Artemia salina* es uno de los biomodelos más usados en las etapas preliminares de una investigación farmacognóstica. De esta manera se predice su habilidad para producir la muerte de células cancerígenas en cultivo de tejidos y/o ejercer un amplio rango de efectos farmacológicos (Fatope, 1995; McLaughlin et al., 1998).

La técnica consiste en exponer la muestra a evaluar, a los nauplios de *A. salina*, (huevos eclosionados bajo condiciones estrictamente controladas de temperatura, salinidad, aireación, luz y pH) para determinar valores de concentración letal media (CL_{50}), expresada en $\mu\text{g/ml}$. La citotoxicidad se puede clasificar según distintas categorías, relacionada con el valor de su CL_{50} (ver más adelante) y en paralelo, se debe realizar una prueba control con una sustancia validada como antitumoral (Vanhaecke y Persoone, 1984). El tiempo de prueba es de 24-48 h, empleando en una primera instancia, concentraciones de las muestras de 1000, 100 y 10 $\mu\text{g/ml}$ (McLaughlin et al., 1998).

El cálculo de la CL_{50} se puede realizar utilizando distintos programas estadísticos. En el presente trabajo de tesis se utilizó el programa estadístico de Finney (1971).

Se debe tener en cuenta que el valor de la CL_{50} no advierte de una actividad fisiológica o biológica en particular; es un indicador de toxicidad a nivel celular que puede orientar investigaciones más específicas (Vanhaecke y Persoone, 1984).

Los extractos de algas marinas ha sido motivo de numerosas investigaciones debido a la presencia de diversos metabolitos con importante actividad citotóxica (Roca et l., 2018). Extractos metanólicos en concentraciones de 0,25; 0,5 y 2,5 %, de 18 especies de algas, de las cuales 9 correspondieron a algas pardas, han sido estudiadas para evaluar su actividad citotóxica frente a *A. salina*. *Pachydietyon*

coriaceum, *Dictyota dichotoma*, y *Ecklonia kurome* demostraron alta actividad citotóxica. El extracto de *P. coriaceum* produjo el 100 % de letalidad frente a *A. salina* a las 24 y 48 h en concentraciones de 0,5 % y 2,5 %, en tanto que *D. dichotoma* y *E. kurome* lo fueron a las 48 h a una concentración de 2,5 %. Las especies que presentaron moderada toxicidad fueron *Ishige sinicola*, *Saccharina japonica*, y *Undaria pinnatifida*, con porcentajes de letalidad del 48, 46,4 y 47,2 % respectivamente, a las 48 h a una concentración de 2,5 %. Se consideró que las especies *Colpomenia bullosa*, *Costaria Costata*, *Ecklonia cava*, *Eisenia bicyclis*, *Hizikia fusiformis*, *Myelophycus simplex*, *Petalonia binghamiae*, *Sargassum micracanthum* y *Sargassum thunbergii* presentaron leve toxicidad a concentraciones de 0,25; 0,5 y 2,5 % a las 12, 24 y 48 h, dado que las mismas mostraron una letalidad < 30 %. (Kim et al., 2017).

El bioensayo frente a *Artemia* sp. puede ser extrapolado con distintas actividades biológicas, por ejemplo con la actividad antiproliferativa frente a distintas líneas celulares (Anderson et al., 1991).

Soleimani et al. (2018) realizaron ensayos de citotoxicidad de tres extractos (hexano, acetato de etilo y metano) de *Sargassum angustifolium*, *Cystoseria myrica* (algas pardas) y *Acanthophora muscoides*, *Chondrophycus papillosus* (algas rojas), colectadas en el intermareal del Golfo Pérsico de Irán, sobre *Artemia salina* y *Artemia franciscana*. Los resultados demostraron que la mortalidad de los nauplios fue directamente proporcional a las distintas concentraciones de prueba (125, 250, 500 y 1000 µg/ml).

El extracto metanólico de *Sargassum* sp. mostró actividad antiproliferativa sobre líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (Namvar et al., 2013).

3.2.2. Ensayo de inhibición de la elongación de las raíces de las semillas de trigo, *Triticum aestivum* (Poaceae)

Durante la germinación de las semillas y los primeros días del desarrollo, ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de un compuesto citotóxico puede interferir y alterar la supervivencia y el desarrollo normal de las plántulas, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos

adversos. Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de *T. aestivum* y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba, son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general (Lewis, 1995).

Para poder evaluar la actividad antitumoral este bioensayo utiliza semillas de trigo, *Triticum aestivum* de una variedad identificada (Poaceae) las que son germinadas en condiciones naturales ambientales (luz, temperatura, presión ambiental) en agua corriente (control negativo), en presencia de un antitumoral conocido (Vinblastina SO_4^{2-} , control positivo), y de distintas concentraciones de los extractos y/o productos a analizar. Al cabo de 5 días se mide la longitud de las raíces y se calcula el % de inhibición en base a la longitud de la raíz de mayor longitud del control negativo (100 % de crecimiento) y la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}). De acuerdo a los criterios de citotoxicidad del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, un extracto es considerado activo si tiene una $\text{CI}_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$ en el ensayo preliminar (Suffness y Pezzuto, 1990).

Este es un ensayo muy preciso, fiel, económico, y que además permite inferir la posibilidad de estar frente a uno o más metabolitos antitumorales presentes en la muestra. Pero puede ocurrir que en lugar de inhibición del crecimiento, provoque estimulación, es decir que las raíces muestren un mayor crecimiento radicular en presencia de la muestra que en presencia del control negativo, por lo que también permite evaluar la presencia de sustancias fitoestimulantes. (Desmarchelier et al., 1995).

Estudios realizados en el extracto crudo del alga roja *Stictosiphonia hookeri* mostraron una inhibición del crecimiento radicular del 16,2 % a una concentración del 0,5 %, cuyo resultado fue comparable con extractos muy activos de plantas superiores. En este mismo estudio se pudo observar que concentraciones diez veces menores, produjeron una estimulación de un 25,8 % lo que podría indicar la presencia de sustancias fitoestimulantes en la muestra (Córdoba et al., 2008).

El alginato de sodio purificado extraído a partir del alga parda *Lessonia vadosa* mostró el 71 % inhibición de la elongación radicular. Además este mismo

compuesto presentó actividad citotóxica frente a *Artemia salina* e inhibió la proliferación celular de cáncer de colon CaCo-2 en un 55 % a una concentración de 1 mg/ml (Becerra, 2016).

3.2.3. Actividad antibacteriana

Durante los últimos veinte años el uso indiscriminado de los antibióticos ha hecho que las bacterias, dotadas de múltiples mecanismos (bioquímicos, genéticos y celulares), desarrollen estrategias que les permitan evadir con efectividad la acción de estos compuestos (Cabrera et al., 2007), atribuyendo a este hecho un importante impacto en la población humana.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018), las bacterias que presentan mayor resistencia en la actualidad son *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella* sp.

La resistencia antibiótica es un problema emergente a nivel mundial lo que supone grandes complicaciones en el tratamiento antibiótico cuando este es requerido. En este sentido, la OMS en 2014 puso énfasis en la necesidad de investigar nuevas moléculas antibacterianas y trabajar mancomunadamente entre sectores públicos y privados (OMS, 2014; OMS, 2018).

El potencial antibacteriano de las algas ha sido atribuido al menos en parte, a su capacidad para sintetizar metabolitos tales como diterpenos en las algas verdes, terpenos halogenados en las algas rojas y metabolitos mixtos de origen terpénico y aromático en las algas pardas (Bhakuni y Silva, 1974; Vlachos et al., 1997; Carvalho y Roque, 2000).

Diferentes métodos experimentales pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante determinados compuestos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, permitiendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado (Cole, 1994), de allí la importancia de conocer los estándares para estas pruebas de actividad biológica.

Algaser et al. (2013) analizaron la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de 19 especies de algas marinas (6 especies de algas verdes, 8 especies de algas pardas y 5 especies de algas rojas) Los extractos mostraron una importante actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella* sp. y *Pseudomonas aeruginosa*. Entre las algas ensayadas, el alga parda *Cystoseira crinita* exhibió la mayor actividad antibacteriana.

3.2.4. Actividad antioxidante

Diversos compuestos antioxidantes sintéticos, altamente empleados por su eficacia y bajo costo, han presentado efectos carcinogénicos y tóxicos, lo que ha promovido la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes naturales para su reemplazo (Namiki, 1990).

Diferentes estudios demuestran que la actividad antioxidante de las algas marinas puede ser explicada por la presencia de moléculas como carotenoides, aminoácidos tipo micosporinas, terpenos y polisacáridos sulfatados, aunque la mayoría de los investigadores consideran a los compuestos polifenólicos como los ácidos fenólicos y cinámicos, florotaninos y bromofenoles, entre los principales responsables de esta propiedad (Dutra–Rocha et al., 2007).

Dentro de los mecanismos de acción antioxidante más importantes de las algas marinas se encuentra la capacidad atrapadora de radicales libres y por este motivo, el ensayo de inactivación del radical DPPH· es una de las metodologías más utilizadas para estudiar sus propiedades antioxidantes (Kaur et al., 2006). El DPPH· es un radical estable coloreado que puede aceptar protones donados por compuestos antioxidantes presentes en estos extractos convirtiéndose en su forma estable e incolora.

Nakai et al. (2006) estudiaron la actividad antioxidante de extractos etanólicos de 25 algas colectadas en las costas de Corea, y atribuyeron esta propiedad en el alga *Sargassum ringoldianum* a la presencia del florotaninos. Resulta interesante señalar que en este trabajo, los extractos de 15 algas, a pesar de mostrar actividad antioxidante, no presentaron compuestos polifenólicos.

Otros estudios efectuados con *Ecklonia* sp., también relacionaron esta actividad a los florotaninos eckol y dieckol (Joe et al., 2006).

3.2.5. Ensayo del Metil Green-ADN (MG-ADN)

Este es un ensayo específico que determina uno de los posibles mecanismos por el cual una muestra posee actividad citotóxica, dado que permite detectar moléculas que se intercalan total o parcialmente en la doble hélice del ADN, aunque no es adecuado para aquellas que se unen en forma covalente (Burres et al., 1992). La interacción con el ADN se mide a través del desplazamiento del colorante Metil Green, que puede ser seguido espectrofotométricamente a 655 nm, por la disminución de la absorbancia del complejo MG-ADN que inicialmente se hallaba coloreado (Burres et al., 1992).

Para poder evaluar el posible mecanismo del extracto, fracción o producto que en un ensayo primario o general haya mostrado citotoxicidad, se adiciona el reactivo comercial MG-ADN y se mide la absorbancia en dos tiempos. Para cada muestra, se determina el porcentaje de intercalación en el ADN a partir de la disminución de la absorbancia calculada por la diferencia entre las absorbancias final e inicial. Para calcular el porcentaje, la absorbancia inicial se toma como 100 %.

De esta forma, este ensayo permite inferir un posible mecanismo molecular de acción de los compuestos que poseen una citotoxicidad importante frente al ensayo de la *Artemia salina* y/o de inhibición del desarrollo radicular de semillas de trigo, esto es una CL_{50} inferior a 250 $\mu\text{g/ml}$ y/o porcentajes de inhibición mayores al 30 % para concentraciones de los productos de 0,5 % en el estudio de inhibición radicular.

En nuestro grupo de investigación se ha utilizado este ensayo sobre distintos extractos de algas como *Lessonia vadosa* (Becerra, 2016), *Ulva* sp (Uhrich, 2016), entre otras. En ambos extractos, de las especies mencionadas anteriormente, se observó disminución de la absorbancia del complejo MG-ADN, sugiriendo a este mecanismo como el responsable, al menos en parte, de la citotoxicidad que demostraron los extractos.

3.2.6. Actividad antileishmania

Las Leishmaniasis son un conjunto de enfermedades muy complejas causadas por parásitos que pertenecen al género *Leishmania*, de la familia Trypanosomatidae. Estos parásitos son transmitidos al ser humano mediante la picadura de flebótomos, que son los insectos vectores previamente infectados.

Los tipos de Leishmaniasis más usuales en Argentina son dos; aquellos que comprometen la piel y las mucosas, denominados respectivamente Leishmaniasis Cutánea y Leishmaniasis Mucosa, o en conjunto Leishmaniasis Tegumentaria, y el que compromete el estado general y algunas vísceras como hígado y bazo, llamado Leishmaniasis Visceral (Ministerio de salud, 2010a,b).

En Argentina hay tres especies identificadas de *Leishmania* que pueden producir Leishmaniasis Cutánea. La más frecuente, *Leishmania brasiliensis*, asociada a los brotes epidémicos y también responsable de la Leishmaniasis Mucosa; en tanto que la especie que puede producir Leishmaniasis Visceral, es la *Leishmania infantum* (Ministerio de Salud, 2010a)

De las 26 especies de flebótomos descritas para Argentina, sólo cuatro serían vectores de la Leishmaniasis Cutánea-Mucosa como *Lutzomyia neivai*, *L. cotelezzii*, *L. migonei*, y *L. whitman*. En cambio para la Leishmaniasis Visceral se ha identificado sólo una especie, *Lutzomyia longipalpis*, como responsable de los brotes epidémicos (Ministerio de Salud, 2010a)

En la **Figura 3.1** se muestra el ciclo de transmisión del parásito (Ministerio de Salud, 2010a). La hembra del flebótomo pica a un animal enfermo de leishmaniasis (**A**) y extrae su sangre para alimentarse. De ese modo, la sangre y las células infectadas con los amastigotes llegan al tubo digestivo del insecto donde se transforman en promastigotes (**B**), la flecha vertical en azul indica la transformación). En el momento en que el flebótomo pica a las personas (**C**), les inyecta los parásitos en su piel o mucosas. La transmisión del parásito es de tipo inoculativa, porque el flebótomo inyecta la *Leishmania* sp. mientras ingiere la sangre del huésped. Una vez en el interior del organismo, los parásitos en su etapa de promastigotes son capturados por los macrófagos. Si el sistema inmunológico (macrófagos) fracasa en su capacidad de destruir el parásito, éste

fácilmente invade las células y se convierte en abrigo y protección del parásito. En ese lugar se produce la transformación del promastigote en amastigote.

En el interior de la célula parasitada los amastigotes se multiplican. Cuando hay una gran cantidad de parásitos dentro de la célula, ésta se acaba rompiendo. Al romperse libera las formas amastigotes. De este modo, nuevas células son parasitadas y se repite el proceso extendiendo la infección.

La Leishmaniasis Visceral es una enfermedad con una incidencia mundial estimada en 200 a 400 mil casos nuevos cada año (Alvares et al., 2012), por tal motivo se plantean estrategias efectivas de control (OMS, 2010).

Desde 1970, el tratamiento se basa en el empleo de sales de antimonio; no obstante, su eficacia ha disminuido notablemente por la aparición de cepas resistentes, lo cual parece estar asociado a tratamientos incompletos.

Por estas razones se hace necesario continuar con la búsqueda de nuevos medicamentos que brinden alternativas para el tratamiento de estas patologías. Los productos naturales constituyen una fuente esencial de metabolitos para el desarrollo de medicamentos. Es por ello que muchos investigadores se han volcado a la realización de estudios en diferentes especies, con el fin de obtener sustancias con actividad antileishmania (Schwickard y Van Heerden, 2002).

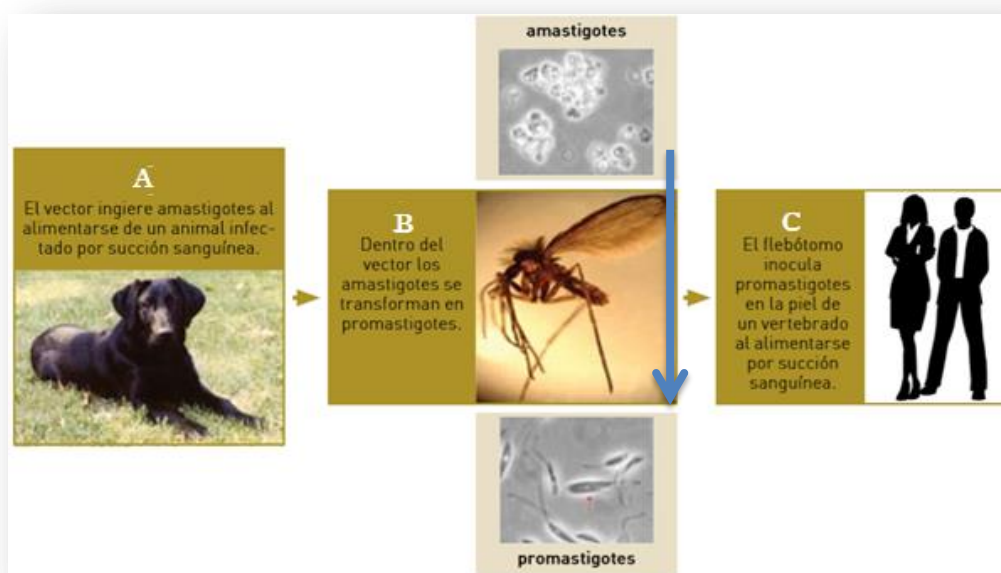


Figura 3.1. Ciclo de transmisión del vector de la Leishmaniasis. (Fuente: Ministerio de Salud, 2010a).

En Argentina, la distribución de la enfermedad indica que el área endémica de Leishmaniasis Cutánea-Mucosa corresponde a las provincias de Salta, Jujuy, Tucumán, Catamarca, Santiago del Estero, Chaco, Misiones y Corrientes (Ministerio de Salud, 2010a).

En comparación con las plantas terrestres, se han descrito aún escasos estudios con macroalgas marinas, lo que pone de relieve la importancia de investigar estos organismos como fuentes potenciales para nuevos fármacos con actividad antileishmania (Tchokouaha Yamthe et al., 2017).

Estudios recientes indican que el fucosterol, aislado de *L. vadosa*, presentó importante actividad antileishmania frente a la forma amastigote intracelular en comparación con el promastigote extracelular de *Leishmania amazonensis* y *L. infantum*. Además, mostró baja citotoxicidad contra la línea celular de macrófagos murinos derivados de un sarcoma de células reticulares (Becerra, 2016).

Para la determinación de la actividad antileishmania, en este trabajo de tesis se utilizó el método de la resazurina (también llamado Azul de Alamar), que se basa en la habilidad de las células viables para reducir la molécula de resazurina y transformarla en resorufina, siendo este último fluorescente a una longitud de onda de emisión de 590 nm (Mikus y Steverding, 2000; Escobar, 2007).

Estudios realizados por Becerra (2016) con fucosterol purificado de *Lessonia vadosa*, mostraron actividad antileishmania.

3.2.7. Actividad sobre líneas celulares tumorales

Uno de los primeros artículos que aparecen en la literatura acerca de la evaluación antineoplásica de los extractos de algas marinas, es el de Kashiwagi et al. (1980), quienes evaluaron en ratones de experimentación, 107 extractos de macroalgas y microalgas marinas del Océano Pacífico contra la leucemia linfocítica P388 y el tumor ascítico de Ehrlich.

Fernández et al. (1989) demostraron la actividad inmunomoduladora del polisacárido extraído del alga roja *Gracilaria dominguensis*.

Los ensayos para la detección de la viabilidad y proliferación celular son cruciales en Farmacología ya que permite la evaluación de los efectos tóxicos provocados por extractos de productos naturales o compuestos químicos aislados, posibilitando de esta manera descubrir nuevos compuestos con uso potencial en Salud. La necesidad de lograr una prueba confiable, relativamente sencilla y rápida, ha llevado al desarrollo de varios ensayos que ahora se utilizan habitualmente, y que están disponibles para detectar los efectos citotóxicos de los sistemas celulares *in vitro*.

En este sentido Harada et al. (1997) evaluaron 1446 extractos acuosos y metanólicos procedentes de 306 especies de algas marinas de las costas de Japón, mediante ensayos *in vitro*. Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron la efectividad de los extractos de cuatro especies de algas verdes frente a leucemia L1210, en particular el extracto metanólico de *Cladophoropsis vaucheriaformis*, que exhibió un 86 % de viabilidad para las células normales y resultó selectivamente citotóxico para células de leucemia P388 y L1210.

El extracto de *Styopodium zonale* demostró gran actividad citotóxica contra la línea celular de melanoma humano (Rocha et al., 2007). Otro estudio realizado con el extracto enriquecido en florotaninos del alga parda *Laminaria japonica* ha mostrado una considerable actividad antiproliferativa, dosis dependiente, sobre líneas celulares de leucemia murina y carcinoma hepatocelular humano con valores de CI_{50} de 120 $\mu\text{g/ml}$ y valores mayores a 200 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, después de 48 h de incubación. En este mismo estudio, la observación microscópica de las características morfológicas de las células tumorales tratadas con el extracto enriquecido con florotaninos y 5-fluorouracilo (un fármaco de quimioterapia comercial) mostraron diferencias con respecto al grupo control, lo que sugiere la acción antiproliferativa (Yang et al., 2010).

Por otro lado, los polisacáridos extraídos de *Sargassum stenophyllum* y *Capsosiphon fulvescens* inhibieron la migración y la viabilidad de las células de melanoma humano *in vitro* e *in vivo* (Días et al., 2005) y la inducción de apoptosis en células gástricas humanas (Kwon y Nam, 2007), respectivamente.

Dentro de los polisacáridos, el alginato de sodio de *Lessonia vadosa* colectada en las costas de la zona central del Golfo San Jorge, obtenido en nuestro grupo de

investigación, mostró actividad antiproliferativa sobre la línea celular de cáncer de colon Caco-2, exhibiendo a 1 mg/ml, una inhibición de la proliferación celular del 55 % (Becerra, 2016).

En la presente tesis, la evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* sobre líneas celulares, se realizó mediante el ensayo descrito también para actividad antileishmania empleando la resazurina. Para este ensayo las células se exponen a la resazurina que ha sido añadida al medio de cultivo (O'Brien et al., 2000). Posteriormente cada línea celular se incubaba a 37 °C, en condiciones de oscuridad. Las células viables son determinadas en un fluorómetro (Ahmed et al., 1994; Skehan et al., 1990), y se calculan a partir de la relación de unidades relativas de fluorescencia (RFU) (Skehan et al., 1990).

3.2.8. Test del *Allium cepa*

Este test es un biomonitor sensible (Fiskesjö, 1988) adecuado tanto para el análisis de toxicidad como de genotoxicidad (Fiskesjö, 1985). Su aplicación en el análisis genotóxico de compuestos químicos y mezclas complejas es ampliamente utilizado desde su implementación desarrollada por Levan en 1938. Los resultados obtenidos de distintos compuestos químicos con el test de *Allium cepa* demostraron una correlación de un 70 % comparados con ensayos sobre diferentes líneas celulares (Grant, 1982).

Cuando un bulbo de *Allium cepa* se rehidrata se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemas apicales puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz, y por lo tanto su elongación (Fiskesjö, 1985, 1993, 1997).

La toxicidad analizada mediante este test, contempla parámetros macro y microscópicos para evaluar alteraciones morfológicas de las raíces y el potencial efecto citotóxico mediante el Índice Mitótico (IM), utilizándose como testigo agua potable. Para evaluar el IM y la genotoxicidad se utiliza un microscopio óptico,

calculándose el IM como la relación entre el número de células en mitosis y el número de células totales. La disminución del índice mitótico es consecuencia de un menor desarrollo radicular expresada por el compuesto químico de prueba a distintas concentraciones y tiempos (Fiskesjö, 1985).

En la actualidad existen diversas referencias bibliográficas del uso del test *Allium cepa* para evaluar la toxicidad de compuestos químicos como el azufre, magnesio, boro, cromo, pesticidas, herbicidas, productos farmacéuticos entre otros (Fiskesjö, 1993; Peña et al., 1999; Tartar et al., 2006; Feretti et al., 2007; Mustafa et al., 2008). Sin embargo, no se han encontrado en bibliografía resultados de ensayos de *A. cepa* con extractos y/o productos de algas pardas.

3.2.9. Ensayo alelopático

Algunas especies poseen la capacidad de liberar compuestos químicos que influyen en el crecimiento y desarrollo de otras especies. Este mecanismo se conoce como alelopatía. Por lo tanto la alelopatía representa el área de la Bioquímica Ecológica que estudia las interacciones entre diferentes organismos vivos y su medio ambiente.

La International Allelopathy Society en el año 1996, define la alelopatía como “*Todo proceso que implica metabolitos secundarios producidos por especies exóticas que influyen en el crecimiento y desarrollo de las especies nativas (excluyendo los animales), comprendiendo efectos positivos y negativos*”. Esta definición se amplió luego a cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por las plantas (con este término se incluyen a las algas), microorganismos, virus y hongos que influyen en el crecimiento y desarrollo de otras especies presentes en el mismo ecosistemas (Ringuelet, 2013).

Por lo expuesto en el párrafo anterior, la utilización de extractos de plantas como una herramienta de manejo en los cultivos, puede ser uno de los usos más prácticos y aplicables de la alelopatía en la agricultura (Setyowati y Simaramata, 1999). La liberación de los metabolitos a partir del extracto producen reacciones naturales con múltiples efectos, que van desde la inhibición o estimulación de los procesos de crecimiento de las plantas vecinas, hasta la inhibición de la

germinación de semillas. Así, los metabolitos secundarios conforman una parte muy importante de los sistemas de defensa de las plantas, con la ventaja de ser biodegradables. Por otra parte, las diferentes concentraciones influyen mucho en las reacciones alelopáticas, ya que se ha demostrado que los extractos pueden actuar tanto como inhibidor o estimulante en diferentes cultivos, ya sea en el crecimiento de raíces o tallos; además, se ha observado que las extracciones acuosas pueden tener un potencial alelopático negativo sobre diferentes cultivos y esto se debe al contenido de aleloquímicos de estos extractos, el tiempo de aplicación y la concentración empleada (Setyowati y Simaramata, 1999).

Se ha descrito que los extractos de algas ayudan a resistir daños por enfermedades, insectos o condiciones de estrés, así como a incrementar la producción, la resistencia, la absorción de nutrientes del suelo y la germinación de las semillas (Abreu, 2005). Dentro de los compuestos ya identificados en las algas está el ácido algínico, manitol, vitaminas, entre otros. Se ha demostrado que el contenido de clorofila y la capacidad fotosintética son elevados en plantas tratadas con estos extractos. Además del *Sargassum* sp., otros géneros de algas marinas como, *Ecklonia*, *Laminaria*, *Macrocystis*, *Fucus*, *Ulva*, *Gracilaria*, entre otros, son utilizados en la agricultura en diferentes países (Abreu, 2005).

Para evaluar el potencial alelopático de los extractos se emplean semillas germinadas, sensible a herbicidas, como *Lycopersicum esculentum* (dicotiledónea) y *Lolium multiflorum* (monocotiledónea), las cuales son colocadas en placas de Petri transparentes y expuestas a un fotoperiodo de luz artificial con distintas concentraciones de la muestra a evaluar, durante 10 días. Como variables experimentales se tiene en cuenta el porcentaje de germinación y la elongación radicular con respecto al control negativo (semillas cultivadas en agua destilada). Al cabo del tiempo de prueba, se mide la longitud de la raíz de cada semilla y se promedian por placa y por triplicado, para cada dilución. Finalmente se calcula el % de inhibición en base a la longitud de las raíces del control negativo (100 % de desarrollo) (Arancibia, 2015).

3.3. Aplicaciones farmacéuticas - Microencapsulación

La microencapsulación de medicamentos, desde el punto de vista tecnológico, se puede definir como el proceso de recubrimiento de medicamentos, bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o glóbulos líquidos, con materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. El producto resultante de este proceso tecnológico, se denomina “micropartícula”, “microcápsula” o “microesfera” (Remuñán-López y Alonso-Fernández, 1997), con un diámetro que varía desde unos pocos micrones hasta 1000 μm (1 mm). El núcleo que compone la macropartícula se denomina también fase interna o principio activo, mientras que la membrana suele nombrarse como capa externa o matriz, constituyendo sistemas que se diferencian en su morfología y estructura interna. Cuando las partículas son menores que 1 μm , el producto del proceso de encapsulación recibe el nombre de “nanopartícula”, “nanocápsula” o “nanoesfera”, (Remuñán-López y Alonso-Fernández, 1997).

Existen distintos biopolímeros que pueden ser empleados en la fabricación de micropartículas, entre ellos los polisacáridos han sido empleados como matriz debido a su capacidad para absorber agua, biocompatibilidad, fácil manipulación e inocuidad. El alginato de sodio es ampliamente utilizado en la industria de farmacéutica, destacándose aplicaciones terapéuticas, biomédicas y en biomateriales (Hori et al., 2009). Los alginatos son extraídos primariamente de tres especies de algas pardas como *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera* (Rodríguez-Llimos et al., 2003).

En la presente tesis aplicamos uno de los productos obtenidos, el alginato, a la microencapsulación de paracetamol (PCT). El paracetamol (N-acetil-aminofeno) es un fármaco clasificado como antiinflamatorio y analgésico no esteroidal (AINE), eficaz para el tratamiento contra el dolor y la fiebre, ampliamente usado en la actualidad, si bien evidencia una débil actividad antiinflamatoria. Es un fármaco bien tolerado, aunque la sobredosis aguda ocasiona lesión hepática mortal. El PCT a pH 7,4 se encuentra disociado únicamente en un 0,42 %, por lo que se puede asumir que en el torrente sanguíneo este fármaco se encuentra preferentemente en forma molecular. Los coeficientes de reparto son ligeramente

superiores a 1, lo que indica que este compuesto es semipolar y de naturaleza parcialmente lipofílica; además esta propiedad fisicoquímica disminuye con el aumento de la temperatura mostrando un carácter exotérmico para la transferencia hacia el medio orgánico (Baena et al., 2004).

Debido a las propiedades que el paracetamol posee de baja fluidez, lubricación y cohesividad, es difícil de comprimir en determinadas dosis y el margen para corregir sus deficientes propiedades de compresibilidad se ve limitado las formulaciones de comprimidos, por ello se efectúan otros métodos para su formulación como la microencapsulación (Dewani et al., 2015).

El alginato de sodio es un polisacárido de origen natural, como mencionáramos en el Capítulo 2 de este trabajo de tesis, altamente soluble en agua. Existen varios factores que pueden modificar las propiedades fisicoquímicas de sus soluciones; a continuación se particularizan los más importantes.

- La concentración de la solución: al aumentar la concentración de la solución aumenta fuertemente su viscosidad, lo cual se ve reflejado en las curvas de flujo de disoluciones de diferentes concentraciones (0,1; 0,5 y 1,0 %) (Avendaño et al., 2013).
- La temperatura: por cada 6 °C de aumento de la temperatura, la viscosidad disminuye aproximadamente un 12 %, y al enfriar, no se recuperan los valores de viscosidad iniciales (Whistler y BeMiller, 1993) debido a la despolimerización producida, la cual depende de la temperatura, del tiempo que se esté calentando, y del peso molecular del alginato.
- La longitud (y por ende el peso molecular) y la rigidez de las moléculas del alginato.
- El pH: su descenso repercute directamente en la transformación del anión del alginato de sodio soluble en agua en ácido algínico insoluble, lo cual se traduce en una mayor viscosidad. A un pH inferior a 2, el ácido algínico precipita.
- El peso molecular: la viscosidad de la solución acuosa de alginato de sodio depende directamente del peso molecular, es decir, del grado de polimerización del polímero.

- Efecto de un electrolito monovalente: el cloruro de sodio como electrolito inorgánico libera cationes monovalentes en la solución de alginato de sodio, lo cual reduce la viscosidad, debido a un aumento en la fuerza iónica (Avendaño et al., 2013).

En consecuencia, la viscosidad de una disolución de alginato de sodio al 1 % puede variar dependiendo del tipo de alginato utilizado y del pH (las disoluciones de la sal sódica del polisacárido son inestables a valores de $\text{pH} \geq 11$), así como de la presencia de sales monovalentes o polivalentes.

En presencia de agua, estos sistemas forman una matriz cuya viscosidad aumenta debido a que las cadenas poliméricas adyacentes se entrelazan, constituyendo una estructura dinámica. Las cadenas pueden moverse entre sí y el principio activo difunde a través de la fase intersticial (Lawrie et al., 2007).

3.3.1. Clasificación de las micropartículas

Las microcápsulas y microesferas se han diferenciado principalmente por la distribución del principio activo. En las microcápsulas, el principio activo puede ser de naturaleza líquida o sólida incluido en una especie de reservorio recubierto por una película del material. Mientras que, en las microesferas, el principio activo se encuentra altamente disperso en forma de partículas o moléculas en una matriz. La obtención de un tipo de estructura u otra depende de las propiedades físicoquímicas del principio activo y de la matriz, así como de la técnica empleada para su preparación (Lopretti et al., 2007).

Las microcápsulas pueden tener forma esférica o irregular. Así mismo, pueden estar constituidas por una membrana simple, múltiples capas e incluso núcleos múltiples cuya matriz puede ser del mismo material o una combinación de varios tal como se muestra en la **Figura 3.2** (Gibbs et al., 1999).

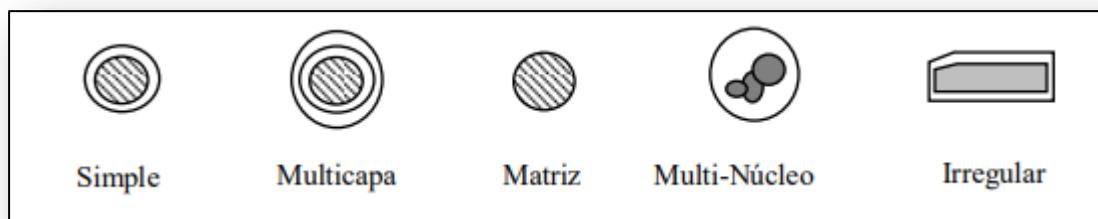


Figura 3.2. Clasificación de la microcápsulas.

3.3.2. Condiciones de Gelificación

La propiedad más importante del alginato de sodio es su capacidad para formar geles al reaccionar con cationes divalentes como el calcio. Este polímero forma una estructura en contacto con cationes, originando una red tridimensional que atrapa las moléculas del fármaco. Las micropartículas se pueden preparar por gelificación iónica a partir de una solución de alginato de sodio, que se deja caer en forma de gotas sobre otra que contienen cationes como calcio, estroncio o bario. La gelificación y reticulación del polímero se consiguen mediante el intercambio químico de iones de sodio con cationes divalentes lo que provoca el apilamiento de los grupos urónicos, creando una estructura reticulada conocida como caja de huevo, que se caracteriza por contener aproximadamente un 99 % de agua y presentar características muy similares a los sólidos, ya que conservan su forma y son resistentes al estrés físico. Las reacciones químicas entre los grupos urónicos del alginato y el catión, pueden ser temporales o permanentes, por lo que empleando bajas concentraciones de calcio se consiguen asociaciones temporales que dan lugar a soluciones viscosas y tixotrópicas, mientras que utilizando concentraciones altas, el polímero gelifica produciendo microesferas que precipitan formando asociaciones permanentes (George et al., 2006).

3.3.3. Mecanismos de Gelificación iónica con alginato

Los alginatos de sales polivalentes son insolubles, con excepción de la sal de magnesio. La razón de que el magnesio sea el único catión divalente que no forma

gel con el alginato es la preferencia del Mg^{2+} por el entrecruzamiento intramolecular frente al intermolecular de los demás cationes polivalentes. De esta forma, la adición controlada de cualquier otro catión polivalente lleva al alginato a la formación de un gel, pudiéndose establecer una serie de afinidad creciente de los alginatos por los cationes alcalinotérreos de la forma $Mg \ll Ca < Sr < Ba$, siendo el calcio el más empleado en la industria farmacéutica. Asimismo, la fuerza de gel aumenta con la afinidad entre el polímero y los cationes.

El proceso de formación del gel se inicia a partir de una solución de sal de alginato y una fuente de calcio externa o interna desde donde el ión calcio se difunde hasta alcanzar la cadena polimérica. Como consecuencia de esta unión, se produce un reordenamiento estructural en el espacio resultando en un material sólido con las características de un gel (**Figura 3.3**). El grado de gelificación dependerá de la hidratación del alginato, la concentración del ión calcio y el contenido de los bloques de ácido gulurónico (Funami et al., 2009).

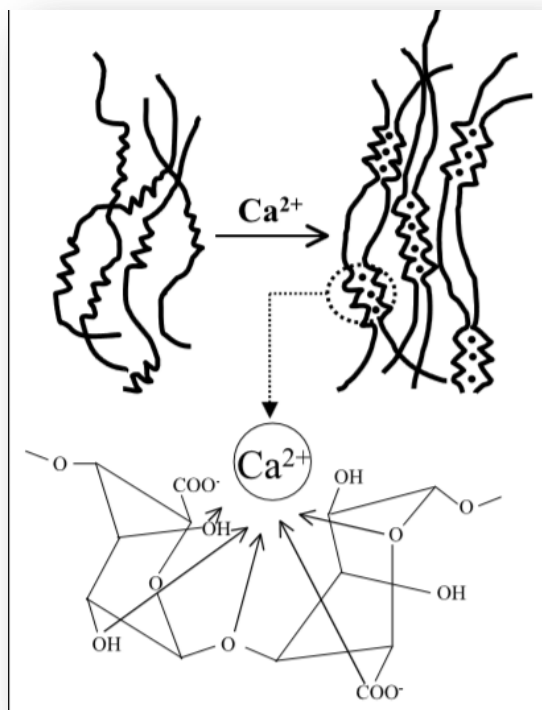


Figura 3.3. Mecanismo de gelificación del alginato en presencia de cationes de calcio (Fuente; Draget, 2000).

Los mecanismos de gelificación iónica incluyen fundamentalmente dos procesos: la gelificación externa y la gelificación interna (Draget, 2000).

3.3.3.1. Gelificación externa

El proceso de gelificación externa ocurre con la difusión del ión calcio desde una fuente que rodea al hidocoloide hacia la solución de alginato de sodio de pH neutro. La formación del gel se inicia en la interfase y avanza hacia el interior a medida que la superficie se encuentra saturada de iones calcio, de manera que el ión sodio proveniente de la sal de alginato es desplazado por el catión divalente solubilizado en agua. Este interacciona con los bloques GG de diferentes moléculas poliméricas, enlazándolas entre sí. Aunque, la fuente de calcio más usada ha sido el CaCl_2 debido a su mayor porcentaje de calcio disponible, han sido empleadas otras sales tales como el acetato monohidratado y el lactato de calcio (Saha y Bhattacharya, 2010; Helgerud et al., 2010).

3.3.3.2. Gelificación interna

Este proceso consiste en la liberación controlada del ión calcio desde una fuente interna de sal de calcio insoluble o parcialmente soluble dispersa en la solución de alginato de sodio. La liberación del ión calcio puede ocurrir de dos formas si se tiene una sal de calcio insoluble a pH neutro, pero soluble a pH ácido, por lo que es necesario adicionar un ácido orgánico que al difundirse hasta la sal permita la acidificación del medio consiguiendo solubilizar los iones calcio. En este caso, las sales de calcio más empleadas son el carbonato de calcio y el fosfato tricálcico, y en casos específicos el fosfato dicálcico y el citrato tricálcico. Para la acidificación del medio se cuenta con ácidos orgánicos como el acético y adípico. Si la sal de calcio es parcialmente soluble, el proceso de gelificación interna consiste en la adición a la mezcla alginato-sal de calcio, de un agente secuestrante como el fosfato, sulfato o citrato de sodio, siendo el sulfato de sodio el más empleado

debido a su bajo costo y conveniente solubilidad. Al adicionar un secuestrante, éste se enlaza con el calcio libre retardando así el proceso de gelificación.

El gel de alginato cálcico formado es permeable a moléculas solubles en agua, cuyos pesos moleculares sean menores a 5000 Dalton. Moléculas mayores también pueden difundir a través del gel, pero si el peso molecular excede los 10000 Dalton, la difusión no ocurre. La excepción a esto, la constituyen los lípidos, que permanecen en la matriz aun cuando sean de peso molecular bajo (Martín Villena et al., 2009).

Rodríguez-Llimos et al. (2003) estudiaron parámetros tales como:

- Tiempo de agitación con el ácido acético glacial: al aumentar diez veces el tiempo de contacto se observa que la encapsulación del paracetamol aumenta 3 veces, esto podría deberse a que se lleva a cabo una gelificación más completa debido a una mayor liberación de iones calcio desde el complejo insoluble de carbonato de calcio.
- Tiempo de contacto de las micropartículas con la solución de cloruro de calcio: si bien es necesario un tiempo de reacción, éste no debe ser excesivo debido a que facilitaría la difusión del principio activo por gradiente de concentración. Se observó que al disminuir el tiempo de contacto, se obtuvieron mejores resultados en la encapsulación y, consecuentemente, mayor rendimiento total de micropartículas.
- Concentración de iones calcio: parece ser un parámetro crítico en la producción de micropartículas. La influencia de la concentración del ión calcio fue evaluada con tres concentraciones diferentes (157, 314, 629 nM). Se observó que a medida que se incrementó la concentración, aumentó el rendimiento total de micropartículas y la encapsulación de principio activo.

También ha sido estudiado el efecto de ruptura de la emulsión con y sin centrifugación (Poncelet et al., 1992).

El gel de alginato de calcio formado es permeable a moléculas solubles en agua, cuyos pesos moleculares sean menores a 5000 Dalton. Moléculas mayores también pueden difundir a través del gel, pero si el peso molecular excede los 10000 Dalton, la difusión no ocurre (Helgerud et al., 2010).

En resumen, la principal diferencia entre el mecanismo de gelificación externa e interna es la cinética del proceso. Si lo que se pretende es el control de la transición sol-gel, en el proceso de gelificación externa los factores a manipular son la concentración de calcio y composición del polímero. Mientras que, para el proceso de gelificación interna, se deben considerar la solubilidad, concentración de la sal de calcio, concentración del agente secuestrante y del ácido orgánico empleado (Draget, 2000).

3.3.4. Características morfológicas, tamaño de partícula y estructura interna

Para analizar la morfología de las micropartículas, se recurre normalmente a técnicas de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (MEB), las que también permiten detectar la posible agregación de las partículas así como determinar su tamaño. La observación por microscopía electrónica de barrido de los cortes transversales de las micropartículas permite caracterizar su estructura interna. El tamaño y la distribución de tamaños se determinan empleando técnicas de difracción de rayos X, entre otros (Martín Villena et al., 2009).

Otros ensayos que permiten caracterizar las micropartículas y que brindan información sobre su calidad, son la determinación del rendimiento de producción, la eficacia de encapsulación y el contenido en principio activo.

Al igual que en otras formas farmacéuticas, el estudio de liberación *in vitro* de la molécula activa a partir de las micropartículas es muy importante ya que está gobernada por una serie de factores que son dependientes del polímero, del principio activo y de la propia micropartícula. Entre los primeros se puede citar el tipo de polímero (insoluble, solubilidad pH dependiente), su peso molecular y estado cristalino. Entre los parámetros relacionados con el principio activo, se destaca la solubilidad y su peso molecular. Por último, factores dependientes de la propia micropartícula son el tipo de estructura interna y el contenido teórico de principio activo con respecto al polímero.

La mayoría de los procedimientos de microencapsulación implican un mezclado íntimo entre el polímero y el principio activo, por lo que pueden tener lugar diversas interacciones fisicoquímicas que pueden influir en la eficacia terapéutica de la forma farmacéutica final. En consecuencia, es conveniente caracterizar el estado físico del polímero y del principio activo por separado, y del principio activo en la micropartícula (principio activo disuelto o dispersado en el polímero), interacciones medicamento–excipiente. Para ello se recurre a técnicas espectroscópicas del tipo de difracción de rayos X (DRX), infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN), así como a técnicas de análisis térmico diferencial. Además de estos estudios, también se deben realizar controles de disolventes orgánicos residuales (mediante cromatografía gaseosa) si las micropartículas han sido preparadas por procesos que impliquen la utilización de disolventes (Fundueanu et al., 1998).

3.4. Bibliografía

Abreu, G. F. Bioprospección de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Federal de Santa Catarina. Brasil. 2005.

Algaser, R.; Whida, F.; Abduelrhman, E.; Gammoudi, F.; Azawai, S. Screening of antibacterial activity in marine green, red and brown macroalgae from the western coast of Libya. *Nat. Sci.* **2013**, *5*, 1, 7–14.

Alvar, J.; Vélez, I. D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; den Boer, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. [Online acceso libre] **2012**, *7*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>. Publicado Online: 31 Mayo, 2012. Acceso 18 Enero, 2017.

Anderson, J.; Goetz, C.; McLaughlin, J.; Suffness, M. A blind comparison of simple bench- top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem. Anal.* **1991**, *2*, 3, 107–111.

Antolovich, M.; Prenzler, P. D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.* **2002**, *127*, 183-198.

Arancibia, L. A. Estudio químico y bioactividad biológica de derivados sesquiterpénicos presentes en especies patagónicas del género *Senecio*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Dpto. de Farmacia. Argentina. 2013.

Avendaño-Romero, G.; López-Malo, A.; Paolu, E. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. [Online acceso libre] **2013**, *7*, *1*, 87–96.

http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/acym/ALGINATOS_I.pdf. Acceso 2 Mayo, 2017.

Baena, Y.; Pinzón, J.; Barbosa, H.; Martínez, F. Estudio termodinámico de la transferencia de acetaminofén desde el agua hasta el octanol. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *40*, 3, 413–420.

Becerra, M.; Boutefnouchet, S.; Córdoba, O.; Pinto Vitorino, G.; Brehu, L.; Lamour, I.; Laimay, F.; Efstathiou, A.; Smirlis, D.; Michel, S.; Kritsanida, M.; Flores, M.L.; Grougnet, R. Antileishmanial activity of fucosterol recovered from *Lessonia vadosa* Searles (Lessoniaceae) by SFE, PSE and CPC. *Phytochem. Lett.* **2015**, *11*, 418-423.

Becerra, M.B. Obtención de productos de importancia farmacéutica biosintetizados por especies de algas pardas de las costas del Golfo San Jorge. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Dpto. de Farmacia. Argentina. 2016.

Bhakuni, D.; Silva, M. Biodynamic substances from marine flora. *Bot. Mar.* **1974**, *27*, 1, 40–51.

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* **2011**, *28*, 196–268.

Burrell, N.; Frigo, A.; Rasmussen, R.; McAlpine, J. A colorimetric microassay for the detection of agents. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 158–187.

Cabrera, C. E.; Gómez, R. F.; Zúñiga, A. E. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes, una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Méd.* **2007**, *38*, 149-158.

Cañas, R.; López, M.; Determinación de la bioactividad citotóxica de extractos de veintiséis especies vegetales mediante el bioensayo simple con *Artemia salina*. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de el Salvador. El Salvador. 2001.

Carvalho, L.; Roque, V. Fenóis halogenados e/ ou sulfatados de macroalgas marinhas. *Química Nova*. 2000, 23, 6, 757–763.

Cole, D. Key antifungal, antibacterial and antiinsect assay a critical, Review. *Biochemical Systematics and Ecology*. 1994, 22, 837–847.

Desmarchelier, C.; Mongelli, E.; Coussio, J.; Giulietti, A.; Ciccía, G. Etnobotánica y bioactividad de plantas medicinales utilizadas por un grupo indígena Takana de la Amazonia Peruana. *Ac. Farm. Bon*. 1995, 14, 3, 195–208.

Dewani, A. P.; Dabhade, S. M.; Bakal, R. L.; Gadewar, C. K.; Chandewar, A. V.; Patra, S. Development and validation of a novel RP-HPLC method for simultaneous determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride, caffeine, cetirizine and nimesulide in tablet formulation. *Arab. J. Chem*. 2015, 8, 4, 591–598.

Días, P. F.; Siqueira, J. M.; Vendruscolo, L. F.; de Jesús Neiva, T.; Gagliardi, A. R.; Maraschin, M.; Ribeiro-do-Valle, R. M. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Cancer Chemother. Pharmacol*. 2005, 56, 436–446.

Drageta, K. I.; Stranda, B.; Hartmanna, M.; Valla, S.; Smidsroda, O.; Skjak-Braeka, G. Ionic and acid gel Formation of epimerised alginates; the effect of AlgE4. *Intern. J. biol. macromolec*. 2000, 27, 2, 117–122.

Dutra–Rocha, F.; Crespo–Pereira, R.; Coelho–Kaplan, M. A.; Laneuville–Teixeira, V. Produtos naturais de algas marinhas e sue potencial antioxidante. *Braz. J. Pharmacogn*. 2007, 17, 4, 631–39.

El Gamal, A. A. Biological importance of marine algae. *Saudi. Phar. J.* **2010**, *18*, 1, 1–25.

Escobar, L. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT empleados en la evaluación de citotoxicidad sobre tres líneas celulares tumorales, Tesis doctoral. Pontificia Universidad Javeriana, 2007.

Fatope, M. Phytochemicals: Their bioassay and diversity. *Discov Innov.* **1995**, *7*, 3, 229–235.

Feretti, D.; Zerbini, I.; Zani, C.; Ceretti, C.; Moretti, C.; Monarca, S. *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. *Food Additives and Contaminants.* **2007**, *24*, 6, 561–572.

Fernández, L. E.; Valiente, O. Mainardi, V.; Bello, J. L.; Velez, H.; Rosado, A. Isolation and characterisation of antitumor agar type polysaccharides of *Gracilaria dominguesis*. *Carboh. Res.* **1989**, *2*, 4, 80–87.

Finney, D. J.; *Probit Analysis*, 3rd ed., Cambridge University Press: Cambridge, 1971.

Fiskesjö, G. Allium Test for Screening Chemicals; Evaluation of Cytological Parameters. En: *Plants for Environmental Studies*. CRC Press, Florida, 1997, pp 308–329.

Fiskesjö, G. The Allium test an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Res.* **1988**, *197*, 243–260.

Fiskesjo, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas.* **1985**, *102*, 99–112.

Fiskesjö, G. The Allium test in wastewater monitoring. *Environmental Toxicology*. **1993**, *8*, 291–298.

Funami, T.; Fang, Y.; Noda, S.; Ishihara, S.; Nakauma, M.; Draget, K. I.; Nishinari, K.; Phillips, G. O. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. *Food Hydrocolloids*, **2009**, *23*, 7, 1746-1755.

Fundueanu, G.; Esposito, E.; Mihai, D.; Carпов, A.; Desbrieres, J.; Rinaudo, M.; Nastruzzi, C. Preparation and characterization of Ca-alginate microspheres by a new emulsification method. *Intern. J. Pharmac.* **1998**, *17*, 11–21.

Gibbs, Bernard F.; Kermasha, Selim; Alli, Inteaz and Mulligan, Catherine N. Encapsulation in the food industry. Review *Intern. J. Food Sci. Nutr.* **1999**, *50*, 3, 213–224.

Grant, W. F. Chromosome aberration assays in Allium. A report of the US Environmental Agency Gene-Tox Program. *Mutation Res.* **1982**, *99*, 273– 291.

Grasa-López, A.; Miliar-García, A.; Quevedo-Corona, L.; Paniagua-Castro, N.; Escalona-Cardoso, G.; Reyes-Maldonado, E.; Jaramillo-Flores, M. E. *Undaria pinnatifida* and fucoxanthin ameliorate lipogenesis and markers of both inflammation and cardiovascular dysfunction in an animal model of diet-induced obesity. *Mar. Drugs*. **2016**, *14*, 148.

Harada, H.; Noro, T.; Kamey, Y. Selective antitumor activity from marine algae from Japan coasts. *Biol. Pharm. Bull.* **1997**, *20*, 5, 541–546.

Harrison, P.J. y Hurd, C.L. Nutrient physiology of seaweeds: Application of concepts to aquaculture. *Cah. Biol. Mar.* **2001**, *42*, 71–82.

Helgerud, T.; Gaserød, O.; Fjæreide, T.; Andersen, P.O.; Larsen, K.C. Alginates. Food stabilisers, thickeners and gelling agents. WileyBlackwell, Oxford, 2010, 50–72.

Heo, S.J.; Park, P.J.; Park, E.J.; Kim, S.K.; Jeon, Y.J. Antioxidant activity of enzymatic extracts from a brown seaweed *Ecklonia cava* by electron spin resonance spectrometry and comet assay. *Eur. Food Res. Technol.* **2005**, 221, 41–47.

Hori, Y.; Winans, A.; Irvine, D. Modular injectable matrices based on alginate solution/microsphere mixtures that gel in situ and co-deliver immunomodulatory factors. *Ac. Biomaterialia*, **2009**, 5, 969–982.

Jiao, G.; Yu, G.; Zhang, J.; Ewart, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs.* **2011**, 9, 2, 196–233.

Joe, M. J.; Kim, S. N.; Choi, H. Y.; Shin, W. S.; Park, G. M.; Kang, D. W.; Kim, Y. K. The inhibitory effects of Eckol and Dieckol from *Ecklonia stolonifera* on the expression of Matrix Metalloproteinase–1 in Human dermal fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, 29, 8, 1735–1739.

Kashiwagi, M.; J. S. Miynderse, R. E. Moore, T. R. Norton antineoplastic of pacific Basin marine algae. *J. Pharm. Sci.* **1980**, 69, 6, 735–738.

Kaur, G.; Alam, S.; Jabbar, Z.; Javed, K.; Athar, M. Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, 108, 340–348.

Khan, M. N. A.; Suk–Choi, J.; Lee, M. C.; Kim, E.; Nam, T. J.; Fujii, H.; Hong, Y. K. Anti-inflammatory activities of methanol extracts from various seaweed species. *J. Environ. Biol.* **2008**, 29, 465–469.

Kim, Y. D.; Choi, J. S. Larvicidal effects of Korean seaweed extracts on brine shrimp *Artemia salina*. *J. Anim. Plant. Sci.* **2017**, *27*, 3, 1039–1046.

Koleva, I.; Van Beek, T.; Linssen, J.; Groot, A.; Evstatleva, L. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 8–17.

Kumar, R., Zi-rong, X. Biomedical Compounds from Marine organisms. *Mar. Drugs.* **2004**, *2*, 123–146.

Kwon, M. J.; Nam, T. J. A polysaccharide of the marine alga *Capsosiphon fulvescens* induces apoptosis in AGS gastric cancer cells via an IGF-IR-mediated PI3K/Akt pathway. *Cell Biol. Int.* **2007**, *31*, 768–775.

Tchokouaha Yamthe, L. R.; Appiah-Opong, R.; Tsouh Fokou, P. V.; Tsabang, N.; Fekam Boyom, F.; Kwadwo Nyarko, A.; Wilson, M. D. Marine algae as source of novel antileishmanial drugs. Review, *Mar. Drugs.* **2017**, *15*, 323.

Lawrie, G.; Keen, I.; Drew, B.; Chandler-Temple, A.; Rintoul, L.; Fredericks, P.; Grondahl, L. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules.* **2007**, *8*, 8, 2533–2541.

Lee, R. E. Phycology. 4th ed. Editorial. Cambridge University Press. New York, USA.

Lewis, M. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing; Review. *Environmental Pollution.* **1995**, *87*, 319–336.

Lopretti, M.; Barreiro, F.; Fernandes, I.; Damboriarena, A.; Ottati C. y Olivera A. Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. INNOTECH (Publicación anual del Laboratorio Tecnológico del Uruguay). 2007, *2*, 19–23.

Martín Villena, M. J.; Morales Hernández, M. E.; Gallardo Lara, V.; Ruiz Martínez, M. A. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharm.* **2009**, *50*, 1, 43–50.

Matsukawa, R.; Dubinsky, Z.; Kishimoto, E.; Masaki, K.; Masuda, Y.; Takeuchi T.; Chihara, M.; Yamamoto, Y.; Niki, E.; Karube I. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *J. Appl. Phycol.* **1997**, *9*, 29–35.

McLaughlin, J. L.; Lingling, L. R.; Anderson, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug. Information J.* **1998**, *32*, 513–524.

Meyer, B.; Ferrigni, N.; Putman, J.; Jacobsen, L.; Nichols, D.; McLaughling, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica.* **1982**, *45*, 1, 31–34.

Mikus, J.; Steverding, D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. *Parasitol. Int.* **2000**, *48*, 265–269

Ministerio de Salud. Curso sobre Enfermedades Vectoriales para Agentes Comunitarios en Ambiente y Salud. Módulo IV: Leishmaniasis. Cdad. Autónoma de Bs. As., República Argentina. 2010a.

Ministerio de Salud. Enfermedades infecciosas / leishmaniasis visceral. Guía para el equipo de salud. Cdad. Autónoma de Bs. As., República Argentina. 2010b.

Miyashita, K.; Airanthi, M.; Widjaja-Adhi, K.; Abe, M.; Hosokawa, M. Algal carotenoids as potent antioxidants. En: *Handbook of marine microalgae: biotechnology and applied phycolgy*. Pukyong National University. John Wiley and Sons, Ltd., Publication. Busan, Corea del Sur. 2012, pp 403–414.

Mustafa, Y.; Suna, E. Destroy Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Caryologia*. **2008**, *61*, 1, 45–52.

Nakai, M.; Kageyama, N.; Nakahara, K.; Miki, W. Phlorotannins as Radical Scavengers from the extract of *Sargassum ringgoldianum*. *Marine Biotechnology*. **2006**, *8*, 409–414.

Namiki M. Antioxidants/antimutagenics in foods. CRC Critical Reviews, *Food Sci. Nutr.* **1990**, *29*, 273–300.

Namvar, F.; Mahamad, R.; Baharara, J.; Balnejah, S. Z.; Fargahi, F.; Rahman, H. S. Antioxidant, antiproliferative, and antiangiogenesis effects of polyphenol-rich seaweed (*Sargassum muticum*). *Biomed Res. Int.* **2013**, 604787.

Nguyen, V. T.; Qian, Z. J.; Lee, B.; Heo, S. J.; Kim, K. N.; Jeon, Y. J.; Park, W. S.; Choi, I. W.; Jang, C. H.; Ko, S. C.; Park, S. J.; Kim, Y. T.; Kim, G.; Lee, D. S.; Yim, M. J.; Je, J. Y.; Jung, W. K. Fucoxanthin derivatives from *Sargassum siliquastrum* inhibit matrix metalloproteinases by suppressing NF- κ B and MAPKs in human fibrosarcoma cells. *Algae*. **2014**, *29*, 4, 355–366.

O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan F., Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421–5426,

OMS. Control of leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva. [Online acceso libre] 2010. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acceso 9 Abril, 2016.

OMS. The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action. Geneva. [Online acceso libre] 2014. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets#A>. Acceso 17 Junio, 2018.

OMS. Resistencia a los antibióticos. [Online acceso libre] 2018. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>. Acceso 2 junio, 2018.

Panlasigui, L.; Baello, O.; Dimatangal, J.; Dumelod, B. Blood cholesterol and lipid lowering effects of carrageenan on human volunteers. *Asia-Pac. J. Clin. Nutr.* **2003**, *12*, 209–214.

Payyavula, R. S.; Navarre, D. A.; Kuhl, J. C.; Pantoja, A.; Pillai, S. S. Differential effects of environment on potato phenylpropanoid and carotenoid expression. *BMC Plant Biology*. **2012**, *12*, 1, 39–56.

Peña, C.; Añez, B.; Dávila, M. Respuesta de la cebolla (*Allium cepa* L.) a la aplicación de azufre, magnesio, cinc y boro en un suelo alcalino. *Rev. Forestal Venezolana*. **1999**, *43*, 2, 173–182.

Pino-Pérez, O.; Jorge-Lazo, F. Ensayo de *Artemia*: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev. Protección Veg.* **2010**, *22*, 1, 34–43.

Ponce, N. M.; Pujol, C. A.; Damonte, E. B.; Flores, M. L.; Stortz, C. A. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: Extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 153–165.

Poncelet, D.; Lencki, R.; Beaulieu, C.; Halle, J. P.; Neufeld, R. J.; Fournier, A. Production of alginate beads by emulsification/ internal gelation I. *Methodology. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *38*, 39–45.

Remuñán-López, C.; Alonso-Fernández M. J. Microencapsulación de medicamentos. En: Vilá-Jato J. L. *Tecnología Farmacéutica. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. Madrid: Ed. Síntesis, S.A; 1997, pp 577–609.

Ringuelet, J.A. Productos naturales vegetales. 1a ed. Universidad Nacional de La Plata, 2013.

Rocha de Souza, M.; Marques, C.; Guerra-Dore, C.; Ferreira da Silva, F. Oliveira Rocha H and Leite E. Antioxidant activities of sulphated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J. Appl. Phycol.* **2007**, *19*, 153–160.

Rocha, D. H. A.; Seca, A. M. L.; Pinto, D. C. G. A. Seaweed secondary metabolites *in vitro* and *in vivo* anticancer activity. *Mar. Drugs.* **2018**, *16*, 410.

Rocha, F. D.; Soares, A. R.; Houghton, P. J.; Pereira, R. C.; Kaplan, M. A.; Teixeira, V. L. Potential cytotoxic activity of some Brazilian seaweeds on human melanoma cells. *Phytother. Res.* **2007**, *21*, 170–175.

Rodríguez-Llimos, A.; Chappetta D.; Szeliga, M.; Fernández, A.; Bregni, C. Micropartículas de alginato conteniendo paracetamol. *ARS Farmaceutica.* **2003**, *44*, 332–342.

Rupérez, P.; Ahrazem, O.; Leal, J.A. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 840–845.

Saha, D.; Bhattacharya, S. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. *J. food sci. technology.* **2010**, *47*, 6, 587–597.

Schwikkard, S.; Van Heerden, F. Antimalarial activity of plants metabolites (1990 to 2000). *Nat. Prod. Rep. Articles.* **2002**, *19*, 675–692.

Setyowati, N. y Simaramata, M. HPLC identification of allelopathic compounds from *Lantana camara*. *J. Agrotropika Indonesia*. **1999**, 4, 1, 37–41.

Shibata, T.; Fujimoto, K.; Nagayama, K.; Yamaguchi, K.; Nakamura, T. Inhibitory activity of brown algal phlorotannins against hyaluronidase. *Int J Food Sci. Tech.* **2002**, 37, 703–709.

Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI J. Nat. Cancer Inst.* **1990**, 82, 13, 1107–1112.

Solís, P. N.; Wright, C. W.; Anderson M. M.; Gupta, M. P.; Phillipson, J. D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Plant Med.* **1993**, 59.

Sousa, A. P. A.; Torres, M. R.; Pessoa, C.; Morales, M. O.; Rocha-Filho, F. D.; Alves, A. P. N. N.; Costa-Lotuf, L. V. *In vivo* growth-inhibition of sarcoma 180 tumor by alginates from brown seaweed *Sargassum vulgare*. *Carbohydr. Polym.* **2007**, 69, 7–13.

Stengel, D. B.; Connan, S.; Popper, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and the incidence for the application of applications. *Biotechn. Advances.* **2011**, 29, 5, 483–501.

Suffness, M.; Pezzuto, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. London, Academic Press. 1990, 6, pp 71–133.

Tartar, G.; Kaymak, F.; Gokalp, F. Genotoxic effects of Avenoxan on *Allium cepa* L. and *Allium sativum* L. *Caryologia*. **2006**, 59, 3, 241–247.

Trease, G. E.; Evans, W. C., 1996. Pharmacognosy. 14th ed., W.B Saunders Company Ltd., London, Philadelphia, Toronto, Sydney, Tokyo, pp. 18–27.

Uhrich, A. V. Validación química y biofarmacológica de especies de algas marinas del género *Ulva* con potencialidad terapéutica, colectadas en el Golfo San Jorge (Patagonia Argentina). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Dpto. de Farmacia. Argentina. 2016.

Vanhaecke, P.; Persoone, G. The ARC-Test: a standardized short-term routine toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicolog. Testing Mar. Environ.* **1984**, *2*, 143–157.

Wang, J.; Zhang, Q.B.; Zhang, Z.S.; Li, Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *42*, 127–132.

Wang, S. K.; Li, Y.; White, W.L.; Lu, J. Extracts from New Zealand *Undaria pinnatifida* Containing Fucoxanthin as Potential Functional Biomaterials against Cancer *in Vitro*. *J. Funct. Biomater.* **2014**, *5*, 29–42.

Whistler, R. L.; BeMiller, J. N. (Eds.), “Industrial gums. Polysaccharides and their derivatives”, 3ª edición, Academic Press, Inc., California (EEUU) 1993.

Yang, H.; Zeng, M.; Dong, S.; Liu, Z.; Li, R. Antiproliferative activity of phlorotannin extracts from brown algae *Laminaria japonica* Aresch. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* **2010**, *28*, 122–130.

Zheng, L. H.; Wang, Y. J.; Sheng, J., Wang, F.; Zheng, Y.; Lin, X. K.; Sun, M. Antitumor peptides from marine organisms. *Mar. drugs.* **2011**, *9*, 10, 1840–59.

PARTE II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

CAPITULO 4

ESTUDIOS BIOLÓGICOS

Y

QUÍMICOS

4.1. Colecta de los ejemplares

Para los primeros estudios, los ejemplares de *Undaria pinnatifida* fueron colectados manualmente en la zona intermareal, en las costas de Bahía Bustamante ($45^{\circ} 07'45,63''$ S, $66^{\circ} 32'06,99''$ O) durante la primavera de 2008 y determinados taxonómicamente, con la colaboración de la Dra. Alicia Boraso y el Dr. H.C. Héctor Zaixso (Q.E.P.D.).

La colecta en Comodoro Rivadavia se realizó también manualmente en la zona intermareal, en las estaciones de primavera de 2010, y verano, otoño e invierno de 2011, en las costas de Km 4, ubicadas a 150 m del edificio de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, correspondientes a la región central del Golfo San Jorge. Las Figuras 4.1 y 4.2 presentan las zonas de colecta mencionadas.



Figura 4.1. Zonas de colecta de los ejemplares de *Undaria pinnatifida*, en la provincia de Chubut, Patagonia Argentina. (Fuente editada: Google Earth).



Figura 4.2. Zona de colecta de los ejemplares de *Undaria pinnatifida* en las playas de Km 4, lindantes a la Universidad de la Patagonia San Juan Bosco, en la región central del Golfo San Jorge. (Fuente editada: Google Earth).

Las **Figuras 4.3 a y b** corresponden a fotografías tomadas durante las colectas realizadas en las playas de Km 4, Comodoro Rivadavia.

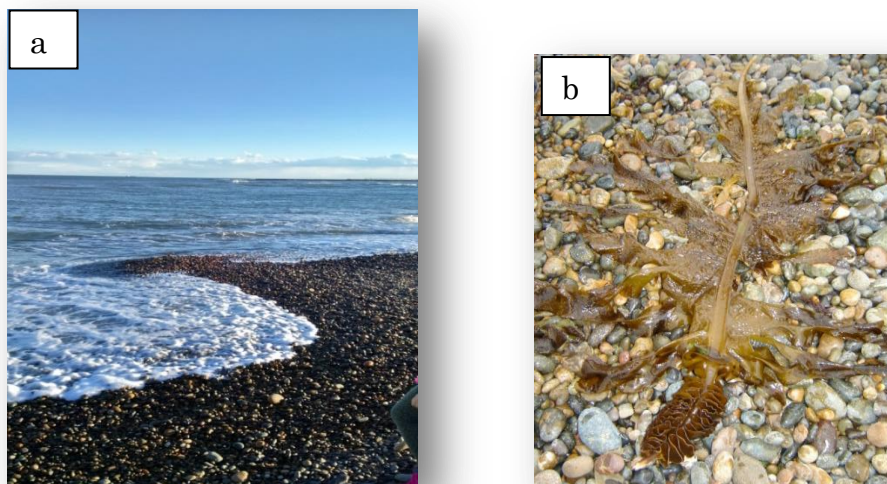


Figura 4.3. a. Costas de Comodoro Rivadavia (lugar central de colecta), b. ejemplar completo de *Undaria pinnatifida* en la zona de colecta.

En todos los casos, las algas fueron limpiadas con agua de mar y colocadas en bolsas plásticas para su transporte al laboratorio, donde posteriormente fueron seleccionados mediante inspección macroscópica.

Un ejemplar de cada lugar y estación colectado fue separado, acondicionado, herborizado y depositado en el Herbario Regional Patagónico de la Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud, UNPSJB, bajo los números de registros que se indican en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1. Números de registros en el Herbario Regional Patagónico (HRP) de los ejemplares de cada estación anual y coordenadas del lugar de colecta.

Estación	N° HRP	Coordenada central de colecta
primavera	7096	45° 49'35,0" S, 67° 27'36,0" O
Verano	7162	
Otoño	7163	
invierno	7164	

Durante las colectas se determinaron los factores ambientales correspondientes a temperatura, pH y salinidad, empleando un equipo que permite medir la temperatura y el pH (Beekman® 350, **Figura 4.4.a**) y un salinómetro digital (G-Won Hitech® GMK- 540, **Figura 4.4.b**), respectivamente.

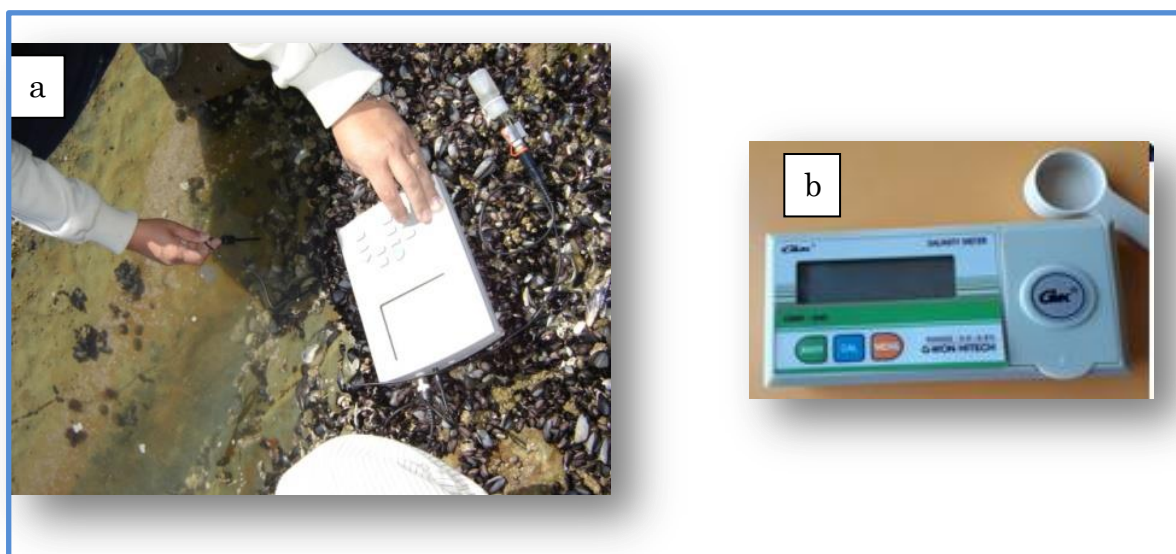


Figura 4.4. a, equipo Beekman® 350, utilizado en la medición de temperatura y pH; b, salinómetro G- Won Hitech® GMK- 540, ambos empleados durante las colectas de *Undaria pinnatifida*.

4.2. Conservación y molienda

Una parte de los ejemplares fue conservada a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, para estudios posteriores. El resto del material fue secado, sobre papel madera, bajo techo, al abrigo de la luz solar y a temperatura ambiente, girando periódicamente el material, con cambio de papeles.

Algunas frondas secas se guardaron intactas para su posterior estudio; el resto fueron reducidas a polvo en un molino de paletas provisto de un tamiz de malla 20 (RetschMühle, Dietzmotorem). El material en polvo fue conservado a temperatura ambiente en recipientes de cierre perfecto, al abrigo de la luz y humedad, hasta su utilización.

4.3. Caracterización morfológica

4.3.1. Evaluación organoléptica y Macroscopía

Se observaron aspectos externos de las frondas y esporofilo, fundamentalmente color, presencia de marcas externas y marcas en la superficie de fractura, fractura y olor.

Se determinaron también las longitudes de los talos de los ejemplares de *Undaria* mediante el uso de una regla convencional.

4.3.2. Microscopía

Las observaciones microscópicas para determinar características morfoanatómicas de la especie en estudio, se realizaron mediante cortes longitudinales o transversales a mano alzada según cada caso, efectuados a partir de trozos frescos de fronda, esporofilo y nervadura tomados al azar. Estos estudios se efectuaron con un Microscopio Olympus CX 31 equipado con una cámara digital Olympus.

Para el alga colectada en primavera e invierno, se realizaron además observaciones superficiales de las frondas, esporofilo y nervadura, con un Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) (Jeol- JSM-LV 6510 Scanning electron Microscope). En todos los casos se tomaron al azar distintos trozos secos de la parte morfológica a estudiar.

4.3.3. Histoquímica

Sobre cortes de las frondas y nervadura se aplicaron diferentes tinciones histoquímicas a fin de identificar y localizar a nivel tisular los grupos químicos más destacables.

Los cortes con las distintas tinciones, que se detallan a continuación, fueron observados con los objetivos de 10X, 40X y 100X (objetivo de inmersión) en orden

secuencial, con un Microscopio Olympus CX 31 equipado con una cámara digital Olympus.

4.3.3.1. Tinción con Lugol

Especificidad: amilosa y amilopectina en el citoplasma, y amiloides en las paredes celulares. La observación de color azul, violáceo hasta rojizo resulta positiva.

Preparación del reactivo: se disolvió 1 g de ioduro de potasio en 100 ml de agua destilada y se agregaron 0,3 g de iodo sublimado. Se agitó hasta disolución completa del iodo.

Procedimiento: se dispusieron los cortes a analizar sobre un portaobjetos y se les agregó 1 gota de reactivo. Se dejó unos minutos y se retiró el excedente de reactivo con una servilleta de papel; posteriormente se cubrieron con cubreobjetos y se observaron en el microscopio óptico (D'Ambrogio de Argüeso, 1986).

4.3.3.2. Tinción con Sudán III

Especificidad: grasas, aceites, cutina y suberina. La observación de color rojizo resulta positiva.

Preparación del reactivo: se utilizó una solución saturada del reactivo comercial (Sigma) preparada en etanol al 80 % y filtrada antes de ser empleada.

Procedimiento: los cortes se colocaron sobre un portaobjetos, se les agregaron 2 gotas del reactivo, se dejaron actuar durante 10 minutos y se lavaron rápidamente con etanol de 70°. Se cubrieron con cubreobjetos y se observaron en el microscopio óptico (D'Ambrogio de Argüeso, 1986).

4.3.3.3. Tinción con FeCl₃ al 1 %

Especificidad: fenoles con uno, dos o tres hidroxilos libres adyacentes. La observación de color amarillento, verdoso o azulado, resulta positiva en cada caso, respectivamente.

Preparación del reactivo: se disolvió 1 g de cloruro férrico en cantidad suficiente de agua destilada, con agitación, y se llevó a volumen final de 100 ml. El reactivo se conservó en un recipiente de vidrio color caramelo con cierre perfecto (Harborne, 1991; Rondina y Coussio, 1989).

Procedimiento: los cortes se colocaron sobre un portaobjetos y se agregaron unas gotas del reactivo; se dejaron actuar unos minutos, se cubrieron con cubreobjetos y se observaron en el microscopio óptico.

4.3.3.4. Tinción con Ninhidrina

Especificidad: aminogrupos primarios o secundarios; proteínas, péptidos. La observación de color azul violáceo o rojo violáceo resulta positiva.

Preparación del reactivo: se disolvieron 0,2 g de Ninhidrina en cantidad suficiente de etanol de 96°, con agitación, y se llevó a volumen final de 100 ml con el alcohol. El reactivo se conservó en un recipiente de vidrio color caramelo y de cierre perfecto (Rondina y Coussio, 1989).

Procedimiento: los cortes se sumergieron en el reactivo durante unos minutos, se dejaron escurrir, se lavaron con agua destilada, se dispusieron sobre un portaobjetos, se cubrieron con cubreobjetos y se observaron en el microscopio óptico.

4.4. Extracción y fraccionamiento

Para las distintas extracciones y fraccionamientos se utilizó un agitador mecánico de paletas Decalab S.R.L. y para las centrifugaciones, una centrífuga refrigerada Hettich Mod. Rotina 38 R. Las evaporaciones se realizaron en un evaporador rotatorio Büchi R11 a presión reducida, con temperatura del baño no mayor a 40 °C. Las muestras se llevaron a sequedad en una estufa de vacío Peet Lab MP-20C.

4.4.1. Extracción preliminar

En la **Figura 4.5** se muestra el protocolo de trabajo seguido.

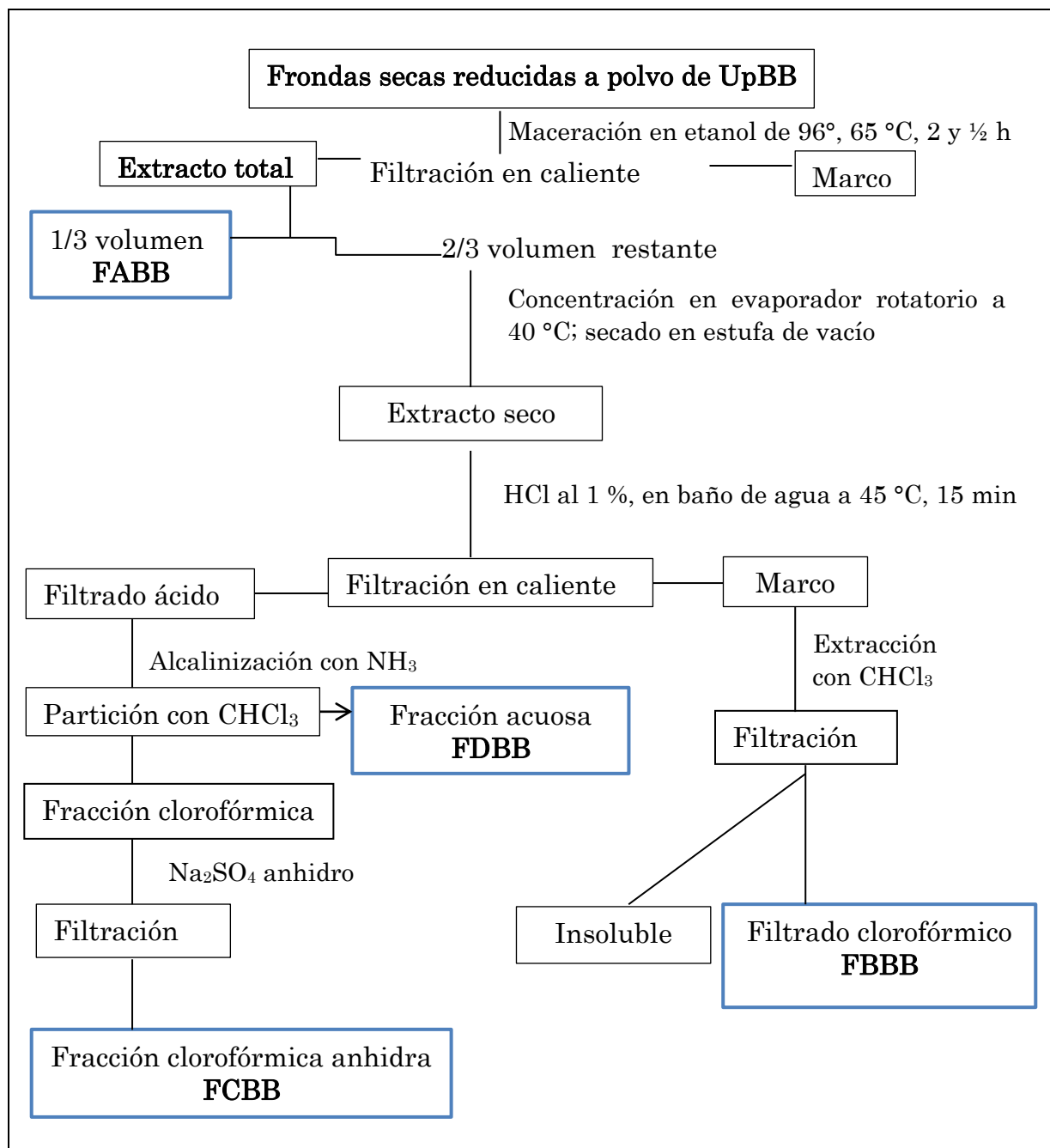


Figura 4.5. Extracción y fraccionamiento de las frondas de *Undaria pinnatifida* colectada en Bahía Bustamante en primavera.

A partir de 10 g de frondas secas, reducidas a polvo y tamizadas de *Undaria pinnatifida* colectada en Bahía Bustamante (UpBB), se efectuó una extracción con etanol de 96° durante dos horas y media, en un baño de agua a 65 °C empleando un baño termostatzado (Electrotem). El extracto crudo obtenido fue fraccionado mediante cambios de pH y partición con solventes de distinta polaridad, obteniéndose una serie de fracciones (Harborne, 1991).

4.4.2. Extracción exhaustiva

Para el material colectado estacionalmente en las costas de Comodoro Rivadavia, se realizó una extracción exhaustiva secuencial a diferentes temperaturas, **Figura 4.6.**

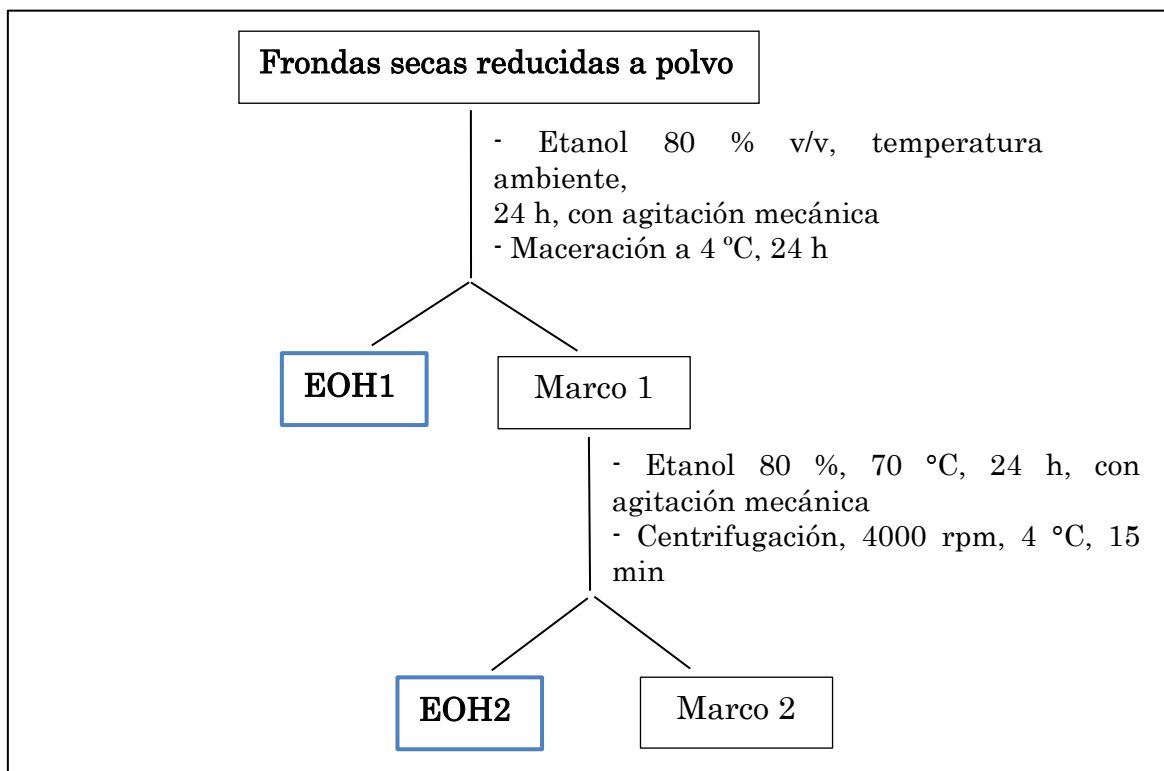


Figura 4.6. Extracción secuencial exhaustiva de las frondas de *Undaria pinnatifida* colectada estacionalmente en las costas de Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

La primera extracción se llevó a cabo con etanol acuoso al 80 % v/v, a temperatura ambiente, durante 24 h, empleando agitación mecánica. Posteriormente se dejó macerando a 4 °C, durante 24 h más. El marco fue recuperado por centrifugación y sometido a una segunda extracción con el mismo solvente, pero aplicando temperatura mediante el uso de un baño de agua a 70 °C. El marco remanente se guardó para la extracción y purificación de alginato de sodio, siguiendo la técnica propuesta por Becerra (2016). Una vez obtenidos los extractos, se concentraron, secaron y pesaron.

4.5. Extracciones específicas

Fueron realizadas para aquellos grupos de metabolitos más destacables que requerían condiciones especiales.

4.5.1. Extracción de lípidos

La extracción de lípidos se realizó siguiendo la metodología descrita por Folch (1957). Para ello, en el caso del material colectado en Bahía Bustamante, se trabajó con el marco obtenido luego de la extracción con etanol a 65 °C (Figura 5), el cual se maceró en cloroformo - metanol (2:1) durante 24 h, protegido de la luz, a temperatura ambiente y con agitación magnética continua. El extracto se centrifugó y se llevó a seco a 65 °C, en baño termostático. El rendimiento de la extracción se calculó según la siguiente expresión:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{peso del marco final}}{\text{peso del marco de la extracción con etanol}} \times 100$$

Para las algas de Comodoro Rivadavia, se partió de las frondas colectadas en primavera y verano, las que fueron secadas y reducidas a polvo, y posteriormente extraídas por maceración con cloroformo – metanol (2:1), siguiendo lo indicado en el párrafo anterior.

4.5.2. Extracción y purificación de alginato

Se utilizó la metodología de extracción y purificación de alginatos propuesta por Becerra (2016), con modificaciones para adecuarla al material en estudio, **Figura 4.7.**

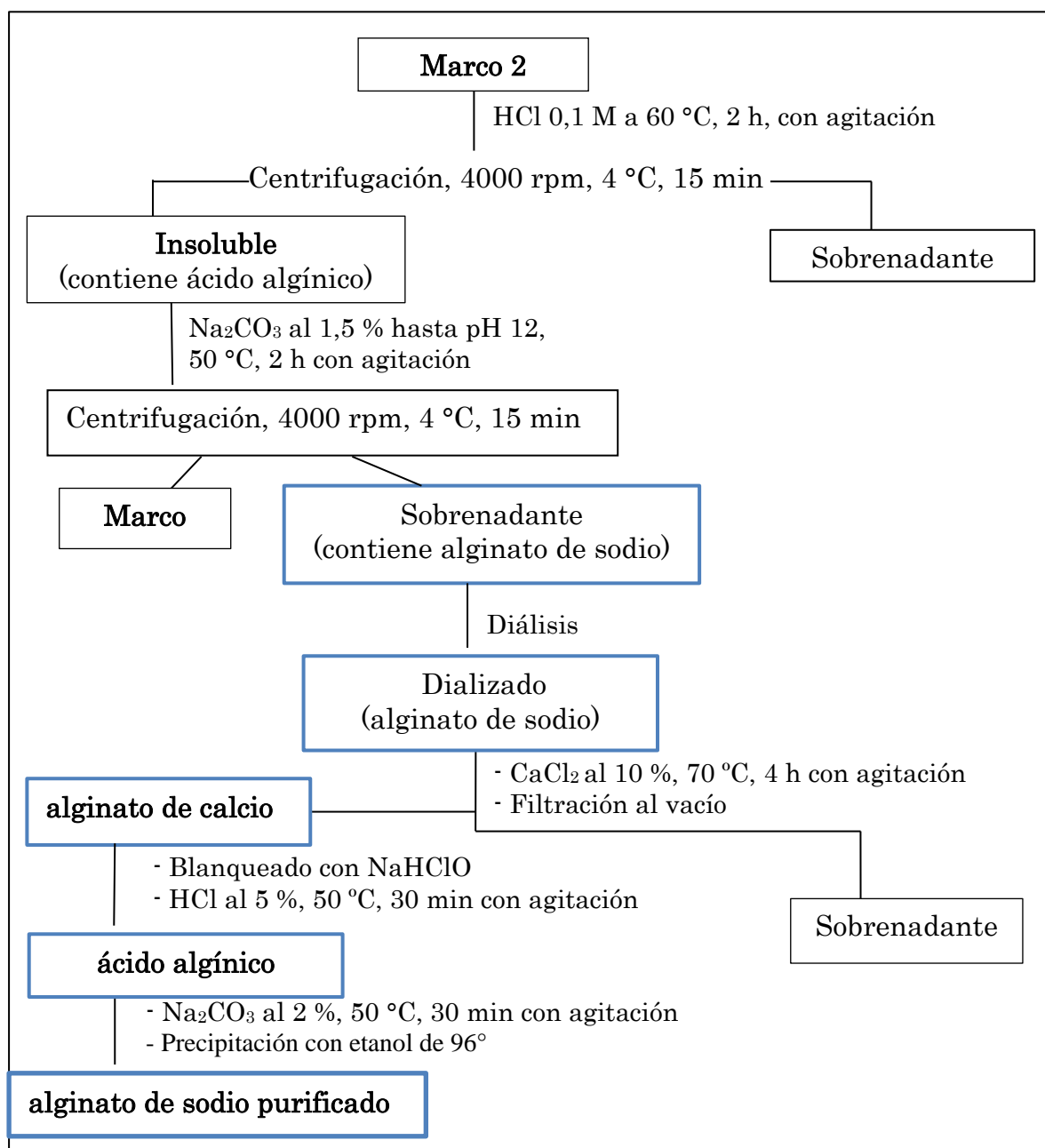


Figura 4.7. Extracción y purificación de alginato de sodio de las frondas del alga parda *U. pinnatifida* colectada estacionalmente en las costas de Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

Para ello, una porción del marco (10 g) obtenido mediante la extracción exhaustiva secuencial con etanol acuoso al 80 % a 70 °C (Marco 2, **Figura 4.6**), fue tratada inicialmente con HCl diluido (200 ml), a fin de liberar el ácido algínico de sus sales de calcio y magnesio como se halla normalmente en el alga, seguido de su conversión a alginato de sodio. Este producto se dializó, utilizando bolsas de diálisis con corte de poro 6000-8000 Dalton, a temperatura ambiente durante 48 h, en sistema abierto contra agua corriente y 24 h más, en sistema cerrado contra agua destilada, en este último caso renovando el agua tres o cuatro veces. Mediante una extracción en medio alcalino, se convirtió el producto a alginato de calcio, el cual fue blanqueado con NaHClO al 12 % y se lavó cuatro veces con agua destilada. Posteriormente se volvió a liberar el ácido algínico, se solubilizó como alginato de sodio, se precipitó con etanol de 96° y se llevó a sequedad.

4.5.3. Extracción de péptidos

La extracción de péptidos, se realizó según **Figura 4.8**.

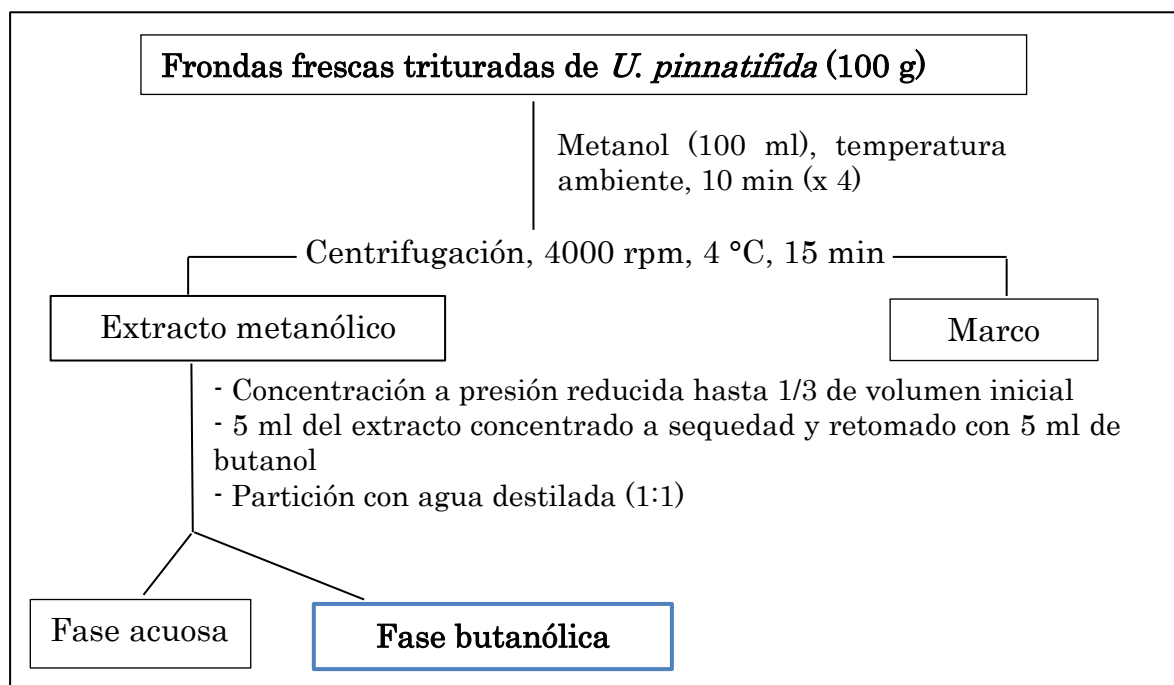


Figura 4.8. Extracción de péptidos a partir de las frondas de *U. pinnatifida* colectada en primavera en las costas de Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

Las frondas frescas (100 g), recientemente colectadas en primavera en las costas de Comodoro Rivadavia, se trituraron empleando una licuadora manual (Russell Hobbs®) y se trataron siguiendo la metodología propuesta por Yun et al (1997), excepto en la temperatura del metanol que en nuestro caso fue a temperatura ambiente.

4.6. Screening fitoquímico

La composición química general fue determinada mediante reacciones cualitativas usuales de identificación de grupos químicos, sobre el extracto y las distintas fracciones (**FABB**, **FBBB**, **FCBB** y **FDBB**) obtenidos a partir del material colectado en Bahía Bustamante (**BB**), y sobre **EOH1** y **EOH2** de las frondas colectadas estacionalmente en Comodoro Rivadavia, como se describe a continuación.

4.6.1. Sobre **FABB**, **EOH1** y **EOH2** se efectuaron las siguientes reacciones:

- **Molisch** (hidratos de carbono): se colocaron 2 ml de cada muestra y se agregaron 2 gotas del reactivo de Molisch (α -naftol en etanol al 10 % p/v), luego se agregó H_2SO_4 concentrado cuidadosamente por las paredes del tubo. La reacción positiva se evidencia por la aparición de un anillo de color púrpura violáceo en la interfase.

- **Shinoda** (flavonoides): se llevaron a seco 0,5 ml de cada muestra y se retomaron con igual volumen de etanol al 80 % (v/v). Luego se les agregaron unas granallas de Zn^0 y 0,2 ml de HCl concentrado. Se observó la aparición de color. El resultado positivo se evidencia mediante la aparición de color púrpura que puede variar desde el rosa tenue hasta el color rojo escarlata.

- **Vapores de I_2** (lípidos): 3 gotas de cada muestra se dispusieron sobre papeles de filtro los que posteriormente fueron expuestos a vapores de yodo. La reacción

positiva se observa mediante coloración marrón o parda grisácea de la zona del papel de filtro que contiene la muestra.

- **Dicromato de potasio** (polifenoles, taninos): 0,5 ml de cada muestra se trataron con 2 gotas de una solución acuosa de $K_2Cr_2O_7$ al 0,5 % y se observaron los cambios de color producidos por la reducción del dicromato. El resultado positivo se observa mediante un precipitado.

- **Gelatina** (taninos): 0,5 ml de cada muestra se trataron con 3 gotas de una solución acuosa de gelatina al 0,5 % y se observó turbidez o precipitación, indicativos de resultado positivo de la reacción.

- **FeCl₃ al 2 %** (oxhidrilos fenólicos): 0,5 ml de cada muestra a ensayar se trataron con 2 gotas de una solución acuosa de FeCl₃ al 2 %. La aparición de colores amarillo, verde grisáceo o azul negro resulta indicativa de resultado positivo debido a la presencia de uno, dos o tres oxidrilos adyacentes fenólicos, respectivamente.

4.6.2. Sobre **FBBB**, **EOH1** y **EOH2** se efectuaron las reacciones de:

- **Bornträger** (antraquinonas): se agitaron suavemente 3 ml de **FBBB** y de las restantes muestras previamente llevadas a seco y retomadas con ese volumen de cloroformo, con 5 ml de NaOH al 5 % acuoso y se observó el color. La presencia de antraquinonas se evidencia por la aparición de coloración rojiza o anaranjada en la fase acuosa.

- **Liebermann-Burchard** (esteroides y/o triterpenos): se mezclaron 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo, y se enfrió en un baño de hielo. Dicha mezcla se puso en contacto con 2 ml de **FBBB** y de las restantes muestras previamente llevadas a seco y retomadas con ese volumen de cloroformo (también enfriadas en baño de hielo), colocadas en tubos y se deslizaron por las paredes,

gotas de ácido sulfúrico concentrado previamente enfriado a 0 °C. Finalmente se observó la coloración. La reacción resulta positiva para esteroides si da color azul o verde petróleo, mientras que si se colorea de marrón o pardo, indica la presencia de triterpenos.

- **Kedde** (cardenólidos): a 3 gotas de cada muestra llevada previamente a seco y retomada con etanol, dispuestas sobre un papel de filtro, se les agregó 0,1 ml del reactivo preparado con volúmenes iguales de las soluciones de ácido 3,5 dinitrobenzoico al 2 % en metanol (Kedde I) y d KOH al 5,7 % en agua destilada (Kedde II). Una coloración rosa, púrpura o violeta persistente indica presencia de lactonas pentagonales con una instauración característica de los cardenólidos.

4.6.3. Sobre **FCBB**, **EOH1** y **EOH2** se efectuaron las reacciones de:

- **Dragendorff** (alcaloides): se llevaron a sequedad 0,2 ml de las muestras, se retomaron con 2 ml de HCl al 1 % y se les agregaron 2 gotas del reactivo [Bi(NO₃)₃ en HNO₃-KI, en agua destilada] (Smith y Gilkerson, 1979). El resultado positivo se evidencia por la aparición de un precipitado de color naranja o pardo anaranjado. Esta reacción carece de especificidad, por lo que solo es orientativa en el caso de los extractos crudos.

- **Mayer** (alcaloides): se llevaron a sequedad 0,2 ml de las muestras, se retomaron con 2 ml de HCl al 1 % y se les agregaron 2 gotas del reactivo (HgCl₂ en agua destilada + KI en agua destilada). El resultado positivo se evidencia por la aparición de un precipitado blanco amarillento. Esta reacción también carece de especificidad, por lo que solo es orientativa en el caso de los extractos crudos. En cambio en fracciones purificadas (**FCBB**), un resultado positivo indica la presencia de alcaloides, pero además en cantidades interesantes ya que la sensibilidad es baja.

- **Kedde** (cardenólidos): se realizó sobre **FCBB** como se indicó en **4.6.2**.

4.6.4. Sobre **FDBB** se repitieron las reacciones de Shinoda, Liebermann-Burchard y Dragendorff (en este último caso para detectar sales de amonio cuaternario). Para cada caso se procedió como se indicó en 4.6.1, 4.6.2 y 4.6.3, respectivamente.

4.6.5. Reacciones directas

- **Ninhidrina** (amino grupos primarios y secundarios, péptidos y proteínas): se pesó 1 g de las frondas de cada colecta secas y reducidas a polvo, y se calentó en 100 ml de agua destilada; se filtró y se concentró a 5 ml; posteriormente se colocaron 2 gotas superpuestas sobre un papel de filtro y se dejaron secar. A continuación se agregó sobre cada muestra 2 gotas de una solución etanólica de Ninhidrina al 2 %. Paralelamente se realizó de idéntica forma un ensayo utilizando el testigo (triptofano al 50 % en etanol) y el blanco (reactivo). Se calentaron los papeles en estufa a 110-120 °C y se compararon los resultados con la el color y la intensidad azul violácea del testigo.

- **Poder afrógeno** (saponinas): 0,5 g de las frondas de cada colecta secas y reducidas a polvo, se calentaron en baño de agua a 100 °C con 4 ml de agua destilada en cada caso, durante 30 min y se filtró en caliente. Se tomó 1 ml de esta solución y se dispuso en un tubo de hemólisis, el cual se tapó y se agitó fuertemente durante 15 seg. Se midió la altura de la espuma producida a los 5 y a los 15 min. Se considera positivo cuando la espuma persiste aún a los 15 min, con una altura mínima de 0,5 cm.

- **Antraquinonas**: alrededor de 0,8 g de las frondas de cada colecta secas y reducidas a polvo, se colocaron en un tubo de ensayo, se agregaron 7 ml de NaOH al 5 % y se calentó en baño de agua a 100 °C durante 20 min, agitando con una

varilla. Se enfrió y filtró al vacío; el filtrado se dividió en 3 alícuotas de 1 ml cada una:

Primera alícuota: se acidificó con HCl concentrado (cc) y se agitó suavemente con 1 ml de benceno. La fase orgánica se pasó a otro tubo y se le agregó 0,25 ml de una solución de NaOH al 5 %. La presencia de antraquinonas libres propiamente dichas se evidencia por la aparición de coloración roja, amarilla o amarilla anaranjada con fluorescencia roja en la fase acuosa.

Segunda alícuota: se le agregaron unas gotas de ácido nítrico fumante y a continuación unas gotas de amoníaco, dejándolas mezclar gradualmente con el líquido ácido. La presencia de derivados de antraquinonas reducidos se evidencia por la aparición de color violáceo, rojo o amarillo anaranjado en un tiempo no mayor a 30 minutos.

Tercera alícuota: se calentó en presencia de 1 ml HCl cc y 1 ml de FeCl₃ al 1 % durante 30 minutos, y posteriormente se agitó la solución con 1 ml de benceno. La fase orgánica se trató en otro tubo con 0,25 ml de una solución de NaOH al 5 %. La presencia de dímeros (uniones C-C) y/o de C-glicósidos de antraquinonas se evidencia por la aparición de color rojo, amarillo o amarillo anaranjado con fluorescencia roja en la fase acuosa. Para informar un resultado negativo se dejó en reposo 48 h.

4.7. Determinación de perfiles cromatográficos

Para caracterizar algunos grupos químicos se emplearon diferentes sistemas cromatográficos planares e instrumentales.

4.7.1. Sistemas cromatográficos para lípidos

El perfil lipídico de FABB, EOH1, EOH2 y EF (obtenidos de las frondas de Bahía Bustamante y de Comodoro Rivadavia según lo descrito previamente en 4.4.1, 4.4.2 y 4.5.1, se determinó mediante sistemas cromatográficos planares bidimensional y monodimensional (Hellebust y Craigie, 1978).

Otra fracción analizada mediante el sistema monodimensional, fue el extracto de Folch (EF) procedente de la porción fibrilar de las paredes celulares de la especie colectada en Comodoro Rivadavia, en verano (**Figura 4.9**, ver más adelante).

El análisis de los perfiles se realizó mediante el empleo de sustancias patrón, marcadores, productos de referencia y/o por comparación con bibliografía.

4.7.1.1. Sistema cromatográfico planar analítico bidimensional

Cromatofolio de medidas adecuadas para un desarrollo de 10 cm en cada dimensión.

Fase estacionaria: Sílicagel G60F₂₅₄, previamente activada en estufa a 110 °C, por 10 min.

Fase móvil 1: cloroformo - metanol - hidróxido de amonio (65:25:5).

Fase móvil 2: cloroformo - acetona - metanol - ácido acético - agua (50:20:10:10:5).

Muestra: alícuota del extracto o fracción a analizar, previamente llevada a seco a presión reducida en un evaporador rotatorio y retomada con etanol de 96°.

Procedimiento: se sembraron 5 gotas superpuestas (dejando secar entre cada siembra) de cada muestra en un extremo del cromatofolio a 1 cm de distancia de cada borde. Se efectuó el desarrollo ascendente con la Fase móvil 1 y se retiró el cromatograma; se dejó secar a temperatura ambiente durante 12 h. Una vez seco, el cromatograma se giró 90° y se desarrolló en sentido ascendente con la Fase móvil 2.

Revelado: se efectuó con luz natural, con luz UV (365 nm) y con vapores de yodo, en ese orden.

4.7.1.2. Sistema cromatográfico planar analítico unidimensional

Cromatofolio de medidas adecuadas para un desarrollo de 10 cm.

Fase estacionaria: Sílicagel G60F₂₅₄, previamente activada en estufa a 110 °C, por 10 min y saturada con una solución acuosa de sulfato de amonio al 2 %.

Fase móvil: benceno – acetona – agua (30:91:8).

Sustancia patrón: ácido palmítico en etanol.

Muestra: alícuota del extracto o fracción a analizar, previamente llevada a seco a presión reducida en un evaporador rotatorio y retomada con etanol de 96°.

Procedimiento: el cromatofolio previamente activado, se saturó con la solución acuosa de sulfato de amonio al 2 %. Se dejó secar y se realizó la siembra de las muestras (5 gotas superpuestas) y de la sustancia patrón (2 gotas superpuestas). Se desarrolló la cromatografía en forma ascendente con la Fase móvil, se retiró el cromatograma y se dejó secar a temperatura ambiente durante 12 h.

Revelado: se efectuó con luz natural, con luz UV (365 nm) y con vapores de yodo, en ese orden.

4.7.2. Sistema cromatográfico para hidratos de carbono

Cromatofolio de medidas adecuadas para un desarrollo de 10 cm.

Fase estacionaria: papel Whatman N° 1.

Fase móvil: piridina - acetato de etilo - ácido acético - agua (5:5:1:3)

Sustancias patrones: soluciones acuosas de glucosa, fucosa, galactosa, ácido galacturónico, alginato de sodio comercial (Sigma).

Muestra: alícuotas de **EOH1** y **EOH2** (previamente llevadas a seco y retomadas con agua destilada) y de alginato de sodio purificado obtenido de todas las estaciones, nativas e hidrolizadas. Para la hidrólisis, se colocaron 10 mg de cada muestra seca en viales provistos de tapas de teflón, se les agregó 1 ml de TFA 2 M y se llevaron a estufa a 121 °C, durante 90 min; se eliminaron los restos de ácido por evaporación en un baño de agua a 60 °C y lavados repetidos con agua destilada.

Procedimiento: las muestras (nativas o hidrolizadas) y las sustancias patrones fueron sembradas en bandas superpuestas de 2–3 mm (5 bandas superpuestas para las muestras y 2 para los patrones) y se efectuó el desarrollo ascendente con la Fase móvil. Finalizada la cromatografía, se retiró el cromatograma y se dejó secar a temperatura ambiente.

Revelado: fue específico y consistió en el uso de 3 reactivos:

- 1- AgNO_3 al 40 % (diluido 1:40 en acetona al momento de usar)
- 2- NaOH en etanol (1 ml de NaOH 10 M más 20 ml de etanol de 96°)

3- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 2,5 % en agua destilada.

Se realizó la inmersión del cromatograma en un recipiente que contenía el reactivo 1. Se dejó escurrir y se lavó exhaustivamente con el reactivo 2 usando la misma técnica de inmersión. Luego se fijó con el reactivo 3. Este último paso evita que se desvanezcan las manchas y permite solubilizar el exceso de Ag_2O . El tiosulfato de sodio compleja y solubiliza la plata del Ag_2O que es el que ha quedado en el papel. La Ag en forma de Ag° queda adherida al hidrato de carbono (Flores, 2000).

4.7.3. Sistema cromatográfico para fenoles

Cromatofolio de medidas adecuadas para un desarrollo de 10 cm.

Fase estacionaria: papel Whatman N° 1.

Fase móvil: *n*-butanol - ácido acético - agua (BAW, 4:1:5).

Sustancia patrón: solución de quercetina al 1 % en etanol de 96°.

Muestra: alícuotas de **EOH1** y de **EOH2** de las cuatro estaciones. Además se analizó EP, fracción obtenida con fenol - ácido acético - agua (2:1:1, p/v/v) a partir de la porción fibrilar de las paredes celulares de la especie colectada en Comodoro Rivadavia, en verano (**Figura 9**, ver más adelante).

Procedimiento: se sembraron 3 gotas superpuestas (dejando secar entre cada siembra) de cada muestra y 1 gota de cada sustancia patrón. Se desarrolló en forma ascendente con la Fase móvil, se retiró el cromatograma y se dejó secar a temperatura ambiente.

Revelado: se efectuó con luz natural, con luz UV (254 y 365 nm) sin y con vapores de NH_3 , en ese orden. (Harbone, 1967; 1991).

4.7.4. Sistema cromatográfico para pigmentos, esteroides y polifenoles

Cromatofolio de medidas adecuadas para un desarrollo de 10 cm.

Fase estacionaria: Sílicagel G60F₂₅₄ previamente activada en estufa a 110 °C, por 10 min.

Fase móvil: diclorometano - metanol (9:1).

Muestra: alícuotas de **EOH1** y de **EOH2** de las cuatro estaciones.

Procedimiento: se sembraron 10 gotas superpuestas en forma de bandas de 2-3 mm (dejando secar entre cada siembra) de cada muestra. Se desarrolló en forma ascendente con la Fase móvil, se retiró el cromatograma y se dejó secar a temperatura ambiente.

Revelado: se efectuó con luz natural, con luz UV (254 nm y 365 nm), FeCl₃ al 1 % y K₂Cr₂O₇ al 5 %.

4.7.5. Análisis de péptidos por HPLC

El estudio de los péptidos presentes en el extracto butanólico (ver **Figura 4.8**) se realizó con un equipo de cromatografía líquida de alta performance (Waters 1525 Binnary) HPLC (High Performance Liquid Chromatography), equipado con un detector de arreglo de diodos Waters 2996.

Fase estacionaria: columna de fase reversa C18 (Water Simetric 300) de 250 x 4,6 mm y 5 µm de diámetro de partícula.

Fase móvil: **A**, ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % preparado con agua bidestilada; **B**, 80 % de acetonitrilo, 0,08 % de TFA y 19,92 % de agua bidestilada.

Gradiente y flujo de trabajo: 0 a 15 min, 10 % de A; 15 a 70 min, 60 % de A; 70 a 95 min, 90 % de A; 95 a 106 min, 0 % de A; flujo constante de 0,8 ml/min.

Muestra: 2 ml de extracto butanólico (ver **Figura 4.8**) acidificado con 2 µl de TFA al 0,1 %, centrifugado a 10,000 rpm durante 5 min y filtrado a través de una membrana de 0,20 µm de diámetro de poro. Se empleó un volumen de inyección de 200 µl.

Detección: se realizó a una longitud de onda de 220 nm (Córdoba et al., 1999).

4.8. Determinaciones cuantitativas

Se determinó el contenido de los principales grupos químicos presentes en los extractos alcohólicos **EOH1** y **EOH2**, y en el alginato de sodio purificado obtenidos a partir de las frondas de *Undaria pinnatifida* colectada estacionalmente en Comodoro Rivadavia.

Para la homogeneización de las soluciones y suspensiones de las muestras, se utilizó un Vórtex CK-Tech VI-2. En los casos necesarios, las muestras se sonicaron en un equipo Ultrasonic Testlab®. Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Varian CARY 50 conc. UV-Visible Modelo CARY 50.

En el caso de la cuantificación de azúcares totales, a **EOH1** y **EOH2** se les agregó 2 µl de DMSO y luego se sonicaron durante 4 h para favorecer la solubilización, antes de llevar a volumen final la solución madre preparada.

4.8.1. Hidratos de carbono totales

Se realizó siguiendo una modificación de Flores (2000) del método colorimétrico del fenol - ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956).

Reactivos utilizados:

– solución acuosa de fenol al 5 % (p/v). Esta solución es estable a temperatura ambiente durante varios meses, conservada en frascos de color caramelo.

– Ácido sulfúrico al 98 % grado analítico.

Procedimiento: a 3 alícuotas de 0,1, 0,2 y 0,4 ml de una solución de la muestra preparada por disolución de 10 mg en 10 ml de agua destilada, llevadas a volumen final de 0,5 ml, se les adicionaron 0,5 ml de fenol al 5 % y se mezclaron. Luego se agregaron 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado directamente sobre el centro de la superficie de la mezcla y se dejaron reposar 10 min. Transcurrido ese tiempo, los tubos se agitaron en un vórtex y se mantuvieron 20 min más a temperatura ambiente. Paralelamente se preparó un blanco con 0,5 ml de agua destilada en idénticas condiciones. Finalmente se leyó la absorbancia del color desarrollado por las muestras, a 482 nm (máximo de absorción para desoxiazúcares y para pentosas) y a 490 nm (máximo de absorción para las hexosas), determinando el contenido de hidratos de carbono totales por referencia a una curva patrón de glucosa preparada a partir de 5 alícuotas de una solución de concentración de 100 µg/ml (SIGMA-ALDRICH®).

4.8.2. Ácidos urónicos totales

Se realizó siguiendo la modificación de Filisetti-Cozzi y Carpita (1991) del método Blumenkrantz y Asboe-Hansen (1973).

Reactivos utilizados:

- solución A: sulfamato de NH_4 98 % 4 M (pH 1,6). Se pesaron 4,56 g de la sal, se disolvieron con 5 ml de agua destilada y se llevó a pH 1,6 con H_2SO_4 cc. Finalmente se llevó a volumen final de 10 ml con agua destilada.
- Solución B: tetraborato de sodio 0,0125 M en ácido sulfúrico concentrado, grado analítico.
- Solución C: *m*-hidroxidifenilo al 0,15 % en una solución acuosa de hidróxido de sodio al 0,5 %.

Procedimiento: a 3 alícuotas de 0,1, 0,2 y 0,3 ml de una solución de la muestra preparada por disolución de 20 mg en 10 ml de agua destilada, llevadas a volumen final de 0,5 ml, se les agregaron 40 μl de la Solución A y se agitaron en un vórtex. Sobre los tubos colocados en un baño de hielo, se adicionaron 2,5 ml de la Solución B, se agitaron nuevamente, se taparon y se llevaron a un baño de agua a 100 °C, durante 30 min. Luego se colocaron en un baño de hielo para alcanzar rápidamente la temperatura ambiente y se les agregaron 80 μl de la Solución C. Finalmente se agitaron los tubos en el vórtex, se dejaron reposar 5 a 10 min y se leyeron las absorbancias a 525 nm. Esta mezcla permanece estable 1 hora. Paralelamente, se preparó un blanco con 0,5 ml de agua destilada en idénticas condiciones. Se utilizó D-glucuronolactona y/o ácido D-glucurónico, de concentración 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ como patrones, con los que se prepararon las curvas de trabajo. Se considera que la absorbancia producida por reacción con azúcares neutros es de 1/40 respecto de la que se produce con el ácido glucurónico.

4.8.3. Proteínas totales

Se siguió la técnica propuesta por Lowry et al. (1951).

Reactivos utilizados:

- solución A: solución de carbonato de sodio al 2 % en hidróxido de sodio 0,1 M.
- Solución B: sulfato cúprico pentahidratado al 0,5 % en solución de tartrato de sodio y potasio al 1 %.
- Solución C: preparada mezclando 50 ml de la Solución A y 1 ml de la Solución B. Esta mezcla debe ser usada dentro de las 24 h posteriores a su preparación.
- Solución D: dilución al medio de un volumen del reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck). Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de ser usada, y su absorbancia contra agua destilada debe ser inferior a 0,040.

Procedimiento: se tomaron 4 alícuotas de 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4 ml de una solución de la muestra preparada por disolución de 20 mg en 10 ml de agua destilada, llevadas a volumen final de 0,4 ml con agua destilada. Luego se agregaron a cada tubo 2,5 ml de la Solución C. Se mezclaron con ayuda de un vórtex y se dejaron a temperatura ambiente durante al menos 10 min. A continuación, se agregaron 0,2 ml de la Solución D rápidamente y con agitación dentro de los 2 seg; se mantuvieron durante 30 min en reposo, y luego de ese tiempo se leyeron las absorbancias a 600 nm. Paralelamente se preparó un blanco de 0,4 ml de agua destilada en idénticas condiciones. Para determinar la cantidad de proteínas totales presentes en las muestras, se preparó una curva patrón con una solución de albumina de suero bovino (SIGMA®) de 500 µg/ml.

4.8.4. Sulfato total

Se empleó el método turbidimétrico de Dodgson (1961) y Dodgson y Price (1962).

Reactivos utilizados:

- cloruro de bario-gelatina: se preparó por disolución de 200 mg de gelatina (Oxoid, libre de sulfatos) en 40 ml de agua destilada, a 60-70 °C. Esta solución se mantuvo en heladera durante no menos de 6 h. Luego se disolvieron en ella, 200 mg de cloruro de bario (grado analítico) y se dejó en

heladera por al menos 3 h más. Este reactivo es estable por aproximadamente 7 días si se conserva a menos de 4 °C.

- Solución de ácido tricloroacético (TCA) al 3 % (p/v): se preparó por disolución de 15 g del ácido en agua destilada o desionizada, llevando a un volumen final de 500 ml. Esta solución es estable conservada en heladera.

Procedimiento: se colocaron hasta 3 mg de las muestras en viales provistos de tapas de teflón. Se les agregó 1-1,5 ml de HCl 1 M y se llevaron a estufa a 110 °C durante 4,5 h. Una vez enfriadas, se tomaron alícuotas desde 100 a 400 µl y se llevaron a un volumen final de 400 µl con ácido clorhídrico 1 M. Se les adicionó 2,8 ml de la solución de TCA al 3 % y se agitaron. Luego se les agregó 800 µl del reactivo de cloruro de bario-gelatina y tras agitar nuevamente, se dejaron en reposo por 20 min. Posteriormente se procedió a leer las absorbancias (turbidez) a 360 nm en menos de una hora. El blanco se preparó en idénticas condiciones utilizando 500 µl de HCl 1 M. Como solución patrón se utilizó una solución preparada disolviendo sulfato de sodio anhidro en HCl 1 M de manera de lograr una concentración equivalente a 400 µg/ml de SO₄²⁻. La medición debe ser realizada dentro de la primera hora, debido a que luego el sulfato de bario tiende a precipitarse.

4.8.5. Fenoles totales

Se efectuó mediante la técnica de Folin-Ciocalteu (Folin y Ciocalteu, 1927) adaptada por Pinto Vitorino et al. (2004).

Reactivos utilizados:

- Folin-Ciocalteu diluido en agua (1:10) en el momento de ser usado.
- Solución de Na₂CO₃ preparada por disolución de 75 g de la sal en 1 l de agua destilada.

Procedimiento: se tomaron alícuotas de 0,20; 0,25; 0,30 y 0,35 ml, a partir de una solución madre de cada muestra de concentración de 2 mg/ml, llevando hasta 0,5 ml de volumen final con agua destilada y se adicionaron a cada una 2,5 ml de una solución acuosa del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido. Se mezclaron, y

transcurridos 5 minutos, se adicionaron 2 ml de la solución de Na₂CO₃. Las soluciones se agitaron y luego de permanecer 2 h en oscuridad a temperatura ambiente, se midieron las absorbancias a 765 nm. Se utilizó como patrón una solución acuosa de ácido gálico de 100 µg/ml y como blanco, 0,5 ml de agua destilada tratados de igual forma.

4.9. Determinación del peso molecular promedio

Se efectuó para el alginato de sodio purificado obtenido de las cuatro estaciones mediante la determinación de grupos reductores, siguiendo la técnica de Park y Johnson (1949).

Reactivos utilizados:

- Solución A: ferrocianuro de potasio (500 mg/l). Esta solución debe ser conservada en un recipiente de color caramelo.
- Solución B: cianuro de potasio (0,65 g/l) en una solución de carbonato de sodio (5,3 g/l).
- Solución C: preparada a partir de 1,5 g de sulfato amónico-férrico hidratado y 1 g de dodecilsulfato de sodio (SDS) disueltos en 1 litro de ácido sulfúrico 0,025 M. Esta solución debe ser filtrada luego de prepararla.

Procedimiento: se tomaron 3 alícuotas de 0,1; 0,2 y 0,35 ml a partir de las soluciones madres acuosas de alginato de cada estación, que habían sido preparadas con una concentración de 2 mg/ml, conteniendo hasta 30 nanomoles de azúcar reductor, y se llevaron a un volumen final de 0,5 ml con agua destilada. Luego se les agregaron 0,5 ml de la Solución A y 0,5 ml de la Solución B a cada uno de los tubos y se agitaron. Los tubos se taparon con esferitas de vidrio y se calentaron en un baño de agua a 100 °C durante 15 min. Se enfriaron y se les adicionaron 2,5 ml de la Solución C. Posteriormente se leyeron las absorbancias del color desarrollado a 690 nm y la cantidad de grupos reductores se determinó por referencia a una curva patrón. Se utilizó como blanco 0,5 ml de agua destilada tratada de igual forma. Para la construcción de la curva patrón, se

efectuaron diluciones a partir de una solución de galactosa conteniendo hasta 30 nanomoles del azúcar reductor/0,5 ml.

Para calcular el peso molecular (promedio numérico) los datos se volcaron en la siguiente ecuación:

$$\overline{PM} = \frac{m \times \% \text{ H de C} \times p \times V_{alic} \times 10}{A \times V_t} \times PM_{anh} \times \frac{180}{162}$$

en donde,

m: masa del polisacárido en mg

% H de C: porcentaje de hidratos de carbono totales del polisacárido

p: pendiente de la curva de absorbancia vs concentración del azúcar

V_{alic} : volumen de la alícuota de la solución del polisacárido

A: absorbancia

V_t : volumen total de la solución (0,5 ml)

PM_{anh} : peso molecular promedio de la unidad monosacáridica anhidra 180/162, factor que corrige el hecho de que el peso molecular de la unidad monosacáridica en el polisacárido tiene 18 unidades de masa menos que el azúcar empleado como estándar.

4.10. Determinación de la viscosidad

Se prepararon soluciones acuosas al 1 % de alginato de sodio purificado obtenido de las cuatro estaciones y se midieron las viscosidades en un viscosímetro Brookfield DV-II + Pro.

4.11. Estudio particular de la porción fibrilar de las paredes celulares

Cuando fue necesario, las muestras se trataron mediante ultrasonido utilizando un sonicador Lavador Ultrasónico Testlab®.

Todas las muestras se llevaron a sequedad en un liofilizador Vacuum Freeze Dryer, Boyikang Laboratory Instruments Inc.

Las extracciones y fraccionamientos se efectuaron con agitación constante mediante agitadores magnéticos Stirrer CK-Tech.

4.11.1. Obtención de la pared celular fibrilar

Se trabajó con los marcos remanentes de la extracción de alginato de sodio purificado (ver **Figura 4.7**) de las frondas del alga colectada en verano e invierno en las costas de Comodoro Rivadavia.

Para ello, 1 g de cada marco fueron disgregados manualmente en un mortero de porcelana. A continuación, con el objetivo de eliminar los componentes intracelulares y obtener así el material correspondiente a la porción fibrilar de las paredes celulares, se utilizó un potter manual y uno mecánico, previa suspensión de los marcos disgregados en el paso anterior, en 70 ml de agua destilada. Una vez homogeneizados, se sonicaron durante 20 min y se llevaron a volumen final de 250 ml con agua destilada. Posteriormente se agitaron durante 24 h a temperatura ambiente, se centrifugaron y se separaron los sobrenadantes de los marcos; estos últimos fueron liofilizados y pesados, obteniéndose **Mv** y **Mi**, correspondientes a verano e invierno, respectivamente. Una vez secos y pesados, **Mv** y **Mi** fueron retomados con 100 ml de agua potable y sonicados durante 20 min; a continuación se les agregó a cada uno 100 ml más de agua potable, y se agitaron en un baño de agua a 80 °C durante 10 h. Al cabo de ese tiempo se procedió a centrifugar y se separaron ambos marcos de los sobrenadantes. Estos últimos fueron descartados, mientras que **Mv** y **Mi** se retomaron con otros 200 ml de agua potable y se agitaron en un baño de agua a 80 °C, durante 6 h más. Las siguientes 12 h se siguió con agitación a temperatura ambiente; luego nuevamente agitación durante 4 h más en un baño de agua a 80 °C, y se centrifugaron, descartando los sobrenadantes. Ambos marcos fueron retomados con otros 200 ml de agua potable, se sonicaron durante 20 min y se agitaron a temperatura ambiente otras 24 h. Posteriormente se homogeneizaron una vez más ambos marcos con ayuda de un potter mecánico, se sonicaron durante 30 min y se centrifugaron. En todos los casos los sobrenadantes fueron descartados. Los marcos se fueron observando en todos los pasos efectuados, mediante un

Microscopio Olympus CX 31 equipado con una cámara digital Olympus, a fin de corroborar ausencia de estructuras celulares.

Finalmente los marcos correspondientes a la región fibrilar de las paredes celulares, denominados en adelante **RU_{pv}** (verano) y **RU_{pi}** (invierno), se liofilizaron y pesaron.

4.11.2. Fraccionamiento de los constituyentes de la pared celular fibrilar

Se siguió la técnica propuesta por Flores (2000).

Los marcos **RU_{pv}** y **RU_{pi}** fueron tratados de igual manera durante todo el fraccionamiento; para ello se siguió la secuencia extractiva que se muestra en la **Figura 4.9**. Se pesó aproximadamente 0,2 g de muestra, se maceró con 30 ml de cloroformo – metanol (2:1, v/v, extracción de **Folch**), durante 24 h a temperatura ambiente y al abrigo de la luz. El residuo (**RF**) de verano e invierno se pesó y se sometió a una extracción secuencial con urea 7 M (2 x 30 ml, 12 h cada vez, a temperatura ambiente), EDTA al 2 % a pH 5,0 (2 x 30 ml, 6 h cada vez, a 100 °C), y una mezcla de solventes conocido como PAW constituida por fenol - ácido acético - agua (2:1:1, w/v/v, 60 ml, durante 24 h, en baño de hielo). En todos los casos se pesaron los residuos, mientras que los extractos o fracciones solubles (**EU**, **EE** y **EP**) se purificaron mediante diálisis utilizando bolsas con corte de poro de 3,500 Da. Las diálisis se realizaron a temperatura ambiente durante 48 h, en sistema cerrado contra agua destilada, seguido de 24 h más en sistema abierto contra agua potable y nuevamente en sistema cerrado por 24 h, en este último caso renovando el agua tres o cuatro veces.

Durante las diálisis, se obtuvieron dos subfracciones del dializado en cada caso, solubles e insolubles (precipitadas dentro de la bolsa de diálisis, **E-U_{di}**, **E-E_{di}** y **E-P_{di}**). Estos últimos fueron secados por liofilización, pesados y caracterizados químicamente.

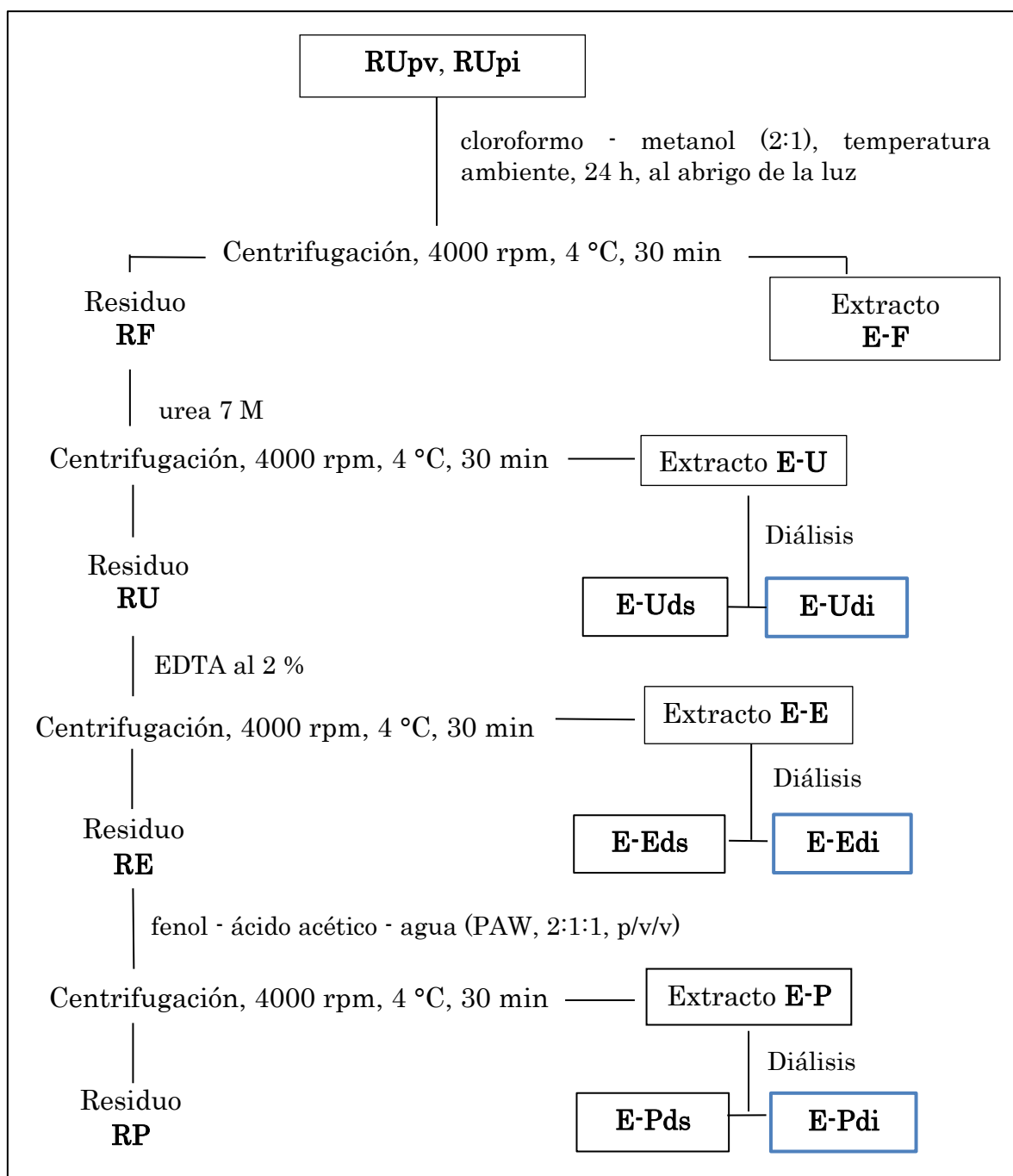


Figura 4.9. Fraccionamiento de los principales constituyentes de la porción fibrilar de la pared celular de las frondas de *Undaria pinnatifida*, colectada en verano e invierno en las costas de Comodoro Rivadavia.

4.11.3. Análisis cuantitativo de los constituyentes de la pared celular fibrilar

Para el análisis se preparó una solución madre de **E-Udi**, de **E-Edi** y de **E-Pdi**, de concentración 1 mg/ml, y a partir de ella se realizó una dilución 1:5 obteniendo en cada caso una concentración final de 200 µg/ml.

Las cuantificaciones realizadas fueron:

- Determinación de proteínas totales

Se tomaron alícuotas de 0,05 ml, 0,15 ml y 0,25 ml de la solución madre de **E-Edi** y de **E-Pdi**, y alícuotas de 0,15 ml, 0,25 ml y 0,35 ml de la dilución 1:5 de **E-Udi**. Para la cuantificación se siguió lo descrito en la sección 4.8.3 del presente capítulo.

- Determinación de hidratos de carbono totales

Se tomaron alícuotas de 0,25 ml, 0,35 ml y 0,45 ml de la dilución 1:5 de **E-Udi** y alícuotas de 0,10 ml, 0,20 ml y 0,30 ml de la solución madre de **E-Edi** y de **E-Pdi**, y se siguió lo descrito en la sección 4.8.1 del presente capítulo.

- Determinación de fenoles totales

Se tomaron alícuotas de 0,30 ml, 0,40 ml y 0,50 ml de las soluciones madres de **E-Udi**, **E-Edi** y **E-Pdi**, y se siguió lo descrito en la sección 4.8.5 del presente capítulo.

4.12. Extracción de fucosterol y fucoxantina

La extracción de fucosterol y de fucoxantina fue realizada en los laboratorios de Farmacognosia de la Universidad París Descartes (París, Francia), mediante un trabajo en colaboración con aquella Institución, durante una estancia de investigación de la Dra. Mónica Becerra de nuestro grupo de trabajo.

Preliminarmente se trabajó con un extracto orgánico obtenido como se indica a continuación, el que fue purificado mediante resinas de adsorción. Además se realizó una extracción mediante fluido supercrítico (FSC) y otra con alta presión.

4.12.1. Extracción con ciclohexano

Se pesaron 50 g de frondas secas y reducidas a polvo de *U. pinnatifida* colectada en primavera, se colocaron en un balón de vidrio con 150 ml de ciclohexano y se sometieron a una agitación constante a 50 °C, durante 2 h. Del extracto total, 20 ml (MT) fueron reservados para estudios posteriores; el volumen restante se trasvasó a un balón de 250 ml y se llevó a sequedad en un evaporador rotatorio a presión reducida, a una temperatura del baño de 40 °C.

4.12.2. Fraccionamiento mediante una resina de adsorción

Una porción de la resina XAD-4 dispuesta en medio etanólico, fue trasvasada a una columna de vidrio de 15 cm de longitud por 1,5 cm de diámetro interno, provista de lana de vidrio en la base. A continuación se lavó tres veces con 50 ml de ciclohexano a fin de eliminar algunos componentes utilizados como conservantes de la resina. Finalmente se aplicó vacío para secar la resina. A través de un embudo se colocó la muestra (extracto obtenido según se describió en 4.12.1) suspendida en ciclohexano y 25 ml más de ciclohexano, y se colectó gota a gota a razón de 1 ml/min. Se eluyó dos veces más con otros dos volúmenes de 25 ml cada uno de ciclohexano, con un flujo de 3 ml/min. Todo el volumen eluido se colectó en un vaso de precipitado, denominándolo **M1**.

Al finalizar la extracción con ciclohexano, se eluyó con 50 ml de metanol con el propósito de desprender los pigmentos adsorbidos en la resina. El volumen colectado fue denominado **M2**.

La columna se dejó durante 10 h embebida en metanol y el volumen eluido se denominó **M4**. Posteriormente se eluyó con 25 ml de ciclohexano, y la resina se secó con vacío. La muestra eluida se volvió a pasar por la resina seca usando nuevamente 25 ml de ciclohexano; todo el volumen eluido se denominó **M3**.

Las muestras así obtenidas fueron analizadas por cromatografía planar en capa fina (TLC) utilizando cromatoplasmas de Sílicagel G60F₂₅₄ Merk® de 0,25 mm de espesor y cloroformo-metanol en distintas proporciones como fase móvil como se muestra en la **Tabla 4.2**.

Tabla 4.2. Proporción de los solventes utilizados como fase móvil para el análisis mediante TLC, de las principales muestras obtenidas por tratamiento con resinas de adsorción, del extracto total de ciclohexano de *Undaria pinnatifida* (MT) colectada en primavera en Comodoro Rivadavia.

Sistema	Proporción diclorometano - metanol	Muestras sembradas en la fase estacionaria
1	100 % diclorometano	M1, M2, M3
2	99:1	M1, M2, M3
3	97:3	M1, M2, M3
4	95:5	M1, M2, M3
5	90:10	MT, M2, M3

El revelado se efectuó mediante luz UV (254 nm y 365 nm), seguido de la utilización del reactivo vainillín-sulfúrico y calentamiento a 110 °C.

4.12.3. Extracción con Fluido Súper Crítico (FSC)

La extracción de fucosterol y fucoxantina con fluido supercrítico (FSC) se realizó mediante un trabajo en colaboración en Hitex Company (París, Francia), empleando un sistema de SFE200 Separex (Champigneulles, Francia), compuesto de un extractor de acero inoxidable de 2 l que contenía dos celdas de extracción en el interior, con capacidad de operación hasta 29 MPa y 150 °C. Como extractante se empleó CO₂ con el agregado de etanol como co-solvente; este último se inyecta antes de llegar al extractor, por lo que la extracción se realiza mediante una mezcla de CO₂ y etanol (**Figura 4.10**). Este proceso permite mejorar la extracción de pigmentos derivados de carotenoides. Para la fucoxantina, debido a su alto peso molecular, se requieren presiones más altas para extraerlo

mediante CO₂ supercrítico, por lo que en nuestro estudio se trabajó en 2 etapas a fin de extraer primero los esteroides, fundamentalmente fucosterol y en la siguiente etapa, la fucoxantina.

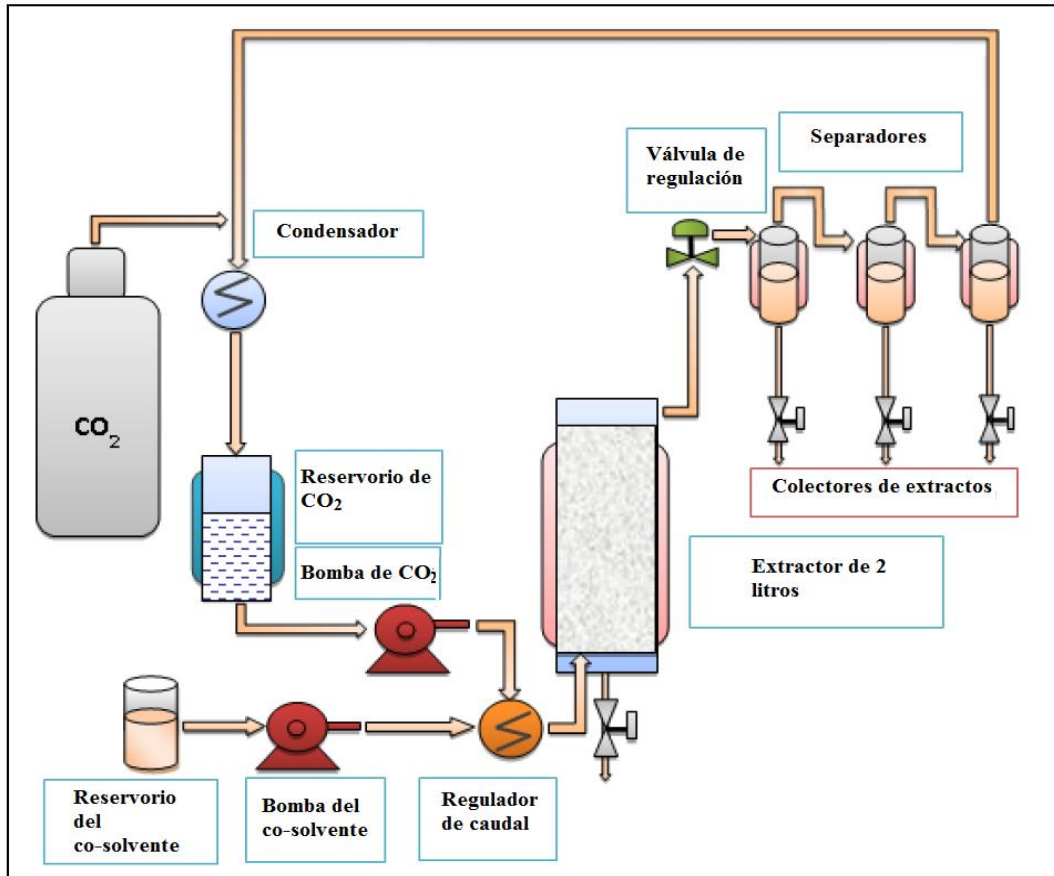


Figura 4.10. Esquema del sistema de extracción mediante FSC con CO₂ y agregado de etanol como co-solvente, empleado para la obtención de metabolitos de *Undaria pinnatifida* colectada en primavera en Comodoro Rivadavia. (Fuente: adaptación de Hitex Company, Francia, Reporte E.14.FX1.02).

4.12.3.1. Extracción de esteroides a menor presión

Las celdas de extracción se llenaron con la muestra y una cantidad equivalente de arena (Fontainebleau). Se utilizaron los parámetros que se indican a continuación.

- Masa del material cargado / celda de extracción: 420 g (celda no llena, con alrededor del 70-80 % del volumen total ocupado) de frondas secas y reducidas a polvo del alga colectada en primavera en Comodoro Rivadavia.
- Celulosa: ocupando un 20-30 % del volumen de la celda, dispuesta en la parte superior para evitar el arrastre de la materia prima y la extracción de pigmentos; este paso se logró en condiciones isotérmicas e isobáricas, a 50 °C y 18 MPa (Mega Pascal) de presión.
- Presión: 180 bars, durante 2 ciclos de 40 min cada uno.
- Temperatura del extractor: 50 °C.
- Diluyente: etanol de 96°.
- Relación FSC/muestra: 15 kg de CO₂ / kg de material cargado.

La velocidad de flujo del CO₂ supercrítico (CO₂SC), fue de 6 kg/h hasta alcanzar la proporción deseada. Se añadió etanol de 96° como diluyente con un caudal de 90 g/h. La mezcla de soluto-CO₂SC, se dividió en los separadores (recipientes para la recuperación de los extractos) mediante la reducción de la presión a 5 MPa. A continuación, el CO₂ descomprimido se hizo recircular, se enfrió y se volvió a comprimir para lograr un nuevo ciclo de extracción. Los extractos se concentraron y se llevaron a sequedad a presión reducida, y se almacenaron a 4 °C, protegidos de la luz.

4.12.3.2. Extracción de pigmentos a alta presión con la adición de un co-solvente

Las celdas de extracción se llenaron con una mezcla del residuo de la primera extracción y un peso equivalente de arena (Fontainebleau). Se utilizaron los parámetros que se indican a continuación.

- Presión: 290 bars, durante 2 ciclos de 40 min cada uno.
- Temperatura del extractor: 50 °C.
- % de co-solvente: 5 % de etanol / flujo de CO₂.
- Relación FSC/muestra: 30 kg de CO₂ / kg de material cargado (+ secado: 10 kg / kg).

Los extractos se concentraron y llevaron a sequedad en un evaporador rotatorio a 50 °C, a presión reducida de 100 y 5 mbar; posteriormente se almacenaron a 4 °C, protegidos de la luz.

4.12.4. Análisis de los productos

Las fracciones obtenidas mediante FSC, fueron analizadas por cromatografía planar en capa fina (TLC) utilizando cromatoplasmas de 0,25 mm de espesor de Sílicagel G60F₂₅₄ Merk® y como fase móvil cloroformo – éter dietílico (9:1). El revelado se efectuó mediante luz UV (254 nm y 365 nm), seguido de la utilización del reactivo vainillín-sulfúrico y calentamiento a 110 °C.

4.12.5. Otros estudios

Paralelamente a las extracciones con CO₂ supercrítico, se extrajo el material saponificable mediante saponificación en presencia de una solución etanólica de hidróxido de potasio y hexano. Los extractos obtenidos y llevados a seco a presión reducida, se analizaron mediante GC-MS para determinar la presencia de los metabolitos de interés.

4.13. Perfil metabólico por ¹H-RMN

El análisis del perfil metabólico se realizó durante una estancia de investigación que efectué en el Laboratorio de Farmacognosia, área de Metabolómica del Instituto de Biología, Universidad de Leiden, Holanda, en febrero de 2015.

Se trabajó con los extractos alcohólicos **EOH1** y **EOH2** de las frondas colectadas en las costas de Comodoro Rivadavia, en primavera (ver **Figura 4.6**), siguiendo el protocolo que se muestra en la **Figura 4.11** (Kim et al., 2010). Todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente (25 °C).

Solventes: MD6, constituido de 250 μl de CD_3OD y 250 μl de buffer KH_2PO_4 en D_2O (pH 6,0) que contenía 0,1 % (p/p) de la sal de sodio del ácido 3 (trimetilsilil) propiónico-2,2, 3,3-d4 (TSP) (1: 1).

Procedimiento: se pesaron 7,76 mg de **EOH1** y de **EOH2** en tubos Eppendorf y se disolvieron con 500 μl de MD6 [250 μl CD_3OD - 250 μl buffer KH_2PO_4 en D_2O (pH 6,0) que contenía 0,1 % (p/p) de la sal de sodio del ácido 3 (trimetilsilil) propiónico-2,2, 3,3-d4 (TSP), 1: 1]. Luego se mezclaron en un vórtex durante 1 minuto, y a continuación se sonicaron en un ultrasonicador (Branson) durante 20 min. Posteriormente las muestras se centrifugaron en una centrífuga (MC-13, Amicon) a 14,000 g durante 10 min. Se transfirieron 800 μl de los sobrenadantes a tubos de RMN de 5 mm. Finalmente las muestras se analizaron en un espectrómetro de ^1H -RMN Brüker de 600 MHz.

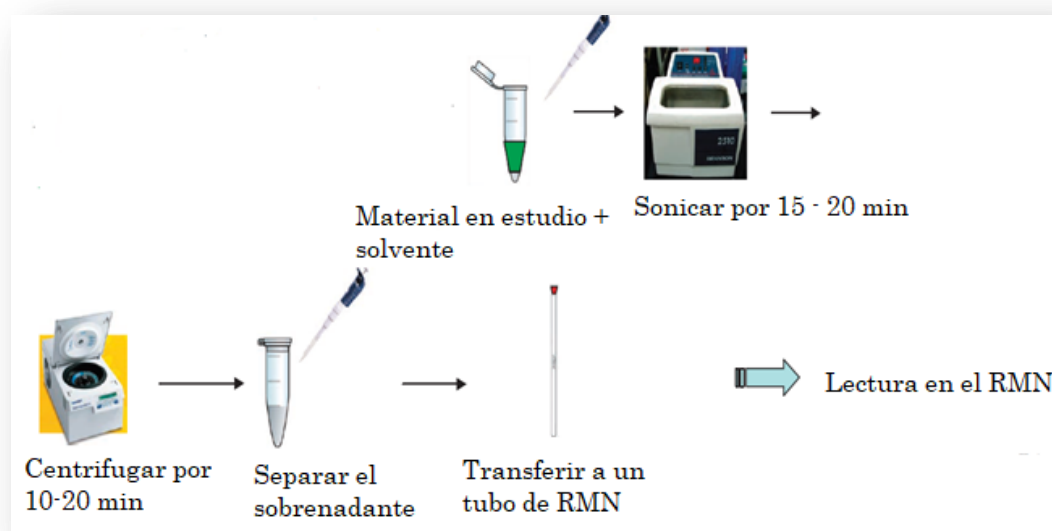


Figura 4.11. Esquema de preparación de **EOH1** y **EOH2** para su análisis por ^1H -RMN. (Fuente: adaptación de Kim et al., 2010).

Análisis de los datos: se identificaron tantos metabolitos cómo fue posible por comparación con una base de espectros de ^1H -RMN de compuestos de referencia, realizado por el Dr. Young Hae Choi (director de la estancia de investigación), disponible en la base de datos del software CHENOMX, nmr suitr 8.1.

4.14. Bibliografía

Becerra, M.B. Obtención de productos de importancia farmacéutica biosintetizados por especies de algas pardas de las costas del Golfo San Jorge. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Dpto. de Farmacia. Argentina. 2016.

Blumenkrantz, N.; Asboe-Hansen, G. A new method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biol.* **1973**, *54*, 484.

Córdoba, O. L.; Sánchez, E. I.; Santomé, J. A. The main fatty acid-binding protein in the liver of the shark (*Halaetunus bivius*) belongs to the liver basic type. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *265*, 1-8.

D'Ambrogio de Argüeso, A. Manual de técnicas en histología vegetal. Editorial Hemisferio Sur S.A., 83 pp., 1986.

Dodgson, K. S. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochem. J.* **1961**, *78*, 312-319.

Dodgson, K. S.; Price, R. G. A note on the determination of ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.* **1962**, *84*, 106-110.

Filisetti-Cozzi, T. M.; Carpita, N.C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal. Biochem.* **1991**, *197*, 157-162.

Flores, M. L. Estudio de los polisacáridos de la pared celular del alga roja *Iridaea undulosa* Bory. Tesis doctoral, FCN, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, 2000.

Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stangley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, 226, 497-509.

Folin, O.; Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* **1927**, 7, 627.

Harbone, J. B. Comparative Biochemistry of Flavonoids. Academic Press. London and New York, 1967, pp 357.

Harborne, J. B. Phytochemical Methods. En: A Guide to Modern Techniques of Plants Analysis; 2nd edición; Chapman and Hall.; Londres, 1991; pp 54-84.

Hellebust, J.; Craigie, J. Physiological and Biochemical methods. Cambridge University Press, 1978, pp 512.

Kim, H.K.; Choi, H.Y.; Verpoorte, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nature protocols.* **2010**, 5, 3.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J. N.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265-275.

Park, J.; Johnson. M. A submicrodetermination of glucose. *J. Biol. Chem.* **1949**, 181, 149-151.

Pinto Vitorino, G.; Toledo, I. B.; Córdoba, O. L.; Flores, M. L. y Cabrera, J. L. Análisis fitoquímico de *Colliguaya integerrima* (Hook.) Gill. et Hook. (Euphorbiaceae), una planta de la Patagonia, Argentina. *Acta Farm. Bonaer.* **2004**, 23, 459-465.

Rondina, R.V.V.; Coussio, J. D. Estudio fotoquímico de plantas medicinales Argentinas (1). Revista de Investigaciones Agropecuarias, INTA, serie 2, Biología y Producción Vegetal. 1969, 22, 351-366.

Smith, R. L.; Gilkerson, E. Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Anal. Biochem.* **1979**, 98, 478-480.

Yun, S.Y.; Morita, H.; Takeya, K.; Itokawa. Cyclic Peptides from Higher Plant. 34. Segetalins G and H, Structures and Estrogen-like Activity of Cyclic Pentapeptides from *Vaccaria segetalis*. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 216-218.

CAPITULO 5

ESTUDIOS BIOLÓGICOS

Y

APLICACION

5.1. Test de la *Artemia salina* (BST= Brine Shrimp Assay)

Los extractos alcohólicos obtenidos a distintas temperaturas (**Figura 5.1**), y el alginato de sodio purificado extraído de las frondas de *U. pinnatifida* (**Figura 5.2**), fueron evaluados mediante el bioensayo de la *Artemia salina* (BST) a fin de determinar la citotoxicidad primaria, siguiendo la técnica de Mc Laughlin et al. (1993).

Los huevos de *Artemia salina* (“camaroncitos de mar”) (*Vita Fish*[®]), se incubaron en agua salada, preparada disolviendo una cucharada sopera colmada de sal gruesa de mesa (CELULAL), 19,39 g ± 0,31, por cada litro de agua potable, a 27 °C durante 24 h. El recipiente de incubación utilizado constaba de dos cámaras, una descubierta expuesta a la luz artificial y otra cubierta, donde se colocaron los huevos. Trascurrido el tiempo se colectaron los nauplios fototrópicos, con una pipeta Pasteur.

Con las muestras a evaluar se prepararon soluciones de aproximadamente 10 mg/ml, en el caso de los extractos alcohólicos se prepararon las soluciones con etanol, mientras que la solución de alginato de sodio se realizó con agua destilada. A partir de éstas se tomaron alícuotas de 500, 50 y 5 µl, se colocaron en tubos de hemólisis, se llevaron a sequedad y se conservaron en un desecador al vacío hasta el momento de realizar el ensayo.

Las alícuotas secas se retomaron con 5 ml de agua de mar artificial para obtener una serie de diluciones de concentraciones 1000, 100 y 10 µg/ml respectivamente. Sobre cada tubo conteniendo cada dilución, se agregaron 10 nauplios y se incubaron durante 24 h, a 27 °C en presencia de luz artificial. Paralelamente se preparó un control negativo de agua salada. Este procedimiento se realizó en todos los casos por triplicado.

Luego de 24 h de incubación se examinaron los tubos, contándose en cada uno el número de organismos muertos (no móviles).

Debido a que la mayoría de los extractos etanólicos (EOH1 y EOH2) presentaron una elevada actividad, se modificaron las concentraciones, reduciéndolas a ¼ de la técnica original, de tal manera que las mismas fueron de 250, 25 y 2,5 µg/ml.

El cálculo de la concentración de los extractos alcohólicos y alginato de sodio que provoca la muerte del 50 % de los nauplios (CL_{50}) y su intervalo de confianza del 95 %, se efectuó por el programa estadístico de Finney.

5.2. Ensayo de inhibición de la elongación de las raíces de semillas de trigo

Los granos de trigo (*Triticum sativum* var. Bointa 3006) se germinaron en agua potable, en oscuridad y a temperatura ambiente durante 48 h. Al cabo de ese tiempo, se colocaron las semillas germinadas sobre papeles de filtro dentro de placas de Petri de 9 cm de diámetro (10 semillas por placa) y se le agregaron 5 ml de cada solución a ensayar. Las muestras se ensayaron en concentraciones de 0,05 y de 0,5 % o de 0,5 y 1 % en agua potable. Se efectuaron duplicados para las muestras y para los controles (negativo, agua potable; positivo, sulfato de vinblastina). Las placas de Petri fueron incubadas durante 5 días en la oscuridad a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo se midió la longitud de la raíz más larga de cada semilla, se promediaron por placa y luego por duplicado para cada dilución y se calculó el % de inhibición en base a la longitud de las raíces del control negativo (100 % de desarrollo).

Se tuvo en cuenta además el número de raíces secundarias por semilla, así como también el aspecto de las raíces y del vástago, en comparación con lo observado para el control positivo.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\overline{\text{Long. del control negativo}} - \overline{\text{Long. de la muestra}}}{\overline{\text{Long. del control negativo}}} \times 100$$

donde, $\overline{\text{Long}}$ corresponde a la longitud promedio radicular

5.3. Actividad antibacteriana

Para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos (EOH1 y EOH2) y alginato de sodio purificado de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente, se procedió de la siguiente manera:

5.3.1. Preparación de medios de cultivo

- Agar nutritivo (Britania). Se pesaron 0,775 g, se disolvieron en 25 ml de agua potable y se esterizaron en autoclave. El agar se fundió en baño María, se colocaron 5 ml en cada frasco estéril y se enfriaron en forma inclinada para obtener la superficie como “pico de flauta”.
- Medio ATB N° 1 (Britania). Se pesaron 6,1 g y se disolvieron en 200 ml de agua. El medio así preparado se esterilizó en autoclave.

5.3.2. Preparación del inóculo

Las cepas utilizadas para el estudio fueron: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25723), y *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Las cepas conservadas en freezer en estado latente en un medio de caldo nutritivo y glicerol (1:1), se retiraron y se dejaron hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se repicaron sobre el agar nutritivo en pico de flauta y se incubaron en estufa 24 h a 37 °C. Al cabo de este tiempo se verificó mediante observación macroscópica la uniformidad de las colonias. Posteriormente se procedió a preparar la suspensión de microorganismos, para lo cual se tomó con un ansa una colonia de cada uno de los picos de flauta de los microorganismos a ensayar, y se sembró un tubo con 1 ml de caldo nutritivo (uno por cada microorganismo). Se homogeneizaron y se colocaron en estufa a 37 °C por 24 h.

Para la preparación del inóculo se tomó la suspensión de microorganismos desarrollada en el caldo nutritivo, y se le agregó solución fisiológica estéril hasta

alcanzar la turbidez comparable con la correspondiente a la dilución 0,5 de la escala de Mc Farland. De esta dilución final se tomó 1 ml para inocular la placa.

5.3.3. Preparación de las placas

Se utilizaron placas de Petri estériles de material plástico. El medio ATB N° 1 preparado con anterioridad y esterilizado se fundió en baño de agua a 95 °C, luego se dejó enfriar hasta que el baño alcanzó 40 °C. Sobre cada placa de Petri conteniendo 1 ml del inóculo se volcaron aproximadamente 25 ml del medio. Se taparon y se homogeneizaron mediante movimientos ondulantes. Se dejaron enfriar y solidificar. Se colocaron en estufa en forma invertida durante media hora con el fin de eliminar los restos de líquido. Con un sacabocados estéril se realizaron dos orificios centrales destinados al control positivo y negativo respectivamente y hacia los bordes de la placa tantos orificios como muestras a ensayar para cada microorganismo.

5.3.4. Preparación de las muestras

Se colocaron sobre cada uno de los orificios 50 µl de los extractos alcohólicos de concentración 1 mg/ml preparada con alcohol 70 % (v/v) y de alginato de sodio de igual concentración al de los extractos alcohólicos pero preparada con solución fisiológica.

Como control positivo se utilizó clorhidrato de estreptomicina (10 mg/ml, en alcohol etílico al 70 %) y como control negativo alcohol etílico al 70 %.

Las placas se incubaron en estufa de cultivo (FAETA S.A. Industria Argentina) a 37 °C durante 24 h y al cabo de dicho tiempo se midió el halo de inhibición.

5.4. Actividad antioxidante

Se efectuó mediante el método de inhibición del DPPH (radical 2,2'-difenil-1-picrilhidracilo), utilizando como solvente etanol absoluto y como patrón antioxidante, BHT (butilhidroxitolueno) (Koleva et al., 2002).

La solución de DPPH se preparó en el momento de usar, a partir de 0,118 mg/ml en etanol (teniendo la precaución de que los cristales del reactivo estén muy bien disueltos) y se conservó en un frasco cubierto con papel de aluminio en la oscuridad a 4 °C, entre las mediciones.

Para la preparación del blanco de reacción, se colocaron en un tubo de ensayo 1,5 ml de etanol y 1 ml de solución de DPPH, y para las muestras en estudio y para el patrón se utilizó un esquema similar, siendo la proporción de masa: extracto-DPPH (5,5:1) y BHT-DPPH (0,5:1). Las muestras analizadas fueron los extractos alcohólicos (FABB, EOH1, EOH2) y alginato de sodio purificado de *Undaria pinnatifida* colectada estacionalmente, utilizando como solvente etanol absoluto para el caso de los extractos alcohólicos y agua destilada para las muestras de alginato.

Los tubos se incubaron durante 15 min en la oscuridad a 30 °C y se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Para llevar a cero el espectrofotómetro se usó etanol absoluto.

La actividad antioxidante de las muestras ensayadas se expresó como porcentaje de inhibición del DPPH, y se calculó como:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{(\text{Abs. } m - \text{Abs. blanco } m) \times 100}{\text{Abs. blanco}}$$

donde, *Abs. m* = absorbancia de la muestra

Abs. blanco m = absorbancia del blanco de muestra

Abs. blanco = absorbancia del blanco de reacción

5.4.1. Cuantificación de la actividad antioxidante

Se utilizó la técnica propuesta por Choi *et al.* (2002), la cual determina la concentración de muestra necesaria para atrapar el 50 % de los radicales libres del DPPH (SC₅₀).

Para ello se preparó una solución etanólica de la FABB de concentración 1 mg/ml y a partir de la misma se procedió a realizar las diluciones que se muestran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Diluciones a partir de la solución de FABB (1 mg/ml).

Dilución	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
1/2	500
1/4	250
1/10	100
1/20	50
1/100	10
1/200	5
1/500	2

La concentración empleada del DPPH fue de 0,3 mmol/l (0,118 mg/ml).

Se mezclaron 1,5 ml de cada dilución, con 1 ml de la solución de DPPH; transcurridos 30 min a temperatura ambiente, se realizó la lectura de las absorbancias a 518 nm. Las muestras se procesaron por triplicado.

La SC_{50} de cada muestra se determinó mediante un gráfico de % de inhibición versus concentración.

5.5. Prueba del Metilgreen-ADN (MG-ADN)

Se utilizó la técnica descrita por Burrell et al. (1992), modificada por Bonjean et al. (1996).

Es un ensayo colorimétrico que permite inferir un posible mecanismo de acción de los compuestos que poseen una citotoxicidad importante frente al test de la *Artemia salina*, esto es una CL_{50} inferior a 250 $\mu\text{g/ml}$. Se incluye en los llamados ensayos moleculares (secundarios *in vitro*), que consisten en ensayos de inhibición que utilizan receptores, enzimas, ADN, entre otros, y tienen alta

especificidad por lo que detectan sólo compuestos que actúan por un determinado mecanismo.

5.5.1. Preparación de la muestra y del control

5.5.1.1. Preparación de muestras

Se preparó una solución madre de concentración 10 mg/ml de NaAlg (primavera, verano e invierno) disuelta en agua destilada; cuando fue necesario se disolvió la muestra con ayuda de un sonicador, tratándola por intervalos de 10 min (3 veces). Cada muestra se llevó hasta volumen final de 10 ml con agua destilada en un matraz aforado, para obtener una concentración final de 1000 µg/ml (d1). Luego se tomó 1 ml de d1 y se llevó nuevamente a volumen final de 10 ml con agua destilada en un matraz aforado, para obtener la concentración de 100 µg/ml (d2). Por último se tomó 1 ml de d2 y se llevó una vez más a volumen final de 10 ml con agua destilada en un matraz aforado, para obtener la concentración de 10 µg/ml (d3).

La cantidad de reactivo a preparar se calculó teniendo en cuenta la cantidad de muestras, de diluciones de cada muestra, el control positivo (clorhidrato de doxorrubicina de concentración 30 µg/ml) y el control negativo o blanco de reactivo (MG-ADN). Se consideró además que se trabajaría por triplicado con cada dilución de cada muestra, al igual que el control positivo.

5.5.1.2. Preparación de control positivo

La concentración del control positivo, clorhidrato de doxorrubicina, fue de 30 µg/ml, la cual se obtuvo a partir de 0,3 mg de clorhidrato de doxorrubicina que fueron disueltos en etanol, llevando a volumen final en un matraz aforado de 10 ml.

Se tomaron 60 µl de cada dilución y del control positivo y se dispusieron en tubos de ensayos. Se llevaron a seco en baño de agua a 60 °C, o en evaporador rotatorio

a presión reducida (dependiendo de la naturaleza química de los constituyentes) y se dejaron una noche en estufa de vacío.

5.5.1.3. Preparación de blanco de reactivo

Por cada 100 ml a preparar, se suspendieron 20 mg del reactivo Metil Green ADN (MG-ADN, Sigma) en 100 ml de buffer Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. El buffer conteniendo 7,5 mM de MgSO₄, se preparó según indicaciones del catálogo de Sigma teniendo en cuenta la temperatura ya que afecta el pH. Seguidamente, se agitó a 37 °C, protegido de la luz, durante 24 h.

5.5.2. Procedimiento

Se agregaron 600 µl del reactivo MG-ADN a cada una de las diluciones de cada muestra y al control positivo, que habían sido llevados a seco previamente, como se indicó en párrafos anteriores. Los tubos se mantuvieron protegidos de la luz.

Como control negativo o blanco de reactivo, se dispuso 600 µl de reactivo MG-ADN en tubos, por triplicado y se mantuvieron protegidos de la luz.

Se trabajó en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 655 nm, para lo cual se llevó la absorbancia a cero con el blanco de reactivo e inmediatamente después se efectuaron las lecturas de las absorbancias iniciales de las muestras y del control positivo.

Posteriormente se incubaron todos los tubos protegidos de la luz, durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se efectuaron las lecturas de las absorbancias finales tal como se indicó anteriormente para las absorbancias iniciales.

Para cada dilución de cada muestra, se determinó el porcentaje de intercalación en el ADN a partir de la disminución de la absorbancia calculada por la diferencia entre las absorbancias final e inicial. Para calcular el porcentaje, la absorbancia inicial se tomó como 100 %. En este ensayo también se calculó la CI₅₀ de las muestras analizadas.

5.6. Ensayo de citotoxicidad in vitro con líneas celulares

Este ensayo se realizó en colaboración con la Dra. Caroline Weinstein en el Laboratorio de Cultivo Celular de la Universidad Católica de Valparaíso (Chile). Se midió el efecto del alginato de sodio purificado de *U. pinnatifida* colectada en primavera, sobre la proliferación de dos líneas celulares tumorales humanas, Caco-2 (cáncer de colon) y MCF-7 (cáncer de mama).

El efecto de los productos ensayados sobre la actividad antiproliferativa en las líneas celulares mencionadas, se midió utilizando el método de la resazurina, el cual se basa en la capacidad de las células viables para reducir esta molécula y formar un producto fluorescente con una longitud de onda de excitación a 544 nm y una emisión a 590 nm. La fluorescencia (leída en un equipo Thermo Scientific Appliskan) es proporcional al número de células viables. Las poblaciones de células se mantuvieron en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (mezcla de nutrientes), suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (FBS), glutamina 2 mM, 10 U/L de penicilina y 10 µg/ml de estreptomicina, en una incubadora humidificada (Thermo Forma) con 5 % de CO₂. Para el ensayo se utilizaron 5000 células MCF-7 y 10000 células Caco-2, sembradas en placas de 96 pocillos, las cuales fueron expuestas a diluciones seleccionadas de las soluciones a ensayar. Cada ensayo fue realizado por triplicado. Después de 48 h de incubación, se añadió resazurina en medio fresco a una concentración final de 4 mg/ml y a las 2 h se tomó una muestra del sobrenadante para leer fluorescencia. Se calcularon los porcentajes de supervivencia celular relativos a las células de control de crecimiento y se construyeron curvas de concentración en función del porcentaje de proliferación. En base a éstas, se calcularon las concentraciones que inducían a la inhibición de la proliferación celular (Skehan et al., 1990).

5.7. Actividad antileishmania

La actividad fue realizada en el Instituto Helénico Pasteur - Atenas, Grecia, en el marco de un convenio de cooperación internacional.

La muestra evaluada fue alginato de sodio purificado de la estación primavera.

5.7.1. Mantenimiento de cultivos celulares y parásitos

El cultivo celular de promastigotes de *Leishmania infantum* (MHOM / GR / 2002 / GH12) y de *L. amazonensis* (MPRO / BR / 72 / M1845), se efectuó en el medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10 % (v/v) de FBS inactivado por calor (HIFBS), solución HEPES (ácido 4- (2-hidroxietil-1-piperazinetanosulfónico) 10 mM (solución buffer de rango de pH 7,2 y 7,6) y penicilina-estreptomicina (concentración final 100 U/ml) a 25 °C (Xingi et al., 2009).

Se cultivó también la línea celular de macrófagos murinos J774.1 en el medio RPMI-1640, suplementado con 10 % (v/v) de HIFBS, HEPES 10 mM y penicilina-estreptomicina (concentración final 100 U/ml), a 37 ° C en atmósfera de 5 % de CO₂.

5.7.2. Actividad antipromastigote

Para la determinación de la actividad antileishmania, se usó el ensayo de la resazurina (Mikus y Steverding, 2000).

Se preparó una solución acuosa de 1000 µg/ml de alginato de sodio, a partir de la cual se realizan dos diluciones de concentración final de 500 µg/ml y de 200 µg/ml.

Se trabajó con $2,5 \times 10^6$ células/ml en la fase estacionaria de *L. infantum* (MHOM / GR / 2002 / GH12) y *L. amazonensis* (MPRO / BR / 72 / M1845); los promastigotes fueron sembrados en placas de 96 pocillos de fondo plano en un volumen total de 200 µl/pocillo, en el medio RPMI-1640. Se añadió la solución de alginato, por triplicado, en concentraciones crecientes y se incubó durante 72 h a 25 °C con los parásitos.

Luego de la incubación, se le añadió 20 µl por pocillo de solución de resazurina y se incubó 24 h. Finalmente, los cambios colorimétricos se leyeron a 550 nm con longitud de onda de referencia a 620 nm. Los valores de CI₅₀ se determinaron a partir de curvas de dosis respuesta mediante interpolación lineal.

5.7.3. Actividad anti-amastigote

La actividad anti-leishmania *in vitro* de alginato de sodio contra la forma amastigote de los parásitos, se evaluó en macrófagos J774.1 de la línea celular murina infectados con promastigotes metacíclicos de *L. infantum* y *L. amazonensis* (10 parásitos/macrófagos) (Efstathiou et al., 2014).

La citotoxicidad de concentraciones crecientes del alginato contra las células huésped (línea celular de macrófagos murinos J774.1), también se evaluó después de la incubación con los macrófagos durante 72 h a 37 °C, en atmósfera de 5 % de CO₂.

Después, se añadió la solución de resazurina (20 µl/pocillo), se mantuvo durante 24 h más y los cambios colorimétricos se leyeron como se describió. En todos los casos, los experimentos se realizaron por triplicado.

5.8. Test del *Allium cepa*

Este ensayo de toxicidad aguda, demuestra una alta correlación con otros sistemas de ensayo, involucrando la toxicidad general (crecimiento de las raíces) y la genotoxicidad (aberraciones cromosómicas).

La toxicidad analizada contempló parámetros macro y microscópicos y se evaluaron las alteraciones morfológicas de las raíces y el potencial efecto citotóxico y genotóxico. La disminución del Índice Mitótico en relación al control negativo (agua potable), indica el efecto tóxico de las muestras analizadas sobre los meristemas apicales de las raíces de *Allium cepa*.

5.8.1. Lugar de estudio

Este estudio se realizó en el laboratorio 171 del departamento de farmacia de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. La temperatura promedio durante el ensayo fue de 20 °C.

5.8.2. Materiales y reactivos

Se usaron 15 bulbos de cebolla amarillas *Allium cepa* (Amaryllidaceae), de un peso de 60 a 70 g, en estado fresco y sin formación de hojas y raíces por cada muestra a ensayar. Los bulbos se limpiaron mediante la eliminación de la epidermis seca sin dañar las raíces primordiales. Los recipientes para contener los bulbos fueron tubos de ensayos de 18 mm de diámetro por 150 mm de largo de 25 ml de capacidad, es importante destacar que la profundidad de los recipientes debe ser tal que, al término de la prueba, la elongación máxima no alcance el fondo del recipiente (Fiskesjö, 1985). Como control positivo se usó dicromato de potasio en dos concentraciones y agua potable como control negativo. Los reactivos para citogenética fueron fijador Carnoy (etanol:cloroformo:ácido acético 6:3:1), preparada al momento de su uso, y colorante orceína A y B (orceína clorhídrica y acética).

5.8.2.1. Colorante

Solución madre

Se llevó a ebullición 110 ml de ácido acético glacial, en un vaso de precipitado de 250 ml. Al iniciar la ebullición se agregó 4 g de orceína y se mantuvo a ebullición suave durante 10 min. Se enfrió a temperatura ambiente y se llevó a 200 ml con agua destilada y finalmente se filtró.

Orceína A (orceína clorhídrica): a 126 ml de la solución madre se le agregó 14 ml de HCl 1 N.

Orceína B (orceína acética): a 74 ml de la solución madre se le agregó 74 ml de ácido acético 45 % (v/v).

5.8.2.2. Preparación de las muestras

El ensayo se realizó sobre los extractos alcohólicos (EOH1 y EOH2) y alginato de sodio purificado de primavera y verano de *U. pinnatifida*. Se prepararon dos soluciones de cada muestra de concentración aproximada de 900 y 2500 µg/ml

(ver Capítulo 8) diluidas en agua potable. Cada muestra se procesó en paralelo con los controles (positivo y negativo) y por triplicado.

5.8.2.3. Preparación del patrón

Se prepararon dos soluciones de $K_2Cr_2O_7$ (control positivo), diluidas en agua potable de concentración 1,91 y 32,29 $\mu\text{g/ml}$, y agua potable como control (control negativo).

5.8.3. Procedimiento

El ensayo se inicia con el llenado de los tubos con cada una de las concentraciones de las muestras y los controles; este llenado se realizó hasta el borde de cada tubo. A continuación se colocaron los bulbos limpios sobre la boca del tubo, cuidando que la zona radicular quede inmersa en la solución. Los tubos se colocaron en una gradilla, la cual se pone sobre una mesa que no presente vibraciones y se mantuvo a temperatura ambiente durante un período de 72 h, evitándose la radiación solar directa. Se controló continuamente todo el sistema y cuando fue necesario se repuso el volumen perdido por evaporación o absorción, con ayuda de una pipeta Pasteur, esto se realizó entre los bordes del tubo y el bulbo, sin sacar las raíces del mismo.

Al término del período de exposición se registró el promedio de la longitud de todas las raíces de cada bulbo. La medición se llevó a cabo colocando el cero de medición en el anillo radicular del bulbo.

La inhibición del crecimiento radicular se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición radicular} = \frac{\overline{\text{Long. del control negativo}} - \overline{\text{Long. de la muestra}}}{\overline{\text{Long. del control negativo}}} \times 100$$

donde, $\overline{\text{Long.}}$ corresponde a la longitud promedio radicular

5.8.4. Análisis de microscopía

Una vez que se registró el crecimiento de la longitud de las raíces, se realizaron pruebas para analizar la mitosis de los ápices radiculares. Se calculó el índice mitótico general y por fases se observaron la presencia o no de anomalías a nivel de la división nuclear.

Para estudiar la mitosis se analizaron al menos 6 ápices elegidos al azar de cada bulbo. Se cortaron los ápices radiculares a partir del extremo inferior de aproximadamente 3 mm de longitud y se sumergieron en tres gotas de solución de fijación Carnoy durante 5 min, con el objetivo de detener la división celular. El exceso de fijador se eliminó con papel de absorbente e inmediatamente después se realizó la tinción.

5.8.4.1. Tinción y squash

Se colocaron sobre un vidrio de reloj los ápices y se agregó 10 gotas, o hasta que quede totalmente cubierta, de orceína A. Se calentó sobre una manta calefactora durante 1 min. Se repitió esta operación tres veces, hasta la emisión de vapores, evitando la ebullición y sequedad. Usando un pincel N° 1 se retiraron cuidadosamente los ápices (evitando romperlas) y se los introdujo en una placa Petri. Se lavó con agua potable dos veces para eliminar el exceso de colorante. Una vez lavadas se pasaron a un vidrio de reloj y con un bisturí se cortaron cada ápice a unos 3 mm del borde inferior. Sobre el fragmento se agregó 3 gotas de orceína B y se colocó cuidadosamente sobre un portaobjetos. Con un cubreobjetos encima y ayudado de papel absorbente, doblado dos o tres veces, se presionó con el dedo pulgar suavemente, evitando que el cubreobjetos se deslice mientras presiona (squash). La finalidad del último paso es conseguir una monocapa de células, para poder realizar una buena observación. Los preparados se observaron al microscopio óptico, primero a un aumento de 5X o 10X y luego a un aumento de 40X.

5.8.4.2. Índice mitótico (IM)

Este índice permite conocer si existe inhibición en el proceso de división celular. Si se obtienen valores inferiores a los del control negativo, se puede decir que existe inhibición, caso contrario si se obtienen valores mayores indica una estimulación en la división celular, debido a la muestra (Restrepo et al., 2012). El IM se define como el número de células por unidad (normalmente 1.000) que sufren mitosis durante un determinado período de tiempo de exposición y se utiliza principalmente como estimación de la velocidad del crecimiento tisular (Fiskesjö, 1985). En términos generales, valores del IM inferiores al valor del control negativo (agua potable) indican alteraciones inhibitorias, derivadas de las sustancias químicas analizadas en el ensayo. Caso contrario, valores del IM superiores al control negativo indican un incremento en la división celular, mostrando un desorden en la proliferación celular evidenciando una sustancia química con potencial para formación de tejido tumoral (Morais, 2009). La determinación del índice mitótico se realizó en el microscopio con un objetivo de 40X (Barbério et al., 2011).

5.8.4.3. Lectura de la prueba de genotoxicidad

La observación de las aberraciones cromosómicas se realizaron en un microscopio óptico con un aumento de 40X (Morais et al., 2009).

5.9. Ensayo Alelopático

El estudio se realizó en los laboratorios de la Facultad de Ingeniería, de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

En todo el ensayo se mantuvo un testigo de referencia a base de agua potable en sustitución del extracto alcohólico. Para la realización de los ensayos se siguió la técnica descrita por Arancibia (2013), ajustada a las condiciones del laboratorio de la UNPSJB.

Se pesaron 0,6 g del extracto alcohólico (EOH1) de *U. pinnatifida* colectada en primavera, y se disolvieron en 10 ml de DMSO constituyendo la solución madre. A partir de la misma se hicieron distintas diluciones con agua potable (0,1; 0,3 y 0,5 mg/ml). Cada una de las diluciones se vertió en un Erlenmeyer y se agitó por un período de 1 h y luego se filtró.

El ensayo sobre *Lycopersicum esculentum* y *Lolium multiflorum* se realizó colocando 10 semillas, (previamente tratadas con agua potable, en oscuridad y a temperatura ambiente durante 24 h) en cada placa de Petri de 20 mm de diámetro, provista de papel de filtro dispuesto en el fondo, y se añadió 10 ml de la dilución del extracto. Para mantener la humedad en las placas, se sellaron con film autoadherente de PVC. Las placas fueron incubadas a 20 °C durante 7 días, dentro de una cámara provista de lámparas fluorescentes de 20 Watts, y expuestas a un fotoperíodo de 18 h de luz y 6 h de oscuridad.

Al cabo de ese tiempo se midió la longitud de la raíz de cada semilla, se promediaron por placa y luego por triplicado para cada dilución. Se calculó el % de inhibición en base a la longitud de las raíces del control negativo (100 % de desarrollo).

El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorio y los resultados se sometieron a análisis de media, desviación estándar y el error. En el caso de las semillas germinadas (%) se evaluaron visualmente.

5.10. Preparación de micropartículas

5.10.1. Gelificación iónica

La solución de alginato de sodio de primavera y verano (20 ml) se preparó de la siguiente manera (Becerra, 2016): 1 g de alginato de sodio obtenido de las frondas de *Undaria pinnatifida*, se dispersó en 20 ml de agua destilada y se mezcló hasta homogenización, con agitación. A continuación, se dispersaron homogéneamente en la solución de alginato 0,5 g de paracetamol (PCT). Finalmente, se agregó uniformemente 0,1 g de carbonato de calcio. La solución resultante se calentó a 60 °C y se adicionó a 40 ml de vaselina líquida conteniendo 1 g de tween 20,

precalentada a 60 °C. El sistema se agitó a 470 rpm durante 15 min (formación de una emulsión A/O (del inglés: *aqua/oil*). Con agitación constante, se adicionaron 20 ml de vaselina líquida (EWE® densa 180) conteniendo 0,85 ml de ácido acético glacial, para iniciar la gelificación interna. Luego de 30 min bajo agitación, las micropartículas pregelificadas se separaron de la dispersión oleosa por mezclado con una solución acuosa de cloruro de calcio (25 g/250 ml). Las fases se separaron dejando sedimentar las micropartículas (120 min). El sobrenadante fue descartado, separando las micropartículas por centrifugación; estas últimas se filtraron y lavaron con 100 ml de etanol y se secaron hasta peso constante, a 37 °C. Finalmente, se tamizaron para separar por tamaño de partícula.

5.10.2. Caracterización de las micropartículas

Las micropartículas se caracterizaron mediante diferentes ensayos, los que se describen a continuación.

5.10.3 Características morfológicas y tamaño de partícula

Una vez secas, se determinó el tamaño de las micropartículas usando la técnica del tamizado, para lo cual se utilizaron tamices de 1 y 0,63 nm. Las micropartículas desecadas, fueron también monitoreadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) en un microscopio JEOL-LV 6510.

5.10.4. Rendimiento de la producción (% Ren)

Tiene como fin determinar el porcentaje de microcápsulas obtenidas y se obtiene por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{cantidad de micropartículas obtenidas}}{\text{cantidad de micropartículas esperadas}} \times 100$$

5.10.5. Eficacia de la encapsulación (% EE)

Este se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\% EE = \frac{\text{cantidad de principio activo encapsulado}}{\text{cantidad de principio activo}} \times 100$$

5.10.6. Contenido de principio activo (% Cpa)

Se pesaron 100 mg de micropartículas y se diluyeron en 100 ml de buffer fosfato de pH 7,4 (según Farmacopea Argentina 7 Ed). La muestra fue sometida a un baño de agua ultrasónico el tiempo necesario para producir la ruptura de las partículas. Se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm y se preparó una dilución 1/100. La curva patrón se realizó con una solución madre de paracetamol de concentración 0,016 M, a partir de la cual se obtuvieron diluciones de aproximadamente 0,8 10⁻⁵ M a 10 10⁻⁵ M; se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 243 nm. Como blanco de muestra se analizaron micropartículas vacías, preparadas en las mismas condiciones que las micropartículas que contenían paracetamol. Para el cálculo del contenido de principio activo se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% Cpa = \frac{\text{cantidad de principio activo encapsulado}}{\text{peso final de las micropartículas}} \times 100$$

5.11. Bibliografía

Arancibia, L. A. Estudio químico y bioactividad biológica de derivados sesquiterpénicos presentes en especies patagónicas del género *Senecio*. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Dpto. de Farmacia. Argentina. 2013.

Becerra, M. B. Obtención de productos de importancia farmacéutica biosintetizados por especies de algas pardas de las costas del Golfo San Jorge. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Dpto. de Farmacia. Argentina. 2016.

Bonjean, K.; Pauw-Gillet, M.; Bassleer, R.; Quentin-Leclercq, J.; Angenot, L.; Wright, C. W. Critical evaluation of the DNA-Methyl Green assay: application to some indole alkaloids. *Phytother. Res.* **1996**, *10*, S159–S160.

Burrell, N.; Frigo, A.; Rasmussen, R.; McAlpine, J. A colorimetric microassay for the detection of agents. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 11, 1582–1587.

Farmacopea Argentina, 7° Edición, vol 3, 2013.

Fiskesjö, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas.* **1985**, *102*, 99–112.

Restrepo, R.; Reyes, D.; Ortiz, M. C.; Ruiz, F. A. R.; Kouznetsov, V. V. Aberraciones cromosomales en bulbos de cebolla *Allium cepa* inducidas por moléculas híbridas 4-aminoquinolónicas. *Universitas Scientiarum.* **2012**, *17*, 3, 253–261.

Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *JNCI J. Nation. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 13, 1107–1112.

CAPITULO 6

ESTUDIO GENERAL

DE *Undaria pinnatifida*

COLECTADA EN BAHIA

BUSTAMANTE Y EN COMODORO

RIVADAVIA

6.1. Hábitat y ecología de *Undaria pinnatifida*

El Golfo San Jorge (GSJ) es una cuenca semiabierto del Mar Argentino ubicado aproximadamente entre la latitud 44° 55' S 65° 31' O (Cabo Dos Bahías) y 47° 06' S 65° 51' O (Cabo Tres Puntas), que presenta diferentes profundidades. En la zona central, supera los 100 m, mientras que en los extremos las profundidades oscilan entre los 50 y 70 m en el sector sur, y aproximadamente 90 m en el sector norte (en donde se encuentra ubicada Bahía Bustamante).

Las aguas del golfo presentan gran heterogeneidad, tanto espacial como temporal. Esto es debido a la mezcla de corrientes de marea (subantárticas y subtropicales de Brasil), a la estratificación de las aguas y al flujo estacional de aguas de baja salinidad (Vinuesa, 2012). Dos clases de masas de agua están presentes: el agua costera y el agua de plataforma, que baña la mayor parte del golfo (Guerrero y Piola, 1997).

En el fondo marino se observan dos tipos principales de sedimentos: una fracción esencialmente fangosa y fango-arenosa, sin componentes bioclásticos, que ocupa todo el sector occidental y central del golfo, en profundidades superiores a los 80 m; y otra fracción de grava y arena, con rocas sedimentarias de carbonato de calcio, constituidos por restos de bivalvos y cirrípedos. Este último tipo se presenta en los sectores norte y sur de la boca del golfo (Roux et al., 1995). En áreas costeras, el fondo marino puede ser arenoso, con componentes bioclásticos y arenoso-fangoso (Vinuesa, 2012).

En el Golfo San Jorge el ciclo de producción primaria presenta una tasa máxima durante la primavera y una de menor intensidad en el otoño. Este ciclo se halla asociado al proceso de formación estacional del termoclina (capa del agua donde la temperatura cambia rápidamente), que se inicia en la primavera, alcanza su mayor desarrollo en el verano y desaparece en el otoño, debido a las temperaturas y vientos que se producen en cada una de las estaciones mencionadas (Vinuesa, 2012). Debido a las diferencias en los

extremos del golfo de menor profundidad, se generan frentes de marea de desarrollo estacional y permanencia durante la primavera y fines del otoño (Fernández et al., 2005).

Con respecto a las macroalgas, no existe a la fecha una revisión de las algas pardas de las costas patagónicas que permita ver el panorama completo de su diversidad (Zaixso y Boraso de Zaixso, 2015). En la actualidad, en el GSJ las algas pardas bentónicas que forman verdaderos bosques son *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia vadosa* y *Undaria pinnatifida*, siendo esta última una especie alóctona, altamente invasora como describiéramos en los capítulos introductorios, cuyos efectos reales en el ecosistema aún no han sido definidos (Zaixso y Boraso de Zaixso, 2015). Es por esto que en nuestro grupo de investigación se busca alcanzar un conocimiento integral de la especie a partir de estudios exhaustivos que permitan definir un aprovechamiento racional, y así contribuir a un control de su desarrollo. Para ello, en este trabajo de tesis el alga fue analizada estacionalmente, considerando aspectos biológicos, bioquímicos, químicos, actividades biológicas y posibles aplicaciones, en relación con el medio ambiente en que habita en la región central del GSJ.

6.2. Estudio preliminar de ejemplares de Bahía Bustamante

6.2.1. Características macroscópicas y organolépticas

Como se describió en el Capítulo 4, los ejemplares fueron colectados en la zona intermareal. Uno de ellos se herborizó y depositó en el Herbario Regional Patagónico (HRP N° 7656) y el resto fue empleado para nuestro estudio, comenzando con la determinación de las características macroscópicas y organolépticas de las distintas partes morfoanatómicas (Tabla 6.1).

La mayoría de los ejemplares presentaron el grampón formado por varios hapterios y en la base del estipe el esporofilo, una estructura lobulada y

plegada. Esta última estructura anatómica es propia de ejemplares que se encuentran en su estado reproductivo, siendo estas mayoritarias en primavera y verano.

En la zona media del esporofito se observó una nervadura central prominente del que salen unas láminas lobuladas bifurcadas en los laterales (frondas). En general las frondas de la zona central del esporofito eran las de mayor longitud con respecto a los extremos, con significativa diferencia en la parte superior.

Se efectuaron las medidas de las distintas partes morfoanatómicas utilizando los siguientes caracteres: longitud total del esporofito (LE), es decir, la distancia desde la base del estipe hasta la parte superior de la nervadura central; longitud del estipe (LEst), distancia desde la base del estipe hasta el sitio en el esporofito donde comienzan a formarse las frondas; longitud de las frondas (LF); longitud del esporofilo (LEsp); longitud del grampón (LG). La **Figura 6.1** muestra uno de los ejemplares destacando las partes y situando las medidas realizadas.

Las características morfoanatómicas coinciden con lo descrito por otros autores para *U. pinnatifida* que habita en la costa patagónica (Martin y Bastida 2008; Boraso 2013).

Los ejemplares mostraron diferencias en cuanto a la longitud del esporofito y de las frondas, reflejándose en la desviación estándar calculada (**Tabla 6.1**).

Como se mencionó en el Capítulo 1 de la Introducción de esta tesis, la temperatura es un factor relacionado con el desarrollo de las diferentes fases del ciclo de vida de *U. pinnatifida* (Akiyama y Kurogi, 1982; Morita et al., 2003b); esto también es mencionado por otros investigadores para la costa patagónica (Casas, 2005; Casas et al., 2008; Martin y Bastida 2008). Cabe destacar que la variación morfológica (ver **Tabla 1.2** en el Capítulo 1 de la Introducción de esta tesis) de la especie colectada en la zona del intermareal de Bahía Bustamante presentó una notoria plasticidad morfológica (Stuart et al., 1999; Charrier et al., 2012).

Tabla 6.1. Características organolépticas y macroscópicas de las distintas partes morfoanatómicas de *Undaria pinnatifida* colectada en Bahía Bustamante.

Características						
Parte morfo-anatómica	Organolépticas				Macroscópicas	
	Color	Textura	Olor	Sabor	Longitud (cm)	Sustrato orgánico y/o inorgánico
Fronda	Pardo oscuro	Suave	A mar	Salado con gusto a productos marinos	30,2 ± 16	Sin epífitas
Estipe	Pardo oscuro	Rugoso	A mar	n/d	5,5 ± 1	Sin epífitas
Esporofilo	Pardo oscuro	Suave	A mar	n/d	5 ± 2	Sin epífitas
Grampón	Pardo	Rugoso	n/d	n/d	4,7 ± 1	Abundante sustrato inorgánico
Talla del esporofito					97,6 ± 13	

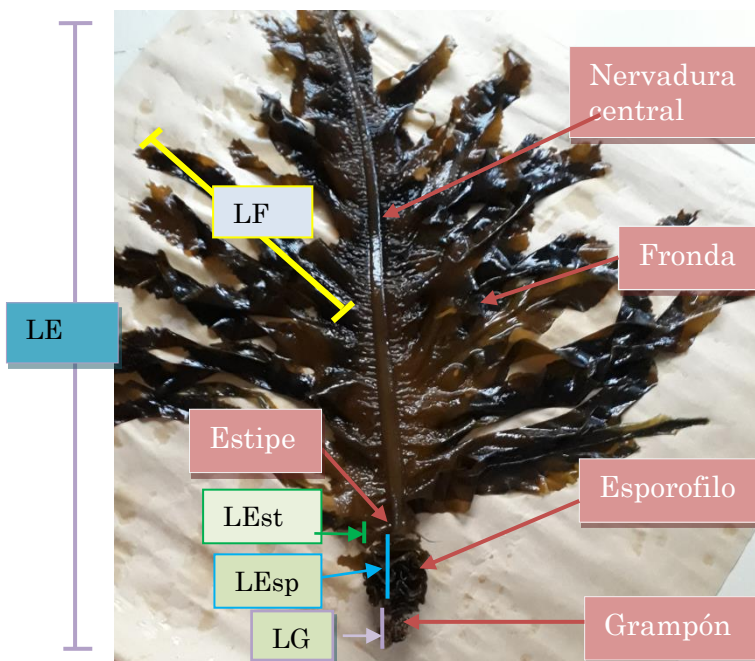


Figura 6.1. Partes morfoanatómicas de *Undaria pinnatifida* colectada en Bahía Bustamante. LE: longitud del esporofito, LF: longitud de la fronda, LEst: longitud del estipe, LEsp: longitud de esporofilo, LG: longitud del grampón.

Con respecto a las características organolépticas, el olor y sabor de las distintas partes morfoanatómicas, mencionadas en la **Tabla 6.1** fueron clasificadas de acuerdo a una percepción personal. En el caso del olor se mantuvo incluso cuando las frondas del alga se encontraban secas y molidas.

6.2.2. Estudios químicos

Las algas sobreviven dentro de comunidades asociadas con otros organismos en un entorno altamente competitivo; además deben ser capaces de adaptarse a diferentes condiciones ambientales relacionadas con la localización geográfica de su hábitat, tales como temperatura, salinidad, luz, nutrientes, entre otras, lo cual les genera la necesidad de sintetizar diferentes metabolitos (Pérez et al., 2016). Debido a esto, la composición

química varía entre diferentes especies e incluso entre individuos de la misma especie, obteniéndose productos con diversas actividades biológicas que constituyen una fuente potencial de nuevos fármacos y un campo abierto a la investigación en Farmacognosia y Bioquímica Marina.

Un estudio preliminar que permita caracterizar en forma general una especie, se inicia con una extracción que permita obtener la mayor parte de los constituyentes químicos (extracto total o crudo o bruto). Para ello se debe utilizar un solvente que solubilice (y cosolubilice) la mayoría de los compuestos, siendo los más utilizados el etanol y el metanol (aunque éste último no se recomienda por la toxicidad).

6.2.2.1. Extracción, fraccionamiento, rendimiento y screening ficoquímico

En este trabajo de tesis, el material seco, reducido a polvo y conservado en un recipiente de plástico con tapa hermética, protegido de la humedad y de la luz, fue sometido a extracción y fraccionamiento según el protocolo señalado en el Capítulo 4 de esta tesis (sección 4.4.1, Figura 4.5). El rendimiento del extracto bruto fue del 16 %, lo cual resultó interesante ya que sin ser exhaustivo, se logró extraer una cantidad importante.

El screening químico realizado sobre el extracto y las distintas fracciones mostró los resultados que se presentan en la **Tabla 6.2**. De estos resultados se destacó mediante la intensidad de las reacciones cualitativas aplicadas, una importante proporción de hidratos de carbono, péptidos / aminogrupos y derivados fenólicos. No obstante no se obtuvo reacción positiva para el grupo de flavonoides ni para taninos. Otros estudios han descripto la presencia de flavonoides en distintas especies de algas marinas (Yoshie et al., 2002; Yoshie et al., 2003). En *U. pinnatifida* colectada en Japón se ha detectado la presencia de rutina, quercitrina y morina, además de catequinas (constituyentes de taninos de tipo condensados) (Yoshie et al., 2003). Con respecto a otras algas pardas investigadas en nuestros laboratorios, los flavonoides han sido evidenciados en *Lessonia vadosa* (Becerra, 2016).

Tabla 6.2. Resultados del screening fitoquímico de *Undaria pinnatifida* procedente de Bahía Bustamante.

Fracción	Grupo químico	Resultado
A	Hidratos de Carbono	+++
	Lípidos	+
	Péptidos / aminogrupos 1° y/o 2°	+++
	OH fenólicos	+++ (amarillo)
	Taninos	-
	Flavonoides	-
	B	Triterpenos
Esteroides		+
Quinonas		+
C	Lactona α -insaturada	-
	Leucoantocianidinas	-
	Alcaloides	++
D	Sales de NH_4^+	-

(IDENTIFICACION: positivo +, negativo -. INTENSIDAD: baja +, moderada ++, alta +++, muy alta ++++).

Dentro de los metabolitos detectados, se destacaron también en proporción importante, los péptidos y/o aminogrupos. Los péptidos constituyen moléculas muy versátiles en cuanto a su potencial farmacológico ya que han demostrado actividades tales como antioxidante, antihipertensiva, anticoagulante, antiproliferativa, antidiabética (Ngo et al., 2012).

De las actividades biológicas mencionadas en el párrafo anterior, la hipertensión arterial sigue siendo, pese a los importantes avances logrados en el conocimiento de su fisiopatología y de su abordaje terapéutico, uno de

los objetivos claves para el control de la mortalidad relacionada con patologías cardiovasculares (Verdecchia et al., 2008).

La búsqueda de péptidos bioactivos con propiedades antihipertensivas en algas pardas es de gran interés. Suetsuna et al. (2004) identificaron diez tipos de péptidos en *U. pinnatifida* colectada en Japón de los cuales cuatro disminuyeron significativamente la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas.

Además de esta importante actividad, otros investigadores pudieron determinar que los péptidos de *U. pinnatifida* proveniente de Japón estaban constituidos por aminoácidos esenciales en cantidad superior con respecto al patrón de requerimientos de aminoácidos en mg/g de proteína propuesto por la WHO (1973) (Tabla 6.3; Kolb et al., 2004), siendo este aporte de mayor relevancia aún si el alga fuera destinada a la alimentación.

Otro grupo de metabolitos destacados en el screening químico fueron los polifenoles, compuestos descritos con importantes actividades biológicas (Rodrigo et al., 2011). Cabe destacar el interés científico actual en ellos, debido a que se ha demostrado su importancia en la prevención de enfermedades relacionadas con el envejecimiento celular entre las que se destacan, por su mayor incidencia, las patologías cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Quitral et al., 2012).

Se sabe que las bacterias son los organismos más abundantes en los ecosistemas naturales, donde juegan un papel importante en la absorción y degradación de compuestos orgánicos. Zhao et al. (2018) analizaron muestras de aguas costeras durante el desarrollo de *U. pinnatifida* en Japón y observaron que, durante el período de crecimiento del alga, las colonias bacterianas mostraron variaciones. Por ejemplo, las flavobacterias aumentaron su desarrollo, en tanto que las β -proteobacterias disminuyeron. Si bien estos autores atribuyeron como posibles factores de influencia a la temperatura, oxígeno disuelto, pH y nitrógeno, otros investigadores han demostrado el rol de metabolitos biosintetizados por el alga,

fundamentalmente quinonas, esteroides, alcaloides y terpenos, los cuales también han sido evidenciados en la presente tesis. (Pérez et al., 2016).

Tabla 6.3. Contenido de aminoácidos de *Undaria pinnatifida* proveniente de Japón con respecto al patrón de requerimientos de aminoácidos en mg/g de WHO (WHO, 1973) (Fuente: Kolb et al., 2004 modificado).

Aminoácidos	<i>U. pinnatifida</i>	Proteína de referencia WHO
mg/g de proteína		
Histidina (His)	32	19
Isoleucina (Ile)	49	28
Leucina (Leu)	84	66
Lisina (Lys)	68	58
Metionina + Cisteína (Met + Cys)	37	25
Fenilalanina + Triptófano (Phe+Tyr)	74	63
Treonina (Thr)	45	34
Triptofano (Trp)	3	11
Valina (Val)	103	35
Total	495	339

Estos resultados motivaron nuestro estudio de actividad antibacteriana en los extractos de *U. pinnatifida* colectada en la costa de Comodoro Rivadavia. Los alcaloides detectados en nuestro análisis fitoquímico resultaron ser interesantes considerando que se observó su presencia no sólo con el reactivo de Dragendorff (muy sensible), sino también con el reactivo de Mayer que detecta cantidades apreciables.

Los alcaloides del tipo β -carbolina del grupo harmala (HAlks), son una familia de compuestos bioactivos presentes fundamentalmente en distintas especies vegetales, entre las que se destacan por su alta concentración a *Peganum harmala* y *Banisteriopsis caapi* (Adhami et al., 2011). Dentro de este grupo, la harmina y la harmalina (Figura 6.2.a, c) son los principales alcaloides presentes en *B. caapi* (McIlhenny et al., 2012). Si bien estos metabolitos no han sido muy descriptos en algas, otros autores detectaron en *U. pinnatifida* trazas (de 7 a 24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de algas secas) de harmalina, harmalol y harmina (Figura 6.2.a, b, c); se observó además que sus proporciones variaban de acuerdo a la zona de colecta del alga (Adhami et al., 2011; Tascón et al., 2017). Estos antecedentes deberían ser considerados si se busca destinar el alga a la alimentación.

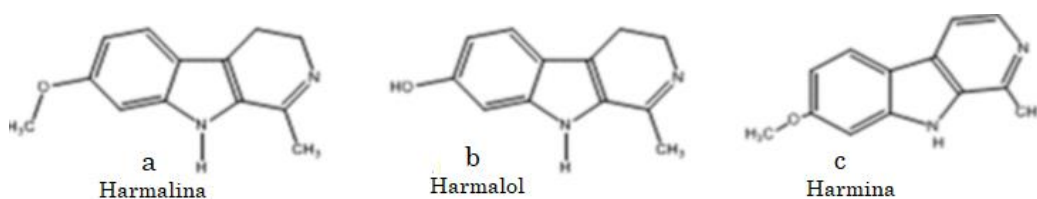


Figura 6.2. Alcaloides del tipo β -carbolinas presentes en *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae) (a, c) y en *U. pinnatifida* (a, b, c). Fuente: Tascon et al., 2015.

6.2.2.2. Otros estudios

6.2.2.2.1. Lípidos

Si bien las algas pardas se caracterizan por presentar bajo contenido en lípidos, tanto simples como complejos, entre 1 y 5 % del peso seco del alga (Lordan et al., 2011), en nuestro caso el rendimiento de la extracción de Folch fue de 13,6 %, lo cual representa una cantidad interesante.

Para poder determinar el perfil lipídico del extracto alcohólico crudo obtenido para el screening fitoquímico (**FABB**) y del extracto preparado según la metodología de Folch (**EFBB**), se emplearon dos sistemas cromatográficos planares (ver Capítulo 4, Desarrollo Experimental). La **Figura 6.3.a**, presenta el cromatograma bidimensional correspondiente al **EFBB** y la **Figura 6.3.b**, el cromatograma monodimensional desarrollado para **EFBB** y **FABB**, en comparación con el ácido palmítico utilizado como patrón.

La cromatografía en capa delgada (TLC) es utilizada ampliamente para la separación y determinación del perfil lipídico, tanto de lípidos simples como complejos. Los lípidos complejos se pueden separar con dos migraciones sucesivas en dirección perpendicular entre sí (TLC bidimensional). La separación más eficiente puede ser lograda usando sistemas de solventes de contraste, es decir, una fase de característica neutra o básica en la primera dirección, seguida de una fase ácida en la segunda dirección (Peterson y Cummings, 2006).

En la presente tesis, ambos cromatogramas (mono y bidimensional) mostraron un perfil lipídico complejo, resultando destacable la fuerte y persistente coloración que se obtuvo con vapores de yodo, lo cual sugiere proporciones interesantes de los grupos de lípidos separados y la presencia de ácidos grasos insaturados. En el cromatograma bidimensional (**Figura 6.3.a**) pudimos observar la presencia de pigmentos y lípidos neutros

(extremo superior derecho) y una zona correspondiente a fosfolípidos, de composición variada (margen inferior central).

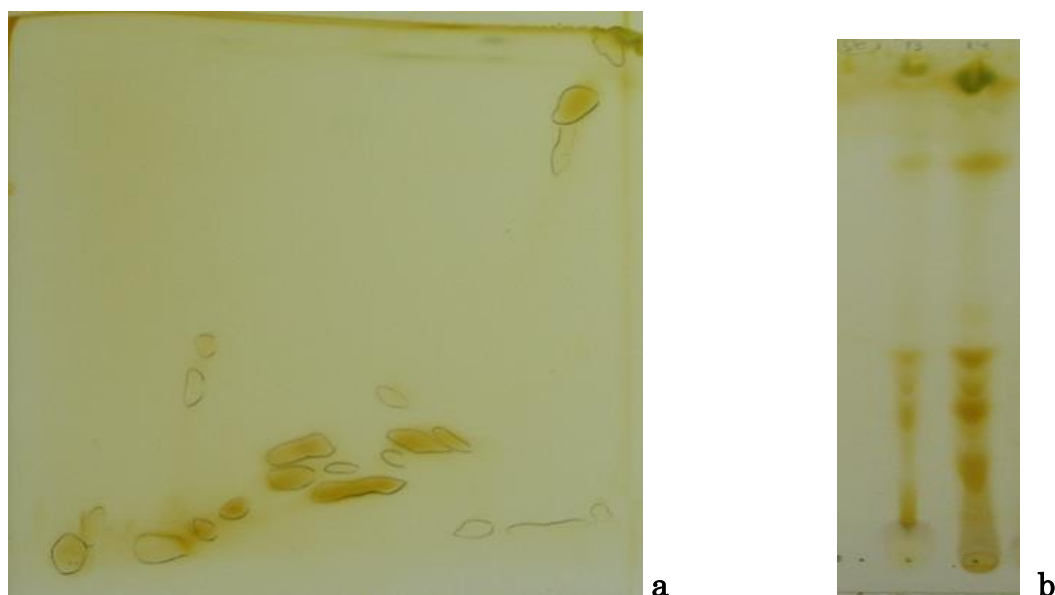


Figura 6.3. a. Perfil bidimensional de **EFBB** de *U. pinnatifida* colectada en Bahía Bustamante; **b.** Cromatograma monodimensional en donde la primera calle corresponde al patrón ácido palmítico, la calle 13 contiene a **EFBB** y la calle 14, a **FABB** de la misma especie.

La **Tabla 6.4** muestra los resultados que se obtuvieron de la cromatografía monodimensional (**Figura 6.3.b**) en la que se señalan la presencia o ausencia de distintos lípidos en **EFBB** y **FABB**, detectados por comparación de los Rf correspondientes con bibliografía (Hellebust y Craigie, 1978).

Monogalactosildiacilglicerol (MGDG), digalactosildiacilglicerol (DGDG), sulfoquinovosildiacilglicerol o sulfolípidos (SL) y fosfatidilglicerol (PG), son los principales lípidos presentes en las membranas celulares de las algas. Estos lípidos, por lo general, están altamente enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados (Harwood, 1998) pertenecientes a las series $\omega 3$ y $\omega 6$ (Wang et al., 2013).

Tabla 6.4. Lípidos detectados mediante cromatografía planar monodimensional, en el extracto alcohólico (**FABB**) y en el extracto de Folch (**EFBB**) de *Undaria pinnatifida* colectada en Bahía Bustamante.

Lípidos	<i>Undaria pinnatifida</i>	
	FABB	EFBB
fosfatidilcolina (PC)	+	+
fosfatidiletanolamina (PE)	+	+
sulfolípidos (SL)	+	-
digalactosil diacilglicérido (DGDG)	+	+
glicósido de esteroles (GS)	+	-
fosfatidilglicerol (PG)	+	-
monogalactosil diacilglicérido (MGDG)	+	+
pigmentos y lípidos neutros (PIG +LN)	+	+
ácido fosfatídico (AP)	-	-
fosfatidilserina (PS)	-	-
ácido palmítico	+	+

Estudios realizados sobre diferentes especies que contenían ácidos grasos poliinsaturados esenciales $\omega 3$ y $\omega 6$, destacaron la presencia de C18:4 $\omega 3$ y C20:4 $\omega 6$ en proporciones variables, desde 1/6 hasta 1/2 con respecto a los ácidos grasos poliinsaturados totales (Li et al., 2002; Sánchez-Machado et al., 2004; Bouloma et al., 2014). Los ácidos grasos poliinsaturados tienen beneficios en la salud por su capacidad antiinflamatoria, anticancerígena, antihipertensiva y también contra la diabetes y obesidad (Maeda et al., 2005; Simopoulos, 2008; Xia et al., 2013).

Desde un punto de vista cualitativo la proporción de ácidos grasos esenciales en algas es mayor que en plantas terrestres, además sintetizan gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, en los que destaca el ácido eicosapentaenoico, C20:5 $\omega 3$ (EPA) y el docosahexaenoico, C22:6 $\omega 3$ (DHA) que derivan vía desaturasas y elongasas del ácido α -

linolénico C18:3 ω 3 (ALA), pertenecientes a la familia de ácidos grasos ω 3 (Lopez-Huertas, 2010). El consumo de estos ácidos grasos se relaciona con una disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, particularmente enfermedad coronaria (Sirot et al., 2012). El efecto biológico de EPA y DHA es variado, involucrando entre otras, a la función cardíaca, endotelial, reactividad vascular y fisiología cardíaca, así como un efecto antiinflamatorio y antiplaquetario (Lopez-Huertas, 2010; Urbano y Goñi, 2002).

La inflamación es una característica clave en una serie de patologías, como las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer, inflamación intestinal crónica, artritis reumatoidea, asma entre otras (Rodrigo et al., 2011). Por ello los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ω -3 son candidatos terapéuticos ideales para la prevención y/o el tratamiento de patologías donde la inflamación juega un rol central.

En la **Tabla 6.5** se presentan la proporción de los ácidos grasos esenciales C18:3 ω 3 (ácido linolénico) y C18:2 ω 6 (ácido linoleico) así como la relación ω 6/ ω 3 presentes en extractos de dos algas pardas. Estos resultados son indicativos del alto potencial de *U. pinnatifida* para su aplicación en salud, por presentar una relación ω 6/ ω 3 baja, ideal para tal fin.

Tabla 6.5. Contenido de lípidos totales, ácido α -linolénico C18:3 ω 3, ácido linoleico C18:2 ω 6 y su relación en dos algas pardas

Alga	Lípidos totales g/100 g	Acido α -linolénico C18:3 ω 3	Acido linoleico C18:2 ω 6	Relación ω 6/ ω 3	Referencia
<i>Laminaria</i> sp.	1,0 \pm 0,3	0,76 \pm 0.93	5,48 \pm 3.44	7,21	Dawczynski et al., 2007
<i>Undaria pinnatifida</i>	4,5 \pm 0,7	11,2 \pm 0.53	7,41 \pm 0.47	0,66	

La presencia de fosfatidilcolina (PC), marcador quimiotaxonómico, mencionado en el Capítulo 2 de la Introducción de esta tesis, confirmó la ubicación de *U. pinnatifida* en el grupo de las Laminariales que contienen

esta sustancia. Otro lípido destacado es el glicósido de esterol detectado en **FABB**, el que también resulta interesante, pudiendo ser al menos en parte, responsable de la reacción positiva obtenida para el grupo esteroide.

Cabe señalar que es posible inducir el aumento de ácidos grasos poliinsaturados, sometiendo a las algas a condiciones de estrés tales como alta radiación y déficit de nutrientes (Xia et al., 2013; Harwood, 1998). Por lo tanto estos factores ambientales pueden tener un efecto significativo en la composición de ácidos grasos, por lo que debe ser tenido en cuenta al momento de efectuar una colecta algal.

6.2.2.2.2. Pigmentos

El estudio efectuado mediante perfiles cromatográficos evidenció la presencia de clorofilas *a*, *c*; clorofilide *a*, violaxantina y $\beta\beta$ -caroteno.

Estos pigmentos han sido descritos como característicos de las algas pardas, además de la fucoxantina.

Dentro de los pigmentos naturales presentes en algas pardas se destaca la fucoxantina, carotenoide que incluye un enlace alélico y algunos grupos funcionales oxigenados como epoxi, hidroxilo, carbonilo en su molécula. La fucoxantina proporciona efectos protectores sobre el hígado, los vasos sanguíneos del cerebro, los huesos, la piel y los ojos (Piovan et al., 2013). Tiene propiedades contra la obesidad, diabetes y la malaria; además, ha resultado muy eficaz para inhibir el crecimiento de células cancerígenas (Kim y Pangestuti, 2011).

Fung et al. (2013) investigaron el contenido de fucoxantina y las propiedades antioxidantes en *U. pinnatifida* colectada en Nueva Zelanda. Los resultados sugirieron que el contenido de fucoxantina muestra una variación en función del ciclo de vida y del lugar de colecta. Además, destacaron que la actividad antioxidante aumentaba directamente con el contenido de fucoxantina.

Investigaciones de Liu et al. (2013) han demostrado que el tratamiento previo con fucoxantina mejora la eficacia quimioterapéutica del cisplatino

(fármaco antitumoral ampliamente empleado en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer), potenciando la inhibición de la proliferación celular.

6.3. Estudio general de la especie colectada en Comodoro Rivadavia

6.3.1. Hábitat y ecología de la zona de colecta

En la zona central del GSJ, donde se encuentra Comodoro Rivadavia, evidentemente las características siguen siendo favorables para el desarrollo, crecimiento y reproducción de *U. pinnatifida*.

Durante la colecta estacional de los ejemplares se registraron la temperatura, salinidad y pH superficial promedio del agua intermareal, los cuales se muestran en la **Figura 6.5** y **Tabla 6.6**.

La temperatura fue el parámetro físico que presentó una marcada variación estacional (**Figura 6.5**), en tanto que no ocurrió lo mismo con la salinidad y el pH.

Akselman (1996) informó temperaturas similares a nuestros registros para verano y temperatura más alta para invierno (13,41 y 5,09 °C, respectivamente).

Además de los aspectos ya mencionados en la sección 6.1 de este capítulo del trabajo de tesis, en el GSJ intervienen las corrientes marinas subtropicales y las subantárticas. Dentro de estas últimas, la Corriente de Malvinas transporta aguas frías, con temperaturas que varían entre los 2 y los 8 °C, siendo sus aguas ricas en oxígeno y nutrientes, lo que fertiliza el océano a lo largo de su recorrido (Saraceno et al., 2012), Estas condiciones contribuyen al desarrollo y colonización de *Undaria* a lo largo del borde del talud continental.

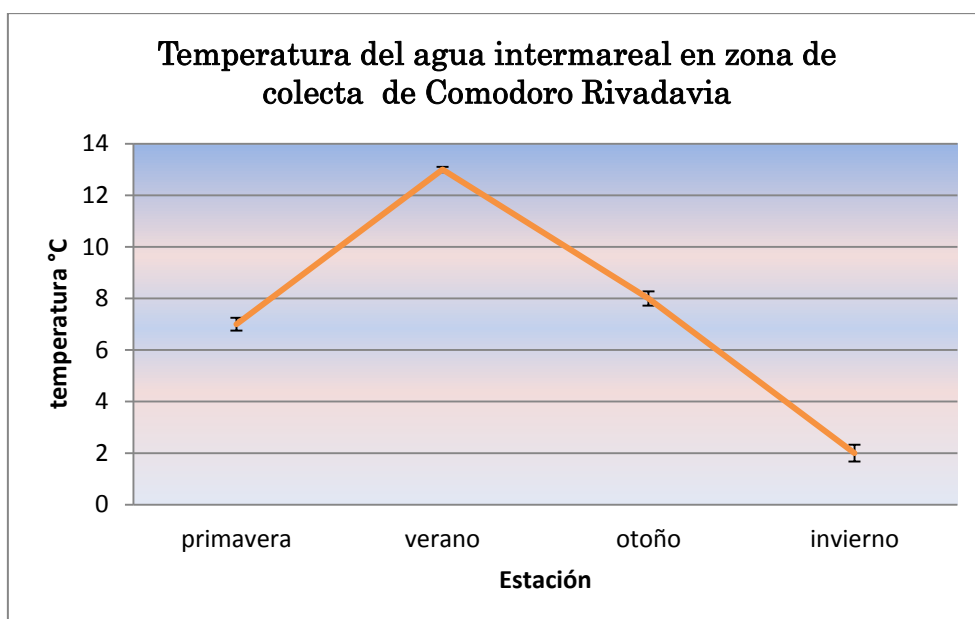


Figura 6.5. Temperatura del agua intermareal registrada en cada una de las estaciones, durante la colecta de *U. pinnatifida* en Comodoro Rivadavia, región central del Golfo San Jorge.

Tabla 6.6. Registro de la salinidad y pH promedio del agua intermareal en cada una de las estaciones durante la colecta de *U. pinnatifida* en Comodoro Rivadavia, región central del Golfo San Jorge.

Estación	Salinidad promedio	Rango de pH promedio
primavera	24 ± 0,8 g/l	8,2 ± 0,4
verano		
otoño		
invierno		

El ciclo de vida de *U. pinnatifida* se encontraría regulado principalmente por la temperatura del agua (Zhang, 1984; Hay y Luckens, 1987; Sanderson, 1990) y posiblemente también por la intensidad de la luz y el fotoperiodo, los cuales presentan una marcada variación estacional en esta zona del golfo (Martin y Bastida, 2008). La temperatura del agua en la costa de Comodoro

Rivadavia se encuentra dentro del rango de tolerancia de *U. pinnatifida* correspondiente a 3,5-24 °C (Zhang, 1984; Sanderson, 1990), posibilitando la adaptación de la especie y su éxito para colonizar este nuevo ambiente.

La salinidad del agua del intermareal de la zona de colecta fue baja con respecto al valor óptimo de crecimiento de *U. pinnatifida*, el cual está sobre los 27 g/l (Zhang et al., 1984). Sin embargo, coincidente con nuestros resultados, se ha observado que esta especie puede sobrevivir en aguas con salinidades menores tal como ocurre en Venecia (20 g/l) y en Nueva Zelanda (22-23 g/l), lo cual resulta indicativo una vez más de la capacidad de adaptación de la especie (Hay y Luckens, 1987; Sanderson, 1990).

Al igual como ocurre en las costas de Bahía Bustamante, en las costas de Comodoro Rivadavia *U. pinnatifida* se encuentra compartiendo el submareal con otras algas pardas de gran tamaño como *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia vadosa*, aunque en menor proporción en esta zona central del golfo (Boraso, 2013).

Para *Undaria pinnatifida* el tiempo de desarrollo de zoospora a esporofito microscópico (y, por lo tanto, la tasa de invasión) es más rápido en ambientes donde la luz y los nutrientes son conjuntamente abundantes, es decir donde el sombreado de especies que forman dosel (zona de los bosques de las macroalgas que se extienden hacia la superficie del océano) es escaso y el aporte de nutrientes antrópicos es considerable (Morelissen et al., 2013). Por ello la zona de colecta resulta apropiada para su crecimiento, desarrollo y dispersión.

Todas las condiciones mencionadas en los párrafos anteriores hacen que actualmente en las costas de colecta, se observe que el intermareal y las arribazones están compuestas principalmente por *U. pinnatifida*. Antes de 1998, las especies que predominaban en las costas de la Patagonia eran *Ulva* sp., *Gracilaria gracilis* y *Macrocystis pyrifera* (Piriz et al., 2003).

6.3.2. Colecta, herborizado, conservación y molienda

La colecta estacional de los ejemplares se realizó manualmente en el intermareal de las Costas de Comodoro Rivadavia. Un ejemplar de cada estación se herborizó y depositó en el HRP (ver Capítulo 4).

La conservación y molienda del material en estudio se realizó según lo descrito en la sección 4.2 de esta tesis.

6.3.3. Aspectos macroscópicos y organolépticos

Los mismos criterios empleados para describir los ejemplares de Bahía Bustamante, fueron usados para el material colectado en las costas de Comodoro Rivadavia.

Las características organolépticas de los ejemplares colectados estacionalmente en nuestras costas mostraron similitudes con respecto a la muestra colectada en Bahía Bustamante. El color que presentaba *U. pinnatifida* en ambas zonas de colecta difiere de lo indicado por la FAO (2012), en donde se describe que tanto el esporofilo como el esporofito son más claros que en nuestro estudio. Esto podría explicarse al menos en parte, por diferencias en los pigmentos considerando las características medio ambientales de nuestra región, fundamentalmente la incidencia de la luz (cantidad y tipo de radiación), temperatura, salinidad, flora acompañante, entre otros factores.

Dentro de las características macroscópicas, el tamaño de las distintas formas anatómicas mostró diferencias significativas entre estaciones (**Figura 6.6**). Además, algunos de los ejemplares colectados en una misma estación, mostraban también variaciones morfoanatómicas.

En todas las estaciones se observó la presencia de la especie en el intermareal. Sin embargo cada estación presentó características propias del momento en el ciclo de vida en que se encontraba el alga. Así, los ejemplares colectados en primavera fueron considerablemente más jóvenes en

comparación con los de verano, donde los esporofitos presentaban esporofilos desarrollados en el 80 % del total de la muestra colectada, indicando que los ejemplares se encontraban en la etapa reproductiva de su ciclo de vida. En otoño la presencia de esporofitos en la zona intermareal fue escasa.

Las características mencionadas en el párrafo anterior también fueron registradas en Puerto Deseado (Santa Cruz) en donde los valores de densidad y biomasa media fueron muy bajos (0,33 individuo/m²; 5,69 g/m², respectivamente) durante el otoño, mientras que durante el invierno se registró un aumento gradual de los mismos, alcanzando el máximo en la primavera (Martín y Bastida, 2008) y principios del verano (Cremades-Ugarte et al., 2006).

Las variaciones longitudinales de las distintas partes morfoanatómicas que observamos en el esporofito, fronda y esporofilo guardaron relación con el ciclo de vida de *U. pinnatifida* (**Figura 6.6**). La talla de los esporofitos de la especie colectada en Comodoro Rivadavia (GSJ) resultó menor que en el caso de la procedente del Golfo Nuevo (hasta 180 cm de longitud, Casas y Piriz 1996). Al comparar los resultados de las partes anatómicas analizadas, se observa que la especie presenta un patrón estacional en el crecimiento y la maduración del esporofito, similar al observado en el Golfo Nuevo (norte de la Patagonia) y Puerto Deseado (sur de la Patagonia) donde la especie también ha colonizado (Casas y Piriz, 1996; Aguilar Rosas et al., 2004; Cremades-Ugarte et al., 2006; Martín y Bastida, 2008).

En nuestro estudio la variabilidad de *U. pinnatifida* dentro de cada estación demostró su alta plasticidad fenotípica en respuesta a los factores ambientales externos como el movimiento del agua, condiciones de luz y la concentración de nutrientes en el medio ambiente, en concordancia con lo descrito por Peteiro (2014).

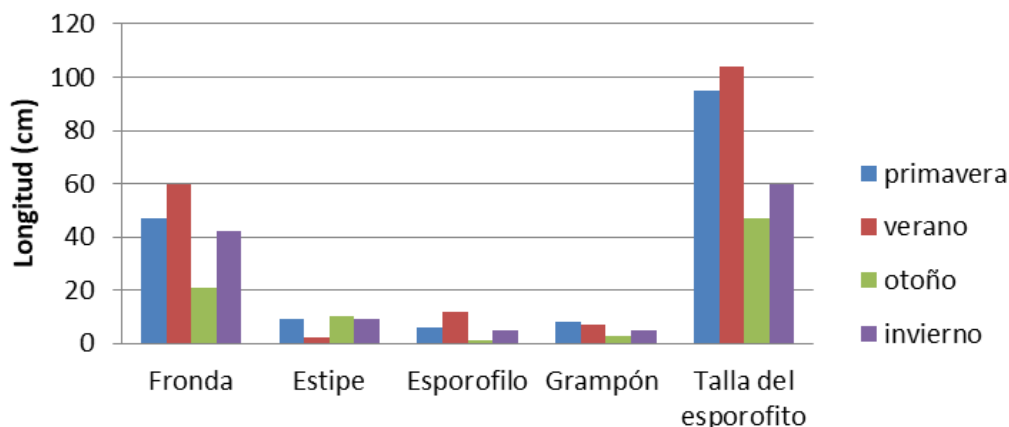


Figura 6.6. Longitud de las distintas partes morfoanatómicas de *Undaria pinnatifida* colectada estacionalmente en las costas de Comodoro Rivadavia, en la región central del Golfo San Jorge.

6.3.4. Aspectos microscópicos

6.3.4.1. Microscopía óptica

La observación microscópica se realizó sobre cortes de las distintas partes anatómicas de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente, destacando las frondas por ser la parte morfológica empleada en esta tesis. Dependiendo de la parte morfológica analizada, se realizaron cortes longitudinales y/o transversales.

En las frondas, nervadura central, esporofilo y hapterios del grampón se observó la presencia de paredes celulares gruesas y abundante cutícula (**Figura 6.7**). En este caso se trabajó sobre un corte transversal de las frondas; tal como se observa en la fotografía, se diferenciaron tres zonas bien definidas, mostrando cada una de ellas formas y disposiciones celulares propias.

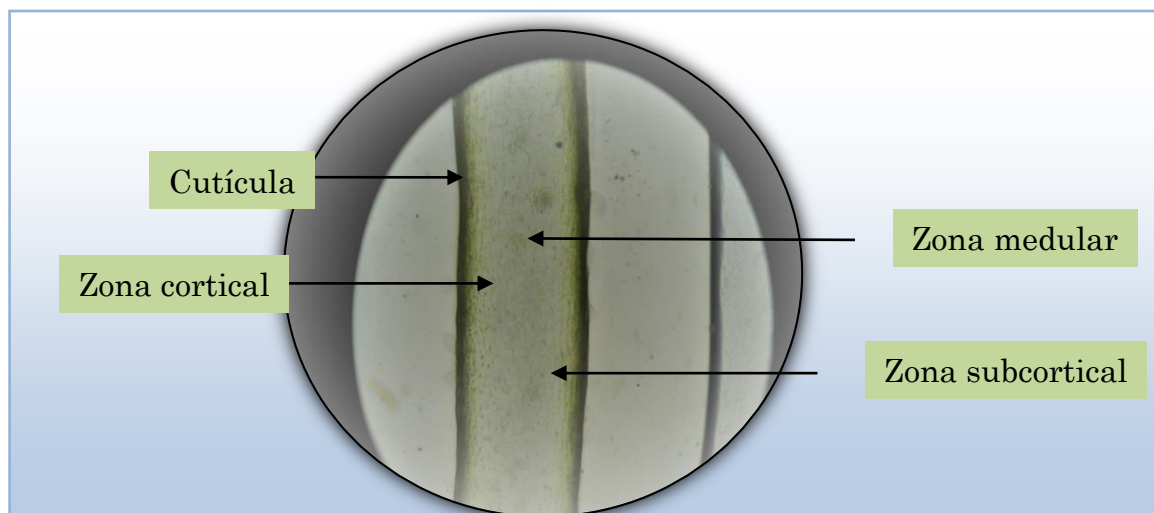


Figura 6.7. Corte transversal de la fronda de *U. pinnatifida* colectada en Comodoro Rivadavia, en que se muestran las distintas zonas en las que se disponen las células (40X).

Además en distintas zonas se observaron cavidades de diámetro variable, rodeadas por células irregulares con una disposición radial, siendo abundantes en primavera y en menor proporción en otoño (**Figura 6.8**). En la zona cortical de las frondas se observaron células glandulares y células pequeñas y regulares con depósito de pigmento, aumentando de tamaño a medida que se avanzó hacia la médula. En la médula, las células se tornaron irregulares, voluminosas e inmersas en polisacáridos (corte longitudinal); estas características fueron comunes en las cuatro estaciones. Tras un corte longitudinal de la nervadura de las frondas de las cuatro estaciones, en primavera, verano e invierno se observaron pelos semejantes a los tectores, y cristales de dimensiones importantes en primavera e invierno. Los cristales presentaban en su mayoría la forma de drusas, y en ocasiones forma de abanico (**Figura 6.9**).

En el esporofilo se destacaron los esporangios pluriloculares con abundantes esporas en verano. Las células de los esporangios y los hapterios del grampón, eran turgentes destacándose en primavera.

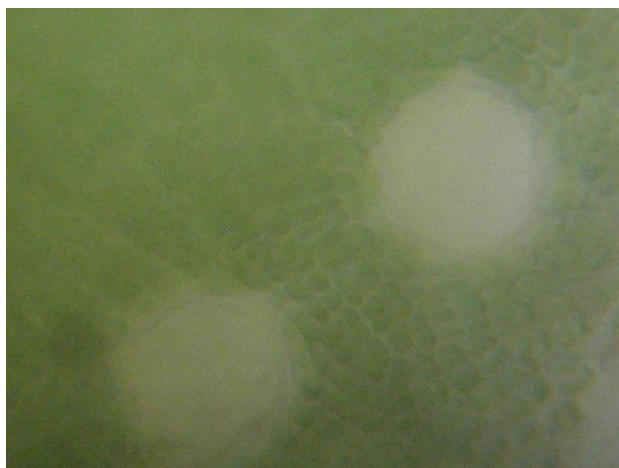


Figura 6.8. Cavidades observadas en un corte transversal de las frondas de *U. pinnatifida* colectada en Comodoro Rivadavia (40X).

En las cuatro estaciones la estructura histológica de las frondas de *U. pinnatifida* resultó similar a la de otras especies de algas pardas del orden Laminariales, como por ej. *Lessonia nigrescens* (Scrosati, 1993). En nuestro caso se observó una pared con células en disposición concéntrica rodeadas por una matriz intercelular amorfa.

En cortes longitudinales de la nervadura y fronda de las cuatro estaciones se observó la presencia de abundantes filamentos. Las Laminariales presentan filamentos que se originan a partir de células corticales internas, característica propia del orden (Sideman y Scheirer, 1977). En la **Figura 6.10** se muestran tales filamentos que forman las placas o tubos cribosos, los cuales fueron definidos como filamentos cribosos medulares (Esau, 1969). Estos últimos están asociados al transporte de sustancias orgánicas e inorgánicas a lo largo del esporofito y son característicos del orden Laminariales (Penot, 1992).

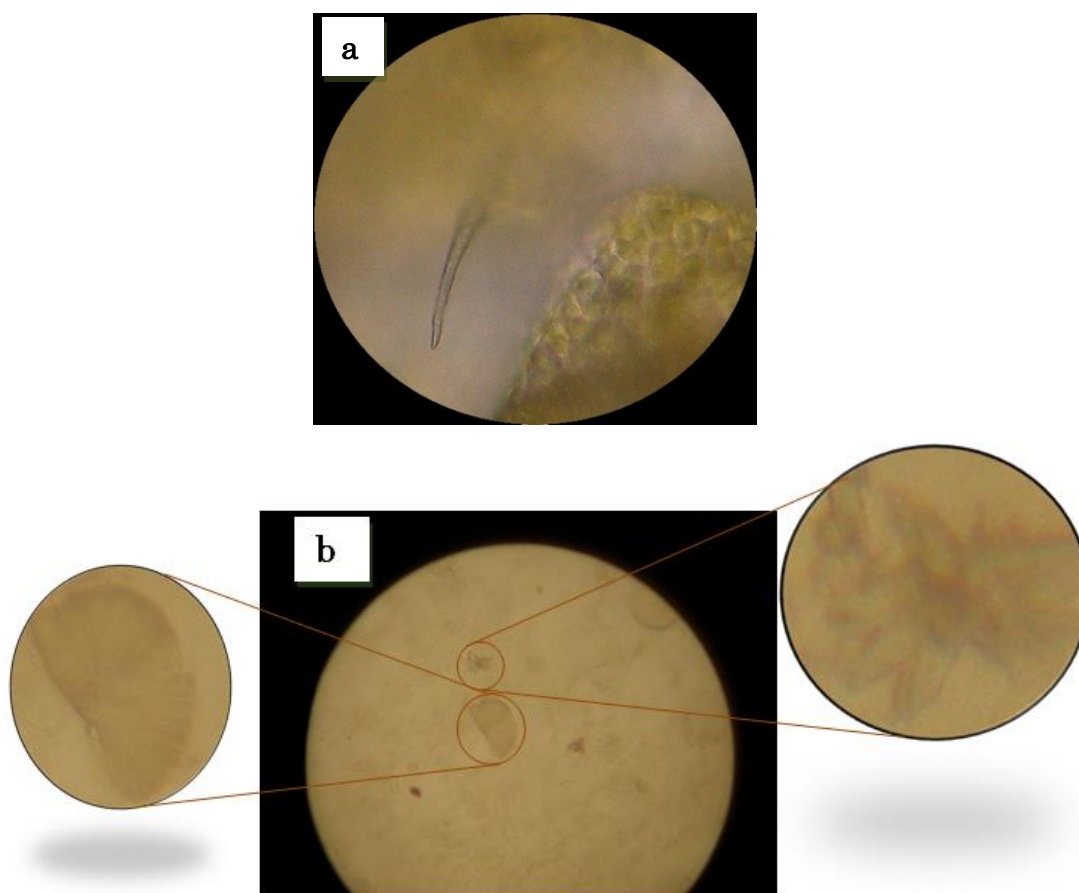


Figura 6.9. Pelo semejante al tector (a) y cristales (b) presentes en la nervadura central de *U. pinnatifida* colectada en primavera, en las costas de Comodoro Rivadavia (corte longitudinal, 40X).

La presencia de las cavidades concéntricas y las disposiciones de las células meristemáticas y corticales observadas en esta tesis en las frondas de *U. pinnatifida*, había sido descripta para el género *Undaria* (Lee y Yoon, 1998). No ocurre lo mismo con los pelos y cristales detectados, los cuales aún no se encuentran descriptos en bibliografía, por lo que nuestros resultados constituyen un nuevo aporte al conocimiento integral de los caracteres morfológicos del alga que habita la región central del Golfo San Jorge.



Figura 6.10. Filamentos presentes en el la nervadura de *Undaria pinnatifida* colectada en las costas de Comodoro Rivadavia (corte longitudinal 40X).

6.3.4.2. Histoquímica

Para avanzar en un estudio integral, es necesario poder localizar histológicamente aquellos grupos químicos más relevantes; para ello se emplearon diferentes tinciones histoquímicas a fin de identificar y localizar diferentes grupos a nivel tisular. Sobre las frondas de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente, se efectuaron determinaciones histoquímicas de hidratos de carbono, fenoles, lípidos y proteínas, cuyos resultados se presentan a continuación.

Con la aplicación de Lugol, reactivo para hidratos de carbono de reserva tipo almidón y dextrinas (**Figura 6.11.a**), se visualizó que se localizaban mayoritariamente en la matriz intercelular, paredes celulares y cutícula, destacándose en las frondas de invierno.

La observación efectuada mediante la utilización del reactivo Sudán III, permitió ubicar la presencia de cuerpos lipídicos en las cuatro estaciones, los

cuales se distinguieron como pequeñas manchas rojizas oscuras, resultando más acentuadas en invierno (**Figura 6.11.b**).

Los fenoles se detectaron con FeCl_3 al 1 %; estos metabolitos se localizaron en los fisodes, en la región subcortical de la fronda en cercanías de la nervadura. Esto fue característico para todas las estaciones. Se observaron manchas amarillas en el interior de pequeñas vacuolas, lo cual fue indicativo de la presencia de fenoles con oxhidrilos no adyacentes o con un solo oxhidrilo libre (**Figura 6.11.c**). En cuanto a las péptidos y/o aminogrupos 1° y 2° , fueron detectados con Ninhidrina, localizándose sobre todo en paredes y cutícula, en mayor proporción en primavera y verano (**Figura 6.11. d**).

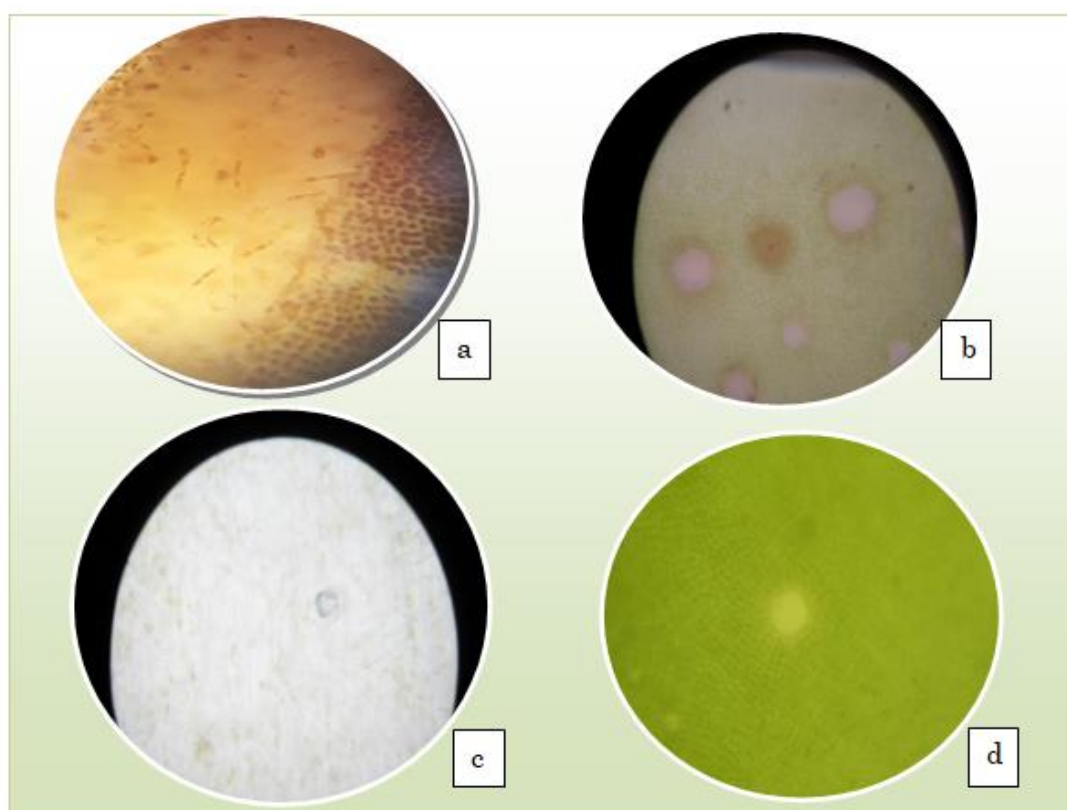


Figura 6.11. Observación mediante microscopía óptica (40X) de cortes de las frondas de *Undaria pinnatifida* colectada estacionalmente en Comodoro Rivadavia, sometidos a distintas tinciones. **a.** Hidratos de carbono en primavera, con Lugol; **b.** Lípidos en verano, con Sudan III; **c.** Fenoles en verano con FeCl_3 ; **d.** Péptidos y/o aminogrupos 1° y 2° en verano con Ninhidrina.

6.3.4.3. Microscopía electrónica de barrido

Considerando que existe aún escasa descripción a nivel microscópico de la especie en estudio, sobre todo para el alga que habita en nuestra región, se analizaron también características superficiales de fronda, esporofilo y nervadura de ejemplares colectados en primavera e invierno, por microscopía electrónica de barrido (MEB).

Las observaciones en la fronda de ambas estaciones, permitieron describir una superficie irregular con borde externo continuo y esponjoso. El esporofilo, también de ambas estaciones presentó bordes convexos; en el caso de primavera se encontró además una zona de liberación de esporas (**Figura 6.12 a, b**). Choi et al. (2007) describieron que los esporofitos maduros liberan esporas del esporofilo situado en la parte basal del estipe.

La nervadura para ambas estaciones, mostró una superficie acanalada longitudinalmente (**Figura 6.12 c, d**).

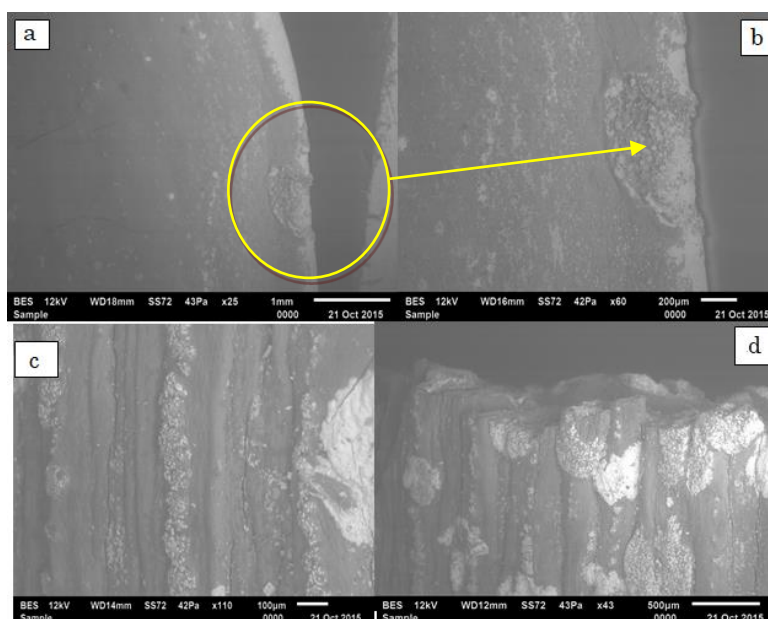


Figura 6.12. Imágenes de la superficie externa observadas mediante MEB, del esporofilo y nervadura de *U. pinnatifida* colectada en Comodoro Rivadavia, en primavera e invierno. **a, b.** Esporofilo de primavera destacando una zona de liberación de esporas; **c, d.** Nervadura en ejemplares de invierno con superficie acanalada, destacándose también filamentos.

Los resultados de los estudios microscópicos descriptos, fundamentalmente los de histoquímica y de MEB, constituyen un novedoso aporte al conocimiento integral de la especie que habita la región central del Golfo San Jorge.

6.3.5. Obtención de extractos crudos alcohólicos

Para la extracción exhaustiva de los distintos metabolitos biosintetizados por la especie en estudio, se realizó un tratamiento con etanol acuoso al 80 % (v/v) a temperatura ambiente por 24 h, seguida de una maceración a 4 °C por 24 h más y posteriormente una digestión a 70 °C, también por 24 h, dando lugar a **EOH1** y **EOH2**, respectivamente. Las frondas secas reducidas a polvo de las cuatro estaciones, fueron sometidas a la mencionada extracción, siguiendo el protocolo de trabajo que se presentó en el Capítulo 4 de esta tesis. Los marcos se continuaron trabajando para la obtención de alginato de sodio purificado.

Los rendimientos, expresados en % con respecto al peso del alga seca molida, resultaron mayores en el caso de **EOH1** para primavera e invierno, mientras que para verano resultó destacable para **EOH2** (**Figura 6.13**).

Estudios realizados en distintas especies de algas marinas demostraron que los rendimientos de la extracción obtenidos a partir de *Sargassum* sp., *Dictyota* sp., *Sargassum cymosum*, *Caulerpa mexicana* y *Laurencia* sp., con una mezcla cloroformo/metanol 2:1 y posterior separación de los metabolitos en metanol, presentaron porcentajes variables de acuerdo a la especie analizada y el solvente empleado. En metanol, los mayores porcentajes correspondieron a *Caulerpa mexicana*, *Sargassum cymosum* y *Laurencia* sp. con valores de 7,94; 6,77 y 6,33 % respectivamente, seguidos de *Dictyota* sp. y *Sargassum* sp. con un 2,84 y 0,64 %, respectivamente (Echavarría et al., 2009).

Otro estudio demostró que el extracto etanólico al 95 % v/v, clorofórmico y decocto (extracción con agua destilada a ebullición) de *Undaria pinnatifida*,

Porphyra umbilicalis y *Himanthalia elongata*, variaba con respecto a distintos metabolitos, entre ellos los compuestos fenólicos que fueron significativamente diferentes entre las especies. En el caso de *U. pinnatifida* mostró un 25,12; 7,24 y 11,12 mg/g, en tanto que para *Porphyra umbilicalis* los valores fueron de 8,43; 3,21 y 4,41 mg/g y *Himanthalia elongata* 34,43; 11,56 y 18,45 mg/g con respecto al ácido gálico para los extractos etanólico, clorofórmico y decocto, respectivamente. Estos resultados demuestran que el contenido de determinados metabolitos presentes en un extracto está relacionado con la especie analizada y el tipo de solvente empleado (Schultz Moreira, et al., 2014).

Nuestros resultados muestran que otro factor a tener en cuenta cuando se plantea una determinada extracción de una especie es la época del año en la que se realiza la colecta.

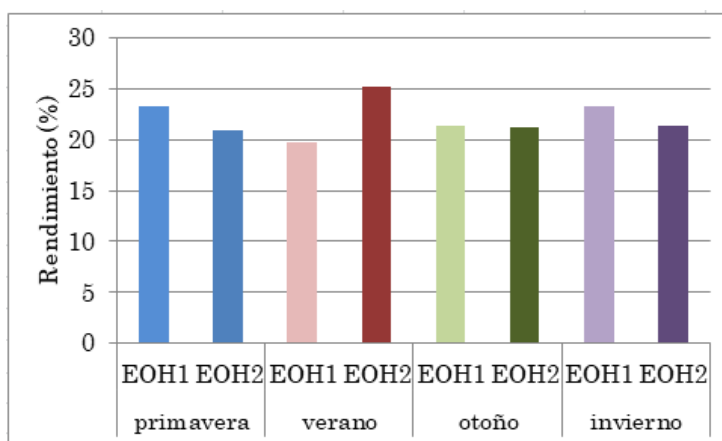


Figura 6.13. Rendimientos de los extractos obtenidos con etanol acuoso al 80 %, a temperatura ambiente (EOH1) y a 70 °C (EOH2), a partir de las frondas reducidas a polvo de *Undaria pinnatifida* colectada estacionalmente, en las costas de Comodoro Rivadavia.

6.3.6. Screening fitoquímico

Se realizó sobre los extractos etanólicos (EOH1 y EOH2) de las frondas colectadas estacionalmente en Comodoro Rivadavia. Los resultados

evidenciaron una proporción importante en hidratos de carbono, compuestos fenólicos, aminoácidos y/o péptidos y lactona α -insaturada (**Tabla 6.7**).

Los esteroides y triterpenos mostraron variación estacional y con respecto a la temperatura (70 °C) empleada para la extracción.

En las últimas décadas se han estudiado a los esteroides por sus propiedades para hacer frente a enfermedades cardiovasculares, al desarrollo de cáncer de colon y mama, como hipocolesterolemiante e hipolipemiante (Choudhary y Tran, 2011; Yuan, 2008). Estudios recientes señalaron que el fucosterol presente en el extracto de *Undaria pinnatifida*, presentó actividad antiinflamatoria (Yoo et al., 2012).

Otros resultados para este estudio estacional del alga colectada en Comodoro Rivadavia, que se diferencian de los obtenidos en el análisis preliminar efectuado con ejemplares colectados en Bahía Bustamante (ver primeras secciones del presente capítulo), fueron la ausencia de alcaloides en todos los casos y la presencia de taninos, presumiblemente florotaninos ya que se observó coloración amarilla indicativa de la presencia de hidroxilos fenólicos aislados. Los taninos se detectaron en los extractos alcohólicos exhaustivos (**EOH1** y **EOH2**) de todas las estaciones a excepción de verano, lo que sugiere una variación espacio-temporal, coincidiendo con los resultados obtenidos en algas verdes colectadas también en las costas de Comodoro Rivadavia (Uhrich et al., 2016).

Las algas que habitan en la zona intermareal, están expuestas a radicales libres y otros agentes oxidantes (Rodríguez-Troncoso et al. 2013). Una de las estrategias que emplean como mecanismo de defensa, es la síntesis de distintos metabolitos con actividad antioxidante, destacándose entre ellos los compuestos fenólicos (Bellassoued et al. 2012).

Tabla 6.7. Screening fitoquímico de los extractos etanólicos EOH1 y EOH2 obtenidos a temperatura ambiente y a 70 °C, respectivamente, de las frondas de *Undaria pinnatifida* colectada estacionalmente en las costas de Comodoro Rivadavia.

Grupo químico	Reactivo	primavera		Verano		otoño		invierno	
		EOH1	EOH2	EOH1	EOH2	EOH1	EOH2	EOH1	EOH2
Hidratos de carbono	Molisch	+++	+++	++	++	++	+	++	++++
OH fenólicos	FeCl ₃ 1 %.	+*	+	+	+	+	+	+	+
Taninos	quinina 0,25 %.	-	+++*	-	-	+++*	+++*	+++	+++
Flavonoides	Shinoda	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteroides	Liebermann-	+	+	-	-	-	+	-	-
Triterpenos	Burchard	-	+	+	+	+	+	+	+
Cardenólidos	Kedde	+++	++	+	+	++++	++	++++	+++
Aminogrupos primarios y secundarios	Ninhidrina	+++	++	++	+	++++	++	++++	+++
Lípidos	Ensayo de volatilidad y vapores de yodo	++	++	+	+	-	-	+	+
Quinonas	Bornträger	+	+	-	-	-	-	+	+
Alcaloides	Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-	-

(IDENTIFICACION: positivo +, negativo -. INTENSIDAD: baja +, moderada ++, alta +++, muy alta ++++). REFERENCIA: * amarillo, 1 OH fenólico aislado; ** opalescente).

Las algas pardas han demostrado contener concentraciones altas de compuestos antioxidantes, destacándose los florotaninos, habiéndose encontrado en especies de los órdenes Fucales y Dictyotales, de 20 a 30 % de estos polifenoles con respecto al peso seco del talo (Targett et al., 1995).

Los florotaninos, se depositan en vesículas del citoplasma llamadas fisodes y juegan un papel fundamental en múltiples funciones tanto a nivel celular como de supervivencia; por ejemplo, intervienen como mecanismo de defensa ante la presencia de herbívoros y en el proceso de anclaje del alga al sustrato (Pavia y Toth, 2000; Vreeland et al., 1998). Las concentraciones de estos metabolitos han mostrado variaciones espacio temporales en respuesta a parámetros ambientales, como la salinidad, la disponibilidad de nutrientes, luz solar, irradiación e intensidad de luz ultravioleta y presencia de herbívoros (Pavia y Toth, 2000; Abdala-Díaz et al., 2006; Connan et al., 2007).

Por lo expuesto, el contenido de polifenoles en la fronda, es un balance entre su síntesis y la excreción. Se han descrito dos fracciones internas de florotaninos: una fracción soluble en los fisodes del citoplasma y una fracción insoluble unida a la pared celular (Koivikko et al., 2005, Gómez y Huovinen, 2010). La proporción de excreción (florotaninos solubles) e insolubles puede ser afectada por procesos intrínsecos y de aclimatación estacional (Gómez y Huovinen, 2010). En *Lessonia nigrescens*, durante el verano cuando las algas están expuestas a altos niveles de radiación UV, se inducen los florotaninos solubles y se observa una alta tasa de excreción, habiendo un aumento de compuestos fenólicos en el agua circundante al alga. Esto reduce la transmisión de luz y las protege contra niveles altos de radiación UV (Pérez-Rodríguez et al., 2001). En cambio los florotaninos insolubles pueden estar relacionados con requerimientos de crecimiento, ya que el desarrollo de las frondas sucede durante el verano (Gómez y Huovinen, 2010). Esto implica que los florotaninos solubles no son estables y su concentración puede estar determinada por el equilibrio entre las tasas de síntesis y la cantidad necesaria para enfrentar los factores ambientales (Arnold y Targett, 2000).

Además, en las algas pardas, los florotaninos se convierten en componentes de las paredes celulares cuando los fisodes se fusionan con la membrana

celular, siendo secretados y finalmente se unen con el ácido algínico (Vreeland y Laetsch, 1990).

A diferencia de nuestros resultados, otros estudios describen la presencia de flavonoides en distintas especies de algas marinas (Yoshie et al., 2002; Yoshie et al., 2003). En las algas pardas *Lessonia vadosa* y *U. pinnatifida* colectadas en el GSJ en distintos años, se ha demostrado la presencia de flavonoides (Becerra, 2016; Ojeda, 2013). Yoshi-Stark et al. (2003) detectaron la presencia de rutina, quercitrina y morina, además de catequinas (constituyentes de taninos de tipo condensados), en extractos de *U. pinnatifida* procedente de Japón.

Dentro de las estrategias bioquímicas con que cuentan los organismos marinos para la subsistencia ante nuevos ambientes, se destaca la producción de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas (Kuhlisch et al., 2015), por lo que es posible pensar que los flavonoides detectados por Ojeda (2013) en *U. pinnatifida* sean consecuencia de su adaptación más reciente en el GSJ. A ello, tal vez puedan sumarse modificaciones posteriores del ambiente provocadas, por ejemplo, por contaminaciones debidas a nuevos derrames de hidrocarburos. En nuestro caso, la ausencia de los flavonoides justificaría el hecho de que la especie fue colectada al inicio de su invasión en la zona central del Golfo San Jorge.

Estas características hacen que las algas tengan un gran potencial como fuente de un amplio rango de compuestos químicos con diferentes actividades biológicas (Chandini et al., 2008; Kim, 2010; Pérez et al., 2016). Por ello, el conocimiento de los metabolitos biosintetizados por las macroalgas resulta crucial para poder evaluar su potencial aplicación en Salud.

6.3.7. Estudios mediante cromatografía planar

6.3.7.1. Lípidos

El perfil lipídico de las frondas colectadas estacionalmente en Comodoro Rivadavia, mostró mayor complejidad durante la primavera. Al comparar con el estudio preliminar de la especie colectada en Bahía Bustamante también en primavera, surge que ambos perfiles se asemejan. En cambio las otras estaciones de colecta de Comodoro Rivadavia mostraron un perfil más simple con algunas variaciones estacionales, y también relacionadas con la temperatura de extracción y/o con la metodología empleada (**Tabla 6.7**).

Todas las estaciones y en particular verano y otoño, mostraron una importante presencia de ácidos grasos poliinsaturados (los vapores de yodo se impregnaron fuertemente a las distintas zonas de correspondencia lipídica). En verano y otoño, posiblemente los digalactosildiacilglicerol (DGDG) y los sulfolípidos (SL), respectivamente, contenían gran parte de los ácidos grasos poliinsaturados.

El rendimiento de la extracción de lípidos (**Figura 6.14**) siguiendo la metodología de Folch (ver Capítulo 4 del Desarrollo Experimental), de las frondas de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente, fue muy importante en las cuatro estaciones comparado con los obtenidos por Boulom et al., 2014. Estos investigadores informaron que en las frondas de *U. pinnatifida* colectada en Nueva Zelanda, el contenido de lípidos totales extraídos por el mismo método usado en la presente tesis, varió de 1,7 a 4,5 % (respecto del alga seca). En dicho estudio, los ácidos grasos poliinsaturados ω -6 alcanzaban un máximo en diciembre (Boulom et al., 2014).

Tabla 6.7. Lípidos detectados mediante cromatografía planar monodimensional en los extractos etanólicos (EOH1, EOH2) y en el extracto de Folch (EF) de *Undaria pinnatifida* colectada estacionalmente en Comodoro Rivadavia.

Lípidos	primavera			verano			otoño			invierno		
	EOH1	EF	EOH2	EOH1	EF	EOH2	EOH1	EF	EOH2	EOH1	EF	EOH2
Fosfatidilcolina (PC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fosfatidiletanolamina (PE)	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Sulfolípidos (SL)	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Digalactosil diacilglicéridos (DGDG)	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Glicósidos de esteroles (GS)	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Fosfatidilglicerol (PG)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Monogalactosil diacilglicérido (MGDG)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigmentos y lípidos neutros (PIG + LN)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ácido fosfatídico (AP)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fosfatidilserina (PS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido palmítico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

En nuestro caso, evidenciamos también una importante variación estacional de los lípidos totales, aumentando a medida que se desarrollan las frondas (primavera a verano), para luego disminuir drásticamente en otoño y finalmente volver a aumentar en invierno.

Se ha informado que la formación de lípidos se ve directamente afectada por los periodos estacionales, con un aumento marcado en los meses más fríos (Renaud y Luong-Van, 2006; Gerasimenko et al., 2010). Esto resulta coincidente con los resultados alcanzados en este trabajo de tesis.

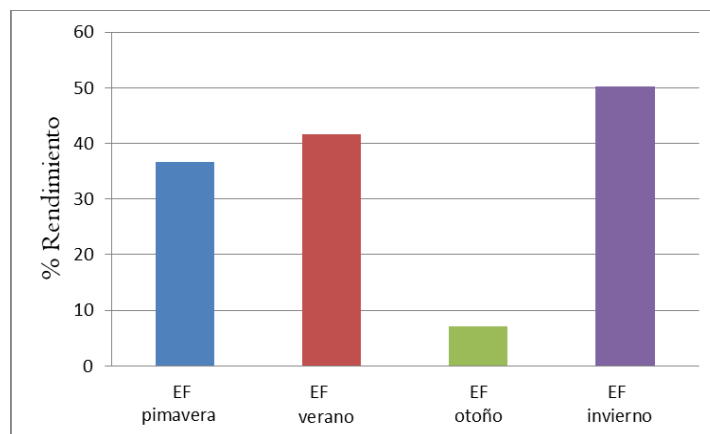


Figura 6.14 Rendimientos de la extracción de lípidos por la metodología de Folch, de las frondas de *Undaria pinnatifida* colectada estacionalmente en Comodoro Rivadavia. (EF: Extracto de Folch).

6.3.7.2. Fenoles

El perfil cromatográfico de los extractos alcohólicos mostró una complejidad interesante de compuestos de naturaleza fenólica. En la **Tabla 6.8** se muestran los Rf correspondientes, una vez revelados con FeCl_3 1 %. En todos los extractos se pudo determinar la presencia de ácido gálico, en tanto que el ácido cafeico lo fue en primavera, en ambos extractos, y en verano en EOH₂. Todos los extractos coincidieron en mostrar zonas de Rf entre 0,02 a 0,50 con características propias de fenoles al ser reveladas con UV_{254} y 365 , sin y con vapores de amoníaco.

La composición y concentración de los compuestos fenólicos varía según el hábitat, las condiciones ambientales y la época de colecta, además de factores intrínsecos de la propia especie e individuo (Rodríguez-Bernaldo et al., 2010). Estos autores detectaron diferentes compuestos fenólicos, en particular flavonoles, en diferentes especies de algas pardas y rojas, incluyendo las especies *Himanthalia elongata*, *Laminaria ochroleuca* y *U. pinnatifida*, colectadas en las costas de Galicia. Los flavonoles identificados fueron catequina (C, **Figura 6.15.a**), epicatequina (EC, **Figura 6.15.b**), epigallocatequina (EGC, **Figura 6.15.c**), catequina galato (CG, **Figura 6.15.d**),

epicatequina galato (ECG, **Figura 6.15.e**) y epigalocatequina galato (EGCg, **Figura 6.15.f**).

Del resultado de esta investigación se desprende que las tres algas pardas presentaron diferentes compuestos, tales como ECG, EC, EGCg y CG; sin embargo *L. ochroleuca* no presentó ácido gálico. En cambio en el caso de *H. elongata* y *U. pinnatifida* este último metabolito fue identificado, y fue además el único compuesto fenólico en *U. pinnatifida*.

Los resultados del perfil cromatográfico y del estudio fitoquímico realizados a los extractos etanólicos EOH1 y EOH2 en la presente Tesis, se complementan al informar la ausencia de flavonoides en las muestras analizadas.

Los compuestos de Rf con valores inferiores a 0,5 y que presentaron coloración amarilla con FeCl₃ al 1 %, podrían atribuirse a florotaninos presentes en los extractos EOH1 y EOH2.

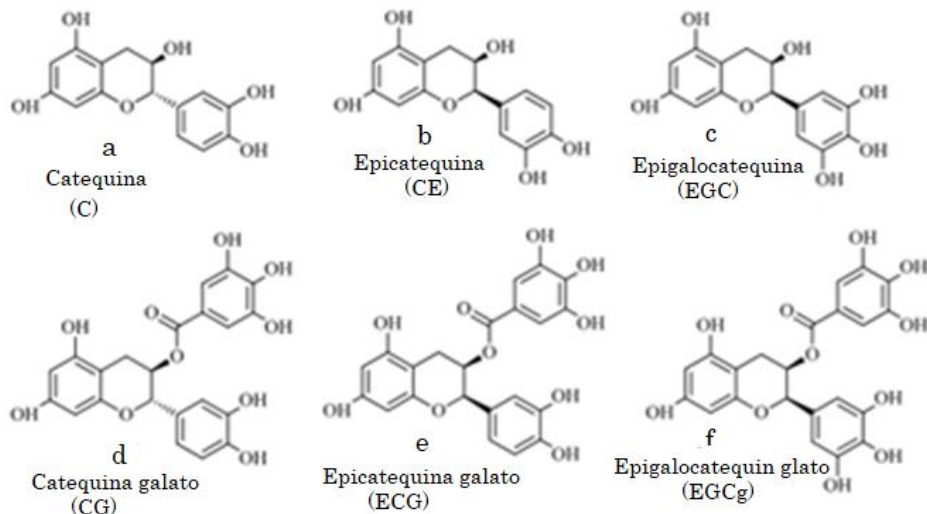


Figura 6.15. Flavonoles presentes en las algas pardas *Himanthalia elongata* y *Laminaria ochroleuca*, colectadas en las costas de Galicia. (Fuente: Rodríguez-Bernaldo de Quirós, 2010 modificada).

Los florotaninos son esenciales para la integridad fisiológica del alga y están involucrados en una serie de funciones secundarias importantes, como la defensa química, la protección contra el daño oxidativo que se produce en respuesta a los cambios en la disponibilidad de nutrientes y la radiación UV, interacciones con otros organismos o el ambiente abiótico además de ser componentes integrales de la pared celular (Shakambari et al., 2015). El extracto de *Laminaria japonica*, ha mostrado importante actividad antitumoral sobre carcinoma hepatocelular y leucemia debido al contenido total de florotaninos (Yang et al., 2010).

Tabla 6.8. Valores de Rf obtenidos en los perfiles cromatográficos planares de los extractos etanólicos a temperatura ambiente (EOH1) y 70 °C (EOH2), de las frondas de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente en Comodoro Rivadavia.

Estación	Extracto	BAW (4:1:5)				Compuesto
		UV 254	UV 365	Rf ± 0.05	FeCl ₃ 1 %	
primavera	EOH1	verde oscuro	verde	0,02	amarillo	
		amarillo	s/c	0,2	amarillo	
		amarillo	-	0,52	verde	
		verde	amarillo	0,74	amarillo	ácido cafeico
		-	verde	0,96	azul	ácido gálico
	EOH2	verde oscuro	-	0,03	amarillo	
		-	Amarillo	0,5		
		amarillo		0,74	verde	ácido cafeico
verde		Verde	0,98	azul	ácido gálico	
verano	EOH1	amarillo	amarillo	0,31	amarillo	
		-	verde	0,55	azul	
		verde	verde	0,96	azul	ácido gálico
	EOH2	verde oscuro		0,05	azul	
		amarillo	-	0,1	amarillo	
		amarillo		0,5	verde oscuro	
				0,72	verde	ácido cafeico
			verde	0,98	azul	ácido gálico
otoño	EOH1			0,03	amarillo	
		verde		0,47	verde	
				0,87		
			verde	0,97	azul	ácido gálico
	EOH2			0,64	verde	
			verde	0,98	azul	ácido gálico
		amarillo		0,24	amarillo	
invierno	EOH1	verde opaco	verde opaco	0,54	verde	
		-	verde	0,97	azul	ácido gálico
	EOH2	-	verde	0,85	verde	
		opaco	-	0,56	amarrillo	
		verde	verde	0,96	azul	ácido gálico

6.3.7.3. Hidratos de carbono

El perfil cromatográfico de los extractos etanólicos EOH1 y EOH2, nativos e hidrolizados, obtenidos de las frondas de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente, mostró la presencia de glucosa (glc) en todas las estaciones, a excepción del extracto EOH2 de invierno. En la misma calle y justo por debajo de la glc se manifestó, después del revelado, una zona clara (Figura 6.16) coincidente con el manitol.

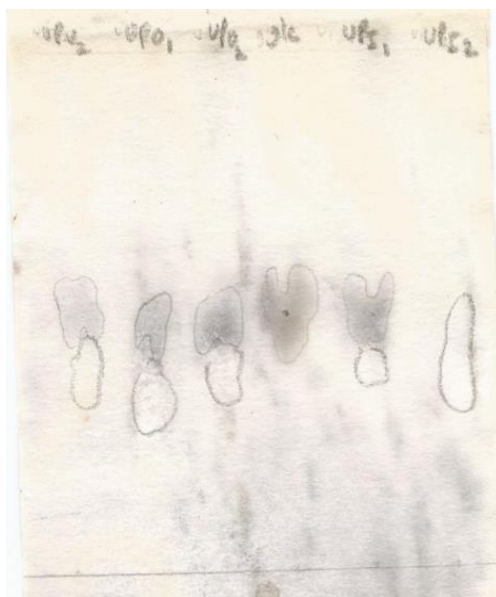


Figura 6.16. Cromatograma en papel Whatman N° 1, empleando como fase móvil una mezcla de piridina, acetato de etilo, ácido acético y agua (5:5:1:3), correspondiente a los extractos etanólicos a 70 °C de verano, otoño e invierno (Upv2, Upo2, Upi2, respectivamente), extracto etanólico a temperatura ambiente de invierno (Upi1) y glucosa como patrón.

Los monosacáridos presentes en las algas incluyen glucosa, manosa, galactosa, fucosa (Rajapakse y Kim, 2011). En nuestros estudios al menos parte de la glc, posiblemente derive del laminarano, polisacárido de reserva que por hidrólisis enzimática liberó a sus monosacáridos constituyentes (Rajapakse y Kim, 2011).

En las algas pardas el D-manitol constituye uno de los productos primarios de la fotosíntesis y sustancia de reserva, además de cumplir el rol como

crioprotector; al igual que otros alditoles puede ser extraído con etanol. Su contenido en las algas se encuentra sujeto a distintas variaciones, entre ellas estacionales (Cárdell Cristellys et al., 1977).

Los alginatos de sodio (NaAlg) hidrolizados de todas las estaciones mostraron dos zonas con valores de Rf 0,28 y 0,35 correspondientes al ácido D-manurónico y L-gulurónico, respectivamente, en cada una de las calles correspondientes a los productos de cada estación.

Al comparar los resultados cromatográficos del NaAlg de cada estación con el mismo producto de *L. vadosa* colectada en el GSJ (Becerra, 2016), se observó una similitud en cuanto a la presencia de los dos ácidos urónicos.

6.3.7.4. Cromatografía de pigmentos, esteroides y polifenoles

Si bien el sistema cromatográfico fue planteado para el análisis de los pigmentos presentes en ambos extractos etanólicos (EOH1 y EOH2), en el cromatograma también se pudo observar la presencia de otros metabolitos que se correspondieron con el screening fitoquímico. El cromatograma fue analizado a la luz visible (**Figura 6.17**), al UV a 365 nm (**Figura 6.18**) y con distintos reactivos, fundamentalmente FeCl₃ al 1 % y K₂Cr₂O₇ al 5 % para compuestos fenólicos, como se muestran en la **Figura 6.19,a y b**.

Los pigmentos a la luz visible se observaron en zonas de color verde amarillento a un Rf de 0,42 atribuible a la presencia de violaxantina en ambos extractos etanólicos (EOH1 y EOH2) de otoño e invierno; en tanto que las estaciones primavera y verano mostraron la misma coloración pero mucho más tenue, sugiriendo una menor proporción (**Figura 6.17**). Estas mismas zonas a la luz UV 365 nm, se detectaron con una tonalidad roja en las mismas estaciones a la luz visible, y rojo tenue para las estaciones primavera y verano (**Figura 6.18**).

También al visible, con un Rf de 0,93 en ambos extractos etanólicos se visualizaron zonas de coloración amarilla clara para las estaciones otoño e invierno y gris claro en primavera y verano, atribuible a la presencia de

zeaxantina y anteraxantina, respectivamente. Estas zonas a la luz UV presentaron una tonalidad blanca fluorescente en las cuatro estaciones, siendo más notoria en los extractos EOH1 y EOH2 de otoño e invierno.

Otras zonas que se pudieron detectar en ambos extractos etanólicos de las cuatro estaciones, a la luz visible, fueron en el extremo superior del cromatograma ($R_f = 0,97$), de color verde y gris tenue que se correspondieron a la presencia de clorofila *a* y *c* y de feofitina, respectivamente. EOH1 de otoño y EOH2 de invierno fueron los que presentaron una coloración verde más intensa a la luz visible. Dichas zonas a la luz UV a 365 nm, se visualizaron rojo fluorescente, siendo más marcado en EOH1 de otoño (**Figura 6.18**).

Otra xantofila detectada en ambos extractos etanólicos fue la fucoxantina a un R_f de 0,71 en la que a la luz natural ((**Figura 6.17**) presentó un color naranja tenue y a la luz UV un rojo fluorescente (**Figura 6.18**). Cabe destacar que el EOH1 de verano presentó una menor proporción de este metabolito en comparación con los otros extractos y estaciones.

Dentro de los pigmentos que se detectaron por TLC, en la presente tesis se resalta la presencia fucoxantina, por su importante actividad biológica (ver más adelante), violaxantina, anteraxantina y zeaxantina dado que estas últimas están implicadas en el ciclo de las xantofilas y en el proceso de fotoprotección (Goss y Jakob, 2010; Celis-Plà et al., 2014).

El estudio de la concentración relativa de los pigmentos implicados en el ciclo de las xantofilas es una herramienta útil para evaluar el grado de estrés ambiental al que está sometido el aparato fotosintético de las algas pardas y verdes (Celis-Plà et al., 2014).

La exposición de las algas pardas a diversas condiciones de estrés ambiental tal como la radiación solar superior a la que puede ser usada en el proceso de la fotosíntesis induce cambios en el ciclo de las xantofilas, caracterizados por la conversión de violaxantina en anteraxantina y posteriormente en zeaxantina, mediante una serie de enzimas inducidas por la luz (Mikami y Hosokawa, 2013).

Nuestros resultados mostraron que la anteraxantina fue la xantofila de mayor síntesis durante las estaciones de mayor incidencia de radiación solar (verano y primavera) en tanto que la violaxantina fue escasa. La desepoxidación de violaxantina a anteraxantina y posteriormente a zeaxantina conduce a una mejor disipación del exceso de energía de excitación en el sistema de antena del fotosistema II, lo que evita la inactivación y el daño al aparato fotosintético (Demmig-Adams y Adams 2006).

Si bien existe bibliografía que describe la presencia de neoxantina en distintos extractos de *U. pinnatifida*, la cual estaría implicada en una de las dos posibles vías de síntesis de la fucoxantina. Mikami y Hosokawa (2013) no pudieron demostrar la presencia de neoxantina ni del gen que codifica la enzima correspondiente. Por lo tanto, a diferencia de las rutas metabólicas de carotenoides en algas rojas y verdes, la ruta de la fucoxantina en las algas pardas no se comprende del todo.

Nuestros resultados concuerdan con la investigación realizada por Endo et al. (2017) quienes demostraron que el color de los esporofilos de *U. pinnatifida*, cultivados bajo distintas condiciones controladas de temperatura, radiación artificial y nutrientes, estaban fuertemente regulados por su contenido de pigmento, y que la disminución de la radiación produce aumentos en todos los contenidos de pigmentos medidos (clorofilas, fucoxantina, violaxantina y zeaxantina) en *U. pinnatifida*. La zeaxantina y la anteraxantina actúan como intermediarios en el proceso de fotoprotección del aparato fotosintético (Verhoeven et al., 1999a, b). Son capaces de contener el exceso de energía presente en la antena fotosintética y disiparla en forma de calor (Mikami y Hosokawa, 2013), por lo que se considera un mecanismo de protección contra la fotodegradación (Demmig-Adams y Adams, 2006).

Cuando las condiciones se vuelven favorables y la energía recibida no excede a la que puede ser utilizada en la fotosíntesis, la zeaxantina vuelve a

convertirse en anteraxantina y violaxantina por la acción de la enzima zeaxantina oxidasa (Adams y Demmig-Adams, 2006).

Los otros metabolitos que se pudieron detectar en este mismo sistema cromatográfico fueron el fucosterol y compuestos polifenólicos relacionados con el floroglucinol, ya sean taninos o polifenoles de bajo peso molecular.

A la luz natural (**Figura 6.17**) el fucosterol presentó una zona verde claro a un Rf de 0,81 y una zona roja intenso a la luz UV a 365 nm (**Figura 6.18**), características que le fueron atribuidas por distintos autores (Becerra et al., 2015; Agatonovic-Kustrin y Morton, 2017; Agatonovic-Kustrin et al., 2018).

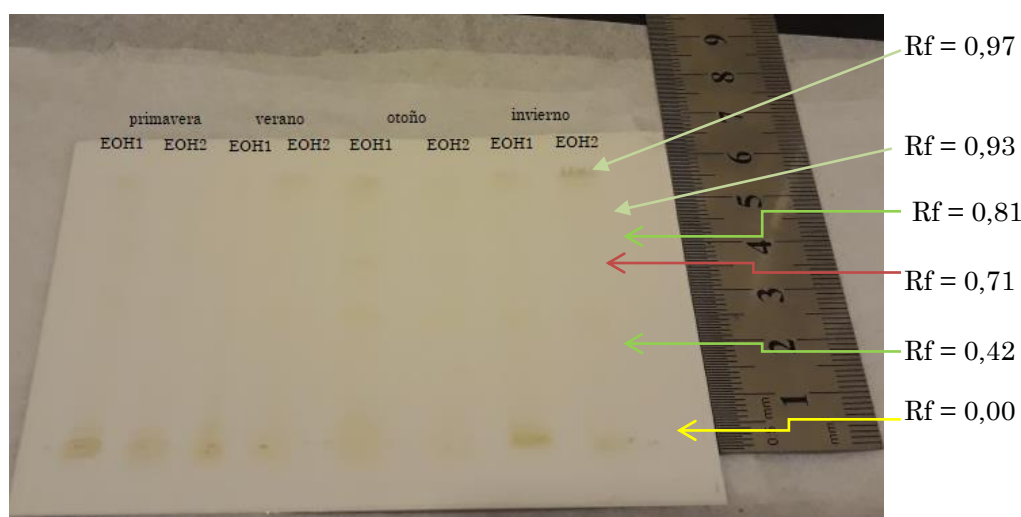


Figura 6.17. Cromatograma obtenido sobre Sílicagel G60, con diclorometano-metanol (9:1) como fase móvil de los extractos etanólicos EOH1 y EOH2 obtenidos a temperatura ambiente y a 70 °C, respectivamente, de las frondas de *Undaria pinnatifida* colectada estacionalmente en las costas de Comodoro Rivadavia. Observada a la luz natural.

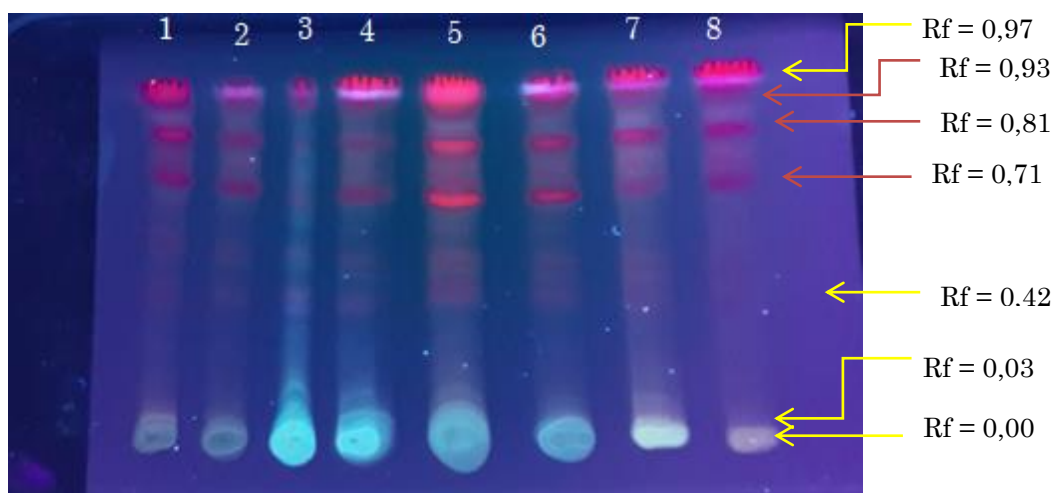


Figura 6.18. Cromatograma obtenido sobre Sílicagel G60, con diclorometano-metanol (9:1) como fase móvil de los extractos etanólicos EOH1 y EOH2 obtenidos a temperatura ambiente y a 70 °C, respectivamente, de las frondas de *Undaria pinnatifida* colectada estacionalmente en las costas de Comodoro Rivadavia. Observado al UV 365 nm. 1: EOH1 de primavera, 2: EOH2 de primavera, 3: EOH1 de verano, 4: EOH2 de verano, 5: EOH1 de otoño, 6: EOH2 de otoño, 7: EOH1 de invierno, 8: EOH2 de invierno.

Los compuestos fenólicos presentes los extractos (EOH1 y EOH2) de las cuatro estaciones se pusieron en evidencia con una solución de FeCl_3 al 1 % (**Figura 6.19**). La solución empleada es una prueba de identificación comúnmente utilizada para determinar la presencia de polifenoles (Shakambari et al., 2015).

Dado que el ion Fe^{+++} es un agente oxidante y quelante, produce una coloración característica que depende de los grupos hidroxilo presente en el anillo bencénico. Para compuestos con dos oxhidrilos adyacentes se observa un color verde y para aquéllos con tres oxhidrilos adyacentes se observa un color gris azulado, en tanto que el color amarillo indica la presencia de oxhidrilos fenólicos aislados (Agatonovic-Kustrin y Morton, 2017).

En las muestras analizadas, (EOH1 y EOH2) de las cuatro estaciones, los polifenoles mostraron un color verde amarillenta a la luz natural y desde un

azul tenue hasta un azul más intenso a la luz UV a 365 nm, color característico de derivados de floroglucinol (Shakambari et al., 2015), a un $R_f = 0,00$ (punto de siembra). El extracto que mostró una mayor proporción y complejidad fue el EOH1 de verano.

Después del revelado con solución de $FeCl_3$ al 1 %, todas las zonas detectadas a la luz natural cambiaron a un tonalidad amarillenta más intensa en los extractos etanólicos EOH2 de otoño e invierno y una tonalidad verde amarillenta en los restantes extractos de cada estación, siendo más acentuadas en EOH1 de primavera y verano (**Figura 6.19.a**). Esto puso en evidencia la presencia de una mezcla de compuestos fenólicos, entre ellos los ácidos fenólicos (ver **Tabla 6.8**) en las distintas estaciones.

La formación de color con $FeCl_3$ al 1 % también puede ocurrir con algunos compuestos no fenólicos ya que se pueden oxidar en presencia de Fe^{+++} (Krishnaswamy, 1999). Dentro de este grupo, los taninos en los que se incluyen a los florotaninos (Quideau et al., 2011) pueden ser detectados en presencia de una solución de $K_2Cr_2O_7$ al 5 %. Ambos reactivos son ampliamente utilizados en los análisis fitoquímico preliminares de extractos vegetales.

En presencia de florotaninos el ión Cr^{+6} (color naranja) se reduce a Cr^{+3} y esto se puede observar por un cambio de color que va desde un pardo oscuro hasta un verde claro debido a la formación de óxido de cromo (Cr_2O_3) (Gutiérrez Corona et al., 2010; Quideau et al., 2011).

Al revelar los cromatogramas con la solución mencionada en el párrafo anterior se observó una mayor proporción y complejidad de compuestos derivados del floroglucinol en el EOH1 de verano y una menor proporción en los EOH1 y EOH2 de invierno (**Figura 6.18.b**). La composición de los florotaninos en las algas es siempre de alta complejidad (Heffernan et al., 2015). Cabe mencionar que se observó distintas bandas a lo largo de la calle correspondiente al EOH1 de verano y además una zona muy notoria en el punto de siembra cuyo centro presentó una tonalidad verde clara, lo que sugiere la presencia de una compleja mezcla de compuestos derivados del

floroglucinol. El contraste del poder reductor podría originarse en las diferencias entre el peso molecular y la cantidad de floroglucinol en la estructura molecular de los florotaninos presentes en las muestras (Shibata et al., 2015). Por lo tanto esto sugiere una mayor síntesis de compuestos fenólicos capaces de enfrentar daño oxidativo en la estación de mayor incidencia de luz solar.



Figura 6.19. Cromatograma obtenido sobre Sílicagel G60, con diclorometano-metanol (90:10) como fase móvil de los extractos etanólicos EOH1 y EOH2 obtenidos a temperatura ambiente y a 70 °C, respectivamente, de las frondas de *Undaria pinnatifida* colectada estacionalmente en las costas de Comodoro Rivadavia. **a:** revelado con FeCl_3 1 %, **b:** revelado con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ al 5 %.

Nuestros resultados tienen concordancia con estudios realizados por otros investigadores. Connan et al. (2004) encontraron niveles más altos de compuestos fenólicos durante el verano, en ocho especies de algas pardas de las costas norte de Bretaña en Francia, los mismos estaban relacionados con una mayor incidencia de radiación solar. Del mismo modo, Abdala Díaz et al. (2006) encontraron un mayor contenido de fenol en verano que en invierno en *Cystoseira tamariscifolia* colectada en las costas del sur de España durante las primeras horas de la mañana. Sin embargo, estos investigadores observaron que al mediodía los niveles eran similares en

ambas estaciones debido a la alta liberación de polifenoles en verano. Cabe destacar que la colecta de los ejemplares de *U. pinnatifida* en las cuatro estaciones, para el estudio en esta tesis, se realizó antes del mediodía.

Los resultados del screening fitoquímico (ver **Tabla 6.7**) mostraron la ausencia de taninos en los extractos etanólicos EOH1 y EOH2 de verano y EOH1 de primavera, lo que estaría relacionado con la presencia de florotaninos de bajo peso molecular, que no forman el precipitado característico entre los taninos y alcaloides. Existe evidencia de la existencia de florotaninos de bajo peso molecular en las algas pardas *Eisenia bicyclis*, *Eisenia arbórea*, *Ecklonia kurome* y *Ecklonia cava*, colectadas a lo largo de las costas de la península de Itoshima en Japón, constituidos por 3 a 7 y 3 a 8 unidades de floroglucinol en los géneros *Eisenia* y *Ecklonia*, respectivamente (Shibata et al., 2015).

A diferencia de nuestros resultados, en la que se manifestó la presencia de florotaninos de bajo peso molecular únicamente en verano, en *Fucus vesiculosus* y en *Fucus serratus*, colectados en la costa oeste de Irlanda en verano y otoño respectivamente, los florotaninos estaban constituidos por 3 a 16 unidades de floroglucinol en ambas especies (Heffernan et al., 2015).

Otros metabolitos secundarios que se pudieron determinar en *U. pinnatifida* fueron los productos oxidados de los polifenoles, las quinonas, observadas a la luz UV a un Rf de 0,03 de color rosa tenue (**Figura 6.18**), sugiriendo bajas proporciones de estos compuestos en los extractos etanólicos EOH1 y EOH2 de primavera e invierno.

Las quinonas se pueden dividir en benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas y sus dímeros; entre ellas se destacan las antraquinonas y naftoquinonas por su actividad farmacología (Silva et al., 2012)

Especies de algas verdes estudiadas en nuestros laboratorios mediante el análisis cromatográfico monodimensional por TLC, revelaron la existencia de antraquinonas en *Ulva lactuca* y *Ulva rigida* colectadas estacionalmente en dos playas distintas del GSJ. Sus perfiles cromatográficos fueron complejos debido a la presencia de derivados diméricos tipo sennósido C,

como aloe emodina y reína, presentes en ambas especies colectadas en invierno y primavera (Uhrich, 2016). Nuestros resultados en cuanto a la presencia de quinonas en *Undaria pinnatifida*, coinciden estacionalmente con los resultados observado en *Ulva lactuca* y *Ulva rigida*.

Desde el punto de vista de la salud las antraquinonas y sus derivados actúan acelerando el peristaltismo intestinal. Es por ello que nuestros resultados deben ser considerados especialmente al momento de decidir o proponer la utilización de *U. pinnatifida* para alimentación.

Dentro de las naftoquinonas la β -lapachona, obtenida de la corteza de *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae), presenta actividad antitumoral (Pardee et al., 2002) y se ha demostrado que el sulindac (fármaco antiinflamatorio no esteroideo) y sus metabolitos aumentan sinérgicamente los efectos anticancerígenos de la naftoquinona sobre líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, por lo que estos resultados sugieren que estos principios activos podrían proporcionar una nueva terapia de combinación para el tratamiento de cáncer de pulmón (Kung et al., 2014).

Las algas que habitan los intermareales en regiones de aguas poco profundas, como lo es la zona de colecta de las muestras para la presente tesis, deben hacer frente a importantes gradientes en la intensidad de la luz incidente, que depende no solo del curso diario de la radiación solar, sino también del rango de mareas y de la coincidencia temporal de la radiación máxima al mediodía (Goss y Jakob, 2010).

Dada la variabilidad de la luz solar, no es sorprendente que sea aceptada como un parámetro clave que controla la estructura de las comunidades de macroalgas en relación con su distribución de profundidad y el transcurso estacional (Goss y Jakob, 2010). En particular, el potencial de la fotoprotección se ve como un rasgo funcional de la diversidad de algas. Los diferentes mecanismos fotoprotectores, tales como la producción de compuestos absorbentes de UV (compuestos polifenólicos) o la disipación de energía excesiva (absorción relacionada con el ciclo de la xantofila), son de

gran importancia para la prevención del daño en los sistemas fotosintéticos de las algas (Goss y Jakob, 2010).

Los resultados aquí descriptos demuestran una variabilidad metabólica estacional, atribuible a la necesidad de adaptarse a los cambios ambientales. Esto constituye una contribución al conocimiento de la metabolómica de *U. pinnatifida* que habita en las costas de Comodoro Rivadavia.

6.3.8. Cuantificación de los principales grupos químicos presentes en los extractos etanólicos

Para poder cuantificar los principales grupos químicos presentes en los extractos etanólicos EOH1 y EOH2, se preparó una solución madre, a partir de la cual se tomaron distintas alícuotas (ver Capítulo 4 de esta tesis); cada alícuota se trabajó por triplicado (n=3). A partir de las distintas absorbancias promedio medidas y la ecuación de la recta de la curva patrón correspondiente de cada grupo químico (hidratos de carbono con respecto a la glucosa, fenoles con respecto a ácido gálico, proteínas con respecto a la albúmina de suero bovino y sulfatos con respecto a sulfato de sodio anhidro) se determinó la masa total del metabolito contenida en la alícuota. Posteriormente los valores de las masas de las alícuotas se promediaron y con este último se estableció el porcentaje total.

Los metabolitos bioactivos como polisacáridos, proteínas y polifenoles deben ser evaluados cuantitativamente porque de ello depende en gran medida su bioactividad. A su vez la cantidad de metabolitos presentes en una muestra depende de la metodología y tipo de solvente empleado en su extracción.

El etanol presenta la desventaja de precipitar las macromoléculas como polisacáridos y proteínas, por lo que este tipo de extractos puede contener oligosacáridos de baja masa molecular y monosacáridos, como representantes de los hidratos de carbono, y péptidos y/o aminoácidos, como representantes de las proteínas.

Nuestros resultados mostraron en general valores bajos con respecto a otras investigaciones (Cofrades et al., 2008; Renaud y Luong-Van, 2006); estas variaciones pueden deberse a las metodologías y solventes empleados.

En ambos extractos (EOH1 y EOH2) los hidratos de carbono y aminogrupos primarios y/o secundarios variaron cuantitativamente de acuerdo al momento del ciclo de vida de *U. pinnatifida*, mostrando en general un descenso de sus metabolitos en primavera y otoño con excepción de los aminogrupos extraídos en caliente en primavera (**Figura 6.20.a, b**). Esto puede explicarse considerando que en primavera el alga comienza la síntesis de metabolitos relacionados con su etapa reproductiva en verano, mientras que en otoño los esporofitos se desintegran para dar paso a un nuevo reclutamiento durante el invierno (Martín y Bastida, 2008). La cantidad de aminogrupos resultó ser mayor al aumentar la temperatura de extracción (70 °C, **Figura 6.20.b**) en las estaciones de primavera y verano.

Con respecto al grupo sulfato, estuvo ausente en ambos extractos EOH1 y EOH2 de todas las estaciones. El mayor aporte de este grupo está dado por los fucoidanos, polisacárido característico de las algas pardas. En el caso de *U. pinnatifida*, colectada en el norte y sur de Corea, los fucoidanos extraídos con HCl 0,1 N, a temperatura ambiente durante 24 h, mostraron diferencias en cuanto a los monosacáridos constituyentes, pero además los mismos estaban sustituidos con grupos sulfato en un 97 % (Synytsya et al., 2010).

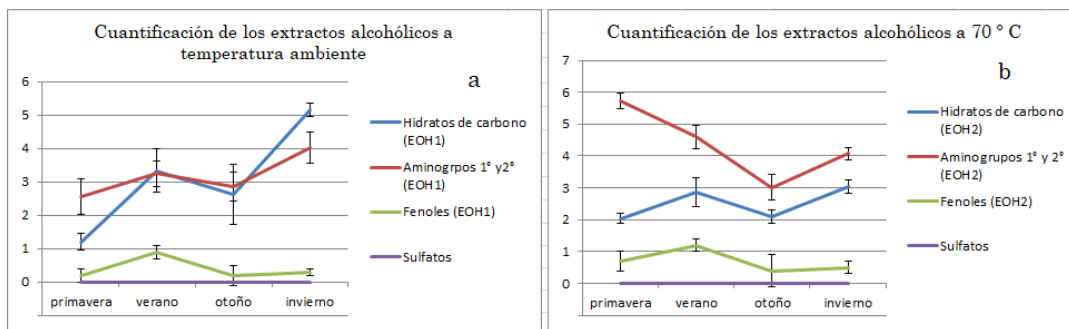


Figura 6.20. Cuantificación de hidratos de carbono, aminogrupos primarios y secundarios, fenoles y sulfatos, presentes en los extractos etanólicos obtenidos a partir de las frondas de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente en Comodoro Rivadavia. **a:** extractos a temperatura ambiente (EOH1), **b:** extractos a 70 °C (EOH2).

Los fenoles presentan un aumento en verano, para ambos extractos, manteniendo el resto del año una concentración similar. Esto se puede atribuir al ciclo de vida del alga. Como se mencionó, la concentración de los polifenoles en las algas pardas puede variar entre distintas especies e incluso entre individuos de la misma especie, siendo afectados por diversos factores como su ontogenia, salinidad, niveles de nutrientes, intensidad de la luz, temperatura del agua, presencia de herbívoros, entre otros (Rodríguez-Bernaldo de Quirós et al., 2010).

En los extractos etanólicos, la presencia y cantidad de los metabolitos cambió de una estación a otra, correspondiéndose este comportamiento con los criterios de Chopin et al. (1992), quienes plantean que la composición química depende de la especie, influencia estacional y condiciones ambientales en general.

Las algas tienen un período de vida relativamente corto y una estación implica una diferencia importante en el desarrollo ontogenético.

6.4. Conclusiones

Con relación a uno de los objetivos planteados, el estudio integral de los metabolitos biosintetizados por *Undaria pinnatifida* implicó la colecta de ejemplares de dos zonas pertenecientes al Golfo San Jorge, Bahía Bustamante y Comodoro Rivadavia, con el propósito de un estudio preliminar y exhaustivo, respectivamente.

Las características macroscópicas de *U. pinnatifida* permitieron establecer la presencia de estructuras propias de la especie como el estipe, esporofilo, estructura que en la especie determina la etapa reproductiva de su ciclo de vida, frondas pinnadas y nervadura central.

La especie de ambas zonas de colecta fue debidamente clasificada y herborizada. Posteriormente las frondas de los ejemplares fueron secadas, molidas y tamizadas.

En el estudio preliminar, el screening fitoquímico realizado sobre el extracto total y las distintas fracciones, mostraron la presencia en proporción importante, de péptidos y/o aminogrupos y compuestos fenólicos, metabolitos con importante actividad farmacológica. Otro de los grupos químicos destacados fueron los alcaloides, si bien mostraron una menor proporción, su presencia debería ser considerada si se busca destinar el alga a la alimentación.

El perfil lipídico reveló una complejidad de sus constituyentes, en las que se destacaron los ácidos grasos poliinsaturados. En cuanto a la presencia de fosfatidilcolina (PC), marcador quimiotaxonómico, confirmó la ubicación de *U. pinnatifida* en el grupo que biosintetiza este compuesto dentro del orden Laminariales.

Los principales pigmentos observados fueron clorofilas *a*, *c*; clorofilide *a*, violaxantina y fucoxantina. Este último metabolito descrito con actividad antitumoral.

En el estudio exhaustivo, los registros de los factores ambientales como la temperatura y salinidad mostraron encontrarse dentro del rango de

tolerancia de *U. pinnatifida*, facilitando la adaptación de la especie y su éxito para colonizar este nuevo ambiente.

En el análisis macroscópico, se observó la presencia de ejemplares que guardan relación con el ciclo de vida de la fase esporofítica.

El análisis de microscopía óptica (MO) mediante cortes transversales o longitudinales, permitió observar la presencia de distintas zonas en las que se disponen las células y la variabilidad de formas que ellas presentan. La presencia de pelos y cristales fueron caracteres morfológicos que constituyen un novedoso aporte al conocimiento integral de la especie que habita la región central del Golfo San Jorge.

Mediante el estudio histoquímico de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente, se pudo identificar y localizar los grupos químicos más relevantes, principalmente fenoles, lípidos y proteínas. Tales grupos presentaron variabilidad en cuanto a la estación y la zona de localización tisular.

La observación superficial mediante MEB, de fronda, esporofilo y nervadura de ejemplares colectados en primavera e invierno, contribuyó al conocimiento superficial de la especie, permitiendo visualizar la generación de esporas y filamentos (estos últimos también fueron observados mediante MO).

En el screening fitoquímico, los extractos etanólicos al 80 % (v/v) a distintas temperaturas, mostraron una importante variación estacional y metodológica en cuanto a las proporciones de los metabolitos, entre los que se destacaron los polifenoles (fundamentalmente derivados del floroglucinol y quinonas), además de péptidos y/o aminogrupos 1° y 2°, esteroides, entre otros. Por cromatografía en capa delgada (TLC) fue posible identificar la presencia de distintos pigmentos como violaxantina, anteraxantina, fucoxantina y algunos metabolitos de grupos químicos destacados en el screening fitoquímico.

La cuantificación de los grupos químicos más relevantes, también mostró una variación estacional y esto debe ser tenido en cuenta en el análisis de bioactividad.

La adaptación a nuevos ecosistemas y la competencia con especies nativas hacen que una especie invasora necesite desarrollar diversas estrategias metabólicas y/o morfológicas, que le permitan colonizar el nuevo hábitat.

Nuestros resultados muestran que *U. pinnatifida* tiene la capacidad de desarrollar estas estrategias, siendo esta capacidad adaptativa, gran responsable de su capacidad invasora, permitiéndole transformarse en una especie aloctona.

6.5. Bibliografía

Abdala-Diaz, R. T.; Cabello-Pasini, A.; Perez-Rodriguez, E.; Conde-Alvarez, R.M.; Figueroa, F.L. Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Mar. Biol.* **2006**, *148*, 459–465.

Adhami, H.R.; Farsam, H.; Krenn, L. Screening of medicinal plants from Iranian traditional medicine for acetylcholinesterase inhibition, *Phytother. Res.* **2011**, *25*, 1148–1152.

Agatonovic-Kustrin, S.; Kustrin, E.; Angove, M. J.; Morton, D. W. A screening method for cardiovascular active compounds in marine algae, *J. Chromatogr. A.* **2018**, *1550*, 57–62.

Agatonovic-Kustrin, S.; Morton, D. W. Direct HPTLC-bioautography as a method of choice for alpha-amylase and antioxidant activity evaluation in marine algae. *J. Chromatogr. A.* **2017**, *1530*, 197–203.

Aguilar-Rosas, R.; Aguilar-Rosas, L.; Ávila-Serrano, G; Parcelas-Ramirez, R. First record of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Laminariales, Phaeophyta) on the Pacific coast of Mexico. *Bot. Mar.* **2004**, *47*, 255–258.

Akiyama, K.; Kurogi, M. Cultivation of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, the decrease in crops from natural plants following crop increase from cultivation. *Tohoku Reg. Fisheries Res. Lab. Bul.* **1982**, *44*, 91–100.

Akselman, R. Estudios ecológicos en el Golfo San Jorge y adyacencias (Atlántico Sudoccidental). Distribución, Abundancia y variación estacional del fitoplancton en relación a factores físico-químicos y la dinámica hidrológica. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Argentina. 1996.

Arnold, T. M.; Targett, N. M. Evidence for metabolic turnover of polyphenolics in tropical brown algae. *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26*, 1393–1410.

Becerra, M. B. Obtención de productos de importancia farmacéutica biosintetizados por especies de algas pardas de las costas del Golfo San Jorge. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Dpto. de Farmacia. Argentina. 2016.

Becerra, M., Boutefnouchet, S., Córdoba, O., Vitorino, G.P., Brehu, L., Lamour, I., Laimay, F., Efstathiou, A., Smirlis, D., Michel, S., Kritsanida, M., Flores, M.L., Grougnet, R. Antileishmanial activity of fucosterol recovered from *Lessonia vadosa* Searles (Lessoniaceae) by SFE, PSE and CPC. *Phytochem. Lett.* **2015**, *11*, 418–423.

Bellassoued, K.; Hamza, A.; Abdelmouleh, A.; van Pelt, C.J.; Elfeki, A. Antioxidant response of a common herbivorous fish species (*Sarpa salpa*): Seasonal variation. *Ciencia Mar.* **2012**, *38*, 57–71.

Bohn, T. Bioavailability of non-provitamin A carotenoids. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2008**, *4*, 240–58.

Boraso, A. Algas Pardas. En: *Elementos para el estudio de las macroalgas de Argentina*, 1er edición; Edit. Universitaria de la Patagonia EDUPA: Comodoro Rivadavia, 2013, pp 103–104.

Boulom, S.; Robertson, J.; Hamid, N.; Ma, Q.; Lu, J. Seasonal changes in lipid, fatty acid, α -tocopherol and phytosterol contents of seaweed, *Undaria pinnatifida*, in the Marlborough Sounds, New Zealand. *Food Chem.* **2014**, *161*, 261–269.

Cárdell Cristellys, E.; Calvo Esteban, M.; Lecuona Fernandez, C. Curvas anuales del Contenido en Agar-Agar y Aislamiento del D-manitol en dos algas de las Islas Canarias: *Gelidium Arbuscula* Bory y *Gelidium Cartilagineum* (L.) Gaill. Var. Canariensis Grün. *Anal. Inst. Bot. Cavanilles*. **1977**, *34*, 1, 303–308.

Casas, G.; Piriz, M. Surveys of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Golfo Nuevo, Argentina. *Hydrob*. **1996**, *326/327*, 213–215.

Celis-Plà, P.; Díaz-Caneja, B. M.; Quintano, E.; García-Sánchez, M.; Pedersen, A.; Navarro, N. P.; Copertino, M. S.; Mangaiyarkarasi, N.; Mariath, R.; Figueroa, F. L.; Korbee, N. Short-term ecophysiological and biochemical responses of *Cystoseira tamariscifolia* and *Ellisolandia elongata* to environmental changes. *Aquat. Biol*. **2014**, *22*, 227–243.

Chandini, S. K.; Ganesa, P.; Bhaskar, N. *In vitro* antioxidant activities of three selected seaweeds of India. *Food. Chem*. **2008**, *107*, 707–713.

Charrier, B.; Le Bail. A.; De Reviers, B. Plant Proteus: drown algal morphological plasticity and underlying developmental mechanisms. *Trends. plant Sci*. **2012**, *17*, 8, 468–477.

Choi, H. G.; Kim, Y. S.; Lee, S. J.; Nam, K. W. Growth and reproductive patterns of *Undaria pinnatifida* sporophytes in a cultivation farm in Busan, Korea. *J. Appl. Phycol*. **2007**, *19*, 131–138.

Chopin, T.; Hourmant, A.; Floc'H, J. Ecophysiological and biochemical study of two of the most contrasting forms of *Chondrus crispus* (Rhodophyta, Gigartinales). *Mar. Ecol. Progress*. **1992**, *81*, 185–195.

Choudhary, S. P.; Tran, L. S. Phytosterols: Perspectives in human nutrition and clinical therapy. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 29, 4557–4567.

Cofrades, S.; Loópez-Loópez, I.; Solas, M. T.; Bravo, L.; Jiménez-Colmenero, F. Influence of different types and proportions of added edible seaweeds on characteristics of low-salt gel / emulsion meat systems. *Meat Sci.* **2008**, *79*, 767–776.

Connan, S.; Deslandes, E.; Ar-Gall, E. Influence of day-night and tidal cycles on phenol content and antioxidant capacity in three temperate intertidal brown seaweeds. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2007**, *349*, 359–369.

Connan, S.; Goulard, F.; Stiger, V.; Deslandes, E.; Ar-Gall, E. Interspecific and temporal variation in phlorotannin levels in an assemblage of brown algae. *Bot. Mar.* **2004**, *47*, 410–416.

Cremades-Ugarte J.; Freire-Gago, O.; Peteiro-Garcia, C. Biología, distribución e integración del alga alóctona *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) en las comunidades bentónicas de las costas de Galicia (NW de la Península Ibérica). *Anal. Jar. Bot. Madrid.* **2006**, *63*, 2, 69–187.

Dawczynski, C.; Schubert, R.; Jahreis, G.; Amino acids, fatty acids and dietary fibre in edible seaweed products. *Food. Chem.* **2007**, *103*, 891–899.

Demmig-Adams, B., Adams, W. W. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytologist.* **2006**, *172*, 11–21.

Echavarría, Z. B.; Franco, S, A.; Martínez, M. A. Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del caribe colombiano. *Vitae*. **2009**, 16, 1, 126-131.

Endo, H.; Okumura, Y.; Sato, Y.; Agatsuma, Y. Interactive effects of nutrient availability, temperature, and irradiance on photosynthetic pigments and color of the brown alga *Undaria pinnatifida*. *J. Appl. Phycol.* **2017**, 29, 3, 1683–1693.

Esau, K. The phloem. En *Handbuch der Pflanzenanatomie*. Gebruder Borntraeuger. Berlin. 1969, 5, 2, pp 263–271.

FAO. Cultured Aquatic Species Information. Programme *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, 1873). FAO, Publishing Management Service, Rome, Italy. 2012.

Fernández, M.; Carreto, J.; Mora, J.; Roux, A. Physico-chemical characterization of the benthic ambient of Golfo San Jorge, Argentina. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom*. **2005**, 85, 1317–1328.

Fung, A.; Hamid, N.; Lu, J. Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chem*. **2013**, 136, 1055–1062.

Gerasimenko, N. I.; Busarova, N. G.; Moiseenko, O. P. Seasonal changes in the content of lipids, fatty acids, and pigments in brown alga *Costaria costata*. *Russian J. Plant Physiol*. **2010**, 57, 2, 205–211.

Gómez, I.; Huovinen, P. Induction of phlorotannins during UV exposure mitigates inhibition of photosynthesis and DNA damage in the kelp *Lessonia nigrescens*. *Photochem. Photobiol*. **2010**, 86, 1056–1063.

Goss, R. y Jakob, T. Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. Review *Photosynth Res.* **2010**, 106, 103–122

Guerrero, R. A.; Piola, A. R. Masas de agua en la plataforma continental. En: *El Mar Argentino y sus recursos pesqueros. Antecedentes históricos de las exploraciones en el mar y las características ambientales*. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero. Mar del Plata, Argentina. 1997, Tomo 1, pp 222.

Gutiérrez Corona, J. F.; Espino Saldaña, A. E.; Coreño Alonso, A.; Acevedo Aguilar, F. J.; Reyna López, G. E.; Fernández, F. G.; Tomasini, A.; Wrobel, K. Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Rev. latinoam. Biotecnol. Amb. Algal.* **2010**, 1, 1, 47–63.

Harwood, J. L. Membrane Lipids in Algae. En: *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*. Advances in Photosynthesis and Respiration. Springer, Dordrecht. 1998.

Hay, C.; Luckens, P. The Asian kelp *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta: Laminariales) found in a New Zealand harbour. *New Zealand J. Bot.* **1987**, 25, 329–332.

Heffernan, N., Brunton, N.P., FitzGerald, R.J.; Smyth, T.J. Profiling of the Molecular Weight and Structural Isomer Abundance of Macroalgae-Derived Phlorotannins. *Mar. Drugs.* **2015**, 13, 509–528.

Hwang, H.; Chen, T.; Nines, R.G.; Shin, H. C.; Stoner, G. D. Photochemo prevention of UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice by brown algae polyphenols. *Int. J. Cancer.* **2006**, 119, 2742–2749.

- Kim, S. K.; Pangestuti, R. Biological activities and potential health benefits of fucoxanthin derived from marine brown algae. *Adv. Food Nutr. Res.* **2011**, *64*, 111–128.
- Kim, S. K.; Wijesekara, I. Development and biological activities of marinederived bioactive peptides: a review. *J. Funct. Foods.* **2010**, *2*, 1–19.
- Kolb, N.; Vallorani, I.; Milanovi, N.; Stocchi, V. Evaluation of Marine Algae Wakame (*Undaria pinnatifida*) and Kombu (*Laminaria digitata japonica*) as Food Supplements. *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, *42*, 1, 57–61.
- Krishnaswamy, N, Chemistry of natural products: a unified approach, Universities Press (India) Limited, Hyderguda, 1999.
- Kuhlisch, C., Pohnert, G. Metabolomics in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 937–955.
- Kung, H. N.; Weng, T. Y.; Liu, Y. L.; Lu, K. S.; Chau, Y. P. Sulindac Compounds Facilitate the Cytotoxicity of b-Lapachone by Up-Regulation of NAD(P)H Quinone Oxidoreductase in Human Lung Cancer Cells. PLoS ONE. [Online acceso libre] **2014**, *9*, 2, e88122. doi:10.1371/journal.pone.0088122. Publicado Online: 5 Febrero, 2014. Acceso 14 diciembre, 2018.
- Lee, Y. P.; Yoon, J. T. Taxonomy and Morphology of *Undaria* (Alariaceae, Phaeophyta) in Korea. *Algae.* **1998**, *13*, 4, 427–446.
- Li, X.; Fan, X.; Han, L.; Lou, Q. Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. *Phytochem.* **2002**, *59*, 157–161.

Liu, C. L.; Lim, Y. P.; Hu, M. L. Fucoxanthin enhances cisplatin-induced cytotoxicity via NF κ B-mediated pathway and down regulates DNA repair gene expression in human hepatoma HepG2 cells. *Mar. Drugs*. **2013**, *11*, 50–66.

Lopez–Huertas, E. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacol. Res*. **2010**, *61*, 200–207.

Lordan, S.; Ross, R. P.; Stanton, C. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Mar. Drugs*. **2011**, *9*, 1056–1100.

Maeda, H.; Hosokawa, M.; Sashima, T.; Funayama, K.; Miyashita, K. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **2005**, *332*, 392–397.

Martín, J. P. y Bastida, R. El alga invasora *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar en la Ría Deseado (Patagonia austral, Argentina): ciclo del esporofito y factores ambientales determinantes de su distribución. *Rev. Biol. Mar. Oceanog*. **2008**, *43*, 2, 335–344.

McIlhenny, E. H.; Riba, J.; Barbanoj, M. J.; Strassman, R.; Barker, A. S. Methodology for determining major constituents of ayahuasca and their metabolites in blood. *Biomed. Chromatogr*. **2012**, *26*, 301–313.

Mikami, K. y Hosokawa, M. Biosynthetic Pathway and Health Benefits of Fucoxanthin, an Algae-Specific Xanthophyll in Brown Seaweeds. Review. *Int. J. Mol. Sci*. **2013**, *14*, 13763–13781.

Morelissen, B.; Dudley, B. D.; Geange, S. W.; Phillips, N. E. Gametophyte reproduction and development of *Undaria pinnatifida* under varied nutrient and irradiance conditions. *J. Exper. Mar. Biol. Ecology*. **2013**, *448*, 197–206.

Morita T, Kurashima A, Maegawa M. Temperature requirements for the growth of young sporophytes of *Undaria pinnatifida* and *Undaria undarioides* (Laminariales, Phaeophyceae). *Phycol. Res.* **2003b**, *51*, 265–270.

Ngo, D. H.; Vo, T. S.; Ngo, D. N.; Wijesekara, I.; Kim, S. K. Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *Inter. J. Biol. Macromolec.* **2012**, *51*, 4, 378–383.

Ojeda, A. G. Informe Beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas (EVC–CIN). Caracterización química y Bioactividad de productos de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae). Área del conocimiento: Bioquímica Marina. 2013.

Okuzumi, J.; Nishino, H.; Murakoshi, M.; Iwashima, A.; Tanaka, A.; Yamane, T.; Fujita, Y.; Takahashi, T. Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-myc expression and cell cycle progression in human malignant tumor cells. *Cancer Lett.* **1990**, *55*, 75–81.

Pardee, A. B.; Li, Y. Z.; Li, C. J. Cancer therapy with beta-lapachone. *Curr. Cancer Drug. Targets.* **2002**, *2*, 3, 227–242.

Pavia, H.; Toth, G. B. Influence of light and nitrogen on the phlorotannin content of the brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Hydrobiol.* **2000**, *440*, 299–305.

Pavia, H.; Toth, G.B. Inducible chemical resistance to herbivory in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Ecology.* **2000**, *81*, 3, 212–225.

Pérez, M. J.; Falqué, E.; Domínguez, H. Antimicrobial Action of Compounds from Marine Seaweed. *Mar. Drugs*. **2016**, *14*, 3, 1–38.

Peteiro, C. Morphological Traits of Wild and Selected Strains of Cultured *Undaria pinnatifida* from Galicia (NW Spain). *J. World Aquacul. Society*. **2014**, *45*, 4, 469–474.

Peterson, L. B.; Cummings, S. B. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. *Biomed. Chromatogr*. **2006**, *20*; 227–243.

Piovan, A.; Seraglia, R.; Bresin, B.; Caniato, R.; Filippini, R. Fucoxanthin from *Undaria pinnatifida*: Photostability and Coextractive Effects. *Molec*. **2013**, *18*, 6298–6310.

Piriz, M. L.; Eyra, M. C.; Rostagno, C. M. Changes in biomass and botanical composition of beach-cast seaweeds in a disturbed coastal area from Argentine Patagonia. *J. Appl. Phycol*. **2003**, *15*, 67–74.

Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouységu, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, *50*, pp 586–621.

Quitral, V.; Morales, C.; Sepúlveda, M.; Schwartz, M. Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. *Rev. Chil. Nutr*. **2012**, *39*, 4, 196–202.

Rajapakse, N.; Kim, S. Nutritional and digestive health benefits of seaweeds. En: *Adv Food Nut Res*. Elsevier Inc. **2011**, *64*; pp 19–23.

Renaud, S. M.; y Luong-Van, J.T. Seasonal variation in the chemical composition of tropical Australian marine macroalgae. *J. Appl. Phycol.* **2006**, *18*, 381–387.

Rodrigo Valenzuela B., Gladys Tapia O., Marcela González E., Alfonso Valenzuela B. OMEGA-3 Fatty Acids (EPA And DHA) and its Application in Diverse Clinical Situations. *Rev. Chil. Nutr.* **2011**, *38*, 3, 356–367.

Rodrigo, R.; Miranda, A.; Vergara, L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clin. Chim. Act.* **2011**, *412*, 410–424.

Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A.; Lage-Yusty, M.A.; López-Hernández, J. Determination of phenolic compounds in macroalgae for human consumption. *Food Chem.* **2010**, *121*, 2, 634–638.

Rodríguez-Troncoso, A.P; Carpizo-Ituarte, E.; Cupul-Magaña, A. Oxidative damage associated with thermal stress in *Pocillopora verrucosa* from the Mexican Pacific. *Cienc. Mar.* **2013**, *39*, 113–118.

Roux, A.; Fernández, M.; Bremec, C. Estudio preliminar de las comunidades bentónicas de los fondos de pesca del Golfo San Jorge (Argentina). *Cienc. Mar. Mexico.* **1995**, *21*, 295–310.

Sánchez-Machado, D.I.; Lopez-Cervántes, J; Lopez-Hernandez, J; Paseiro-Losada, P. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chemistry.* **2004**, *85*, 439–444.

Sanderson, J. A preliminary survey of the introduced macroalga, *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar on the east coast of Tasmania, Australia. *Bot. Mar.* **1990**, *33*, 153–157.

Saraceno, M.; Simionato, C. G.; Ruiz-Etcheverry, L. A. La Corriente de Malvinas y su rol en el clima de la Tierra. *El ojo del cóndor*. **2012**, 3, 11–13.

Schultz Moreira, A. R.; Garcimartín, A.; Bastida, S.; Jiménez-Escrig, A.; Rupérez, P.; Green, B. D.; Rafferty, E.; Sánchez-Muniz, F. J.; Benedí, J. Effects of *Undaria pinnatifida*, *Himanthalia elongata* and *Porphyra umbilicalis* extracts on *in vitro* α -glucosidase activity and glucose diffusion. *Nutr. Hosp.* **2014**, 29, 6, 1434–1446.

Scrosati, R. A. Anatomical Study on *Lessonia nigrescens* (Phaeophyceae, Laminariales) from Chile. *Darwiniana*. **1993**, 32, 271–278.

Shimoda, H.; Tanak, A.; Shan, S.; Maoka, T. Anti-pigmentary activity of fucoxanthin and its influence on skin mRNA expression of melanogenic molecules. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, 62, 1137–45.

Sideman, E. J.; Scheirer, D. C. Some fine structural observations on developing and mature sieve elements in the brow algae *Laminaria saccharina*. *Amer. J. Bot.* **1977**, 64, 649–657.

Silva, A. M. P.; Paiva, S. R.; Figueiredo, M. R.; Kaplan, M. A. C. Atividade biológica de naftoquinonas de espécies de Bignoniaceae. *Rev. Fitos.* **2012**, 7, 4, 207–215.

Simopoulos, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ration in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* **2008**, 233, 674–688.

Siroto, V.; Dumas, C.; Desquilbet, L; Mariotti, F.; Legrand, P.; Catheline, D.; Leblanc, J.C.; Margaritis, I. A restricted cubic spline approach to assess the

association between high fat fish intake and red blood cell EPA + DHA content. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2012**, *22*, 318-326.

Stuart, M. D.; Hurd, C. L.; Brown, M. T. Effects of seasonal growth rate on morphological variation of *Undaria pinnatifida* (Alariaceae, Phaeophyceae). *Hydrobiol.* **1999**, *398*, 399, 191–199.

Shakambari, G.; Ashokkumar, B.; Varalakshmi, P. Phlorotannins from Brown Algae: inhibition of advanced glycation end products formation in high glucose induced *Caenorhabditis elegans*. *Indian J. Exp. Biol.* **2015**, *53*, 371–379.

Shibata, T.; Nagayama, K.; Sugiura, S.; Makino, S.; Ueda, M.; Tamaru, Y. Analysis on Composition and Antioxidative Properties of Phlorotannins Isolated from Japanese *Eisenia* and *Ecklonia* Species. Review. *Am. J. Plant Sci.* **2015**, *6*, 2510–2521.

Suetsuma, K.; Maekawa, K.; Chen, J, R. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem.* **2004**, *15*, 267–272.

Synytsya, A.; Kim, W.J.; Kim, S.J.; Kim, S.M.; Pohl, R.; Synytsya, A.; Kvasnička, F.; Capíková, J.; Park, Y.I. Structure and antitumor activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Carbohydrate Polymers.* **2010**, *81*, 41–48.

Targett, N.M.; Boettcher, A.A.; Targett, T.E.; Vrolijk, N.H. Tropical marine herbivore assimilation of phenolic-rich plants. *Oecologia.* **1995**, *103*, 170–179.

Tascon, M.; Benavente, F.; Sanz-Nebot, M.V.; Gagliardi, L.G. Fast determination of harmala alkaloids in edible algae by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 13, 3637–3645.

Tascón, M.; Gagliardi, L.G.; Benavente, F. Parts-per-trillion detection of harmala alkaloids in *Undaria pinnatifida* algae by on-line solid phase extraction capillary electrophoresis mass spectrometry, *Anal. Chim. Act.* **2017**, *954*, 60–67.

Urbano, M.G.; Goñi, I. Bioavailability of nutrients in rats fed on edible seaweeds, Nori (*Porphyra tenera*) and Wakame (*Undaria pinnatifida*), as a source of dietary fibre. *Food Chem.* **2002**, *76*, 281–286.

Vinuesa, J. Aspectos Ambientales. *El ojo del cóndor.* **2012**, *3*, 11–13.

Vreeland, V.; Laetsch, W. M. A gelling carbohydrate in algal cell wall formation. En: *Organization and assembly of plant and animal extracellular matrix*. Academic Press, 1990; pp. 137–171.

Vreeland, V.; Waite, J.; Epstein, L. Polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. *J. Phycol.* **1998**, *34*, 1–8.

Wang, R.; Paul, V. J.; Luesch, H. Seaweed extracts and unsaturated fatty acid constituents from the green alga *Ulva lactuca* as activators of the cytoprotective Nrf2–ARE pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, *57*, 141–153.

Xia, S.; Wang, K.; Wan, L.; Li, A.; Hu, Q.; Zhang, C. Production, characterization and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella auria*. *Mar. Drugs.* **2013**, *11*, 2667–2681.

Yang, H. C.; Zeng, M. Y.; Dong, S. Y.; Liu, Z. Y.; Li, R. X. Anti-proliferative activity of phlorotannin extracts from brown algae *Laminaria japonica* Aresch. *Chinese J. Ocean. Limnology*. **2010**, *28*, 122–130.

Yoo, M. S.; Shin, J. S.; Choi, H. E.; Young–Wuk Cho, Y. W.; Bang, M. H.; Baek, N. I.; Lee, K. T. Fucosterol isolated from *Undaria pinnatifida* inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines via the inactivation of nuclear factor- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase in RAW264.7 macrophages. *Food Chem*. **2012**, *135*, 967–975.

Yoshie, Y.; Wang, W.; Hsieh, Y. P.; Suzuki, T. Compositional Difference of Phenolic Compounds between Two Seaweeds, *Halimeda* sp. *J. Tokyo Univ. Fish*. **2002**, *88*, 21–24.

Yoshie-Stark, Y.; Hsieh, Y. P.; Suzuki, T. Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. *J. Tokyo Univ. Fish*. **2003**, *89*, 1–6.

Zaixso, H. E.; Boraso de Zaixso, A. *Recursos biológicos bentónicos: la zona Costera Patagónica Argentina*, 1ª ed. Comodoro Rivadavia: Universitaria de la Patagonia EDUPA, 2015.

Zhang, D. M.; Miao, G. R.; Pei, L. Q. Studies on *Undaria pinnatifida*. *Proceed. Internat. Seaweed Symposium*. **1984**, *11*, 263–265.

Zhao, Z.; Pan, Y.; Jiang, J.; Gao, S.; Sun, H.; Dong, Y.; Sun, P.; Guan, X.; Zhou, Z. Unrevealing variation of microbial communities and correlation with environmental variables in a full culture-cycle of *Undaria pinnatifida*. *Mar. Environm. Res*. **2018**, *139*, 46–56.

CAPITULO 7

ESTUDIO PARTICULAR DE METABOLITOS DE *Undaria pinnatifida*

7.1. Alginato de sodio

Los alginatos comerciales se obtienen principalmente a partir de diversas algas pardas de los órdenes Laminariales y Fucales, entre las que se encuentran, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria hyperborea*, *L. digitata*, *Lessonia* sp., *Undaria pinnatifida* y *Macrocystis pyrifera*. De ellas, habitan en las costas patagónicas los tres últimos géneros (Zaixso y Boraso, 2015).

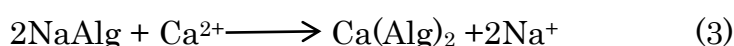
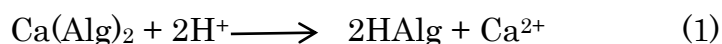
En el Capítulo 2 de Introducción de la presente tesis, se destacó la importancia de los alginatos por sus aplicaciones industriales. El empleo del alginato ha experimentado un avance exitoso, especialmente en el desarrollo de innovaciones científicas que comprenden apósitos biodegradables para la regeneración de la piel, encapsulación de diversos fármacos (Liakos et al., 2013), microencapsulación, transporte de nanopartículas, compuestos antimicrobianos, entre otros (Bajpai et al., 2012).

En la última década, las industrias biomédica y farmacéutica estudian cada vez más a estos polisacáridos para el desarrollo de matrices para encapsular medicamentos (Goh et al., 2012). Entre los alginatos, el de sodio (NaAlg) es el más ampliamente empleado por ser no tóxico y biodegradable.

7.1.1. Obtención de alginato de sodio purificado

La obtención del NaAlg se efectuó mediante una serie de etapas tal como se describió en el Capítulo 4 de este trabajo de tesis.

Las etapas comprenden en general las reacciones que se describen a continuación mediante ecuaciones (Arvizu-Higuera et al., 1996):



El término Alg que aparece en las ecuaciones se emplea para representar la unidad monomérica $C_5H_7O_4COO^-$ ya sea del ácido β -D-manurónico (M) o del ácido α -L-gulurónico (G), cuyas constantes de disociación del ácido carboxílico han sido determinadas como $pK_a = 3,38$ y $pK_a = 3,65$, respectivamente, con valores de pK_a similares para los polímeros (Haug, 1961).

Durante todo el proceso de obtención del alginato de sodio (NaAlg) en la presente tesis, se realizó un estricto control de distintos parámetros críticos como son las temperaturas, pH, agitación y tiempo en cada uno de los pasos, así como la utilización de reactivos y solventes de calidad adecuada, dado que las condiciones de reacción afectan la viscosidad final del alginato obtenido (Hernández-Carmona et al., 2012).

El alginato en el alga se encuentra en forma de sales mixtas insolubles del ácido algínico principalmente como sal de calcio y en menor medida como sales solubles de sodio, potasio, magnesio, entre otras (Hernández-Carmona et al., 2012). Por lo tanto la extracción a partir de algas comprendió un pretratamiento con una solución ácida (Arvizu-Higuera et al., 1996; Becerra 2016) de tal manera de convertir todas las sales en ácido algínico insoluble, cuya reacción se describe en la ecuación (1). En la etapa siguiente se liberó el ácido algínico previo tratamiento con Na_2CO_3 al 1,5 % por formación de alginato de sodio, cuya reacción se describe en la ecuación (2). Las etapas siguientes consistieron en la purificación mediante diálisis y formación de alginato de calcio con $CaCl_2$ al 1 % correspondiente a la ecuación (3) y nuevo tratamiento de acidificación con una solución de HCl al 5 % y posterior alcalinización con Na_2CO_3 al 2 %.

El producto final obtenido, NaAlg purificado (de cada estación), se precipitó con etanol y una vez seco se pulverizó obteniéndose un polvo de una coloración blanca (primavera, otoño e invierno) y blanca amarillenta (verano).

Las etapas de extracción descritas en los párrafos anteriores, en general son comunes para la obtención de alginato a partir de distintas especies de algas pardas, con algunas variantes en cuanto al tipo de solución, concentración, pH y tiempo de reacción; ejemplo de ello lo constituye la extracción a escala piloto de NaAlg a partir de *Macrocystis pyrifera* colectada en las costas de México (Hernández-Carmona et al., 2012).

En la etapa de conversión de ácido algínico a NaAlg (correspondiente a la ecuación 2), dependiendo de la especie utilizada, puede requerir hidratación como es en el caso de *Lessonia vadosa* colectada en las costas del Golfo San Jorge (Becerra, 2016). En nuestro caso, la hidratación durante el proceso de extracción de *U. pinnatifida* no fue necesaria en ninguna de las estaciones.

Por lo tanto el proceso de extracción realizado en la presente tesis, es un punto inicial de partida para optimizar la obtención de NaAlg a escala piloto.

7.2. Análisis de los productos

7.2.1. Rendimiento y viscosidad

Los rendimientos de extracción de NaAlg mostraron valores interesantes al compararlos con otras investigaciones (Murata y Nakazoe, 2001; Yoon et al., 2004; Skriptsova et al., 2004). No obstante, los niveles de alginato también dependen de diferentes factores ambientales, como la estación del año, el ciclo de vida, el lugar de colecta, entre otros (Stengel et al., 2011).

En la **Figura 7.1** se observa un aumento progresivo del rendimiento de extracción con un mínimo en otoño y un máximo en verano, marcando claramente una variabilidad estacional.

Tal como ocurre con otras algas, las variaciones en el rendimiento de obtención del alginato de sodio en *Undaria pinnatifida* está relacionado con la distribución del polisacárido en las frondas, la proporción de residuos de las unidades monoméricas ácido manurónico y ácido gulurónico, la estación de colecta y la etapa de desarrollo de los esporofitos (Skriptsova et al., 2004).

El NaAlg obtenido a partir de *U. pinnatifida* colectada en la costa de Bahía de Pedro el Grande, Mar de Japón (Rusia), registró valores de rendimiento de extracción máximos en primavera y mínimos en otoño (Skriptsova et al., 2004), a diferencia de estos resultados, en nuestro caso el valor máximo de rendimiento fue en verano, lo que se relaciona con la temperatura en la zona de colecta (13 °C) que favorece la tasa de crecimiento y la etapa reproductiva del alga, lo que contribuye a la producción de alginato, manteniéndolo en un valor máximo. En

tanto que el valor mínimo de rendimiento también fue en otoño, y guarda relación con la época de menor crecimiento de la especie; esto se vio reflejado en la longitud de los ejemplares que se colectaron durante esta estación (ver Capítulo 6).

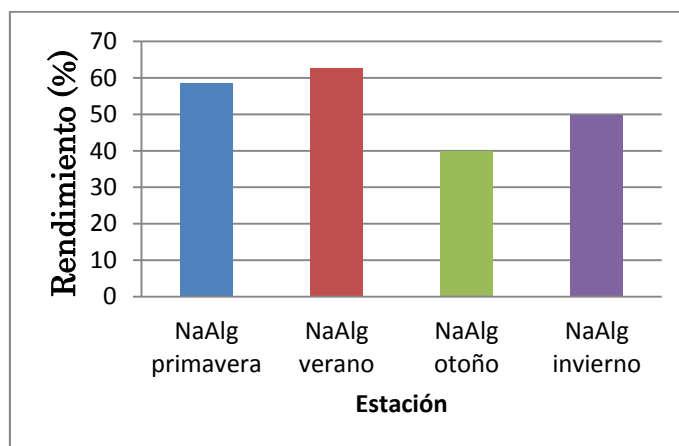


Figura 7.1. Rendimientos de las extracciones de alginato de sodio (NaAlg) a partir de las frondas de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente en las costas de Comodoro Rivadavia.

El aumento del contenido de alginato en los esporofilos está claramente relacionado con el desarrollo de estructuras reproductivas (Skriptsova et al., 2004). En nuestro caso las muestras colectadas en verano presentaron un alto porcentaje de esporofilos (ver Capítulo 6), coincidiendo con la mayor producción de alginato en las frondas.

Además del rendimiento, es de gran importancia conocer la viscosidad del alginato obtenido, ya que de esta depende el uso que pueda darle la industria.

La aplicación de los alginatos se basa en sus distintas propiedades, entre ellas su habilidad como espesantes al ser disueltos en agua, generando un aumento en la viscosidad del disolvente.

La capacidad del alginato para formar soluciones coloidales se mide en función de su grado de polimerización, el cual es una medida de la masa molecular promedio (MWa) y la proporción de los constituyentes del polisacárido, esto es los ácidos urónicos β -D-manurónico (mana) y α -L-gulurónico (gula) que se relacionan directamente con la viscosidad de sus soluciones (Lupo et al., 2012).

Por otra parte las soluciones de alginato presentan un comportamiento de carácter no-newtoniano, donde la viscosidad depende de la velocidad de deformación y la temperatura (Arvizu-Higuera et al., 1996). Las temperaturas elevadas y los tiempos de agitación prolongados producirán alginatos de menor viscosidad, debido al fraccionamiento de las cadenas de los ácidos urónicos que conforman el alginato.

En la industria de los alginatos se emplea en general para evaluar la calidad del polisacárido en términos de viscosidad, la determinación de la viscosidad aparente (Mazumder et al., 2016). En este trabajo de tesis, la viscosidad aparente se determina a partir de una solución de alginato de sodio purificado preparada al 1 % p/v en agua bidestilada y equilibrada en reposo, por 2 h a 25 °C. Se mide la viscosidad después de mantener una agitación por 30 s a 60 rpm. Los resultados se muestran en la **Tabla 7.1**; también se muestran las proporciones de los constituyentes del alginato y su MWa.

Tabla 7.1. Resultados de masa molecular promedio, viscosidad y constituyentes de los alginatos purificados de *Undaria pinnatifida* colectada estacionalmente en Comodoro Rivadavia.

Estación	Muestras	MWa (Da)	Viscosidad (cP)	Hidratos de carbono constituyentes
primavera	NaAlg	1083	7,2	manA–gula (0,7–1)
verano	NaAlg	7359	10,7	manA–gula (1,1–1)
otoño	NaAlg	805	9,0	manA–gula (0,8–1)
invierno	NaAlg	603	6,7	manA–gula (1,5–1)

La composición de ácidos urónicos mostró una variación estacional, resultando interesante la proporción de estos ácidos para el producto de verano, lo cual se correlaciona con su MWa. En el producto de invierno la proporción de ácido D-manurónico fue mayoritario con respecto a las restantes estaciones.

Nuestros resultados concuerdan con otras investigaciones realizadas por Skriptsova et al. (2004), quienes mediante estudios realizados con ¹³C-RMN sobre

el alginato obtenido de *U. pinnatifida* colectada en las costas de Rusia durante el invierno, mostraron que el producto contenía principalmente ácido manurónico, mientras que el producto obtenido de ejemplares adultos colectados en verano mostraron proporciones iguales de los residuos de manurónico y gulurónico. Estas variaciones fueron distintas en otras especies del orden Laminariales, por ejemplo las proporciones relativas de los residuos de manurónico y gulurónico en ejemplares juveniles y adultos de *Laminaria digitata* fueron 0,8–1 y 1–1,84; respectivamente (Indergaard et al., 1990).

La obtención de alginato de sodio de baja viscosidad (menor a 50 cP), resulta también interesante desde el punto de vista de la conservación ya que permite que se puedan almacenar a temperaturas entre 10 a 20 °C sin observarse cambios por hasta tres años. Al contrario, los de mayor viscosidad son menos estables. En la industria farmacéutica se comercializan productos con grado de polimerización entre 100 y 1000 unidades cuyas viscosidades están en el rango de 10-1000 cP para soluciones al 1 % ((McHugh, 1987; Muniswamy, 1989). Los resultados obtenidos en la presente tesis mostraron que los NaAlg de las cuatro estaciones registraron valores bajos de viscosidad, indicando productos con gran estabilidad y con potencial para aplicaciones farmacéuticas.

La **Figura 7.2** muestra nuestros resultados de las cuantificaciones realizadas al alginato obtenido estacionalmente de *U. pinnatifida*. En las cuatro estaciones los alginatos presentaron grupos sulfato como parte de su estructura molecular, siendo el producto de verano el de mayor proporción.

Con el objetivo de evaluar la posibilidad del uso de *Macrocystis pyrifera* y *Undaria pinnatifida*, colectadas en las costas de Bahía de Camarones (norte del GSJ) y del Golfo Nuevo durante los meses de noviembre a diciembre, para la remoción de mercurio, zinc, cadmio, cromo y níquel, se demostró mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), la presencia de grupos sulfato en el espectro del alginato de *U. pinnatifida*, no así en el de *M. pyrifera*, señalando una diferencia notoria en la composición del polisacárido en ambas especies (Plaza-Cazón, 2012).

Estudios de distintos polisacáridos han descrito cómo influye la presencia de grupos sulfato en su estructura, así como en el peso molecular que adquieren, la

complejidad de los polímeros o su composición, pudiendo ser responsables además de la potenciación de su actividad biológica (De Jesus Raposo et al., 2015; Montoya-Rosas et al., 2017).

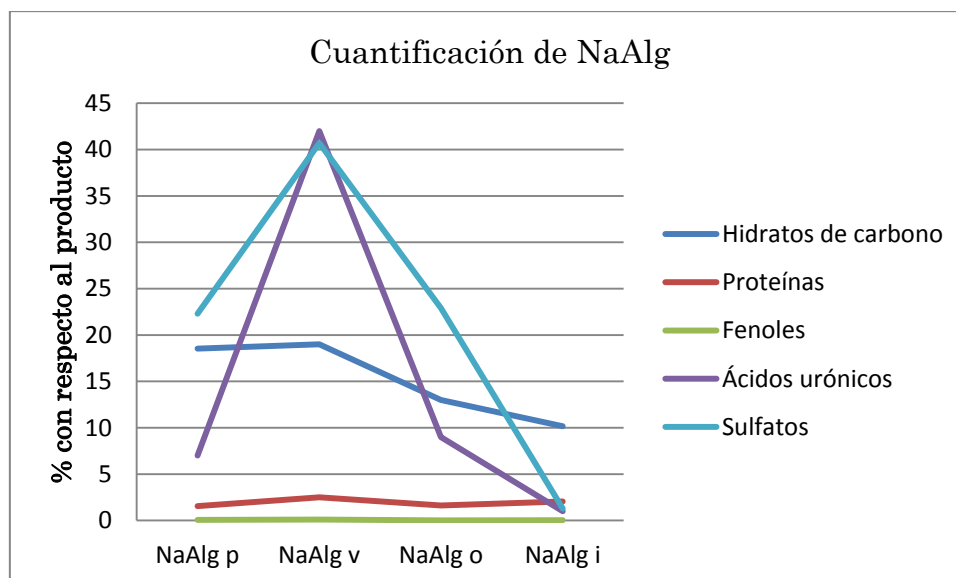


Figura 7.2. Resultados de las cuantificaciones realizadas del NaAlg extraído de las frondas de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente en las costas de Comodoro Rivadavia. (NaAlg p, NaAlg v, NaAlg o, NaAlg i, corresponden a alginato de sodio de primavera, verano, otoño e invierno, respectivamente).

Los distintos bloques (G, M y MG) constituyentes del alginato de sodio de *Lessonia vadosa* colectada en la zona central del GSJ durante el verano, evidenciaron ausencia de proteínas en todos los casos y muy bajo contenido en sulfatos (Becerra, 2016).

En nuestro caso, las proteínas estuvieron presentes en todas las estaciones en bajas proporciones, siendo el producto de primavera y de otoño los que presentaron menor valor; esto permite indicar que estos alginatos son los que presentaron mayor pureza.

Si bien el procedimiento aplicado para la extracción de los alginatos resultó promisorio para todas las estaciones, resulta evidente que en el caso del alga en estudio en esta tesis, se requiere una mayor purificación a fin de obtener alginatos de calidad óptima. En este contexto, estos resultados constituyen un importante aporte que permitirá definir a futuro una metodología apropiada para

la obtención racional de este polisacárido, sobre la base del conocimiento integral alcanzado durante la tesis.

7.3. Péptidos

En la actualidad existen diversas técnicas para la purificación de péptidos potencialmente bioactivos, las cuales pueden ser utilizadas para obtener resultados promisorios y confiables. De ellas, destacamos la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC en inglés) que ha sido ampliamente utilizada como una herramienta para el análisis y purificación de biomoléculas. Este tipo de cromatografía no sólo es capaz de separar péptidos de bajo peso molecular provenientes de hidrólisis enzimáticas, o purificar péptidos sintéticos, sino también, polipéptidos y proteínas de alto peso molecular. Además, se pueden separar péptidos con secuencias de aminoácidos casi idénticas, los cuales difieren solo de un residuo de aminoácido (Aguilar, 2004).

La columna (fase estacionaria sólida) contiene una matriz de naturaleza no polar sobre la cual los péptidos y polipéptidos se retienen. La columna está empacada con microesferas de sílica porosa acoplada con un derivado alquilsilano. Los alquilsilanos de entre 4 y 18 átomos de carbono (conocidos como columnas C-4 y C-18, respectivamente) son utilizados para modificar la superficie de la fase estacionaria. La retención del soluto se produce a través de interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas con la fase estacionaria de la columna, y la elución se lleva a cabo por la disminución de la naturaleza iónica, o el aumento de la hidrofobicidad del eluyente. En la separación de péptidos, éstos son eluidos con gradientes en los cuales se va incrementando la concentración de un solvente orgánico (fase móvil) como el acetonitrilo, conteniendo un modificador iónico, como el ácido trifluoroacético (TFA) (Sewald y Jakubke, 2002; Aguilar, 2004).

7.3.1. Extracción y determinación de péptidos por RP-HPLC

La extracción de los péptidos presentes en las frondas de *Undaria pinnatifida* colectada en las costas de Comodoro Rivadavia (Golfo San Jorge) durante la

primavera (EMUpp), se realizó con metanol (ver Capítulo 4, Desarrollo Experimental). La presencia de estos metabolitos, en el extracto metanólico concentrado, fue analizada por HPLC en una columna C18, con un detector de arreglo de Diodos (RP-HPLC-DAD), a una longitud de onda de 215 nm. En la **Figura 7.3** se muestra el perfil obtenido, ampliando en la parte inferior la zona de interés. En él se destacó la presencia de dos señales interesantes; la señal A, con un tiempo de retención (t_R) de 41,04 min, que mostró un espectro de absorción con máximo en la zona de 280 nm, propia de péptidos en cuya estructura están presentes aminoácidos aromáticos tales como fenilalanina o triptófano. Y la señal B, con un t_R de 59,31 min, que mostró un espectro de absorción con máximo en la zona de 254 nm, propia de péptidos en cuya estructura está presente el aminoácido tirosina.

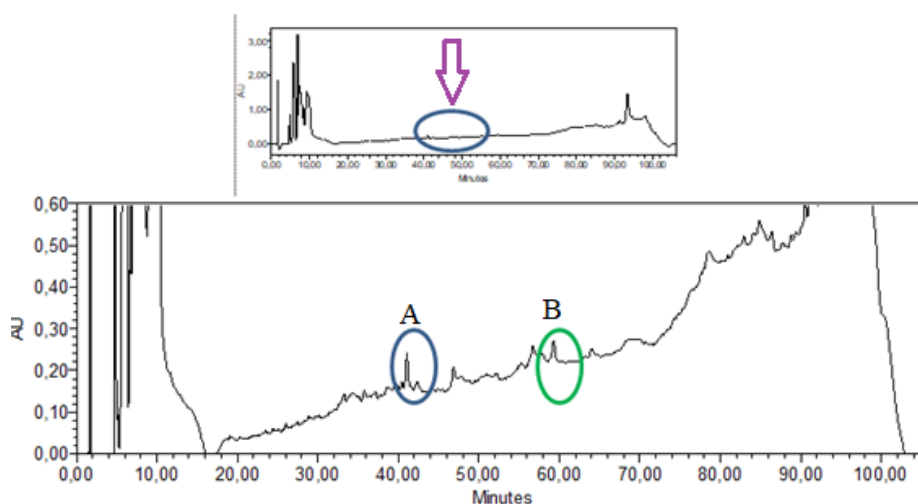


Figura 7.3. Cromatograma obtenido mediante RP-HPLC-DAD del extracto metanólico de *U. pinnatifida* colectada en primavera (parte superior) y ampliación de la zona de interés (parte inferior).

En algunas algas rojas, como *Palmaria palmata* y *Porphyra tenera*, las proteínas pueden representar de un 35 y 47 % (con respecto al peso seco). En las algas verdes como *Ulva* sp. se encuentran entre un 15 a un 20 % con respecto al peso seco. En tanto que en algas pardas como *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* y *Himanthalia elongata* tienen un bajo contenido cuyos valores van de un 5 a un 15 % (Burtin, 2003).

Entre los péptidos encontrados en macroalgas abundan los de 2 a 20 aminoácidos y pueden ser lineales, cíclicos o péptidos con uno o más enlaces amida no peptídico (Frikha et al., 2011). Estos péptidos aislados se caracterizan por poseer actividades antioxidante, antitumoral, antiviral, antimicrobiana, antihipertensiva, anticoagulante, hipoglucemiantes, hipocolesterolemiantes, entre otras (Holdt y Kraan, 2011; Samarakoon y Jeon, 2012).

Dentro de la actividad antihipertensivas, estudios realizados sobre *Porphyra yezoensis* (Suetsuna, 1998) y *Undaria pinnatifida* (Suetsuna y Nakano, 2000) sugirieron que ciertos péptidos podrían tener potentes efectos antihipertensivos comparables a los de los fármacos terapéuticos. Suetsuna y Nakano (2000) aislaron en fracciones peptídicas de *U. pinnatifida*, cuatro tetrapéptidos (ver Capítulo 2, Tabla 2.2) cuyo efecto antihipertensivo es a través de la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).

Los resultados obtenidos aunque preliminares, constituyen una base para profundizar el estudio que conduzca a la elucidación estructural y bioactividad.

7.4. Análisis del perfil metabólico por ^1H -RMN

Los ambientes marinos son diversos y heterogéneos, lo que está relacionado en cierta medida con distintas condiciones físico-químicas como la salinidad, la radiación UV, la temperatura y la presión. Dichos hábitats están ocupados por una gran diversidad de organismos, destacándose las algas (Mora et al., 2011).

Las micro y macroalgas son organismos que biosintetizan una gran variedad de metabolitos, a menudo únicos, relacionados con diferentes factores como las vías metabólicas, los sistemas reproductivos, los patrones de desarrollo, los mecanismos sensoriales y de defensa (Blunt et al., 2012). Los metabolitos desempeñan funciones importantes en muchos procesos biológicos, la reproducción, el desarrollo y la respuesta a los cambios en el medio ambiente (factores abióticos o bióticos), por lo que su perfil metabólico se ve alterado por los cambios en la expresión génica, la regulación de las funciones de proteínas, y está bajo la influencia de mutaciones y factores endógenos o exógenos. En este sentido, la metabolómica debe considerarse como el estudio metabólico de un organismo

en un momento dado, y puede modificarse de acuerdo con las diferentes etapas de la vida y las condiciones de crecimiento de cada especie (Gerwick, et al., 2012). Los complejos perfiles metabólicos son el resultado de las interacciones de cada especie con su entorno (Blunt et al., 2012).

Durante muchos años, el estudio de los metabolitos en los extractos de algas marinas se restringió a la identificación y cuantificación de aquellos más relevantes. En 2011 se publicó el primer estudio metabolómico de algas rojas (Nylund et al., 2011), que describía los cambios en el perfil metabólico producidos por *Gracilaria vermiculophylla* en relación con una respuesta de defensa.

Las ciencias “ómicas” permiten estudiar un gran número de moléculas biológicas, implicadas en el funcionamiento de un organismo (Jamers et al, 2009).

El avance tecnológico ha permitido el estudio de las ciencias “ómicas” a gran escala de muchos genes, proteínas y metabolitos, permitiendo la creación de nuevas ciencias como la genómica, proteómica y metabolómica, entre otras (Jamers et al, 2009). Estas ciencias proporcionan métodos de generación de alto contenido de datos que permiten una descripción completa de casi todos los componentes dentro de la célula.

La metabolómica es el estudio de los procesos químicos que involucra todos los metabolitos necesarios para el funcionamiento normal, el mantenimiento y el crecimiento de una célula (Beecher, 2004).

En el caso de plantas terrestres y de las algas, se puede realizar el estudio de la composición química durante su desarrollo cuyo resultado brinda información detallada sobre un gran número de compuestos que se encuentran en la célula o tejidos en un momento dado (Fiehn, 2002; Förster et al., 2006). Por ello, el fenotipo metabólico de una célula o tejido es el resultado final de la interacción entre el genotipo y el medio ambiente. Este fenotipo varía en el espacio según el tipo de célula, en el tiempo dependiendo de la etapa de desarrollo y caracteriza un estado dado (normal o en respuesta al estrés biótico o abiótico) (Fiehn et al., 2003).

Las principales técnicas analíticas que se emplean están basadas en resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (MS) y espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT IR) (Nylund et al., 2011). Lo central

de esta ciencia es que ya no se aíslan compuestos individuales, sino que se realiza un análisis del perfil metabólico de un organismo y los informes producen una cantidad de datos que solamente se pueden manejar con sistemas de información muy avanzados (Verpoorte et al., 2005).

7.4.1. Metabolómica: empleo de la espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectrometría de RMN es un método de elección para un análisis comparativo de extractos de plantas (Ward et al., 2007).

Esta metodología no requiere purificación ni derivatización química de los compuestos a analizar (Fan, 1996). Permite la detección simultánea de los principales metabolitos presentes en extractos complejos sin destruir las muestras que se pueden recuperar después del análisis. La desventaja es la baja sensibilidad, 10^{-6} moles. La espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (^1H -RMN) se ha desarrollado para obtener rápidamente huellas metabólicas o perfiles metabólicos que resultan útiles para la identificación y posterior cuantificación de los metabolitos (Moing et al., 2007) mediante métodos analíticos complementarios (Nylund et al., 2011).

No obstante, no se realiza la asignación de señales porque hay muchas superposiciones en los espectros.

En este trabajo de tesis, trabajamos en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Leiden (Holanda), bajo la dirección del Dr. Yang Choi, mediante una estancia de investigación que realicé en el marco del proyecto internacional ChemBioFight FP7 IRSES.

Para poder asignar las señales del espectro a su correspondiente metabolito, se utilizó la base de datos incorporada en el software Chenomx NMR Suite 8.1, 2001-2015, disponible en aquel laboratorio.

Previo al análisis por ^1H RMN, los extractos etanólicos secos de primavera e invierno se pesaron y disolvieron con 500 μl de MD6 [250 ml de CD_3OD (MeOD) + 250 ml buffer KH_2PO_4 en D_2O (pH 6.0) conteniendo 0,1 % (p/p) del ácido 3-

(trimetilsilil) propionico-2, 2, 3, 3-d4 (TSP), 1:1]. La **Tabla 7.2** detalla las condiciones empleadas y los resultados alcanzados en esta tesis.

En la **Figura 7.4** se presentan los espectros correspondientes obtenidos a partir de los extractos etanólicos a temperatura ambiente (EOH1) y a 70 °C (EOH2) de primavera (**a, b**) e invierno (**c, d**). Como se puede observar, se detectaron distintas señales; de ellas, se destacaron las de mayor proporción en la región de los hidratos de carbono y de los aminoácidos, las que se correspondieron con el manitol y la alanina, respectivamente. Además, en ambos extractos de invierno se detectó la señal correspondiente a la glicina.

Tabla 7.2. Condiciones y perfil metabólico de ¹H-RMN de los extractos etanólicos al 80 % (v/v) obtenidos a temperatura ambiente (EOH1) y a 70 °C (EOH2) de *U. pinnatifida*.

Estación	Muestra	Peso (mg)	Solvente	Perfil metabólico
Primavera	EOH1	8,47	MD6 (250 µl MeOD + 250 µl buffer)	manitol, alanina
	EOH2	6,19	MD6 (250 µl MeOD + 250 µl buffer)	manitol, alanina
Invierno	EOH1	7,78	MD6 (250 µl MeOD + 250 µl buffer)	manitol, alanina, glicina
	EOH2	7,49	MD6 (250 µl MeOD + 250 µl buffer)	manitol, alanina, glicina

En general, las proteínas de las algas son ricas en glicina, arginina, alanina y ácido glutámico; contienen aminoácidos esenciales en niveles comparables a los que indica FAO/OMS como requerimientos (Rajapakse y Kim, 2011).

La presencia de alanina en todos los extractos EOH1 y EOH2 concuerda con el análisis de un producto comercial de *U. pinnatifida*, proveniente de Japón, que demostró que el contenido de proteínas totales era del 16,3 g/100 g de alga seca y dentro de los aminoácidos constituyentes la alanina representó el mayor valor (27,20 mg/g del alga seca) respecto de los demás aminoácidos (Kold et al., 2004). Distintas algas verdes y rojas, por ejemplo: *Ulva pertusa* (6,1 mg/g del alga seca)

y *Porphyra tenera* (7,4 mg/g del alga seca) mostraron la presencia de alanina en menores cantidades con respecto al aminoácido arginina de mayor valor 14,9 y 16,4 g/100 g de alga seca, respectivamente (Fleurence, 1999).

En otro estudio se ha encontrado que los extractos obtenidos del esporofito de *U. pinnatifida* contenían alanina, la cual resultó variable de acuerdo al lugar geográfico de colecta (Kwang-Jae et al., 2012). El predominio de alanina, se relaciona con el gusto típico *U. pinnatifida* (Nisizawa et al., 1987).

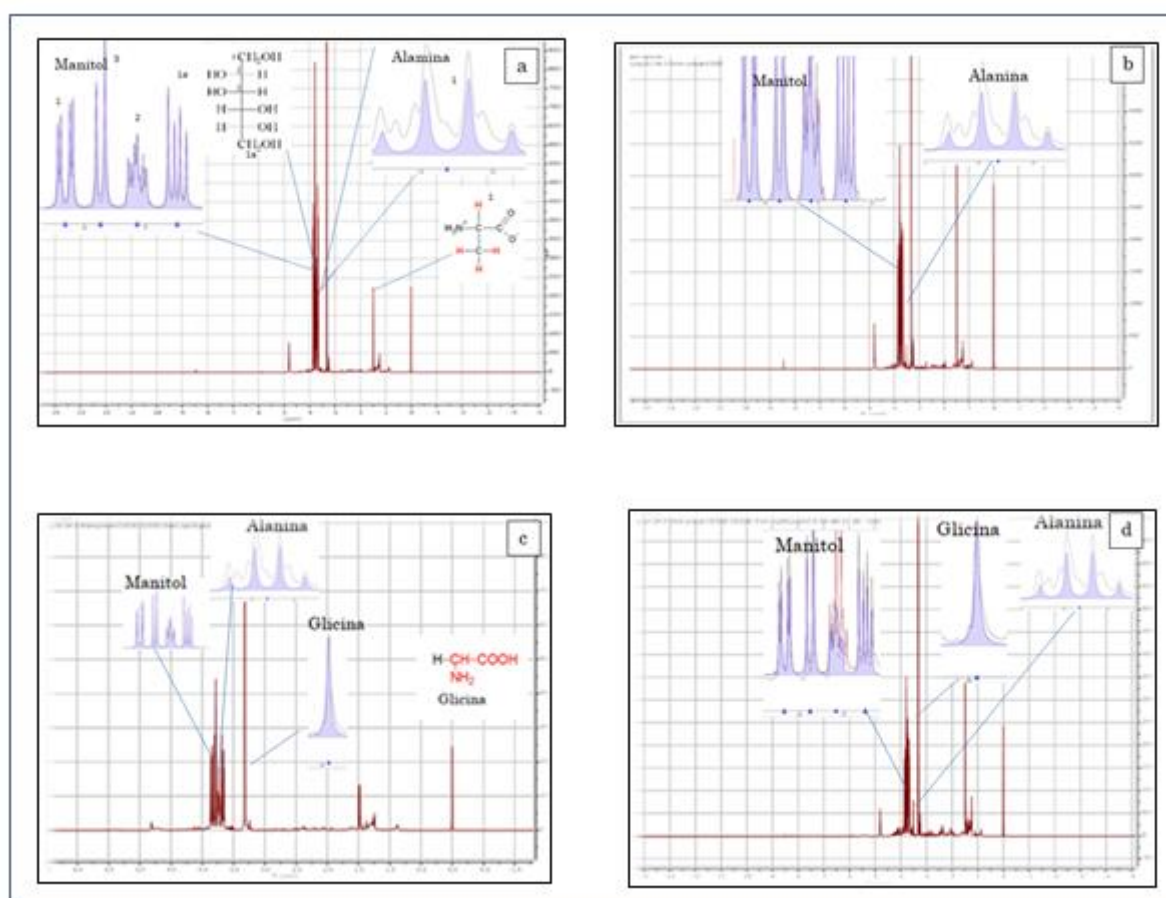


Figura 7.4. Espectro de ¹H-RMN, en donde se muestran las zonas correspondientes al manitol, alanina y glicina presentes en el extracto etanólico obtenido a temperatura ambiente y 70 °C de primavera e invierno a partir de las frondas de *U. pinnatifida* colectada en Comodoro Rivadavia. **a:** EOH1 primavera, **b:** EOH2 primavera, **c:** EOH1 invierno, **d:** EOH2 invierno.

La deshidratación y la salinidad son factores ambientales importantes que provocan estrés osmótico, teniendo un impacto negativo en el crecimiento de

plantas terrestre y algas. Es por ello que distintas especies incrementan su potencial osmótico y mantienen estable las condiciones intracelulares, a través de la síntesis de metabolitos intracelulares como la glicina y el manitol, entre otros (Zhu, 2002; Wang et al., 2007).

Durante la colecta en el intermareal de la especie en estudio, la salinidad fue un factor que se mantuvo constante en las distintas estaciones, por lo que este parámetro no puede ser considerado como un factor que modifique el perfil metabólico de los extractos etanólicos analizados. Seguramente en este caso, el clima y las estrategias del alga para colonizar el hábitat, son los factores externos determinantes de los perfiles obtenidos.

En el estrés hídrico, los tejidos vegetales generan una acumulación activa de solutos para asegurar su sobrevivencia (Attipalli et al., 2004). En las algas pardas dentro de los solutos implicados en la osmorregulación se encuentran el manitol y la glicina, cuya síntesis se ha asociado con el mantenimiento de la turgencia de sus tejidos para continuar con la función celular (Raven y Reed, 1989; Reed et al., 1995; Yanagisawa et al., 2013).

Ascophyllum nodosum a diferencia de otras especies de algas pardas, soporta en su hábitat natural (Japón) períodos de inmersión marina y períodos de exposición según el ciclo de las mareas, hecho que constituye un éxito de adaptación fisiológica frente a condiciones de estrés hídrico y salino. El manitol sintetizado por *Ascophyllum nodosum*, además de actuar como osmoregulador, se comporta como un eficaz antioxidante al bloquear las especies reactivas de oxígeno (ROS) y evitar así alteraciones metabólicas (Abu et al., 2013).

La presencia de glicina en los extractos etanólicos de *U. pinnatifida* estaría relacionado con una mayor exposición a la desecación de los ejemplares colectados en el intermareal.

En la década del 90 se investigó el efecto beneficioso de la glicina en la salud, el cual no es compartido por otros aminoácidos (Zhong et al., 1999). Además de ser un antioxidante, la glicina bloquea el proceso inflamatorio sistémico originado por diversas patologías. Valores superiores a los normales en sangre de este aminoácido, han demostrado mejorar entre otros, el daño hepático y la nefrotoxicidad producida por medicamentos (Ramos, 2004).

Estos resultados demuestran la importancia de la determinación del perfil metabólico en un estudio integral, dado que a partir de los mismos es posible seleccionar adecuadamente la estación de colecta de los ejemplares para obtener determinados metabolitos de interés.

7.5. Pared celular fibrilar

Las paredes celulares de las algas juegan un rol trascendente en el mantenimiento celular, siendo para las especies alóctonas un factor crucial para sobrevivir en condiciones muy distintas a las de origen. En las costas del Golfo San Jorge, *U. pinnatifida* se ha adaptado a nuevas condiciones con respecto a su lugar de origen, tanto de temperatura como con respecto a la variabilidad en la concentración salina y el pH, esto último debido a la influencia de corrientes marinas que confluyen en el Golfo (ver Capítulo 6, hábitat y ecología de *Undaria pinnatifida*).

El compartimento fibrilar de las paredes celulares de algas pardas se forma principalmente por microfibrillas de celulosa, incrustadas en una matriz amorfa de polisacáridos, principalmente ácido alginico y fucoidanos sulfatados, unidos entre sí mediante proteínas y restos de fenoles. Los polisacáridos le aportan resistencia y flexibilidad ya que forman geles en la matriz intercelular, ayudándole a resistir las tensiones provocadas por las olas y las corrientes marinas.

Dada su importancia, a lo cual se suma el hecho de que no existen estudios previos de la porción fibrilar de algas pardas, se extrajeron y caracterizaron por primera vez los constituyentes de la pared celular fibrilar de *U. pinnatifida*, colectada en la región central del Golfo San Jorge, en verano e invierno.

Para liberar la porción fibrilar de las paredes, se utilizaron técnicas de disrupción celular, combinando disrupción mecánica, sonicado y temperatura; luego el material fue sometido a una extracción secuencial mediante Folch (cloroformo–metanol, 2:1), urea 7 M, EDTA al 2 % y PAW (fenol–ácido acético–agua, 2:1:1, p/v/v) (ver esquema y descripción en la parte experimental, Capítulo 4 de este trabajo de tesis). Los extractos se purificaron por diálisis y se

obtuvieron dos subfracciones, correspondientes a materiales que permanecieron solubles dentro de la bolsa de diálisis y a otra parte que se insolubilizó durante la diálisis. Los productos fueron caracterizados químicamente.

La porción fibrilar de la pared celular de las frondas de *U. pinnatifida* colectada en las estaciones de verano e invierno representó un 31,4 y 17 %, respectivamente.

El contenido de lípidos fue calculado a partir del extracto de Folch (ver Capítulo 4, fraccionamiento de los constituyentes de la pared celular fibrilar), el cual constituyó un 12,5 % para la estación verano (EFV) y un 17,6 % para invierno.

En la **Figura 7.5** se presentan los resultados de las cuantificaciones de los distintos constituyentes de la pared celular fibrilar. La urea produce la disrupción de las uniones hidrógeno sin degradación de alguna de las uniones covalentes de los polisacáridos, como β -glucanos; también actúa sobre los puentes hidrógeno de las proteínas. La subfracción insoluble obtenida con urea presentó el mayor contenido de hidratos de carbono con respecto a la L-fucosa (30,10 %) para la estación invierno. Cabe destacar que la cuantificación de hidratos de carbono se determinó a partir de D-galactosa y L-fucosa mediante sus respectivas curvas patrón.

Los solventes quelantes como el EDTA, extraen sustancias ricas en ácidos urónicos, como restos de alginatos. En general, nuestros resultados mostraron que los constituyentes de la pared celular obtenidos con este solvente representaron los más bajos respecto a las demás subfracciones. Dentro de los constituyentes mayoritarios se destacaron las proteínas en invierno.

PAW extrae sobre todo proteínas por un efecto caotrópico debido a que el fenol desordena las estructuras proteicas mediante la ruptura de puentes hidrógeno y alteraciones de las interacciones hidrofóbicas; extrae además arabinosa y galactosa. En nuestro caso, la subfracción insoluble de invierno presentó el mayor contenido en proteínas (22,5 %) respecto a las otras subfracciones.

Estos resultados son inéditos, constituyendo los primeros que describen los constituyentes de la porción fibrilar de las paredes celulares de las frondas de *Undaria pinnatifida* colectada en las costas de la región central del GSJ.

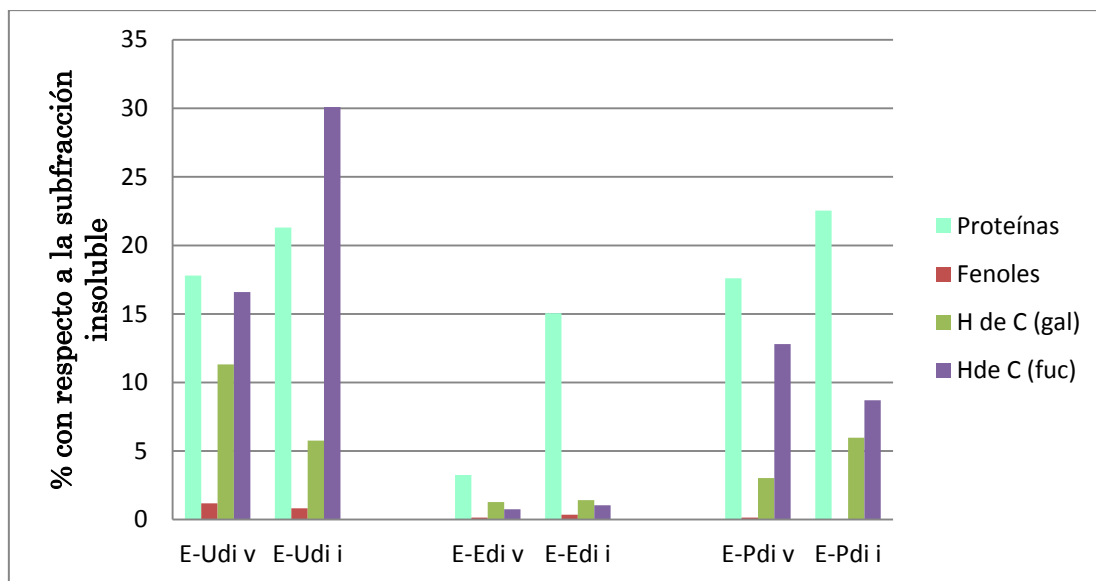


Figura 7.5. Resultados de la cuantificación de los principales componentes de la porción fibrilar de las paredes celulares de las frondas de *Undaria pinnatifida* colectada durante el verano e invierno, en las costas de Comodoro Rivadavia.

Los componentes de la pared celular de las algas y plantas están sometidos a diversas investigaciones, debido a su alto valor económico dentro de las industrias del papel, los alimentos y las fibras; además se proyectan distintas aplicaciones futuras como biocombustibles, nutraceuticos y productos farmacéuticos (Niklas, 2004).

Al igual que en *Iridaea undulosa*, alga roja colectada en las costas de Puerto Deseado a 294 km al sur de Comodoro Rivadavia, la porción fibrilar de la pared celular de *U. pinnatifida* probablemente está constituida por glicoproteínas. Estos agregados macromoleculares desde el punto de vista cuali-cuantitativo, resultaron ser la parte más importante de la porción fibrilar (Flores et al., 1997; 2000). Es posible que los aminoácidos formen zonas que complejan las fibrillas de celulosa, que facilitarían el entrecruzamiento con otras fibrillas de celulosa u otros polisacáridos fibrilares de la pared celular (Flores et al., 1997; 2000). Además, los compuestos fenólicos, entre ellos los florotaninos se encuentra en la pared celular formando complejos con los polisacáridos estructurales (Arnold y Targett, 2003).

En las algas pardas los alginatos están presentes como componente de la matriz de la pared celular y también lo encontramos en las regiones intercelulares. Su

función biológica es principalmente estructural, lo que le otorga a las algas la fuerza mecánica y la flexibilidad necesaria para resistir el movimiento del mar (Plaza-Cazón et al., 2014).

7.6. Extracción de fucosterol y fucoxantina de *Undaria pinnatifida* mediante Fluido Supercrítico (FSC)

Los distintos sistemas cromatográficos planteados (ver Capítulo 4), en el estudio preliminar para la extracción de fucosterol y fucoxantina, demostraron que el extracto de ciclohexano y las distintas fracciones purificadas mediante resinas de adsorción, contenían fucosterol y fucoxantina, por lo que no fue posible la separación de estos metabolitos por estos sistemas.

Es por esto que se estudió la posibilidad de la extracción y purificación de estos metabolitos mediante Fluidos Supercríticos.

La extracción de fucosterol y fucoxantina, de las frondas secas y molidas de *U. pinnatifida* colectada en primavera, se realizó en dos etapas, mediante una estancia de investigación en la Universidad París Descartes (Francia) en el marco del proyecto internacional ChemBioFight FP7 IRSES.

1. Extracción de esteroides a menor presión.
2. Extracción de fucoxantina y otros pigmentos con la adición de un co-disolvente (etanol 5 %) a alta presión para mejorar recuperación.

Paralelamente a las extracciones con CO₂ supercrítico, los compuestos insaponificables se extrajeron con una solución etanólica de hidróxido de potasio y hexano y posteriormente fueron cuantificados.

Las condiciones óptimas para la extracción del fucosterol mediante FSC, fueron obtenidas en un ensayo preliminar con *Lessonia vadosa*, en la que se pudo obtener fracciones enriquecidas en este metabolito (Becerra, 2016); además estas muestras fueron usadas de referencia para poder compararlas con las fracciones obtenidas de *U. pinnatifida* mediante el mismo método de extracción.

7.6.1. Etapa 1: extracción de esteroides

Se realizó la extracción con CO₂ supercrítico a partir de 0,5 kg de frondas secas y reducidas a polvo, a 50 °C y 18 MPa de presión, con el propósito de evitar la extracción de los distintos pigmentos presentes en la muestra.

En esta etapa la extracción con CO₂ supercrítico se realizó en presencia de etanol, el cual no se encontraba en contacto con la materia prima ya que sirvió para evitar la cristalización del extracto y recuperar todo el extracto de los separadores.

Durante la extracción se estudiaron dos parámetros: la cantidad de celulosa necesaria para colocar en el extractor (cuya capacidad es de 2 l); este parámetro limita la extracción de los pigmentos y el arrastre de la muestra en estudio. El segundo parámetro considerado fue la proporción de CO₂ por kg de material algal seco. En la **Tabla 7.3** se presentan los detalles correspondientes.

Tras probar distintas extracciones combinando los parámetros mencionados en párrafos anteriores, se efectuó una estándar de hasta 11 kg de CO₂/kg de las frondas reducidas a polvo, utilizando 30 % de celulosa/volumen total (2 l). A partir de ella se obtuvieron los extractos F1 y F1a (**Figura 7.6**).

F1 una vez disuelto en acetona, fue de color amarillo–naranja (sugiriendo que la fracción se encontraba enriquecida en esteroides). El uso de 30 % de celulosa y 18 MPa resultó adecuado en esta etapa de extracción, debido a que se obtuvo un extracto con la característica buscada, es decir libre de clorofilas y derivados. En nuestro caso, el rendimiento de la extracción fue superior (0,85 %) al de *Lessonia vadosa*, cuyo valor comprendió entre 0,15 a 0,17 % (Becerra, 2016).

7.6.2. Etapa 2: extracción de fucoxantina con un codisolvente a partir del residuo de la etapa 1

En la extracción con CO₂ se inyectó previamente etanol como codisolvente. Este proceso permitió mejorar la extracción de los pigmentos, entre ellos la fucoxantina.

La fucoxantina presente en diversas especies de algas pardas, entre ellas en *U. pinnatifida*, es un metabolito secundario perteneciente a los carotenoides. Debido a su mayor peso molecular respecto al fucosterol, la extracción por CO₂ supercrítico se llevó a cabo a una mayor presión para garantizar su máxima recuperación.

A partir del residuo de la primera extracción, se trabajó con hasta 40 kg de CO₂/kg del alga reducida a polvo, y 30 % de celulosa/volumen total (2 l) con una presión de 29 MPa y 5 % de EtOH de 96°, obteniéndose el extracto F2 (**Figura 7.6**). Cabe destacar que el extracto obtenido a alta presión (F2), con el codisolvente fue de color verde oscuro, esto evidenció la abundante presencia de pigmentos.

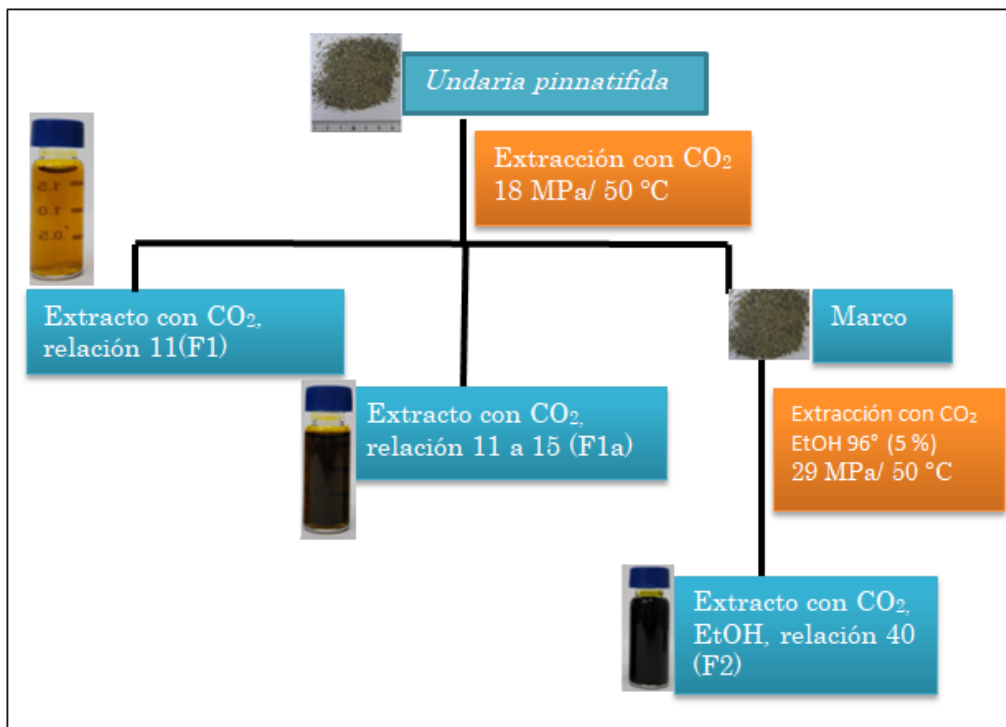


Figura 7.6. Protocolo de extracción mediante Fluidos Supercríticos (FSC) de fucosterol y fucoxantina de *Undaria pinnatifida* colectada en las costas de Comodoro Rivadavia en la estación primavera.

Por otra parte, cabe destacar que la extracción del alga con hidróxido de potasio etanólico produjo un rendimiento mucho más bajo que el obtenido con CO₂ supercrítico (**Tabla 7.3**).

Tabla 7.3. Rendimiento, condiciones y parámetros determinados en la extracción de fucosterol y fucoxantina con CO₂ supercrítico de *U. pinnatifida* colectada en primavera en Comodoro Rivadavia.

Extracto	Celulosa (%)	Relación CO ₂ (kg/kg)	Presión (MPa)	Codisolvente	Rendimiento (%)
F1	30	0-11	18	-	0,68
F1a	30	11-15	18	-	0,17
F2	30	0-40	29	EtOH 96° (5 %)	0,49
Insaponificable de KOH etanólico					0,30

7.6.3. Caracterización preliminar de las fracciones obtenidas mediante FSC

Para evaluar preliminarmente las fracciones obtenidas por FSC, se utilizó una cromatografía en capa delgada (TLC) sobre Silicagel G60 F₂₅₄, con cloroformo – éter dietílico (9:1) como fase móvil. Como referencia se empleó una fracción del extracto de *Lessonia vadosa* analizada previamente (Becerra, 2016). El cromatograma se reveló a la luz natural y al UV (a 254 y 365 nm), seguido de la utilización del reactivo vainillín-sulfúrico y calentamiento.

La **Figura 7.7** presenta el cromatograma obtenido, revelado con luz natural (**a**) y tras la aplicación del reactivo indicado en el párrafo anterior (**b**).

En la **Figura 7.7.a** se puede observar fundamentalmente en F2, un compuesto de intenso color amarillo-anaranjado antes de revelar, el cual tras el revelado con vainillín-sulfúrico se coloreó de azul (**Figura 7.7.b**). Este metabolito, probablemente fucoxantina (Rf= 0,07), prácticamente no se visualizó en F1 ni tampoco en el extracto de *L. vadosa* empleado como referencia; evidentemente en ellos la proporción era muy baja.

Por otra parte, en F2 fue posible también evidenciar a la luz natural y tras el uso del revelador, las clorofilas que corrieron muy cerca del frente del solvente, con Rf de 0,88 (**Figura 7.7.a, b**).

En cuanto al compuesto separado con Rf de 0,47 (**Figura 7.7.b**), por bibliografía se corresponde con el fucosterol. Además se visualizó otro compuesto de Rf= 0,39 el

cual se corresponde con el 24-metilén colesterol. Sánchez-Machado et al. (2004) destacaron la presencia de este último metabolito en *U. pinnatifida*.

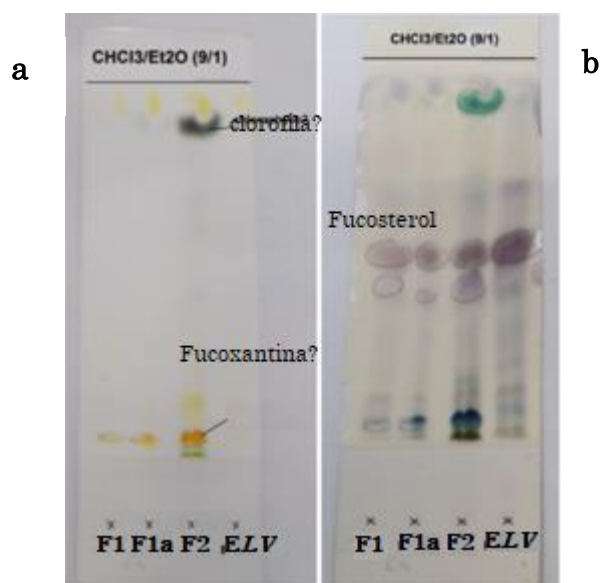


Figura 7.7. Cromatograma obtenido sobre Sílicagel G60 con éter-cloroformo (1:9) como fase móvil, de extractos de *U. pinnatifida* obtenidos mediante fluido supercrítico, en comparación con el obtenido de *Lessonia vadosa*. **a**, revelado a la luz natural; **b**, revelado con vainillín–sulfúrico. (F1, F1a, extractos obtenidos a 18 MPa; F2, extracto recuperado a 29 MPa).

En síntesis, la extracción de las frondas de *U. pinnatifida* con CO₂ supercrítico permitió obtener extractos enriquecidos en fucoesterol, cuyo rendimiento fue del 0,68 y 0,17 % para las fracciones F1 y F1a, respectivamente. Además, bajo estas mismas condiciones fue posible extraer otro esteroles, el 24-metilén colesterol.

No obstante, si bien las condiciones empleadas habían sido óptimas para extraer fucoesterol con buen grado de pureza de *Lessonia vadosa* (Becerra, 2016), para el caso de *U. pinnatifida* además de extraer esteroides también se extrajeron otros compuestos, sobre todo pigmentos en cantidades destacables.

Mediante CG-MS fue posible confirmar la presencia de fucoesterol en los extractos F1, F1a y el extracto de hidróxido de potasio etanólico. Además en este último también se identificó la presencia de 3-eicoseno y ácidos grasos libres como el ácido palmitoléico, araquidónico, linoleico, linolénico y oleico. La detección de la fucoxantina y otros pigmentos no es posible por este sistema.

Las algas pardas (Phaeophyceae) han sido ampliamente estudiadas por su contenido en clorofilas, esteroides, carotenoides, entre otros, mostrando efectos beneficiosos sobre la salud en modelos animales (Stengelet et al., 2011). De las actividades evidenciadas, cabe destacar la hipoglucemiante, la capacidad antioxidante, antihipertensiva y antiobesidad (Okada et al., 2011; Lee, 2012; Fung et al., 2013; Tong et al., 2015).

Se ha observado que la fucoxantina disminuye el nivel plasmático de los lípidos y de la glucosa (Woo et al., 2010). Estudios recientes de Grasa-López et al. (2016) demostraron que este pigmento obtenido de *U. pinnatifida* previene la acumulación excesiva de lípidos reduciendo la inflamación y la resistencia a la insulina. Las investigaciones *in vitro* e *in vivo* van en aumento y sugieren que la fucoxantina, debido a su estructura química característica tiene efectos beneficiosos en la salud por su propiedad antioxidante (Sachindra et al., 2007; Riccioni, 2012; Tanaka et al., 2012; Grasa-López et al., 2016).

En cuanto a la propiedad antiobesidad, también ha sido atribuida a la fucoxantina, siendo éste uno de los carotenoides más abundantes encontrado en algas pardas (Phaeophyta) y en diatomeas (Bacillariophyta) (Peng et al., 2011).

Respecto del fucosterol, Bang et al. (2011) lo aislaron de las frondas secas y molidas de *U. pinnatifida* y demostraron que inhibe la diferenciación osteoclástica, de modo dosis dependiente sin efecto citotóxico, evidenciando una actividad potencial de este metabolito contra la osteoporosis.

Los esteroides tales como fucosterol, α -tocoferol y 24-metilén colesterol presentes en *U. pinnatifida* colectada en Nueva Zelanda, mostraron variaciones estacionales, presentando altas concentraciones durante el invierno (Boulom et al., 2014).

Los resultados alcanzados en este trabajo de tesis muestran la potencialidad del alga como fuente de esteroides y pigmentos, sugiriendo la necesidad de profundizar estos estudios para alcanzar una separación y purificación óptima que permita obtenerlos con un rendimiento y pureza apropiados.

7.7. Conclusiones

La obtención del NaAlg se efectuó usando una metodología práctica cuyo rendimiento mostró una variabilidad estacional con un mínimo de un 40 % en otoño y un máximo del 62 % en verano, sin embargo se sugiere nuevas condiciones para favorecer una mejor calidad de los productos obtenidos.

La viscosidad aparente de la solución del alginato de sodio preparada al 1 % p/v de la cuatro estaciones mostraron valores menores al 50 cP siendo estos valores interesantes desde el punto de vista de la conservación ya que permite que se puedan almacenar a temperaturas entre 10 a 20 °C sin observarse cambios por hasta tres años.

La cuantificación de los alginatos mostró la presencia de grupos sulfatos como parte de su estructura molecular, siendo el producto de verano el de mayor proporción. La composición de ácidos urónicos mostró una variación estacional siendo mayor en verano, lo que se correlacionó con su peso molecular aparente (MWa). En los productos de verano e invierno el ácido D-manurónico fue mayoritaria con respecto a primavera y otoño, en tanto que la porción de ácido L-gulurónico fue idéntica en todas las estaciones. Estos datos son de interés para las posibles aplicaciones de los alginatos. Las proteínas y los fenoles estuvieron presentes en todas las estaciones en bajas proporciones, siendo el producto de primavera y otoño el que presentó mayor purificación.

El análisis de péptidos del extracto metanólico de las frondas colectadas en primavera, realizado por HPLC en columna de fase reversa, mostró dos péptidos cuyas estructuras presentan probablemente aminoácidos aromáticos tales como fenilalanina o triptófano en un caso y tirosina en el otro, como constituyentes. Para un estudio más profundo, será necesario realizar un proceso de purificación preparativo, que permita obtener las cantidades necesarias de material para realizar estudios de elucidación estructural y bioactividad, que exceden este trabajo de tesis.

El perfil metabólico de los extractos etanólicos de primavera e invierno a temperatura ambiente y 70 °C, obtenido por ¹H-RMN determinó la presencia de manitol y alanina en todas las muestras en tanto que la glicina se detectó sólo en

los extractos de invierno. El método analítico propuesto se puede considerar para identificar condiciones de estrés, tal como la deshidratación a la que está expuesta *U. pinnatifida*.

La porción fibrilar de la pared celular de las frondas de *U. pinnatifida* colectada en verano e invierno mostró la presencia de hidratos de carbono, proteínas y compuestos fenólicos.

La extracción de las frondas de *U. pinnatifida* colectada en primavera, con CO₂ supercrítico bajo distintas condiciones de presión permitió obtener extractos enriquecidos en fucosterol, además de 24-metilén colesterol y pigmentos. Se propone continuar su estudio para la obtención de fucosterol y fucoxantina por sus aplicaciones en la industria farmacéutica.

7.8. Bibliografía

Abu, R.; Jiang, Z.; Ueno, M.; Okimura, T.; Yamaguchi, K.; Oda, T. *In vitro* antioxidant activities of sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum*. *Inter. J. Biol. Macromolec.* **2013**, *59*, 305–312.

Aguilar, M. I. HPLC of Peptides and Proteins. En: *Methods and Protocols. Methods en Molecular Biology*. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. 2004, 251, pp 3–22.

Arnold, T. M.; Targett, M. N. To grow and defend: lack of tradeoffs for brown algal phlorotannin. *OIKOS*. **2003**, *100*, 2, 406–408.

Arvizu-Higuera, D. L.; Hernández-Carmona, G.; Rodríguez-Montesinos, E. Effect of temperature and extraction time on the process to obtain sodium alginate from *Macrocystis pyrifera*. *Ciencia. Mar.* **1996**, *22*, 4, 511–521.

Attipalli, R. R.; Kolluru, V. C.; Munusamy, V. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* **2004**, *161*, 1189–1202.

Bajpai, S. K.; Chand, N.; Chaurasia, V. Nano zinc oxide-loaded calcium alginate films with potential antibacterial properties. *Food Bioproc. Technology.* **2012**, *5*, 5, 1871–1881.

Bang, M. H.; Kim, H. H.; Lee, D. Y.; Han, M. W.; Baek, Y. S.; Chunh, D. K.; Baek, N. I. Anti-osteoporotic activities of fucosterol from sea mustard (*Undaria pinnatifida*). *Food Sci. Biotechnol.* **2011**, *20*, 343.

Becerra, M. B. Obtención de productos de importancia farmacéutica biosintetizados por especies de algas pardas de las costas del Golfo San Jorge.

Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Dpto. de Farmacia. Argentina. 2016.

Becerra, M. B.; Pinto Vitorino, G.; Uhrich A. V.; Ponce, N. M. A., Córdoba, O, L.; Stortz, C. A.; Flores, M. L. Estudios químicos y bioactividad de *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonaceae), un alga parda de las costas patagónicas argentinas. *Naturalia patagónica*. **2008**, 4, 1, 46–62.

Beecher, C. W. W. The human metabolome. *En Metabolic profiling: its role in biomarker discovery and gene function analysis*, Boston, Kluwer Academic, 2004.

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 144–222.

Boulom, S.; Robertson, J.; Hamid, N.; Ma, Q.; Lu, J. Seasonal changes in lipid, fatty acid, α -tocopherol and phytosterol contents of seaweed, *Undaria pinnatifida*, in the Marlborough Sounds, New Zealand. *Food Chem.* **2014**, 161, 261–269.

Burtin P. Nutritional Value of Seaweeds. *Electr. J. Environ.; Agricul. Food Chem.* **2003**, 2, 4, 498–503.

De Jesus Raposo, M. F.; de Morais, A. M. B.; de Morais, R. M. S. C. Marine Polysaccharides from Algae with Potential Biomedical Applications. *Mar. Drugs.* **2015**, 13, 5, 2985–2986.

Fan, T. W. M. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. En: *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. Progress. 1996, 28, pp 161–219.

Fiehn O.; Weckwerth W. Deciphering metabolic networks. *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 579–588.

Fiehn, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* **2002**, 48, 155–171.

Fleurence, J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci. Technol.* **1999**, 10, 25–28.

Flores, M. L.; Stortz, C.A. ; Rodríguez, M.C.; Cerezo, A.S. Studies on the skeletal cell wall and cuticle of the cystocarpic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa* Bory. *Bol. Mar.* **1997**, 40, 411–419.

Flores, M. L.; Stortz, C. A.; Cerezo, A. S. Studies on the skeletal cell wall and cuticle of the eystocarpic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa* B. Part II. Fractionation of the cell wall and methylation analysis of the inner core-fibrillar polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* **2000**, 27, 21–27.

Förster, B.; Mathesius, U.; Pogson, B.J. Comparative proteomics of high light stress in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteomics.* **2006**, 6, 4309–4320.

Frikha, F.; Kammoun, M.; Hammami, N.; Mchirgui, R. A.; Belbahri, L.; Gargouri, Y.; Miled, N.; Ben-Rebah, F. Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia. *Ciencias Mar.* **2011**, 37, 113–124.

Fung, A.; Hamid, N.; Lu, J. Fucoxanthin Content and Antioxidant Properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chem.* **2013**, 136, 1055–1062.

Gerwick, W. H.; Moore, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem. Biol.* **2012**, 19, 85–98.

Goh, C.H.; Heng, P.W.S.; Chan, L.W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. Review, *Carbohydr. Polymers*. **2012**, *88*, 1–12.

Grasa-López, A.; Miliar-García, A.; Quevedo-Corona, L.; Paniagua-Castro, N.; Escalona-Cardoso, G.; Reyes-Maldonado, E.; Jaramillo-Flores, M.E. *Undaria pinnatifida* and Fucoxanthin Ameliorate Lipogenesis and Markers of Both Inflammation and Cardiovascular Dysfunction in an Animal Model of Diet-Induced Obesity. *Mar. Drugs*. **2016**, *14*, 148.

Haug, A. The affinity of some divalent metals to different types of alginates. *Ac. Chem Scand*. 1961, *15*, 1794–5.

Hernández-Carmona, G.; McHugh, D. J.; López-Gutiérrez, F. Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera*: 1. Effect of pre-extraction treatment on yield and quality of alginate. *J Appl Phycol*. **1999**, *10*, 507–513.

Hernández-Carmona, G.; Rodríguez-Montesinos, Y. E.; Arvizu-Higuera, D. L.; Reyes-Tisnado, R.; Murillo-Álvarez, J. I.; Muñoz-Ochoa M. Avances tecnológicos en la producción de alginatos en México. *Ing. Investig. Tecnol.* **2012**, *13*, 2, 155–168.

Holdt, S. L.; Kraan, S. Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* **2011**, *23*, 3, 543–597.

Indergaard, M.; Skjak-Breek, G.; Jensen, A. Studies on influence of nutrient on the composition and structure of alginate in *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. (Laminariales, Phaeophyceae). *Bot. mar.* **1990**, *33*, 277–288.

Jamers, A.; Blust, R.; De Coen, W. Review Omics in algae: Paving the way for a systems biological understanding of algal stress phenomena? *Aquatic Toxicol.* **2009**, *92*, 114–121.

Kolb, N.; Vallorani, L.; Milanovi, N.; Stocchi, V. Evaluation of Marine Algae Wakame (*Undaria pinnatifida*) and Kombu (*Laminaria digitata*) as Food Supplements. *Food Technol. Biotechnol.* **2004**, *42*, 1, 57–61.

Lee, S. H.; Min, K. H.; Han, J. S.; Lee, D. H.; Park, D. B.; Jung, W. K.; Park, P. J.; Jeon, B. T.; Kim, S. K.; Jeon, Y. J. Effects of Brown Algae, *Ecklonia cava* on Glucose and Lipid Metabolism in C57BL/KsJ-db/db Mice, a Model of Type 2 Diabetes mellitus. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 575–582.

Liakos, I.; Rizzello, L.; Bayer, I. S.; Pompa, P. P.; Cingolani, R.; Athanassiou, A. Controlled antiseptic release by alginate polymer films and beads. *Carbohydr. Polymers.* **2013**, *92*, 1, 176–183.

Lupo, P.B.; González, A. C.; Maestro, G. A. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Rev. Venezolana Cs. Tecnol.* **2012**, *3*, 1, 130–151.

Mazumder, A.; Holdt, S. L.; De Francisci, D.; Alvarado–Morales, M.; Mishra, H.N.; Angelidaki, I. Extraction of alginate from *Sargassum muticum*: process optimization and study of its functional activities. *J. Appl. Phycol.* **2016**.

McHugh, D. J. Production, properties and uses of alginates. Department of Chemistry, University College. University of New South Wales. *Australian Defence Force Academy*. Campbell. ACT 2600, Australia. 1987.

Moing, A.; Deborde, C.; Rolin D. Metabolic fingerprinting and profiling by proton NMR. En *Functional Plant Genomics*, Enfield, Sciences publishers, chap. 2007, 16, pp 335–344.

Montoya–Rosas, E.; García, Y.; Lira, L. Usos y aplicaciones de las macroalgas marinas: una revisión. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela.* **2017**, *56*, 2, 89–101.

Mora, C.; Tittensor, D. P.; Adl, S.; Simpson, A. G. B.; Worm, B. How many species are there on earth and in the ocean? *PLoS Biol.* **2011**, *9*, e1001127.

Muniswamy, B.; Krishna, G.; Sreenath, H. L. Encapsulation techniques for producing synthetic seeds in coffee. En Indian Nishino, H.; Oide, N.; Anzai, H.; Uchida, N. Bulletin of the College of Agricultural and Veterinary Medicine. **1989**, *46*, 171-174.

Murata M, Nakazoe J. Production and use of marine algae in Japan. *Jpn. Agr. Res. Q.* **2001**, *35*, 281–290.

Niklas, J. K. The cell walls that bind the tree of life. *BioSci.* **2004**, *54*, 9, 831–841.

Nisizawa, K.; Noda, H.; Kikuchi, R.; Watanabe, T. The main seaweed foods in Japan. *Hydrobiol.* **1987**, 151/152, 5–29.

Nylund, G. M.; Weinberger, F.; Rempt, M.; Pohnert, G. Metabolomic assessment of induced and activated chemical defence in the invasive red algae *Gracilaria vermiculophylla*. *PLoS ONE.* **2011**, *6*, 12, e29359.

Okada, T.; Mizuno, Y.; Sibayama, S.; Hosokawa, M.; Miyashita, K. Antiobesity Effects of *Undaria pinnatifida* lipid capsules prepared with Scallop Phospholipids. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, H2–H6.

Peng, J.; Yuan, J. P.; Wu, C. F.; Wang, J. H. Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. *Mar. Drugs.* **2011**, *9*, 2806–1828.

Plaza Cazón, J. Remoción de metales pesados empleando algas marinas. Tesis Doctoral. Universidad de la Plata. 2012.

Plaza-Cazón, J.; Viera, M.; Sala, S.; Donati, E. Biochemical characterization of *Macrocystis pyrifera* and *Undaria pinnatifida* (Phaeophyceae) in relation to their potentiality as biosorbents. *Phycol.* **2014**, *53*, 1, 100–108.

Ponce, N. M. A.; Uhrich, A. V.; Flores, M. L.; Stortz, C. A. Extracción secuencial de los polisacáridos del alga parda *Adenocystis utricularis*. *Rev. química.* **2004**, 7–10.

Rajapakse, N.; Kim, S. Nutritional and digestive health benefits of seaweeds. En: *Adv Food Nut Res.* Elsevier Inc. 2011, 64, pp 17–28.

Ramos, I. N. La importancia del ejercicio de alta intensidad y su repercusión en el crecimiento, menarquía y estado nítrico de jóvenes adolescentes. *Nutr. Clín.* **2004**, *7*, 4, 251–261.

Raven, J. A.; Reed, R. H. Water relations of algae. *Br. Phycol. J.* **1989**, *24*, 297–298.

Reed, R. H.; Wright, P. J.; Chudek, J. A.; Hunter, G. Turnover of hexitols in the marine macroalga *Himantalia elongata* (Phaeophyta, Fucales), *European J. Phycol.* **1995**, *30*, 3, 169–177.

Riccioni, G. Marine carotenoids and oxidative stress. *Mar. Drugs.* **2012**, *10*, 116–118.

Sachindra, N. M.; Sato, E.; Maeda, H.; Hosokawa, M.; Niwano, Y.; Kohno, M.; Miyashita, K. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8516–8522.

Samarakoon, K.; Jeon, Y. Biofunctionalities of proteins derived from marine algae. A review. *Food Res. Intern.* **2012**, *4*, 948–960.

Sanchez–Machado, D. I.; Lopez–Hernandez, J.; Paseiro–Losada, P.; Lopez Cervantes, J. An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomed. Chromatogr.* **2004**, *18*, 183–190.

Sewald, N. y Jakube, H. D. 2002. Peptides: Chemistry and Biology. Wiley-VHC. Verlag GmbH & Co. pp. 14-29.

Skriptsova, A. V.; Khomenko, V.; Isakov, V. Seasonal changes in growth rate, morphology and alginate content in *Undaria pinnatifida* at the northern limit in the Sea of Japan (Russia). *J. Appl. Phycol.* **2004**, *16*, 17–21.

Stengel, D. B.; Connan, S.; Popper, Z. A. Algal Chemodiversity and Bioactivity: Sources of Natural Variability and Implications for Commercial Application. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 483–501.

Suetsuna K. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from the red alga *Porphyra yezoensis*. *Mar. Biotechnol.* **1998**, *6*, 163–7.

Suetsuna, K.; Nakano, T. Identification of an antihypertensive peptide from peptidic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). *J. Nutr. Biochem.* **2000**, *11*, 45–454.

Suetsuna, K.; Maekawab, K.; Chenc, J. R. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem.* **2004**, *15*, 267–272.

Tanaka, T.; Shnimizu, M.; Moriwaki, H. Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molec.* **2012**, *17*, 3202–3242.

Tong, T.; Ko, D. O.; Kim, B. S.; Ham, K. S.; Kang, S. G. Beneficial Effect of Seaweed on High-fat Diet-induced Oxidative Stress and Insulin Resistance in Rats. *Food Sci. Biothechnol.* **2015**, *24*, 2185–2191.

Verpoorte, R.; Choi, Y.H.; Kim, H.K. Ethnopharmacology and systems biology: A perfect holistic match. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 53–56.

Wang, Z. Q.; Yuan, Y. Z.; Ou, J. Q.; Lin, Q. H.; Zhang, C. F. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *J. Plant Physiol.* **2007**, *164*, 695–701.

Ward, J. L.; Baker, J. M.; Beale, M. H. Recent applications of NMR spectroscopy in plant metabolomics. *The FEBS J.* **2007**, *274*, 1126–1131.

Woo, M. N.; Jeon, S. M.; Kim, H. J.; Lee, M. K.; Shin, S. K.; Shin, Y. C.; Park, Y. B.; Choi, M. S. Fucoxanthin Supplementation Improves Plasma and Hepatic Lipid Metabolism and Blood Glucose Concentration in High-fat Fed C57BL/6N Mice. *Chem. Biol. Interact.* **2010**, *186*, 316–322.

Yanagisawa, M.; Kawai, S.; Murata, K. Strategies for the production of high concentrations of bioethanol from seaweeds: Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds. *Bioengineered.* **2013**, *4*, 224–235.

Yoon, M. O.; Rhim, J. W.; Kim, J. M.; Lee, S. C. Comparison of Alginic Acid Yields and Viscosity by Different Extraction Conditions from Various Seaweeds (*Laminaria religiosa*, *Hizikia fusiforme*, and *Undaria pinnatifida*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **2004**, *33*, 4, 747–752.

Zaixso, H. E.; Boraso de Zaixso, A. *La Zona Costera Patagónica Argentina, Recursos biológicos bentónicos*. 1a ed. Comodoro Rivadavia: Universitaria de la Patagonia - EDUPA, 2015. E-Book. ISBN 978-987-1937-45-5.

Zhong, Z.; Enomoto, N.; Connor, H. D.; Moss, N.; Mason, R. P.; Thurman, R. G. Glycine improves survival after hemorrhagic shock in the rat. *Europe PMC.* **1999**, *12*, 54–62.

Zhu, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* **2002**, *53*, 247–73.

CAPITULO 8

ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y APLICACIONES

8.1. *Undaria pinnatifida* colectada en Bahía Bustamante

Las actividades biológicas del extracto alcohólico total de las frondas de *U. pinnatifida* colectada en Bahía Bustamante (**FABB**) fueron evaluadas mediante los ensayos de actividad antioxidante e inhibición radicular, cuyos resultados se muestran a continuación.

8.1.1. Actividad antioxidante

La capacidad atrapadora de radicales libres mediante el ensayo del DPPH, evidenció que el extracto alcohólico **FABB**, presentó una actividad antioxidante interesante con un SC_{50} de 143 $\mu\text{g/ml}$, estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros investigadores, en la que han informado que los extractos metanólicos de las frondas, estipe y esporofilo de *U. pinnatifida* inhibían al DPPH en un 36 y 37 %, respectivamente (Yan et al., 1999).

Dentro de los metabolitos con actividad antioxidante presentes en *U. pinnatifida* se destaca a la fucoxantina (Yan et al., 1999). La misma puede ser extraída, junto con carotenoides oxigenados, con etanol (Yan et al., 1999; Kanda et al., 2014).

8.1.2. Actividad inhibitoria del desarrollo radicular

Se trabajó con dos diluciones (0,05 y 0,5 %) del extracto crudo (**FABB**), cuyos resultados fueron interesantes ya que para la dilución preparada al 0,05 % se obtuvo un $34,7 \pm 0,3$ % de inhibición del desarrollo radicular mostrando un promedio de longitud de la raíz más larga de $5,55 \pm 0,3$ cm. Para la dilución diez veces más concentrada, es decir preparada al 0,5 %, la inhibición fue del $83,5 \pm 0,9$ %, con un promedio de longitud de la raíz más larga de $1,4 \pm 0,3$ cm.

Además se observó una protuberancia en una raíz, semejante a las producidas por el control positivo vinblastina, un antitumoral ampliamente utilizado como antineoplásico, que se une al monómero beta de la tubulina y con ello evita la facultad de los monómeros alfa y beta de formar el dímero y dar origen al polímero de tubulina; por lo que bloquea el proceso de mitosis y provoca que el

ciclo celular se detenga en la metafase con dispersión y desorganización del material cromosómico (Lucas et al., 2010).

La **Figura 8.1.a.** muestra las placas con los resultados observados, mientras que en la **Figura 8.1.b.** se presentan en forma comparativa la raíz más larga de cada dilución de la FABB, la obtenida con el control positivo (+) vinblastina y la del control negativo (-), agua corriente.

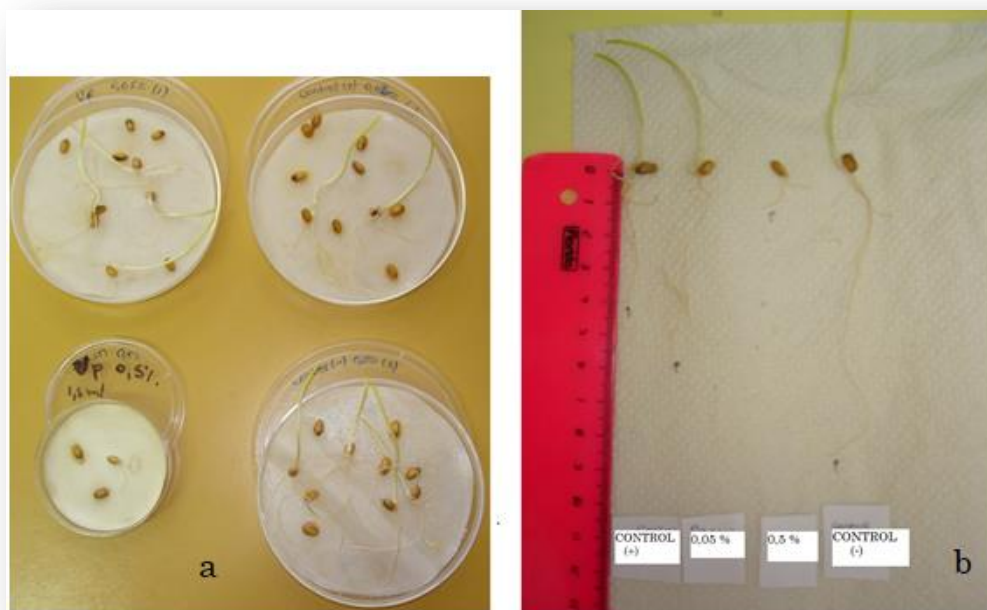


Figura 8.1. a. Placas resultantes del estudio de inhibición radicular de **FABB** de *U. pinnatifida*; **b.** Comparación de las raíces más largas del control negativo agua potable (-) con las dilución 0,05 y 0,5 % de la FABB de *U. pinnatifida* y el control positivo vinblastina (+).

Estos resultados, los cuales presumen actividad antitumoral, conciden con los descritos por otros investigadores en donde han descrito a *U. pinnatifida* con efectos antitumorales, además de actividad anticoagulante (Han et al., 2002).

Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de algas marinas en Japón es un factor de protección contra algunos tipos de cáncer (Carper, 1989), igualmente resultados *in vivo* señalan que la administración de extractos de algas marinas en animales de experimentación suprime la carcinogénesis (Funahashi et al., 2001)

Dentro de los metabolitos bioactivos presente en algas pardas, la fucoxantina ha mostrado tener efectos beneficiosos sobre la quimioprevención del cáncer, ya que inhibe el crecimiento de células de neuroblastoma humano GOTO (Okuzumi, et al., 1990), la carcinogénesis intestinal en experimentos con animales (Okuzumi et al., 1993; Kim et al., 1999), y la apoptosis inducida en células de leucemia humana HL-60 (Hosokawa et al., 1999).

Nuestros resultados y apoyados en bibliografía nos motivaron a profundizar los estudios sobre los distintos metabolitos presentes en los extractos. La posible presencia de fucoxantina presente en el extracto alcohólico analizado explicaría, al menos en parte, la actividad antitumoral detectada.

8.2. *Undaria pinnatifida* colectada en Comodoro Rivadavia

8.2.1. Ensayos de bioactividad primaria y secundaria

En base a los resultados obtenidos en la muestra colectada en Bahía Bustamante y presentada en la sección anterior se profundizan los estudios de bioactividad utilizando distintos ensayos primarios y secundarios sobre los extractos etanólicos a distintas temperaturas y del alginato de sodio purificado de *U. pinnatifida* colectada en las costas de Comodoro Rivadavia durante las cuatro estaciones.

8.2.1.1. Test de la *Artemia salina*

La evaluación biológica primaria citotóxica mediante el Test de la *Artemia salina* (BST = Brine Shrimp Test) de los extractos etanólicos (EOH1 y EOH2) de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente en Comodoro Rivadavia mostraron en general una importante actividad citotóxica, observándose una elevada mortalidad, en las concentraciones habituales de prueba (1000, 100 y 10 µg/ml), por la acción tóxica de los extractos analizados. Por tal motivo, se analizó un perfil de concentraciones de extracto más bajo (250, 25 y 2,5 µg/ml). El grado de toxicidad, según el porcentaje de muerte de los nauplios es expresado

generalmente como CL₅₀ (concentración que causa la muerte, letalidad, del 50 % de los organismos expuestos a la sustancia).

En el caso del alginato de sodio se analizaron concentraciones habituales para este test de 1000, 100 y 10 µg/ml.

La **Tabla 8.1** y **Tabla 8.2** muestran las CL₅₀ y los porcentajes de mortalidad de los nauplios de cada concentración evaluada, en los extractos alcohólicos y NaAlg, con respecto a una población control, las mismas fueron calculadas de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ de mortalidad de } Artemia \text{ salina} = \frac{\sum \text{nauplios muertos}}{\sum \text{total de nauplios}} \times 100$$

Tabla 8.1. Porcentaje de nauplios muertos y CL₅₀ debido a la actividad citotóxica de los extractos **EOH1** (extractos alcohólicos a temp. ambiente), **EOH2** (extractos etanólicos a 70 °C) de las cuatro estaciones.

Estación	Extracto etanólico	Concentración y % de nauplios muertos			CL ₅₀ µg/ml, 24 h	Límite de confianza 95%	
		250 µg/ml	25 µg/ml	2,5 µg/ml		inferior	superior
primavera	EOH1	64,5 ± 5,6	46,7 ± 5,6	26,7 ± 5,6	41,76	10,48	326,65
	EOH2	66,67 ± 15,2	50,0 ± 10	26,7 ± 5,7	32,77	8,29	176,82
verano	EOH1	70,0 ± 17,3	43,33 ± 5,7	20,0 ± 10	46,55	19,43	146,4
	EOH2	16,67 ± 5,7	6,67 ± 5,7	0	> 1000		
otoño	EOH1	83,33 ± 11,5	36,7 ± 5,7	23,3 ± 5,7	29,61	12,97	70,44
	EOH2	83,33 ± 5,7	53,3 ± 5,7	26,27 ± 5,7	16,75	6,19	39,13
invierno	EOH1	66,67 ± 5,77	40,0 ± 10	16,06 ± 5,3	59,44	23,69	235,44
	EOH2	26,67 ± 5,7	17,04 ± 5,1	6,06 ± 5,1	> 1000		

Los valores obtenidos de la CL₅₀ de cada muestra fueron analizadas según el grado de actividad, ya que su magnitud está clasificada en distintas categorías según la actividad citotóxica que presentan (**Tabla 8.3**).

Los extractos etanólicos EOH1, EOH2 y el NaAlg de todas las estaciones presentaron un comportamiento dosis dependientes, es decir, a mayor concentración mayor fue el porcentaje de organismos muertos debido al efecto citotóxico (CL₅₀). El EOH2 de otoño presentó una elevada toxicidad comparada con primavera, en tanto que las estaciones verano e invierno no presentaron actividad citotóxica. Los extractos EOH1 de todas las estaciones mostraron tener interesantes actividad biológica.

El NaAlg de otoño no mostró citotoxicidad en tanto que el de primavera resultó tener una actividad citotóxica interesante.

Tabla 8.2. Porcentaje de nauplios muertos y CL₅₀ debido a la actividad citotóxica del NaAlg (Alginato de sodio) obtenido a partir de las frondas de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente en las costas de Comodoro Rivadavia.

Estación	Alginato de sodio	Concentración y % de nauplios muertos			CL ₅₀ µg/ml, 24 h	Límite de confianza 95%	
		1000 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml		inferior	superior
primavera	NaAlg	86,67 ± 5,72	46,67 ± 5,5	23,33 ± 11,6	107,43	47,76	229,13
verano	NaAlg	50,0 ± 10,0	36,67 ± 5,1	10,0 ± 1,0	842,12	36,42	136,53
otoño	NaAlg	63,33 ± 9,43	43,0 ± 4,71	27,0 ± 4,71	> 1000		
invierno	NaAlg	50,01 ± 10,0	30,0 ± 10,0	13,33 ± 5,77	892,52	52,16	126,83

Los valores de la CL₅₀ de los extractos alcohólicos (EOH1 y EOH2) fueron comparados con un estudio realizado sobre diferentes algas pardas, entre ellas *Dictyota indica*, (141 µg/ml), *Dictyota hauckiana* (524 µg/ml) y *Dictyota dichotoma* var. *Velutricata* (812 µg/ml), en el que se destacó el extracto de *Dictyota indica* por presentar una actividad importante sobre *A. salina* (Ayesha et al., 2010).

Tabla 8.3. Clasificación de la actividad citotóxica de acuerdo al CL₅₀ según McLaughlin et al., 1998

CL ₅₀ (µg/ml)	Clasificación
> 1000	No activa (NAC)
30 – 1000	Activa (AC)
< 30	Muy activa (MAC)

Dentro de nuestro grupo de investigación, los estudios realizados por Becerra (2016) demostraron que la actividad citotóxica frente a la *Artemia salina* del alginato de sodio purificado de *Lessonia vadosa* evidenció citotoxicidad importante (CL₅₀ 168,5 µg/ml), la cual podría deberse al menos en parte al aporte del bloque GG (homopoligulurónico), dado que el mismo presentó valores de citotoxicidad destacables respecto a los bloques MM y GM. Asimismo estos

resultados demostraron que la estructura del polisacárido completo ejerce su efecto más marcado que cada uno de sus bloques por separado.

Los antecedentes mencionados en el párrafo anterior nos permitieron resaltar la actividad citotóxica del NaAlg de primavera, por lo que la CL_{50} fue promisoría para continuar con otros ensayos biológicos.

8.2.1.2. Ensayo de inhibición de la elongación de las raíces de las semillas de trigo

Las capacidades metabólicas y fisiológicas de los organismos marinos que les permiten sobrevivir en un hábitat complejo les otorgan un enorme potencial para la síntesis de diversos metabolitos únicos que no se encuentran en ambientes terrestres. Así, los organismos marinos y particularmente los invertebrados sésiles han sido reconocidos como una fuente atractiva de potenciales compuestos farmacéuticos (Faulkner, 2002).

Entre estos organismos, las algas son una de las fuentes más ricas en nuevos compuestos bioactivos (Blunt et al., 2006). Por otro lado, se ha encontrado que varias especies de algas marinas producen metabolitos secundarios con actividad antitumoral (Blunt et al., 2006).

En nuestro caso, el ensayo de inhibición de la elongación de las raíces de trigo mostró resultados interesantes para la mayor concentración del alginato de sodio de las cuatro estaciones, sugiriendo una potencial actividad antitumoral. Los EOH2 al 0,05 % de las cuatro estaciones generaron estimulación en el crecimiento radicular, este mismo efecto fue detectado en las restantes muestras de otoño y en el NaAlg de invierno (**Tabla 8.4**). En el EOH1 de primavera se observaron raíces más finas que las producidas por el control positivo vinblastina, un antitumoral de amplia utilización. Posiblemente la característica particular de las raíces sometidas al extracto se deba a mecanismos de citotoxicidad distintos al de la vinblastina.

En esta tesis para evaluar la actividad antitumoral se tomó como patrón positivo la vinblastina que es un antimetabólico derivado de la planta de la vinca, *Catharanthus roseus* (Cutts et al., 1960), que actúa mediante la unión a la subunidad β de la tubulina cerca del sitio de unión de GTP, Guanosín trifosfato,

(Rai y Wolff, 1996) y con ello evitan la facultad de los monómeros alfa y beta de formar el dímero y dar origen al polímero de tubulina, por lo que las células se inhiben en la prometafase de la mitosis (Checchi et al., 2003; Correia y Lobert, 2001).

Ensayos primarios sobre la actividad antitumoral que presentan las algas demuestran que los mismos se correlacionan con ensayos específicos; es así como Yuan y Walsh (2006) estudiaron la actividad antiproliferativa de extractos de *Palmaria palmata*, *Laminaria setchellii*, *Macrocystis integrifoli*, *Styopodium zonale* y *Nereocystis luetkeana*. Dentro de ellos el extracto de *Styopodium zonale* demostró tener gran actividad citotóxica contra la línea celular de melanoma humano (Rocha et al., 2007); además se ha descrito que los polisacáridos extraídos de *Sargassum stenophyllum* inhibieron la migración y la viabilidad de las células de melanoma humano *in vitro* e *in vivo* (Días et al., 2005).

Tabla 8.4. Actividad inhibitoria del desarrollo radicular de trigo del EOH1, EOH2 y alginato de sodio purificado (NaAlg), obtenidos a partir de las frondas de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente.

Muestra	Extracto	Concentración	% de inhibición	Observación
Primavera	EOH1	0,05	8,4 ± 0,8	Raíces débiles
		0,5	26,1 ± 0,2	
	EOH2	0,05	1,9 ± 0,04	Estimulación para 0,05 %
		0,5	30,4 ± 0,26	
	NaAlg	0,05	7,8 ± 0,5	
		0,5	45,1 ± 0,21	
Verano	EOH1	0,05	14,2 ± 0,3	
		0,5	25,1 ± 0,3	
	EOH2	0,05	3,1 ± 0,1	Estimulación para 0,05 %
		0,5	26,1 ± 0,2	
	NaAlg	0,05	1,9 ± 0,04	
		0,5	30,4 ± 0,26	
Otoño	EOH1	0,05	19,9 ± 0,9	Estimulación para 0,05 %
		0,5	52,1 ± 1,76	
	EOH2	0,05	15,8 ± 1,05	Estimulación para 0,05 %
		0,5	46,1 ± 1,76	
	NaAlg	0,05	4,9 ± 0,89	Estimulación para 0,05 %
		0,5	71,27 ± 0,98	
Invierno	EOH1	0,05	9,3 ± 0,98	
		0,5	27,8 ± 1,98	
	EOH2	0,05	18,8 ± 1,09	Estimulación para 0,05 %
		0,5	11,7 ± 1,12	
	NaAlg	0,05	2,5 ± 0,98	Estimulación para 0,05 %
		0,5	82,6 ± 1,65	

8.2.1.3. Ensayo del metilgreen-ADN

Los resultados obtenidos fueron promisorios para continuar con su estudio, y para ello se efectuó un ensayo específico que nos permitió analizar uno de los posibles mecanismos de la acción citotóxica, como es el de intercalación en el ADN, mediante el ensayo colorimétrico del metil green-ADN (MG-ADN) (ver Capítulo 5). El alginato de sodio de primavera, verano e invierno fueron analizados en concentraciones de 1000, 100 y 10 µg/ml. En la **Tabla 8.5** se

muestran los resultados obtenidos, en la que se observa una disminución del porcentaje de inhibición del alginato de sodio de primavera, por lo que se concluye que su posible mecanismo molecular de acción es la intercalación en el ADN.

Los extractos etanólicos no mostraron actividad interesante.

Tabla 8.5. Ensayo del metilgreen-ADN sobre alginato de sodio (NaAlg) de primavera y verano de *U. pinnatifida*.

Estación	Muestra	% de inhibición		
		10 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml
Primavera	NaAlg	3,8	5,7	13,8
Verano	NaAlg	0	0,31	3
Invierno	NaAlg	0	0,45	5

Los resultados muestran que la actividad biológica de los polisacáridos obtenidos del alga varían con la estación de colecta y las condiciones ecológicas locales, probablemente debido a una variación en la composición de los mismos.

Los polisacáridos naturales desempeñan un papel relevante en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas, particularmente en el campo de desarrollo de fármacos, por su biocompatibilidad intrínseca y su bajo costo potencial (Laurienzo, 2010). Nuestros resultados muestran la importancia de considerar las variaciones espacio temporales para la obtención de estos polisacáridos.

8.2.1.4. Actividad antibacteriana

El resultado de los extractos etanólicos obtenidos a distinta temperatura (EOH1 y EOH2) y alginato de sodio de las cuatro estaciones no presentaron actividad antibacteriana ante las cepas ensayadas. Diversos autores mencionan que la actividad biológica mostrada por extractos de los organismos marinos depende tanto de factores bióticos como abióticos, entre los que se encuentran la temperatura, la salinidad y la localización geográfica, entre otros factores. Otros autores atribuyen que la actividad antibacteriana de las algas marinas se deben fundamentalmente a la presencia de florotaninos y estos tienen una actividad mayor a los taninos extraídos de distintas especies terrestres (Wang et al., 2009).

En nuestro estudio el bajo contenido de compuestos fenólicos en las distintas muestras evaluadas (ver Capítulos 6 y 7, cuantificación de compuestos fenólicos) estaría relacionado, al menos en parte, con su nula actividad antibacteriana.

8.2.1.5. Actividad antioxidante

Los extractos alcohólicos (EOH1 y EOH2) así como el alginato de sodio de las cuatro estaciones, mostraron una actividad antioxidante frente al DPPH de moderada a baja (**Tabla 8.6**). El bajo % de inhibición guarda relación con los resultados obtenidos por otros investigadores para la misma especie en estudio. Yan et al. (1999) compararon extractos con distintos solventes de las diferentes partes morfológicas de *U. pinnatifida* (**Tabla 8.7**).

La temperatura es otro de los factores que deben ser tenidos en cuenta al momento de evaluar la actividad antioxidante en extractos alcohólicos, dado que nuestros resultados mostraron que los EOH2 tuvieron una marcada diferencia en su actividad con respecto a los EOH1.

Los ensayos sobre la actividad antioxidante de diferentes investigadores han indicado que el contenido de compuestos fenólicos es el responsable de las propiedades antioxidantes en extractos de algas (Karawita et al., 2005, Kuda et al., 2005).

Al comparar nuestros resultados con el trabajo realizado por Mach et al. (2015) en el cual investigaron el contenido fenólico en extractos y lo correlacionaron con la actividad antioxidante de distintas algas, entre ellas *Eisenia bicyclis*, *Hizikia fusiformis* y *Undaria pinnatifida*, destacaron que ambos ensayos son directamente proporcionales. La especie *Eisenia bicyclis* presentó una importante capacidad antioxidante, con respecto a las otras especies.

Tabla 8.6. Actividad antioxidante (DPPH) de los extractos alcohólicos y alginatos de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente.

Estación	Muestra	Absorbancia	% de inhibición
primavera	EOH1	0,8654 ± 0,04	1,48
	EOH2	0,7112 ± 0,02	18,10
	NaAlg	0,6948 ± 0,02	16,80*
verano	EOH1	0,8197 ± 0,02	2,09
	EOH2	0,7341 ± 0,02	13,98
	NaAlg	0,7427 ± 0,03	17,60 *
otoño	EOH1	0,8123 ± 0,02	1,55
	EOH2	0,7224 ± 0,03	12,05 *
	NaAlg	0,755 ± 0,04	4,96
invierno	EOH1	0,8187 ± 0,02	3,09
	EOH2	0,7453 ± 0,03	20,01
	NaAlg	0,7057 ± 0,02	11,96 *

*muestras realizadas con distintos blancos

Tabla 8.7. Actividad antioxidante (DPPH) de extractos obtenidos de diferentes partes morfológicas de *U. pinnatifida* colectada en Japón (Yan et al., 1999). Cloroformo (CHCl₃), etanol acuoso (EtOAc), acetona (Me₂Co), metanol (MeOH).

Parte morfológica	% de inhibición			
	CHCl ₃	EtOAc	Me ₂ Co	MeOH
Fronda	23	6	13,2	36,4
Esporofilo	23,5	5,4	8,3	51,1
Estipe	10,4	-	4,2	36,9

Otro metabolito presente en extractos etanólicos de *U. pinnatifida* es la fucoxantina cuya actividad antioxidante (Yan, et. al., 1999) podría contribuir a los resultados obtenidos en esta tesis.

En el estudio preliminar sobre la actividad antioxidante (muestra colectada en Bahía Bustamante, sección 8.1.1) el resultado fue superior con respecto al EOH1, ambas de primavera. Esta diferencia, podría ser atribuida a la variación de temperatura que se registran en los puntos de colecta de las muestras que se tomó para esta tesis, ya que este factor está fuertemente relacionado con el ciclo de vida de *U. pinnatifida*. En el GSJ la temperatura presenta una distribución horizontal en los diferentes niveles de profundidad y que corresponde en general

a un gradiente que va en aumento en dirección sur-norte, siendo las temperaturas extremas las que se dan en aguas superficiales costeras, y son las que normalmente soportan las algas del sector intermareal (Fernández et al., 2007).

Por otra parte, la mayor actividad antioxidante de los alginatos correspondió al producto de verano y este resultado concuerda con lo obtenido en la cuantificación de grupos sulfatos; se ha demostrado que los polisacáridos sulfatados de algas pardas desempeñan también un papel importante como antioxidantes. Nuestros resultados demuestran que los grupos sulfatos presentes en el alginato de sodio de verano (40,7 %) contribuyen, al menos en parte, a la actividad evaluada.

8.2.1.6. Ensayo de citotoxicidad *in vitro* con líneas celulares

La Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC) ha estimado que en el 2002 hubo 10,9 millones de casos nuevos de cáncer y cerca de 7 millones de muertes por cáncer en todo el planeta. Estas cifras representan un incremento de 22 % en la incidencia y mortalidad por cáncer en comparación con las cifras de 1990. Según la OMS el número de casos se elevará a 15 millones para el 2020 (Parkin, 2002)

El cáncer es una enfermedad progresiva y mortal si no es detecta en etapas iniciales de su aparición. El tratamiento adecuado es fundamental para detener o erradicar el cáncer. Desafortunadamente, los medicamentos y las terapias que se utilizan no son completamente efectivas, y además de su alto costo económico, producen diversos efectos secundarios que desgastan al paciente tanto física como emocionalmente. Los distintos fármacos usados como anticancerígenos actúan tanto en células normales como anómalas.

La búsqueda de nuevas moléculas con potencial actividad anticancerígena a partir de productos naturales es un campo vigente. En este proceso, la valoración de la citotoxicidad *in vitro* sigue siendo una herramienta válida y útil en las primeras etapas de selección de compuestos promisorios, que los grupos de investigación básica utilizan ampliamente.

Para dar solidez a las valoraciones es necesario disponer de un panel de líneas celulares que represente diversos tipos de tumores, y conocer su sensibilidad a agentes con acción citotóxica demostrada (León et al., 2006).

Los resultados previamente obtenidos nos llevaron a evaluar el efecto antiproliferativo del alginato de sodio de primavera a distintas concentraciones (ver Capítulo 5) frente a líneas celulares derivadas de cáncer de mama (CMF-7) y colon (Caco-2) ambas obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC). En este trabajo de tesis se consideraron activas las muestras que presentaron porcentajes de viabilidad inferiores a un 50 % (Cobs-Rosas, et al., 2015).

El fundamento del método de reducción de la resazurina, se basa en el hecho que al ser metabolizada por células viables, genera un metabolito irreversible altamente fluorescente conocido como resorufina, permitiendo de esta manera la detección del crecimiento celular por fluorometría (Escobar, 2007). Una de las ventajas de utilizar resazurina es que las células que son usadas con este colorante pueden ser utilizadas para otros experimentos, puesto que el colorante no es tóxico para las células (O'Brien, 2000). Aprovechando esta característica, en este estudio fue posible observar el efecto antiproliferativo que posee el alginato de sodio de primavera.

El alginato de sodio de primavera presentó una actividad importante sobre las células tumorales MCF-7, exhibiendo a 1 mg/ml, con una inhibición de la proliferación celular del 75 % la cual se mantuvo activa aún a una concentración de 500 µg/ml (**Tabla 8.8**). Si bien el porcentaje de inhibición en las células Caco-2 fue del 61,6 % a una concentración de 1 mg/ml (**Tabla 8.8**) al graficar una curva dosis respuesta se puede observar que la curva se encuentra un poco más desplazada hacia la derecha, esto indica que el NaAlg primavera ejerce una menor afinidad sobre la línea celular Caco-2 en comparación con MCF-7. (**Figura 8.2**).

Tabla 8.8. Porcentaje de proliferación de células de cáncer de mama (MCF 7) sometidas a seis diluciones de alginato de sodio de primavera de *U. pinnatifida*.

Dilución	Promedio RFU	Desviación Estándar	Porcentaje de proliferación	Desviación Estándar (%)
1:1	683256,5	3107,8	24,8%	0,1%
1:2	982090,7	20563,6	35,7%	0,7%
1:4	1964125,9	54985,5	71,4%	2,0%
1:8	2533817,3	27275,5	92,1%	1,0%
1:16	2673937,1	43411,4	97,2%	1,6%
1:32	2745092,1	39300,6	99,8%	1,4%
DMSO 1%	2751154,3	28063,5	100,0%	1,0%
Control	2804485,4			

Porcentaje de muerte por DMSO 1% fue de 1,9%

Tabla 8.9. Porcentaje de proliferación de células de cáncer de colon (Caco-2) sometidas a seis diluciones de alginato de sodio de primavera de *U. pinnatifida*.

Dilución	Promedio RFU	Desviación Estándar	Porcentaje de proliferación	Desviación Estándar (%)
1:1	636663,7	5214,8	38,4%	0,3%
1:2	961794,3	13937,2	57,9%	0,8%
1:4	1340315,7	40727,0	80,7%	2,5%
1:8	1514529,2	48476,3	91,2%	2,9%
1:16	1544698,2	18142,3	93,1%	1,1%
1:32	1620182,0	13114,7	97,6%	0,8%
DMSO 1%	1659891,9	14022,8	100,0%	0,8%
Control	1709849,3			

Porcentaje de muerte por DMSO fue de 1%

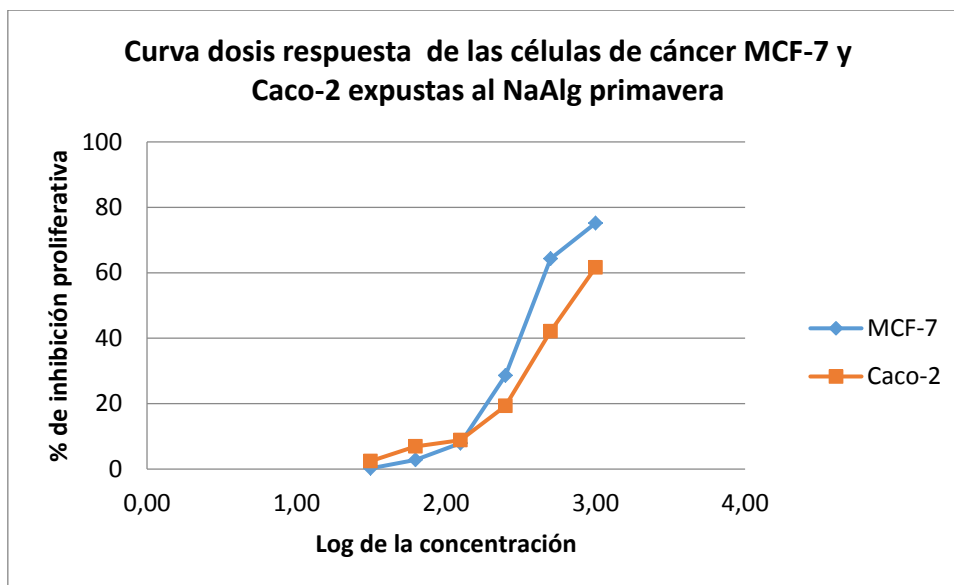


Figura 8.2. Curva dosis respuesta de las células de cáncer de mama (MCF-7) y colon (Caco-2) expuestas a distintas concentraciones de alginato de sodio (NaAlg) de primavera.

El resultado obtenido se condice con los ensayos realizado por Funahashi et al. (2001) en el que usaron un extracto acuoso del esporofilo de *U. pinnatifida*, que mostró una significativa actividad antiproliferativa contra tres tipos de líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, T47D, y MDA-MB-231), a través de una inducción de apoptosis. Posteriormente el extracto fue aplicado en ratas y reveló una actividad supresora significativa en la carcinogénesis mamaria, sin toxicidad en las células normales, este efecto demostró ser mayor comparado con agentes quimioterapéuticos ampliamente utilizados contra el cáncer mamario.

8.2.1.7. Actividad antileishmania

Se evaluó la actividad del alginato de sodio de primavera sobre promastigotes y amastigotes de varias especies de *Leishmania* (ver Capítulo 5) mostrando que hasta una concentración de 250 µg/ml no presenta actividad sobre las dos formas evolutivas del parásito de *L. infantum*, *L. amazonensis* y sobre los macrófagos murinos derivados de un sarcoma de células reticulares (J774).

La línea celular de macrófago J774 aislada de células reticulares se utilizó como control positivo para la infección con los parásitos utilizados en el ensayo. Los

macrófagos son el principal blanco de la infección con promastigotes tanto *in vivo* como *in vitro*, pero estos no son los únicos blancos, debido a que se ha reportado infecciones en células epiteliales, neutrófilos y fibroblastos entre otras (Scout y Hunter, 2002; Engwerda et al., 2004).

En nuestro grupo de investigación se realizó esta misma actividad sobre el alginato de sodio purificado y el fucosterol de *Lessonia vadosa* cuyo resultado mostró que el fucosterol presentó una importante actividad antileishmania frente a la forma amastigote intracelular en comparación con el promastigote extracelular de *Leishmania amazonensis* y *L. infantum*, y baja citotoxicidad contra J774. En cuanto al alginato de sodio, el screening de actividad antileishmania evidenció inhibición, aunque poco relevante, para las formas promastigotes de *L. donovani* y *L. infantum*. En el caso de *L. amazonensis* y J774, no se observó inhibición alguna. (Becerra, 2016).

La necesidad de buscar nuevas drogas y blancos terapéuticos frente a estas patologías, hace necesario continuar con este tipo de estudios. Los productos naturales constituyen una alternativa de investigación (Croft y Coombs, 2003).

8.2.1.8. Test del *Allium cepa*

Al exponer a la hidratación al bulbo de *Allium cepa* se produce una estimulación del crecimiento de las células apicales, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la exposición se lleva a cabo en presencia de sustancias orgánicas o inorgánicas tóxicas, la división celular de los meristemas radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz y, por tanto, su elongación (Fiskesjö, 1985).

Este efecto se estudió en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de *A. cepa* expuestas a las distintas muestras con respecto al control negativo. La cuantificación se efectuó considerando dos respuestas: el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces expuestas al compuesto, respecto a la longitud promedio de las raíces del recipiente control

(IM) y el diagnóstico microscópico, para establecer el índice mitótico y las aberraciones cromosómicas que se presenten en el ciclo celular.

El ciclo celular regula la división celular y es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto. Se distinguen varias fases, en la fase G₀ o de reposo las células permanecen sin dividirse, pero conservan la capacidad de reiniciar el ciclo; en la fase G₁ (gap 1) de presíntesis, las células producen ARN y proteínas; en la fase S se replica el ADN; en la fase G₂ (gap 2) o de postsíntesis el núcleo se organiza para la división celular, que se produce en la fase M o de mitosis. En la apoptosis se produce la activación de enzimas que inducen la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, que conllevan a la destrucción nuclear y citoplasmática (**Figura 8.3**).

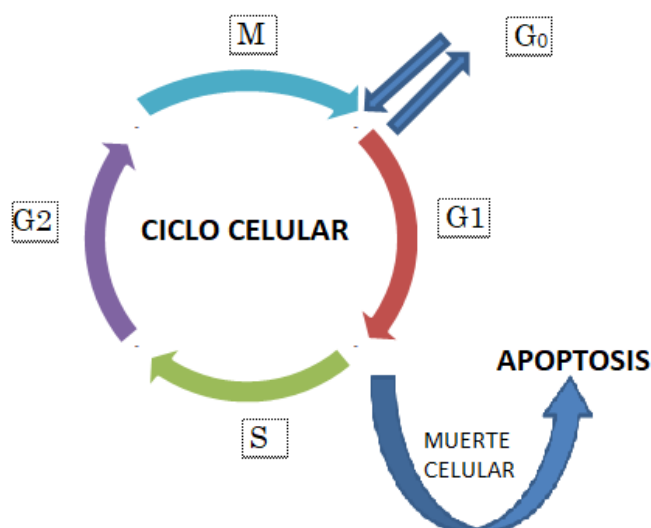


Figura 8.3. Ciclo celular y las distintas fases: G₀. Fase de reposo; G₁. Fase de presíntesis; S. Fase de síntesis; G₂. Fase de postsíntesis; M. Mitosis.

Para poder evaluar la actividad de citotoxicidad y genotoxicidad de los extractos alcohólicos y los alginatos obtenidos a partir de las frondas de *U. pinnatifida* se prepararon dos concentraciones de cada una de las distintas muestras (**Tabla 8.10**)

Tabla 8.10. Concentraciones en las que fueron evaluadas los extractos y productos obtenidos a partir de las frondas de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente. C1 y C2 son la mínima y máxima concentración de prueba.

Concentración µg/ml	primavera				verano				otoño				invierno			
	EOH1		EOH2		EOH1		EOH2		EOH1		EOH2		EOH1		EOH2	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
	960	2550	960	2110	880	2460	964	2450	962	2540	960	2110	964	2547	963	2111

concentración µg/ml	Alginato de sodio (NaAlg)							
	primavera		verano		otoño		invierno	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
	900	2440	902	2400	910	2398	920	2110

El crecimiento radicular de *Allium cepa* durante 72 h con las distintas muestras y los controles empleados en el ensayo, mostró una mayor longitud al estar expuesta con agua potable (control negativo, C-) y un menor crecimiento frente a $K_2Cr_2O_7$ (control positivo, C+), en tanto que con todas las muestras ensayadas la elongación radicular fue variable con respecto a la concentración utilizada. A modo de ejemplo, en la **Figura 8.4** se muestra el crecimiento radicular luego de estar en contacto con la solución de NaAlg de primavera a una concentración de 2,44 mg/ml y con ambos controles.



Figura 8.4. Comparación del crecimiento radicular de *Allium cepa* sometidas al tratamiento con agua potable (C-), solución de $K_2Cr_2O_7$, 32,29 µg/ml (C+) y NaAlg de primavera, 2,44 mg/ml.

Nuestros resultados mostraron que la inhibición del desarrollo radicular de *Allium cepa* por exposición aguda a los extractos etanólicos (EOH1, EOH2) y al alginato de sodio de *U. pinnatifida* fueron dosis dependiente, es decir, a mayor concentración menor fue el crecimiento radicular, por lo tanto mayor es la inhibición del crecimiento con respecto al control negativo.

El análisis del efecto de los extractos alcohólicos y alginatos durante una parte del ciclo celular mostraron una relación directa en la inhibición de la mitosis normal de las células meristemáticas radiculares, los cuales se vieron reflejados en las distintas fases de la mitosis y el índice mitótico (IM) en porcentajes variables.

En términos generales, valores del IM inferiores al valor del control negativo indican alteraciones inhibitorias, derivadas del o los metabolitos presentes en la muestra. En tanto que, valores del IM superiores al control negativo indican un incremento en la división celular, mostrando un desorden en la proliferación celular, evidenciando la presencia de uno o más metabolitos con potencial para formación de tejido tumoral (Morais y Marin-Morales, 2009).

En la **Figura 8.5** el control positivo ($K_2Cr_2O_7$ 32,29 $\mu\text{g/ml}$, IM = 1,02 %) mostró su efecto sobre los procesos de reproducción en las células de *Allium cepa*, observándose un claro efecto inhibitorio. Los IM del control negativo fueron de 22,81 y 23,24 % para las muestras alcohólicas de verano y los restantes extractos y productos de las estaciones primavera, otoño e invierno, respectivamente. Todas las muestras manifestaron una disminución del IM a medida que aumentó su concentración y por lo tanto la inhibición de la mitosis durante la división celular. La mayor concentración del extracto etanólico a 70 °C (EOH2, 2110 $\mu\text{g/ml}$) y el alginato de sodio de primavera (2440 $\mu\text{g/ml}$) mostraron valores de IM de 4,86 y 5,32 %, respectivamente, lo que reveló una importante acción inhibitoria sobre el proceso mitótico, con un porcentaje de inhibición del 79,09 y 77,11 % respectivamente, comparando con el control negativo (**Figura 8.6**). Los extractos etanólicos a temperatura ambiente (EOH1) de las cuatro estaciones mostraron un IM entre un 8 y 9 % a una concentración de 2500 $\mu\text{g/ml}$ aproximadamente, estos valores corresponden a un 40 y 45 % de inhibición mitótica, respectivamente (**Figura 8.5 y 8.6**). El NaAlg (910 $\mu\text{g/ml}$) y el EOH2

(960 µg/ml) de otoño, mostraron la menor actividad inhibitoria en comparación con el resto de las muestras ensayadas.

La alteración del IM se debe a la interferencia de los extractos etanólicos y el alginato de sodio en el proceso normal de mitosis, reduciendo el número de células en división (Ghareeb, 1997; Badr, 1983).

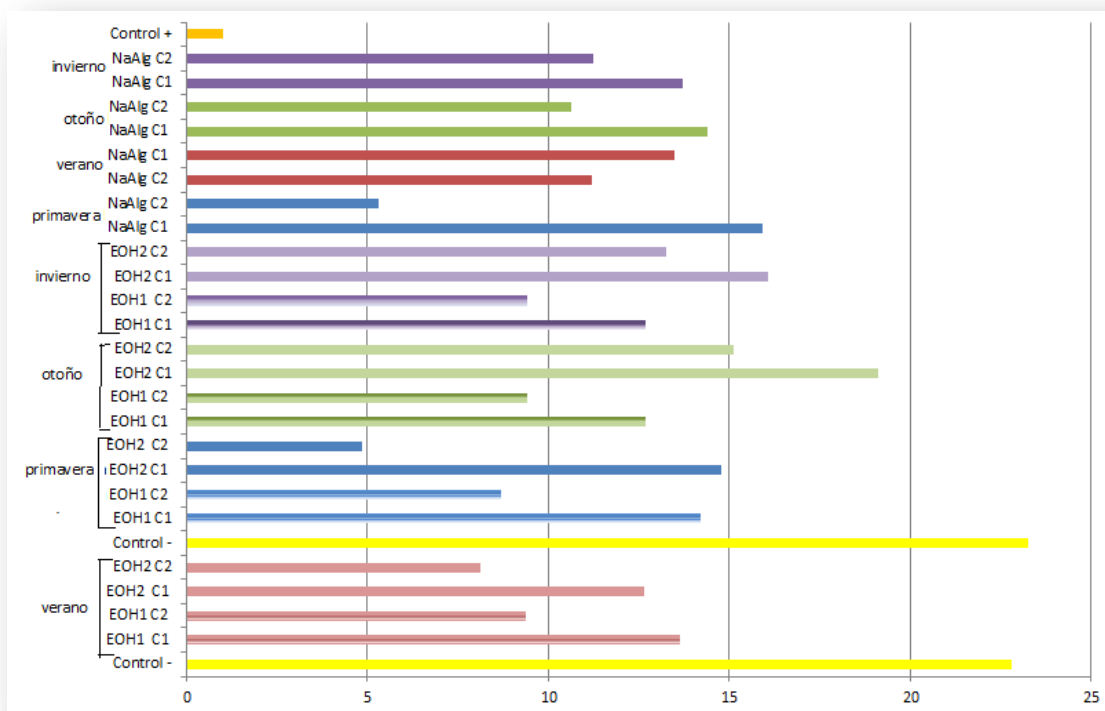


Figura 8.5. Índice mitótico (IM) de los extractos alcohólicos y alginato de sodio (NaAlg) obtenido de las frondas de *U. pinnatifida*, colectada estacionalmente. EOH1: extracto alcohólico a temperatura ambiente; EOH2: extracto alcohólico a 70 °C.

En este ensayo se pudo observar que una disminución del índice de fases (**Figura 8.7**) con respecto al control negativo, lo que indica que el ciclo celular se retrasa antes de pasar a la fase M, sin detener todo el ciclo, ya sea al final de G2 o en el tránsito de G2 a M. Esto se deduce por la disminución en el porcentaje de las distintas fases durante la mitosis comparado con el control negativo. En todos los casos el mayor porcentaje de fase mitótica se correspondió a la profase al igual que ocurrió en el control positivo. Las otras fases de la mitosis en general fueron de mejor porcentaje comparadas con el patrón negativo, excepto el EOH2 de

otoño cuyo valor de metafase superó al C⁻. El EOH2 (2110 µg/ml) y el NaAlg (2440 µg/ml) de primavera fueron los que produjeron mayor inhibición en las fases durante la mitosis de las células meristemáticas de *A. cepa* (Figura 8.7).

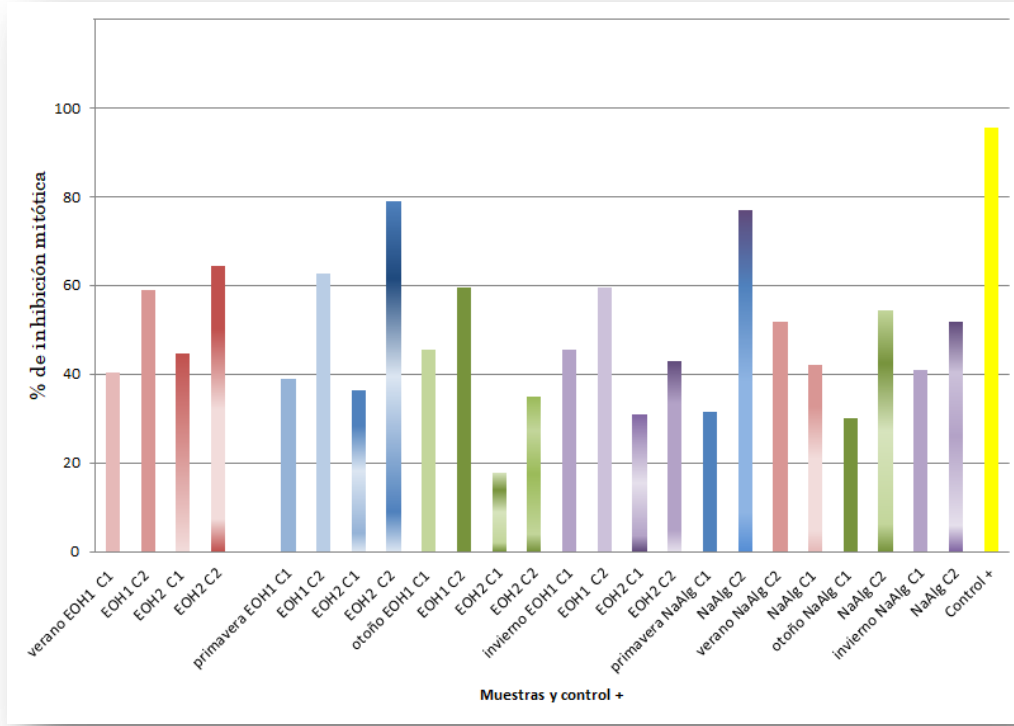


Figura 8.6. Porcentaje de inhibición mitótica del control positivo ($K_2Cr_2O_7$), extractos alcohólicos y alginato de sodio (NaAlg) obtenido de las frondas de *U. pinnatifida*, colectada estacionalmente. EOH1: extracto alcohólico a temperatura ambiente; EOH2: extracto alcohólico a 70 °C.

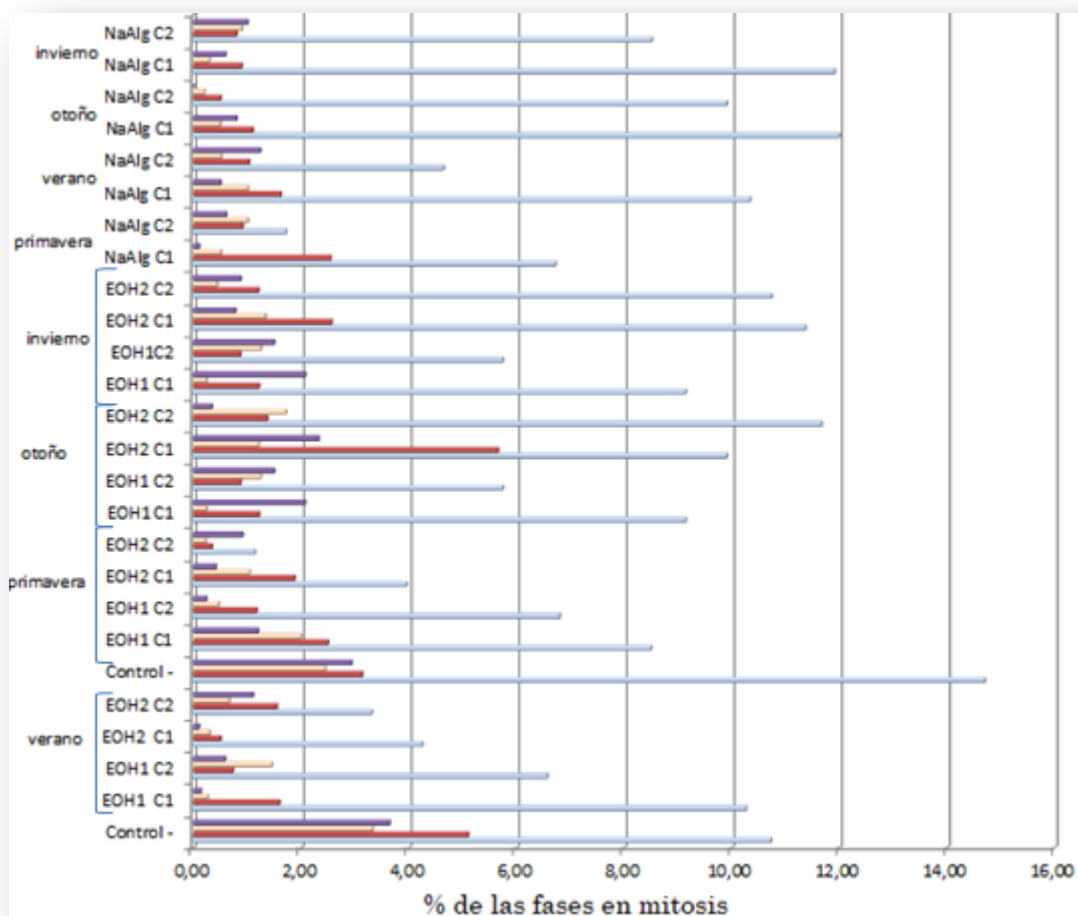


Figura 8.7. Porcentajes de las distintas fases de la mitosis en las células meristemáticas de *Allium cepa* bajo tratamiento de los extractos alcohólicos y NaAlg de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente en las costas de Comodoro Rivadavia. C1: concentración mínima, C2: concentración máxima.

Si bien en todas las muestras los índices mostraron una actividad citotóxica, los hallazgos microscópicos evidenciaron características importantes.

A continuación se exponen algunas fotografías que demuestran la citotoxicidad, evidente en la pérdida de la estructura celular así como la genotoxicidad observada por la presencia de aberraciones cromosómicas en diferentes etapas de la mitosis.

La **Figura 8.8.a** muestra las distintas fases de la mitosis (A, B, C, D) y citocinesis (E) normal en el control negativo, y aumento de tamaño nuclear (F), lisis celular

(G), pérdida del contenido citoplasmático (H), y membrana nuclear (I), en las células del control positivo.

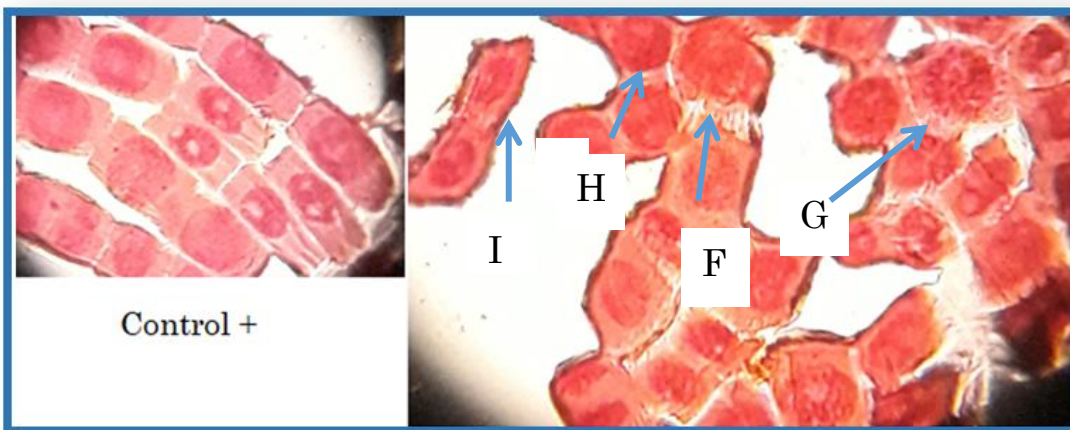
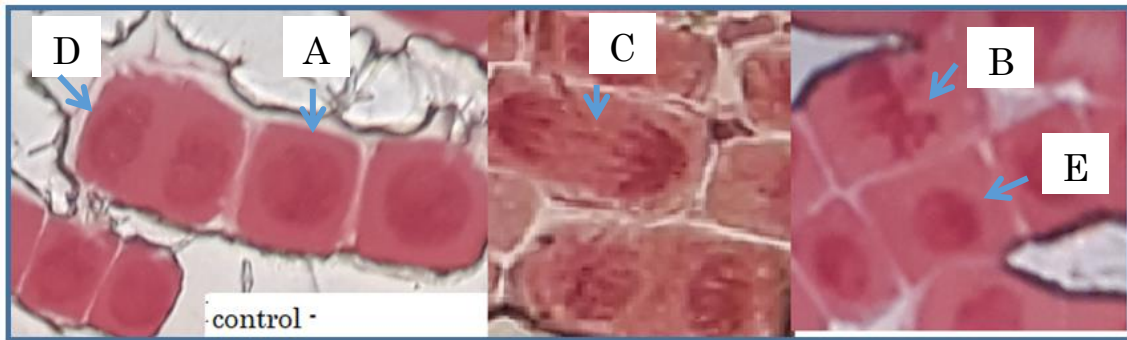


Figura 8.8.a. Diferentes fases de la mitosis del ciclo de división celular normal (tratamiento con agua potable, control negativo, C-); A: profase, B: metafase, C: anafase, D: telofase, E: citocinesis, F: aumento de tamaño nuclear, G: lisis celular, H: pérdida del contenido citoplasmático, I: pérdida de la membrana nuclear, (40X).

Los extractos alcohólicos y el alginato de las distintas estaciones produjeron algunas modificaciones a nivel estructural y/o nuclear en las células meristemáticas. Por ejemplo, en el EOH1 de primavera, en general se conservó el estado de las distintas fases (**Figura 8.8.b I**), pero también se detectó la ausencia

o ruptura de membrana nuclear en algunas células meristemáticas (**Figura 8.8.b II**), el resto de las muestras ensayadas mostrarán diferentes cambios celulares, los mismos se detallan en la **Tabla 8.11**.

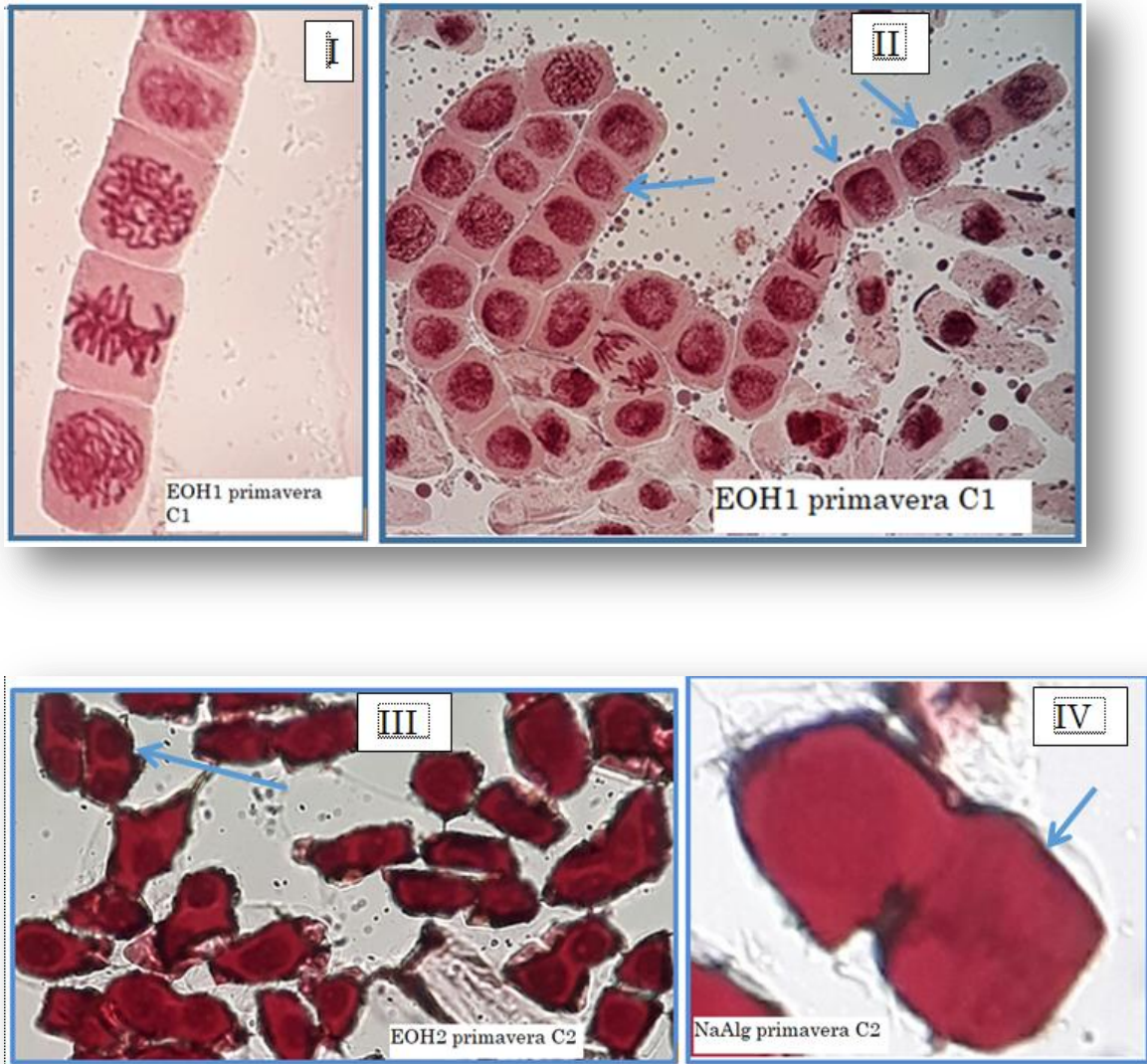


Figura 8.8.b. Características anormales (II- IV) en las células meristemáticas de *Allium cepa* durante la mitosis al estar expuesta a distintas concentraciones de EOH1 (960 $\mu\text{g}/\text{ml}$), EOH2 (2110 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y NaAlg (2440 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de primavera (40X).

Tabla 8.11. Características de los cambios a nivel estructural y/o nuclear en las células meristemáticas de *A. cepa* por efecto de los extractos alcohólicos y alginato obtenidos a partir de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente.

Estación	Muestra	Conc. (µg/ml)	Cambio estructural y/o nuclear	Figura
Primavera	EOH1 C1	960	En general se conservó las distintas fases de la mitosis. Algunas presentaron ruptura de membrana nuclear	Fig. 8.8.b, I (fases de la mitosis) y II (ruptura de la membrana)
	EOH1 C2	2550	Ruptura de membrana nuclear	n. m
	EOH2 C1	960	Células binucleadas	n. m
	EOH2 C2	2110	Células binucleadas y amorfas	Fig. 8.8.b, III
Verano	EOH1 C1	880	Cromosoma errante en telofase	Fig. 8.8.c, V
	EOH1 C2	2460	Cromosoma errante en telofase	n. m
	EOH2 C1	964	Núcleo desplazado a la zona periférica	n. m
	EOH2 C2	2450	Núcleo desplazado a la zona periférica	Fig. 8.8.c, VI
Otoño	EOH1 C1	962	macrocélulas	Fig. 8.8.c, VII
	EOH1 C2	2540	Cromosoma errante	n. m
	EOH2 C1	960	Cromosoma errante	n. m
	EOH2 C2	2110	Cromosoma errante y células alargadas	Fig. 8.8.c, VIII
Invierno	EOH1 C1	964	Células binucleadas y amorfas	n. m
	EOH1 C2	2547	Células binucleadas y amorfas	n. m
	EOH2 C1	963	Células amorfas	n. m
	EOH2 C2	2111	Células amorfas	n. m
Primavera	NaAlg C1	900	Cromosoma errante	n. m
	NaAlg C2	2440	Cromosoma errante en telofase	Fig. 8.8.b, IV
Verano	NaAlg C1	902	macrocélulas y alargadas	n. m
	NaAlg C2	2400	Células amorfas	n. m
Otoño	NaAlg C1	910	Células binucleadas	n. m
	NaAlg C2	2398	Alargamiento de células, cromosoma errante	n. m
Invierno	NaAlg C1	920	Células binucleadas	n. m
	NaAlg C2	2110	Núcleo desplazado a la zona periférica y células amorfas	Fig. 8.8.d, IX

n.m: imagen no mostrada

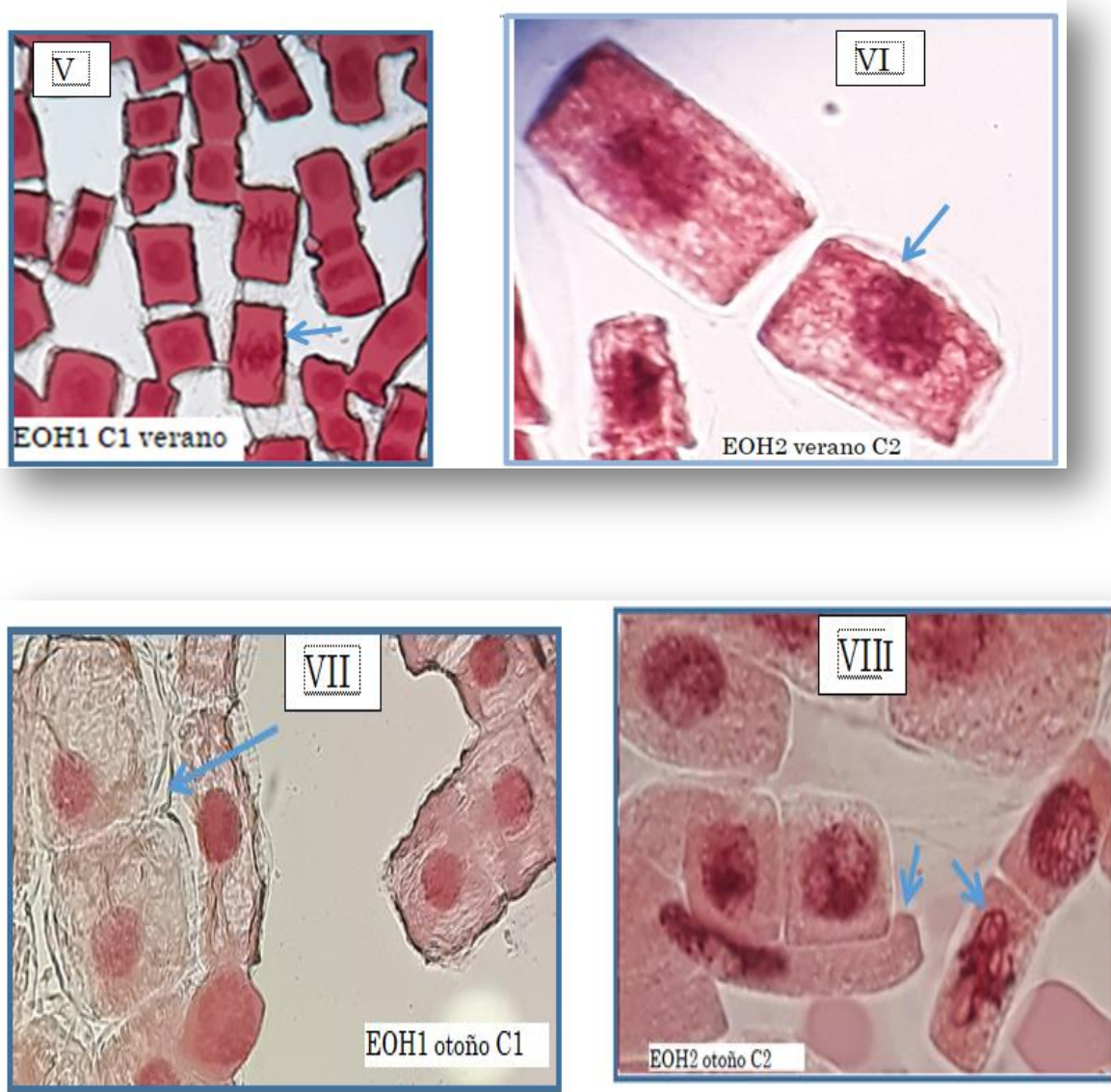


Figura 8.8.c. Características anómalas de las células meristemáticas al estar expuestas al EOH1 (962 $\mu\text{g/ml}$, VII) y EOH2 (2110 $\mu\text{g/ml}$, VIII) de otoño, (40X).

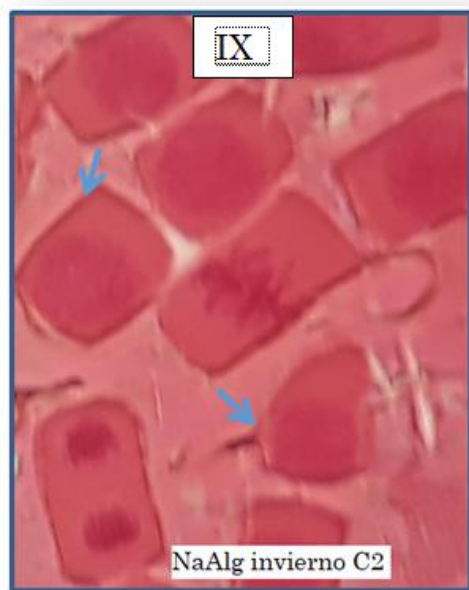


Figura 8.8.d. Características anómalas de las células meristemáticas al estar expuestas al NaAlg (2110 µg/ml, IX) de invierno, (40X).

Las imágenes mostradas son una prueba de la actividad antitumoral de los extractos alcohólicos y el alginato de sodio obtenida a partir de las frondas de *U. pinnatifida*, cuyo mecanismo de acción es a nivel de la mitosis, con diferentes modificaciones estructurales a nivel del ADN.

El paclitaxel, fármaco utilizado en el tratamiento de cáncer, produce la inhibición de la mitosis en un 50 % con la presencia de células multinucleadas y la supresión de la dinámica de los microtúbulos (Jordan et al., 1993).

Teniendo en cuenta nuestros resultados, y la información del mecanismo de acción de fármacos anticancerígenos que inhiben a nivel de la mitosis, proponemos que el bloqueo mitótico inducido por las muestras ensayadas en ambas concentraciones conduce no solo a la inhibición de la proliferación celular entre las fases G2/M, sino también la apoptosis celular.

Nuestros resultados concuerdan con lo informado por Yu et al. (2011). Estos investigadores estudiaron el efecto de la fucoxantina aislada de *U. pinnatifida* sobre líneas celulares de adenocarcinoma gástrico, cuyo efecto fue la inhibición del ciclo celular a nivel de las fases G2/M y la inducción de apoptosis, dosis dependiente, cuyo mecanismo de acción propuesto fue través de la regulación de

expresión de caspasas, proteínas clave en la transducción y apoptosis inducida por una diversidad de estímulos a través de ruta de JAK / STAT. Las proteínas JAK (del inglés: *Janus cinasas*) son las únicas proteínas que se asocian con receptores de citocinas. En la unión del ligando, ellas activan a los miembros de la familia de Transductores y Activadores de las Señales de Transcripción (STAT) (Heim, 1999).

La presencia de fucoxantina, polifenoles (principalmente derivados del floroglucinol), determinados por TLC (ver Capítulo 6), en todos los extractos etanólicos estudiados, muestra que estos metabolitos serían los responsables, de forma sinérgica o individual, de la actividad antitumoral. La proporción de estos metabolitos se ve influenciado por diversos factores, dando variaciones estacionales, que explica al menos en parte, las diferencias bioactivas de los diferentes extractos (Holdt y Kraan, 2011).

En cuanto al NaAlg, características particulares como su alto contenido en grupos sulfatos (ver Capítulo 7), son responsables de su actividad antitumoral, lo que se condice con la actividad del alginato de verano. Sin embargo, el alginato de primavera tiene un menor contenido de sulfato, pero un mayor nivel de intercalación del ADN (Tabla 8.5), lo que explica su alta actividad antitumoral.

8.2.1.9. Ensayo alelopático preliminar

Los resultados muestran que el porcentaje de germinación promedio, en el ensayo del extracto etanólico a temperatura ambiente (EOH1) de *U. pinnatifida* colectada en primavera, sobre *Lycopersicum esculentum*, produjo una estimulación en las dos concentraciones más bajas con valores del 14,29 y 4,76 % mayores con respecto al control (Figura 8.9.a), en tanto que sobre *Lolium multiflorum* se vio inhibida en todas las concentraciones ensayadas con respecto al control (Figura 8.9.b). El porcentaje de crecimiento radicular promedio sobre *Lycopersicum esculentum* presentó una inhibición para las dos concentraciones más bajas y una estimulación a la mayor concentración con un 6,25 % más respecto al control (Figura 8.10.a) y sobre *Lolium multiflorum* el extracto

etanólico mostró tener un efecto de inhibición moderada dosis dependiente (Figura 8.10.b).

Al comparar nuestros resultados de la germinación y desarrollo radicular con los datos obtenidos por Marchiaro et al., (2013), en la que expusieron dos extractos (acuoso y ácido) de *U. pinnatifida* sobre *Salvia officinalis*, se pudo observar que el extracto ácido tuvo una mayor eficacia en la germinación y crecimiento de las plantas a la concentración más baja ensayada (0,05 mg/ml). Sin embargo en la mayor concentración (0,4 mg/ml) se registró inhibición (100%) en el crecimiento de las plantas con los dos tipos de extracto ensayados *in vivo*. Esta marcada diferencia en cuanto a los valores obtenidos nos lleva a pensar que el comportamiento de *U. pinnatifida* tiene una notable influencia en la germinación y el desarrollo radicular, de inhibición o estimulación, que depende de la especie usada en el ensayo, el tipo de extracto y condiciones de cultivo.

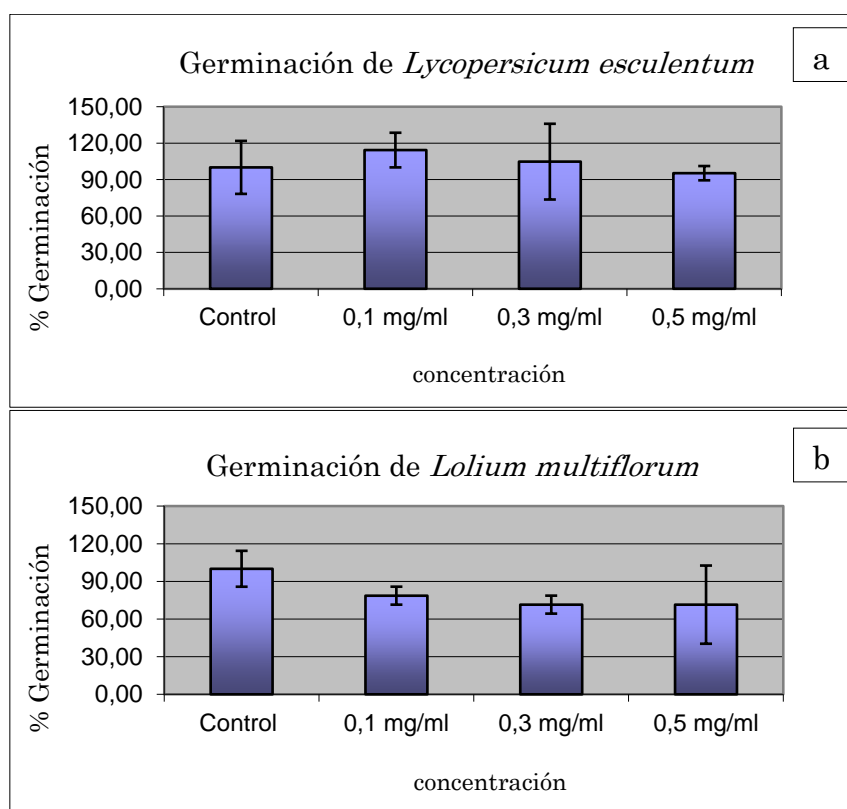


Figura 8.9. Resultados de la germinación de *Lycopersicon esculentum* (a) y *Lolium multiflorum* (b) con distintas concentraciones del extracto alcohólico de *Undaria pinnatifida* colectada en primavera en las costas de Comodoro Rivadavia, GSJ.

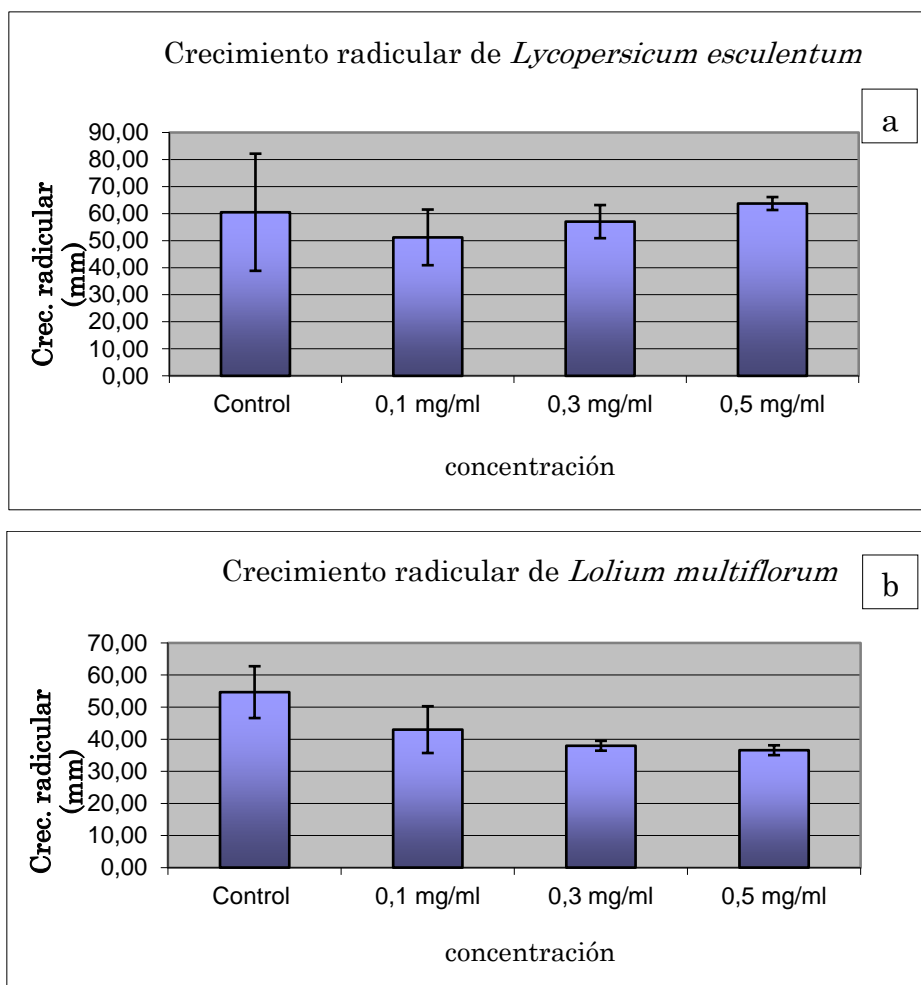


Figura 8.10. Resultados del crecimiento radicular de *Lycopersicon esculentum* (a) y *Lolium multiflorum* (b) con distintas concentraciones del extracto etanólico de *Undaria pinnatifida* colectada en primavera en las costas de Comodoro Rivadavia, GSJ.

8.3. Obtención y caracterización de micropartículas a partir de alginato de sodio

Para dar cumplimiento a uno de objetivos planteados se seleccionó el NaAlg de primavera y verano debido a los resultados obtenidos durante el desarrollo de la presente tesis. Una de las características que se destaca en ambos productos es la diferencia de Mwa, presencia de grupos sulfatos y grado de purificación.

Las obtención de micropartículas, mediante gelificación iónica interna, fueron preparadas a partir de una solución de alginato de sodio de *U. pinnatifida* colectada en primavera y verano, las mismas produjeron valores bajos en cuanto al rendimiento (% Ren), eficacia de encapsulación (% EE) y contenido de paracetamol (% Cpa). Dentro de estos valores, los mayores porcentajes correspondieron al de primavera (**Tabla 8.12**).

Estos resultados muestran que el alginato de sodio de *U. pinnatifida* obtenido de las muestras colectadas en primavera y verano, en las condiciones llevadas a cabo, no son aptas para la microencapsulación de paracetamol mediante gelificación interna iónica.

Tabla 8.12. Porcentajes de rendimiento, eficacia de encapsulación y contenido de principio activo en el proceso de microencapsulación.

Estación	Microencapsulación		
	% Rend	% EE	% Cpa
Primavera	10	2	9,13
Verano	1,16	1,8	7,00

8.3.1. Análisis del alginato mediante Difracción de Rayos X

Con el objeto de conocer la conformación de las micropartículas, identificar si existieron interacciones químicas asociadas al proceso de microencapsulación y estimar la estabilidad del producto, se analizó el alginato de sodio y las microcápsulas, de ambas estaciones, por difracción de rayos X.

Los difractogramas del alginato de primavera y verano se compararon con una muestra de alginato de sodio comercial. En la **Figura 8.11** se observa la presencia de una región amorfa (curva que se aleja de la base) en las tres muestras analizadas, en la que el alginato de sodio comercial presenta una estructura más amorfa comparada con la de primavera y verano. Esto demuestra el plegamiento de cadenas desordenadas o desalineadas debido a las torsiones y dobleces de las cadenas poliméricas que impiden su orientación. Observado esto, se puede inferir

la falta de uniformidad y ordenamiento así como la alta flexibilidad, elasticidad de las muestras analizadas (Dill y Bromberg, 2003).

El alginato es un copolimero por lo que se reduce el grado de cristalización, porque las cadenas poliméricas no pueden ajustarse adecuadamente en la red cristalina de otras cadenas poliméricas y, en el caso de ser muy diferentes, provocan que la cristalización sea completamente impedida por falta de regularidad estructural. Las señales de distintas intensidades en las tres muestras señalan la presencia de cierta cristalinidad, las cuales son atribuidas a la presencia de grupos funcionales, estos por su fuerte interacción forman puentes hidrógeno permitiendo realizar un mejor reordenamiento (Donati y Paoletti, 2009)

Los picos diferenciables para el alginato de sodio de primavera y verano (**Figura 8.12**) se observan a $2\theta = 35^\circ$, en tanto que para la muestra comercial se puede observar dos picos a $2\theta = 30^\circ$ y 42° . Por otra parte, el difractograma mostró además los picos característicos del alginato de sodio.

En cuanto a los difractogramas de las micropartículas (**Figura 8.12 y 8.13**) se observa que la cristalinidad o mejor ordenamiento y regularidad que presentaba el alginato de sodio de primavera y verano al inicio se perdió al elaborar las micropartículas. Este comportamiento se debe a que el proceso de microencapsulación en lugar de contribuir al ordenamiento del polímero, termina por plegarla más y la deforma, debido a la presencia de calcio y que fue el responsable de la gelificación interna, perdiendo su ordenamiento inicial.

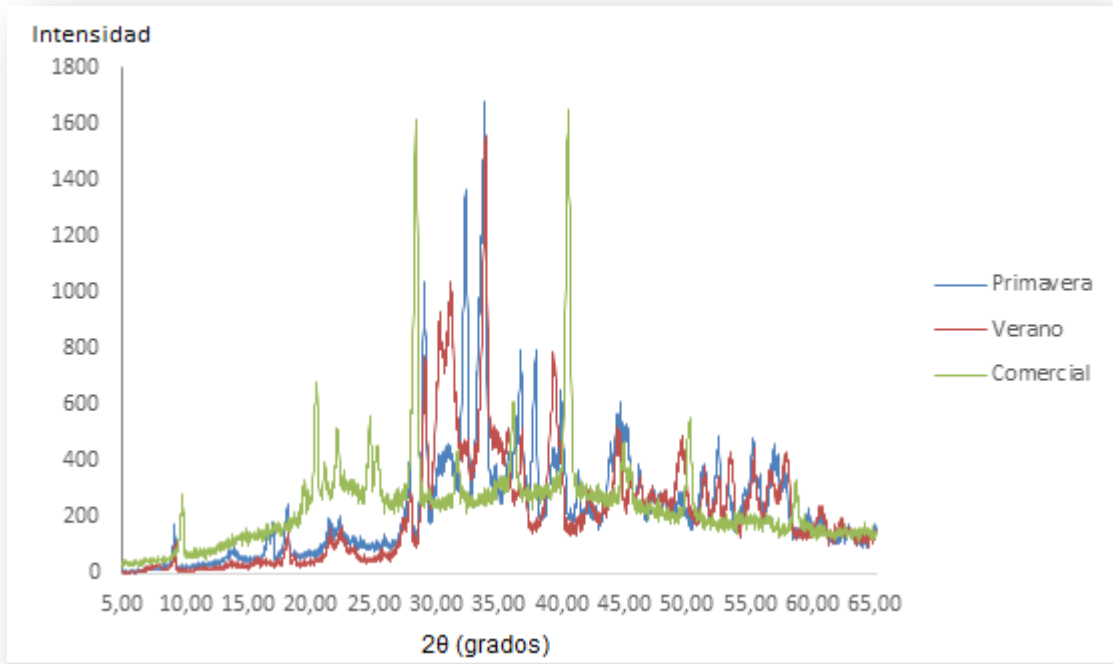


Figura 8.11. Comparación de los difractogramas de alginato de sodio comercial y los obtenido a partir de las frondas de *U. pinnatifida* colectada en primavera y verano.

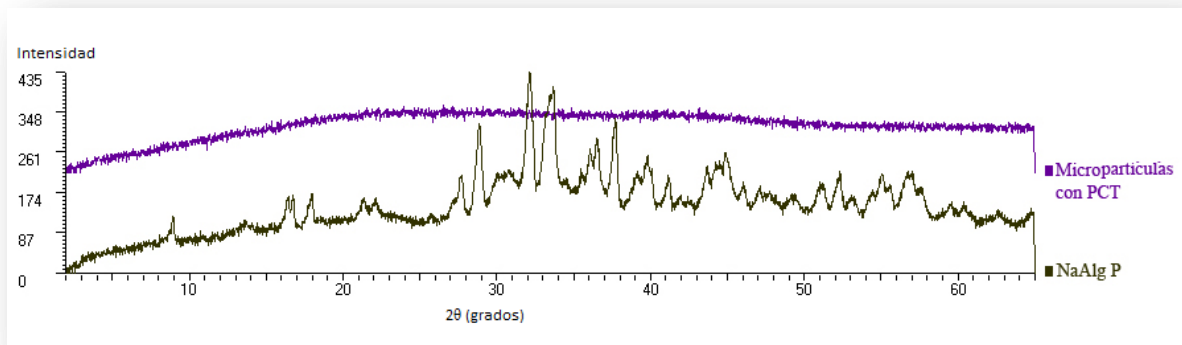


Figura 8.12. Comparación de los difractogramas de alginato de sodio purificado de primavera y de las micropartículas conteniendo paracetamol.

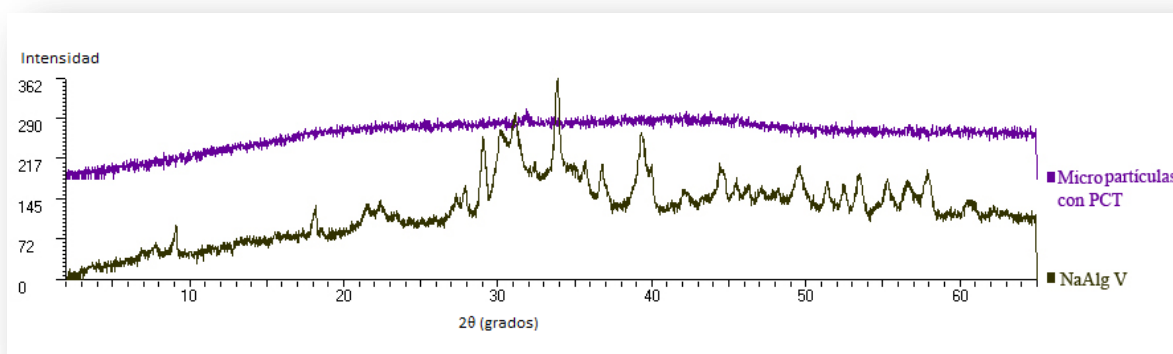


Figura 8.13. Comparación de los difractogramas de alginato de sodio purificado de verano y de las micropartículas conteniendo paracetamol.

8.3.2. Descripción morfológica y tamaño de partícula

En el campo de los polímeros, se deben utilizar técnicas capaces de observar la estructura microscópica. La microscopía electrónica de barrido proporciona información morfológica y topográfica sobre la superficie de los sólidos que son normalmente necesarias para entender el comportamiento de las superficies. Así, un análisis por microscopía electrónica es a menudo la primera etapa en el estudio de las propiedades de las superficies de un sólido (Bassett, 1981).

Las micropartículas tanto vacías como llenas con paracetamol exhibieron formas irregulares y de gran tamaño, como se observa en la **Figura 8.14** y **8.15**.

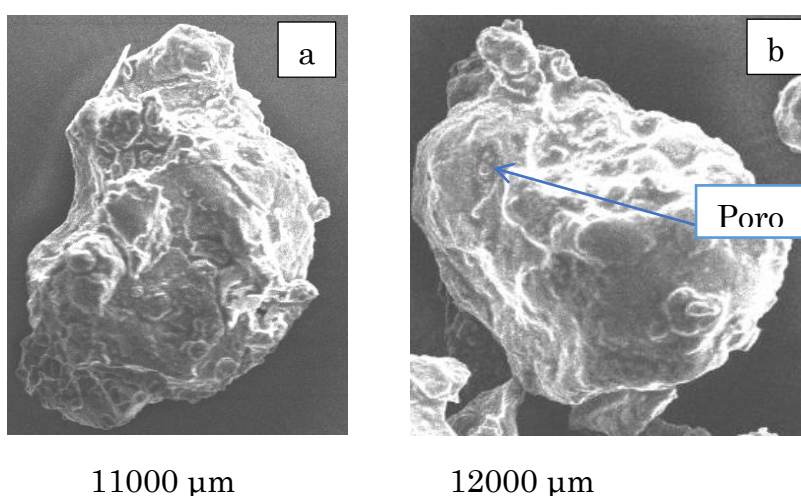


Figura 8.14. Micropartículas vacías. a, primavera; b, verano.

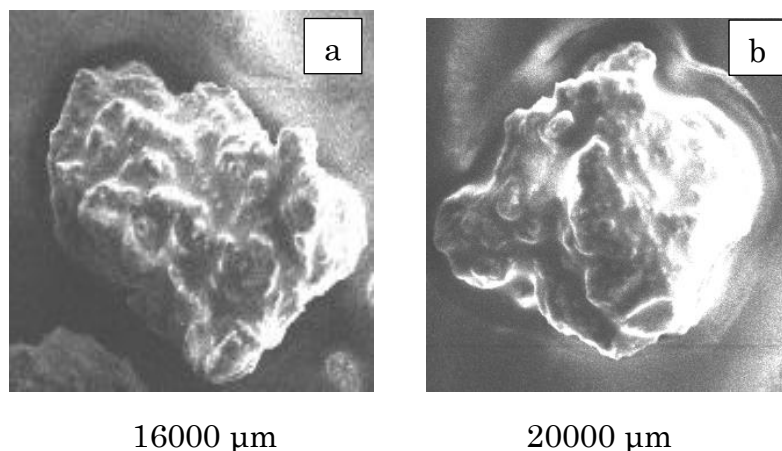


Figura 8.15. Micropartículas con paracetamol. a, verano; b, primavera.

Si bien el procedimiento de obtención de micropartículas de alginato es, desde un punto de vista teórico, relativamente simple, la producción de micropartículas con características óptimas (por ejemplo, forma esférica, capacidad adecuada de hinchamiento) requiere el estricto control de una serie de parámetros. Estos incluyen el tipo de polímero a ser utilizado, la concentración del alginato usada, la estructura monomérica del alginato, el peso molecular y la concentración de iones calcio utilizada para el proceso de gelificación, entre otros (Salib et al., 1978).

8.3.3. Conclusión general de las micropartículas obtenidas a partir de alginato de sodio de *Undaria pinnatifida*

A nivel molecular, la gelificación consiste en un proceso de formación de una red continua tridimensional de macromoléculas, estableciéndose interacciones de diferente naturaleza entre cadenas de polímeros, permitiendo la retención de la sustancia a encapsular y una gran cantidad de solvente (Almdal et al., 1993).

Las uniones se establecen de forma localizada entre porciones de cadenas libres (u otras estructuras por ellas formadas) de conformación y configuración similar, es decir, los segmentos ordenados de una cadena se pueden asociar con los mismos segmentos de otra cadena, formando una hélice doble, en tanto que los

segmentos no periódicos o desordenados no pueden participar en estas asociaciones.

Analizando nuevamente los resultados mostrados en el Capítulo 7 (ver Figura 7.2), observamos claramente que el alginato de sodio de primavera está constituido por cadenas poliméricas más cortas, siendo estas una séptima parte con respecto a la de verano, esto podría explicar, al menos en parte el menor tamaño que presentaron las micropartículas obtenidas (**Figura 8.14.a**). Con respecto al alginato de verano su mayor contenido en grupos sulfatos y su impurificación con proteínas serían los responsables de la estructura reticular del gel formado y que presente mayor tamaño de partícula con poros o cavidades (**Figura 8.14.b**). Las características antes mencionadas hacen que el paracetamol sea capaz de difundir hacia el exterior dando como resultado bajos porcentajes en cuanto a la eficacia de encapsulación y contenido de principio activo, reflejados en un menor tamaño (**Figura 8. 15.a**), caso contrario ocurrió con el producto de primavera (**Figura 8. 15.b**).

Es importante señalar que el rendimiento, encapsulación y contenido de principio activo son controles significativos dado que cada uno refleja la calidad de las micropartículas obtenidas. Por ejemplo, el rendimiento de producción muestra el porcentaje de micropartículas obtenidas con respecto a la cantidad total de alginato de sodio y paracetamol empleado. Se trata de un control muy importante desde el punto de vista económico, teniendo en cuenta el elevado costo de la mayoría de los polímeros y principios activos utilizados.

Otro punto a considerar es que tanto el contenido en principio activo como la eficacia de encapsulación sean lo más elevados posibles, es decir, se busca que todo o prácticamente todo el principio activo utilizado en el proceso sea encapsulado.

Dentro de nuestro grupo de investigación, Becerra (2016) desarrolló una técnica de microencapsulación por gelificación iónica interna con alginato de sodio de *Lessonia vadosa* colectada en Santa Cruz, cuyos resultados fueron óptimos en cuanto al rendimiento de obtención de micropartículas y la eficacia de encapsulación del paracetamol, 46,7 y 98,0 % respectivamente, comparados con una muestra comercial de alginato de sodio.

Teniendo en cuenta los sistemas de colecta a granel utilizados en la industria, esto muestra la importancia de evitar la mezcla de *Lessonia vadosa* con *Undaria pinnatifida*, si se tiene como objetivo la obtención de alginato de alta calidad para la industria farmacéutica.

8.4. Conclusiones

De acuerdo a uno de los objetivos planteados se evaluaron distintas actividades biológicas mediante experiencias *in vitro*.

La actividad antioxidante y el ensayo de inhibición de crecimiento radicular, este último que presume actividad antitumoral, realizados sobre el extracto etanólico total del estudio preliminar, muestra colectada en Bahía Bustamante, mostraron interesantes respuestas, las mismas atribuibles, al menos en parte, a la presencia de aminogrupos primarios y/o secundarios y compuestos fenólicos.

El estudio exhaustivo, muestra colectada en las costas de Comodoro Rivadavia, de los extractos etanólicos (EOH1 y EOH2) y alginato de sodio (NaAlg) obtenidos estacionalmente, mostraron tener una importante actividad citotóxica frente a *Artemia salina* por lo que se continuó con otros ensayos biológicos.

El ensayo de inhibición del crecimiento radicular de los extractos etanólicos a temperatura ambiente (EOH1) a una concentración del 0,05 % mostraron actividad inhibitoria en todas las estaciones a excepción de otoño que produjo una estimulación del crecimiento. Este último efecto también se observó en los extractos a 70 °C (EOH2) al 0,05 % de las cuatro estaciones.

Todos los extractos etanólicos (EOH1 y EOH2) al 0,5 % mostraron una actividad inhibitoria del crecimiento radicular, siendo de aproximadamente un 50 % en otoño. El alginato de sodio de primavera y verano, a ambas concentraciones de prueba, mostraron inhibición radicular. En tanto que otoño e invierno manifestaron estimulación e inhibición radicular a las concentraciones de 0,05 y 0,5 % respectivamente. La mayor actividad de inhibición radicular lo produjo el NaAlg al 0,5 % de invierno cuyo valor fue del 82 %.

De todas las muestras analizadas mediante el ensayo del metilgreen-ADN, el NaAlg de primavera fue el que presentó un posible mecanismo molecular de acción mediante la intercalación en el ADN.

Los extractos etanólicos (EOH1 y EOH2) y el NaAlg de las cuatro estaciones no presentaron actividad antileishmania ni antibacteriana ante las cepas ensayada.

Los extractos alcohólicos (EOH1 y EOH2) así como el alginato de sodio de las cuatro estaciones, mostraron una actividad antioxidante moderada a baja frente al DPPH.

El alginato de sodio de primavera, a una concentración de 1 mg/ml, mostró una actividad antitumoral sobre líneas celulares MCF-7 del 75 % la cual se mantuvo activa aún a una concentración de 500 µg/ml. Si bien la actividad antitumoral sobre líneas celulares Caco-2 fue del 61,6 % el NaAlg mostró una menor afinidad sobre Caco-2 en comparación con MCF-7.

La actividad de cito y genotoxicidad de los EOH1, EOH2 y NaAlg de las cuatro estaciones mostraron citotoxicidad por inhibición mitótica de las células meristemáticas de *Allium cepa* entre las fases G2/M y cambios en las células a nivel estructural y/o nuclear. La mayor concentración del EOH2 y NaAlg, ambos de primavera, mostraron los valores más altos de inhibición con valores del 79,09 y 77,11 % respectivamente, por lo que esta estación produjo un mayor efecto antitumoral comparado a las restantes estaciones. La presencia de fucoxantina, derivados del floroglucinol en el extracto etanólico (EOH1 y EOH2), muestra que estos metabolitos serían los responsables de la actividad antitumoral. En el caso del NaAlg la presencia de grupos sulfatos dan al polisacárido propiedades antitumorales, siendo mayor para la estación primavera.

El ensayo alelopático del extracto etanólico a temperatura ambiente (EOH1) de primavera sobre *Lycopersicum esculentum* (dicotiledónea), produjo una estimulación de la germinación a concentraciones más bajas de prueba (0,1 y 0,3 mg/ml) con valores del 14,29 y 4,76 %, en tanto que sobre *Lolium multiflorum* (monocotiledónea) vio inhibida en todas las concentraciones. El porcentaje de crecimiento radicular promedio sobre *Lycopersicum esculentum* presentó una inhibición para las dos concentraciones más bajas y una estimulación a la mayor concentración (0,5 mg/ml) con un 6,25 % más respecto al control. Sobre *Lolium multiflorum* el extracto etanólico mostró tener un efecto de inhibición moderada dosis dependiente. Este ensayo demuestra que el uso del extracto EOH1 de primavera con fines de cultivo debe ser previamente evaluado en cuanto a las especies y propósitos de su aplicación.

Se aplicó el NaAlg de primavera y verano a la formulación farmacéutica de microencapsulación de paracetamol. Si bien los resultados fueron bajos en cuanto al rendimiento, eficacia de microencapsulación y contenido de principio activo, no debe descartarse la posibilidad de continuar con la elaboración de otras formas farmacéuticas.

8.4. Bibliografía

Almdal, K.; Dyre, J.; Hvidt, S.; Kramer, O., Towards a phenomenological definition Polymer of the term gel. *Polymer Gels and Networks*. **1993**, *1*, 1, 5–17.

Ayesha, H.; Viqar, S.; Jehan, A.; Syed E.H. In Vitro Cytotoxicity of Seaweeds From Karachi Coast On Brine Shrimp. *Pak. J. Bot.* **2010**, *42*, 5, 3555–3560.

Badr, A. Mitodepressive and cytotoxic activities of two herbicides in *Allium cepa*. *Cytology*. **1983**, *48*, 451–457.

Bassett, D. Principles of polymer morphology, 1^{er} ed. Cambridge [England]: Cambridge University Press. 1981.

Becerra, M. B. Obtención de productos de importancia farmacéutica biosintetizados por especies de algas pardas de las costas del Golfo San Jorge. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Dpto. De Farmacia. Argentina. 2016.

Carper, J. Seaweed, or kelp. In: The Food Pharmacy. Bantam Books, New York, NY. 1989, pp. 264–268.

Checchi, P. M.; Nettles, J. H.; Zhou, J.; Snyder, J.P.; Joshi, H.C. Microtubule-interacting drugs for cancer treatment. *Trends Pharm. Sci.* **2003**, *24*, 361–365.

Cobs-Rosas, M.; Concha-Olmos, J.; Weinstein-Oppenheimer, C.; Zúñiga-Hansen, M.E. Assessment of antiproliferative activity of pectic substances obtained by different extraction methods from rapeseed cake on cancer cell lines. *Carbohydrate Polymers*. **2015**, *117*, 6, 923–932.

Correia, J.J.; Lobert, S. Physicochemical aspects of tubulininteracting antimetabolic drugs. *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *7*, 1213–1228.

Croft, S.; Coombs, G. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasit.* **2003**, *19*, 11, 502–508.

Cutts, J.H.; Beer, C.T.; Noble, R.L. Biological properties of Vincalokoblastine, an alkaloid in *Vinca rosea* Linn, with reference to its antitumor action. *Cancer Res.* **1960**, *20*, 1023–1031.

Días, P.F.; Siqueira, J.M.; Vendruscolo, L.F.; de Jesús Neiva, T.; Gagliardi, A.R.; Maraschin, M.; Ribeiro-do-Valle, R.M. Antiangiogenic and antitumoral properties of a polysaccharide isolated from the seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *56*, 436–446.

Dill, K.; Bromberg, S. Molecular driving forces, 2da ed. New York: Garland Science. 2003. Online
[https://books.google.com.ar/books?hl=es&lr=&id=1gYPBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Dill,+K.%3B+Bromberg,+S.+Molecular+driving+forces+\(1st+ed.\).+New+York:+Garland+Science.+2003.+&ots=lQpAK48ane&sig=CGO0lQHFy5eq-7q_yXOpQm3Da-s#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ar/books?hl=es&lr=&id=1gYPBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Dill,+K.%3B+Bromberg,+S.+Molecular+driving+forces+(1st+ed.).+New+York:+Garland+Science.+2003.+&ots=lQpAK48ane&sig=CGO0lQHFy5eq-7q_yXOpQm3Da-s#v=onepage&q&f=false). Acceso 17 Julio, 2018.

Donati, I.; Paoletti, S. Material Properties of Alginates. In H. Bernd Rehm, Alginates: Biology and Applications 1st ed. Germany: Springer Science. 2009.

Engwerda, C.R.; Ato, M.; Kte, P.M. Macrophages, Pathology and Parasite Persistence in Experimental Visceral Leishmaniasis. *Trends in Parasit.* **2004**, *20*, 11, 524–530.

Escobar, L. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT empleados en la evaluación de citotoxicidad sobre tres líneas celulares tumorales, Tesis Doctoral. Pontificia Universidad Javeriana, 2007.

Faulkner, D. J. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 1–48.

Fernández, M.; Cucchi Colleoni, D.; Roux1, A.; Marcos, A.; Fernández, E. Caracterización físico-química del sistema bentónico en el sector sur del Golfo San Jorge, Argentina. *Rev. Biol. Mar. Oceanog.* **2007**, *42*, 2, 177–192.

Fiskesjö, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas.* **1985**, *102*, 99–112.

Funahashi, H.; Imai, T.; Mase, T.; Sekita, M.; Yokoi, K.; Hayashi, H.; Shibata, A.; Hayashi, T., Nishikawa, M., Suda, N., Hibi, Y., Mizuno, Y.; Tsukamura, K.; Hayakawa, A.; Tanuma, S. Seaweed prevents breast cancer? *Jpn. J. Cancer Res.* **2001**, *92*, 483–487.

Funahashi, H.; Imai, T.; Mase, T.; Sekiya, M.; Yokoi, K.; Hayashi, H.; Shibata, A.; Hayashi, T.; Nishikawa, M.; Suda, M.; Hibi, Y.; Mizuno, Y.; Tsukamura, K.; Hayakawa, A.; Tanuma, S. Seaweed prevents breast cancer? *Cancer Sci.* **2001**, *92*, 5, 483–487.

Ghareeb A. Cytotoxicity of insecticide Temik 15 G (Decarb) in mitotic and meiotic cells of *Vicia faba* plant. *Cytology.* **1997**, *62*, 259-263.

Han, J.; Kanga, S.; Chouea, R.; Kimb, H.; Leemc, K.; Chungd, S.; Kimd, C.; Cheng, J. Free radical scavenging effect of *Diospyros kaki*, *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Fitoterapia.* **2002**, *73*, 710–712.

Heim MH. The Jak-STAT pathway:cytokine sgnalling from the receptor to the nucleus. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **1999**, *19*, 4, 75–120.

Hosokawa, M.; Wanezaki, S.; Miyauchi, K.; Kurihara, H.; Kohno, H.; Kawabata, J.; Odashima, S.; Takahashi, K. Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell line HL-60. *Food Sci. Technol. Res.* **1999**, *5*, 243–246.

Jordan, M. A.; Toso, R.J. Thrower, D.; Wilson, L. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993, 90, 9552–9556.

Kanda, H; Kamo, Y; Machmudah, S; Goto, W; Goto M. Extraction of Fucoxanthin from Raw Macroalgae excluding Drying and Cell Wall Disruption by Liquefied Dimethyl Ether. *Mar. Drugs.* 2014, 12, 2383–2396.

Karawita, R.; Siriwardhana, N.; Lee, K. W.; Heo, M. S.; Yeo, I. K.; Lee, Y. D.; Jeon. Y. J. Reactive oxygen species scavenging, metal chelation, reducing power and lipid peroxidation inhibition properties of different solvent fractions from *Hizikia fusiformis*. *Eur. Food Res. Technol.* 2005, 220, 363–371.

Kim, J. M.; Araki, S.; Kim, D. J.; Park, C. B.; Takasuka, N.; Baba-Toriyama, H.; Ota, T.; Nir, Z.; Khachik, F.; Shimidzu, N.; Tanaka, Y.; Osawa, T.; Uraji, T.; Murakoshi, M.; Nishino, H.; Tsuda, H. Chemopreventive effects of carotenoids and curcumins on mouse colon carcinogenesis after 1,2-dimethylhydrazine initiation. *Carcinogenesis.* 1998, 19, 81–85.

Kotake-Nara, E.; Kushiro, M.; Zhang, H., Sugawara, T., Miyashita, K. Nagao, A. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *J. Nutr.* 2001, 131, 3303–3306.

Kuda, T.; Tsunekawa, M.; Hishi, T.; Araki, Y. Antioxidant properties of dried ‘kayamo-nori’, a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *Food Chem.* 2005, 89, 617–622.

Laurienzo, P. Marine Polysaccharides in Pharmaceutical Applications: An Overview. *Mar Drugs.* 2010, 8, 2435–2465.

León, C.J.; Gómez, S.M.; Morantes, S.J.; Cordero, C.P.; Ancizarntan, F. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*. *Biomédica*. **2006**, *26*, 161–168.

Lucas, D.M.; Still, P.C.; Pérez, L.B.; Grever, M.R.; Kinghorn, A.D. Potential of plant derived natural products in the treatment of leukemia and lymphoma. *Curr Drug Targets*. **2010**, *11*, 7, 812-822.

Machu, L.; Misurcova, L.; Ambrozova, J.V.; Orsavova, J.; Mlcek, J.; Sochor, J.; Jurikova, T. Phenolic Content and Antioxidant Capacity in Algal Food Products. *Molecules*. **2015**, *20*, 1118–1133.

Marchiaro, A.B.; Pentreath, V.; Maldonado, F., Berastegui, A.M. Biofertilizantes: Estudios Preliminares Para El Potencial Uso Del Alga *Undaria Pinnatifida*. **2013**, VII CAIQ y 2das JASP.

McLaughlin, J.L.; Lingling, L.R.; Anderson, J.E. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf. J.* 1998, *32*, 513–524.

Morais, D.; Marin-Morales, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*. **2009**, *682*, 71–81.

O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan F., Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem*. **2000**, *267*, 5421–5426.

Okuzumi, J.; Nishino, H.; Murakoshi, M.; Iwashima, A.; Tanaka, Y.; Yamane, T.; Fujita, Y. Takahashi, T. Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid on N-myc expression and cell cycle progression in human malignant tumor cells. *Cancer Lett*. **1990**, *55*, 75–81.

Okuzumi, J.; Takahashi, T.; Yamane, T.; Kitao, Y.; Inagake, M.; Ohya, K.; Nishino, H.; Tanaka, Y. Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine-induced mouse duodenal carcinogenesis. *Cancer Lett.* **1993**, *68*, 159–168.

Parkin DM. The Burden of Cancer in the Developing World: 2002. ASCO Educational Book, 2005, 702–718.

Rai, S.S.; Wolff, J. Localization of the vinblastine-binding site on beta-tubulin. *J Biol Chem.* **1996**, *271*, 14707–14711.

Rocha, F.D.; Soares, A.R.; Houghton, P.J.; Pereira, R.C.; Kaplan, M.A.; Teixeira, V.L. Potential cytotoxic activity of some Brazilian seaweeds on human melanoma cells. *Phytother. Res.* **2007**, *21*, 170–175.

Scolt, P.; Hunter, C.A. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Current Opinion in Immunology.* **2002**, *14*, 466–470.

Wang, Y.; Xu, Z.; Bach, S.; MacAllister, T. Sensitivity of *Escherichia coli* to seaweed (*Ascophyllum nodosum*) phlorotannins and terrestrial tannins. *Asian-Australian Journal of Animal Science.* **2009**, *22*, 238–245.

Yan, X.; Chuda, Y.; Suzuki, M.; Nagata, T. Fucoxanthin as the Major Antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a Common Edible Seaweed. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*, 3, 605–607.

Yu, R.-x., Hu, X.-m., Xu, S.-q., Jiang, Z.-j., Yang, W. Effects of fucoxanthin on proliferation and apoptosis in human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells via JAK/STAT signal pathway. *Eur J Pharmacol.* **2011**, *657*, 10–19.

Yuan, Y.V.; Walsh, N.A. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 1144–1150.

RESUMEN

RESUMEN

El presente trabajo de tesis plantea demostrar el potencial de *Undaria pinnatifida* (Alariceae), especie de alga parda alóctona de las costas patagónicas argentinas, colectada estacionalmente en el Golfo San Jorge, mediante un estudio que integra aspectos farmacognósticos y bioquímicos, priorizando aquellos metabolitos con posible aplicación farmacéutica.

En la **Parte I - INTRODUCCION**, se destacan antecedentes que sirvieron de base para esta tesis, agrupados en los **Capítulos 1, 2 y 3**:

1. Una descripción general de la taxonomía de las algas y en especial una revisión taxonómica de la especie en estudio, así como una breve descripción morfoanatómica y su distribución geográfica.
2. Una descripción de los grupos de metabolitos más relevantes que han sido determinados en las algas pardas, poniendo énfasis en su importancia en salud.
3. Una revisión de la importancia de las algas marinas en Salud, destacando antecedentes de algas pardas. Se incluye también un análisis de antecedentes de distintas actividades biológicas analizadas en esta tesis, destacando el rol de los principales metabolitos de las algas como responsables de las actividades descriptas.

En la **Parte II - DESARROLLO EXPERIMENTAL**, se describe el equipamiento, materiales y métodos utilizados constituyendo los **Capítulos 4 y 5**:

4. Describe la colecta en la costa de Bahía Bustamante y la colecta estacional en la costa de Comodoro Rivadavia. Se detallan: Metodologías de conservación y caracterización morfológica. Diferentes metodologías de extracción y fraccionamiento. Estudios ficoquímicos, cromatográficos y cuantificaciones. Metodología de purificación de alginato y estudios específicos sobre el mismo. Metodologías de purificación de fucosterol y fucoxantina. Otros estudios generales.

5. Contiene una descripción de los diferentes ensayos de bioactividad *in vitro* e *in vivo*. Test de la *Artemia salina*, Ensayo de inhibición de la elongación de las raíces de semillas de trigo, Actividad antibacteriana, Actividad antioxidante, Prueba del Metilgreen-ADN, Ensayo de citotoxicidad *in vitro* con líneas celulares, Actividad antileishmania, Test del *Allium cepa* y Ensayo Alelopático.

Además se describe la metodología de preparación de micropartículas y su caracterización. Análisis de rendimiento de la producción, eficacia y contenido de principio activo.

En la **Parte III - RESULTADOS Y DISCUSION**, se describen los resultados obtenidos y la discusión correspondiente, conformando los **Capítulos 6, 7 y 8**:

6. Estudio Preliminar: Se realizó este estudio con material colectado en la costa de Bahía Bustamante en la provincia del Chubut. Una muestra de la colecta se depositó en el Herbario Regional Patagónico (HRP N° 7656). Se observó que los ejemplares mostraron diferencias en cuanto a la longitud del esporofito, de las frondas y esporofilo.

El resto del material colectado fue secado a temperatura ambiente, bajo techo y al abrigo de la luz, reducido a polvo y sometido a extracción y fraccionamiento con un rendimiento interesante del extracto bruto del 16 %.

Se realizó un screening fitoquímico sobre el extracto y las distintas fracciones mostró una importante proporción de hidratos de carbono, péptidos / aminogrupos y derivados fenólicos. No obstante no se detectaron flavonoides ni taninos.

Otro grupo de metabolitos destacados en el screening químico fueron los polifenoles y los alcaloides. Se realizó un perfil lipídico del extracto alcohólico crudo obtenido para el screening fitoquímico y del extracto preparado según la metodología de Folch, en éste último caso se observó un rendimiento importante del 13,6 %.

Los principales lípidos identificados son el Monogalactosildiacilglicerol (MGDG), digalactosildiacilglicerol (DGDG), sulfoquinovosildiacilglicerol o sulfolípidos (SL), fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilcolina (PC). Este último es un marcador

quimiotaxonómico que confirma la ubicación de *U. pinnatifida* en el grupo de las Laminariales. Otro lípido destacado es el glicósido de esterol, pudiendo ser al menos en parte, responsable de la reacción positiva obtenida para el grupo esteroide.

El estudio de pigmentos efectuado mediante perfiles cromatográficos evidenció la presencia de clorofilas *a*, *c*; clorofilide *a*, violaxantina y $\beta\beta$ -caroteno.

Estos pigmentos han sido descriptos como característicos de las algas pardas, además de la fucoxantina.

Estudio general: Se realizó una colecta estacional en la costa de Comodoro Rivadavia. Un ejemplar de cada estación se herborizó y depositó en el Herbario Regional Patagónico (primavera HRP N° 7096, verano HRP 7162, otoño HRP 7163 e invierno HRP 7164).

Se analizaron las características macroscópicas de los ejemplares colectados. El tamaño de las distintas formas anatómicas mostró diferencias significativas entre estaciones, cada estación presentó características propias del momento en el ciclo de vida en que se encontraba el alga. Los ejemplares colectados en primavera fueron considerablemente más jóvenes en comparación con los de verano, donde los esporofitos presentaban esporofilos desarrollados en el 80 % del total de la muestra colectada, indicando que los ejemplares se encontraban en la etapa reproductiva de su ciclo de vida. En otoño la presencia de esporofitos en la zona intermareal fue escasa.

Se realizó una observación microscópica sobre cortes de las distintas partes anatómicas de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente, destacando las frondas por ser la parte morfológica empleada en esta tesis. En las frondas, nervadura central, esporofilo y hapterios del grampón se observó la presencia de paredes celulares gruesas y abundante cutícula. En la zona cortical de las frondas se observaron células glandulares y células pequeñas y regulares con depósito de pigmento, aumentando de tamaño a medida que se avanzó hacia la médula. En la médula, las células se tornaron irregulares, voluminosas e inmersas en polisacáridos; estas características fueron comunes en las cuatro estaciones. En las frondas de primavera, verano e invierno se observaron pelos semejantes a los tectores, y cristales de dimensiones importantes en primavera e invierno. En el

esporofilo se destacaron los esporangios pluriloculares con abundantes esporas en verano. Las células de los esporangios y los hapterios del grampón, eran turgentes destacándose en primavera. La presencia de las cavidades concéntricas y las disposiciones de las células meristemáticas y corticales observadas en esta tesis en las frondas de *U. pinnatifida*, han sido descritas para el género *Undaria*. No ocurre lo mismo con los pelos y cristales detectados, los cuales aún no se encuentran descritos en bibliografía, por lo que nuestros resultados constituyen un nuevo aporte al conocimiento integral de los caracteres morfológicos del alga que habita la región central del Golfo San Jorge.

Se realizaron estudios histoquímicas sobre las frondas de *U. pinnatifida* colectada estacionalmente, se efectuaron determinaciones de hidratos de carbono, fenoles, lípidos y proteínas. Los hidratos de carbono de reserva tipo almidón y dextrinas se localizan mayoritariamente en la matriz intercelular, paredes celulares y cutícula, destacándose en las frondas de invierno. Se observan cuerpos lipídicos en las cuatro estaciones, los cuales se distinguieron como pequeñas manchas rojizas oscuras, resultando más acentuadas en invierno.

Los fenoles se localizaron en los fisodes, en la región subcortical de la fronda en cercanías de la nervadura. Se detectaron fenoles con oxhidrilos no adyacentes o con un solo oxhidrilo libre. Esto fue característico para todas las estaciones. En cuanto a los péptidos y/o aminogrupos 1° y 2°, se localizaron sobre todo en paredes y cutícula, en mayor proporción en primavera y verano.

Las observaciones por microscopía electrónica de barrido (MEB) de fronda, esporofilo y nervadura de ejemplares colectados en primavera e invierno permitieron describir una superficie irregular con borde externo continuo y esponjoso. El esporofilo, también de ambas estaciones presentó bordes convexos; en el caso de primavera se encontró además una zona de liberación de esporas

Los resultados de los estudios microscópicos descritos, fundamentalmente los de histoquímica y de MEB, constituyen un novedoso aporte al conocimiento integral de la especie que habita la región central del Golfo San Jorge.

Se realizó un **Screening ficoquímico estacional**, a partir del producto de una extracción exhaustiva de frondas secas reducidas a polvo de la especie en estudio. Para ello se realizó un tratamiento con etanol acuoso al 80 % a temperatura

ambiente por 24 h, seguida de una maceración a 4 °C por 24 h más y posteriormente una digestión a 70 °C, también por 24 h, dando lugar a **EOH1** y **EOH2**, respectivamente. Los marcos se continuaron trabajando para la obtención de alginato de sodio purificado.

Los resultados evidenciaron una proporción importante en hidratos de carbono, compuestos fenólicos, aminoácidos y/o péptidos y lactona α -insaturada. Los esteroides y triterpenos mostraron variación estacional y con respecto a la temperatura (70 °C) empleada para la extracción.

Otros resultados para este estudio estacional del alga colectada en Comodoro Rivadavia, que se diferencian de los obtenidos en el análisis preliminar efectuado con ejemplares colectados en Bahía Bustamante, fueron la ausencia de alcaloides en todos los casos y la presencia de polifenoles. Dentro de estos últimos, los taninos se detectaron en los extractos etanólicos exhaustivos (**EOH1** y **EOH2**) de todas las estaciones a excepción de verano, lo que sugiere una variación espacio-temporal, coincidiendo con los resultados obtenidos en algas verdes colectadas también en las costas de Comodoro Rivadavia.

El perfil lipídico de las frondas colectadas estacionalmente en Comodoro Rivadavia, mostró mayor complejidad durante la primavera. Al comparar con el estudio preliminar de la especie colectada en Bahía Bustamante también en primavera, surge que ambos perfiles se asemejan. Se observa una importante variación estacional de los lípidos totales, aumentando a medida que se desarrollan las frondas (primavera a verano), para luego disminuir drásticamente en otoño y finalmente volver a aumentar en invierno.

El perfil cromatográfico de los extractos alcohólicos mostró una complejidad interesante de compuestos de naturaleza fenólica. En todos los extractos se pudo determinar la presencia de ácido gálico, en tanto que el ácido cafeico lo fue en primavera, en ambos extractos, y en verano en **EOH2**. No se detectó la presencia de flavonoides en las muestras analizadas. Se detectaron compuestos atribuibles a florotaninos presentes en los extractos **EOH1** y **EOH2**.

El análisis cromatográfico para hidratos de carbono mostró la presencia de glucosa en todas las estaciones, a excepción del extracto **EOH2** de invierno, y de

manitol. Los alginatos de sodio hidrolizados de todas las estaciones mostraron ácido D-manurónico y L-gulurónico, respectivamente.

Se detectó la presencia de clorofila *a*, *c* y de feofitina. Otra xantofila detectada en ambos extractos etanólicos fue la fucoxantina. La anteraxantina fue la xantofila de mayor síntesis durante las estaciones de mayor incidencia de radiación solar (verano y primavera) en tanto que la violaxantina fue escasa.

Otros metabolitos que se pudieron detectar el fucosterol y compuestos polifenólicos relacionados con el floroglucinol, ya sean taninos o polifenoles de bajo peso molecular y quinonas.

La cuantificación de los grupos químicos más relevantes mostró una variación estacional.

7. La obtención del NaAlg se efectuó en una serie de etapas que se describió en el Capítulo 4 de este trabajo de tesis. El producto final obtenido, NaAlg purificado (de cada estación), se precipitó con etanol y una vez seco se pulverizó obteniéndose un polvo de una coloración blanca (primavera, otoño e invierno) y blanca amarillenta (verano), obteniéndose buenos rendimientos.

La composición de ácidos urónicos mostró una variación estacional, resultando interesante la proporción de estos ácidos para el producto de verano, lo cual se correlaciona con su MW. En el producto de invierno la proporción de ácido D-manurónico fue mayoritario con respecto a las restantes estaciones.

Los resultados obtenidos en la presente tesis mostraron que los NaAlg de las cuatro estaciones registraron valores bajos de viscosidad, indicando productos con gran estabilidad y con potencial para aplicaciones farmacéuticas.

Las proteínas estuvieron presentes en todas las estaciones en bajas proporciones, siendo el producto de primavera y de otoño los que presentaron menor valor; esto permite indicar que estos alginatos son los que presentaron mayor grado de pureza.

Si bien el procedimiento aplicado para la extracción de los alginatos resultó promisorio para todas las estaciones, se requiere una mayor purificación a fin de obtener alginatos de calidad óptima. En este contexto, estos resultados constituyen un importante aporte que permitirá definir a futuro una metodología

apropiada para la obtención racional de este polisacárido, sobre la base del conocimiento integral alcanzado durante la tesis.

Se realizó una extracción de péptidos en las frondas de *Undaria pinnatifida* colectada en las costas de Comodoro Rivadavia durante la primavera con metanol. Al extracto resultante se le hizo un HPLC en una columna de fase reversa, detectándose dos señales de interés: la señal A (t_R de 41,04 min), que mostró un espectro de absorción con máximo en la zona de 280 nm, propia de péptidos en cuya estructura están presentes aminoácidos aromáticos tales como fenilalanina o triptófano; y la señal B (t_R de 59,31 min), que mostró un espectro de absorción con máximo en la zona de 254 nm, propia de péptidos en cuya estructura está presente el aminoácido tirosina. Los resultados obtenidos aunque preliminares, constituyen una base para profundizar el estudio que conduzca a la elucidación estructural y bioactividad.

El perfil metabólico de los extractos etanólicos de primavera e invierno, obtenido por ^1H -RMN determinó la presencia de manitol y alanina en todas las muestras en tanto que la glicina se detectó sólo en los extractos de invierno. El método analítico permite identificar condiciones de estrés, tal como la deshidratación a la que está expuesta *U. pinnatifida*.

La porción fibrilar de la pared celular de las frondas de *U. pinnatifida* colectada en verano e invierno mostró la presencia de hidratos de carbono, proteínas y compuestos fenólicos. Estos resultados son los primeros en describir los constituyentes de la porción fibrilar de las paredes celulares de las frondas de *Undaria pinnatifida* colectada en las costas de la región central del GSJ.

La extracción de las frondas de *U. pinnatifida* colectada en primavera, con CO_2 supercrítico bajo distintas condiciones de presión permitió obtener extractos enriquecidos en fucosterol, además de 24-metilén colesterol y pigmentos. Se propone continuar su estudio para la obtención de fucosterol y fucoxantina por sus aplicaciones en la industria farmacéutica.

8. Se evaluó la actividad antioxidante e inhibición radicular del extracto alcohólico total de las frondas de *U. pinnatifida* colectada en Bahía Bustamante. Presentó una actividad antioxidante interesante con un SC_{50} de 143 $\mu\text{g/ml}$. En

cuanto a la actividad inhibitoria del desarrollo radicular, los resultados fueron interesantes, obteniéndose para la dilución del 0,05 %, un $34,7 \pm 0,3$ % de inhibición del desarrollo radicular mostrando un promedio de longitud de la raíz más larga de $5,55 \pm 0,3$ cm. Para la dilución del 0,5 %, la inhibición fue del $83,5 \pm 0,9$ %, con un promedio de longitud de la raíz más larga de $1,4 \pm 0,3$ cm. Además se observaron protuberancias, semejante a las producidas por el control positivo vinblastina, un antitumoral ampliamente utilizado. Estos resultados presumen actividad antitumoral de este extracto.

En base a estos resultados se profundizan los estudios de bioactividad en los extractos etanólicos a distintas temperaturas y del alginato de sodio purificado de *U. pinnatifida* colectada en las costas de Comodoro Rivadavia durante las cuatro estaciones.

La evaluación biológica primaria citotóxica mediante el Test de la *Artemia salina*, mostró que los extractos alcohólicos EOH1, EOH2 y el NaAlg de todas las estaciones tienen un comportamiento dosis dependientes. El EOH2 de otoño presentó una elevada toxicidad comparada con primavera, en tanto que las estaciones verano e invierno no presentaron actividad citotóxica. Los extractos EOH1 de todas las estaciones mostraron tener interesantes actividad biológica. El NaAlg de otoño no mostró citotoxicidad en tanto que el de primavera resultó tener una actividad citotóxica interesante.

El ensayo de inhibición de la elongación de las raíces de trigo mostró resultados interesantes para el alginato de sodio de las cuatro estaciones, sugiriendo una potencial actividad antitumoral. Los extractos EOH2 al 0,05 % de las cuatro estaciones, generaron estimulación en el crecimiento radicular, este mismo efecto fue detectado en las restantes muestras de otoño y en el NaAlg de invierno.

El ensayo del metil green-ADN mostró una disminución del porcentaje de inhibición solamente en el alginato de sodio de primavera, por lo que se concluye que su posible mecanismo molecular de acción en cuanto a su actividad antitumoral es la intercalación en el ADN.

No se detectó actividad antibacteriana en las muestras analizadas.

La actividad antioxidante de los extractos etanólicos, así como del alginato de sodio de las cuatro estaciones, fue de moderada a baja. En el estudio preliminar

realizado en muestras colectadas en Bahía Bustamante, el resultado fue superior, ambas de primavera. Esta diferencia se puede atribuir a la variación de temperatura que se registran en los puntos de colecta, ya que este factor está fuertemente relacionado con el ciclo de vida de *U. pinnatifida*. La mayor actividad antioxidante de los alginatos correspondió al producto de verano y este resultado concuerda con lo obtenido en la cuantificación de grupos sulfatos; donde nuestros resultados muestran que estos grupos presentes en el alginato de sodio de verano (40,7 %) contribuyen, al menos en parte, a la actividad evaluada.

Los resultados previamente obtenidos llevaron a evaluar el efecto antiproliferativo del alginato de sodio de primavera frente a líneas celulares derivadas de cáncer de mama (CMF-7) y colon (Caco-2). El alginato de sodio presentó una actividad importante sobre las células tumorales MCF-7, exhibiendo a 1 mg/ml una inhibición de la proliferación celular del 75 %, la cual se mantuvo activa aún a una concentración de 500 µg/ml. Si bien el porcentaje de inhibición en las células Caco-2 es del 61,6 % a una concentración de 1 mg/ml, se concluye que la afinidad sobre esta línea celular es menor en comparación con MCF-7.

Se evaluó la actividad antileishmania del alginato de sodio de primavera sobre promastigotes y amastigotes de varias especies de *Leishmania*, no presentando actividad sobre las dos formas de los parásitos *L. infantum* y *L. amazonensis*.

Para evaluar la actividad de citotoxicidad y genotoxicidad de los extractos alcohólicos y los alginatos obtenidos a partir de las frondas de *U. pinnatifida* se utilizó el Test del *Allium cepa*.

Nuestros resultados mostraron que la inhibición del desarrollo radicular de *Allium cepa* por exposición aguda a los extractos etanólicos (EOH1, EOH2) y al alginato de sodio de *U. pinnatifida* fueron dosis dependiente. El análisis del efecto de los extractos alcohólicos y alginatos durante una parte del ciclo celular mostraron una relación directa en la inhibición de la mitosis normal de las células meristemáticas radiculares, los cuales se vieron reflejados en las distintas fases de la mitosis y el índice mitótico (IM). Todas las muestras manifestaron una disminución del IM a medida que aumentó su concentración y por lo tanto la inhibición de la mitosis durante la división celular. Los extractos alcohólicos a 70

°C (EOH2) y el alginato de sodio de primavera mostraron valores de IM de 4,86 y 5,32 %, respectivamente, lo que reveló una importante acción inhibitoria sobre el proceso mitótico, con un porcentaje de inhibición del 79,09 y 77,11 % respectivamente. Los extractos etanólicos a temperatura ambiente (EOH1) de las cuatro estaciones mostraron un IM entre un 8 y 9 %, estos valores corresponden a un 40 y 45 % de inhibición mitótica. El NaAlg y el EOH2 de otoño, mostraron la menor actividad inhibitoria en comparación con el resto de las muestras ensayadas. En este ensayo se pudo observar que una disminución del índice de fases con respecto al control negativo, lo que indica que el ciclo celular se retrasa antes de pasar a la fase M, sin detener todo el ciclo, ya sea al final de G2 o en el tránsito de G2 a M. Esto se deduce por la disminución en el porcentaje de las distintas fases durante la mitosis comparado con el control negativo. En todos los casos el mayor porcentaje de fase mitótica se correspondió a la profase al igual que ocurrió en el control positivo. Las otras fases de la mitosis en general fueron de mejor porcentaje comparadas con el patrón negativo. El EOH2 y el NaAlg de primavera fueron los que produjeron mayor inhibición en las fases durante la mitosis de las células meristemáticas de *A. cepa*. Los extractos etanólicos y el alginato de las distintas estaciones produjeron algunas modificaciones a nivel estructural y/o nuclear en las células meristemáticas. Por ejemplo el EOH1 de primavera en general conservó el estado de las distintas fases, pero se detectó la ausencia o ruptura de membrana nuclear en algunas células meristemáticas, el resto de las muestras ensayadas mostrarán diferentes cambios celulares. Estos resultados son una prueba de la actividad antitumoral de los extractos alcohólicos y el alginato de sodio obtenida a partir de las frondas de *U. pinnatifida*, cuyo mecanismo de acción es fundamentalmente a nivel de la mitosis, con diferentes modificaciones estructurales. La presencia de fucoxantina y derivados de floroglucinol en todos los extractos etanólicos, muestra que estos metabolitos serían los responsables, de forma sinérgica o individual, de la actividad antitumoral, siendo de interés observar que la proporción de estos metabolitos se ve influenciado por diversos factores, especialmente por variaciones estacionales. En cuanto al NaAlg las características particulares, en especial su alto contenido en grupos sulfatos, serían los que aportan a su actividad antitumoral. Si bien el

alginato verano muestra un mayor contenido de grupos sulfatos, el de primavera también actúa a nivel de la intercalación del ADN, lo que permite explicar su actividad.

El ensayo alelopático mostró que el porcentaje de germinación promedio del extracto EOH1 de *U. pinnatifida* colectada en primavera sobre *Lycopersicum esculentum* produjo una estimulación con valores de 14,29 y 4,76 %, en tanto que sobre *Lolium multiflorum* se vio inhibida en todas las concentraciones ensayadas. El porcentaje de crecimiento radicular promedio sobre *Lycopersicum esculentum* presentó una inhibición para las dos concentraciones más bajas y una estimulación a la mayor concentración (6,25 %) y sobre *Lolium multiflorum* mostró tener un efecto de inhibición moderada dosis dependiente.

Se observa una marcada diferencia en cuanto a los valores obtenidos frente a otros trabajos disponibles en bibliografía, realizados con otras especies, lo que nos permite concluir que los extractos de *U. pinnatifida* tienen una notable influencia en la germinación y el desarrollo radicular, de inhibición o estimulación, que depende de la especie usada en el ensayo, el tipo de extracto y condiciones de cultivo. Esto debe ser tenido en cuenta, si se plantea la utilización de esta alga como fertilizante para cultivos.

La obtención de micropartículas conteniendo paracetamol, mediante gelificación iónica interna, se realizó a partir de una solución de alginato de sodio de primavera y verano. Los parámetros analizados fueron bajos en cuanto al rendimiento (% Ren), eficacia de encapsulación (% EE) y contenido de paracetamol (% Cpa). Estos resultados muestran que el alginato de sodio de *U. pinnatifida* obtenido de las muestras colectadas en primavera y verano, en las condiciones llevadas a cabo, no son aptas para la microencapsulación del principio activo empleado, no obstante no debe descartarse la posibilidad de continuar con la elaboración de otras formas farmacéuticas o mejorar la metodología de purificación empleada.

En cuanto a la Bibliografía, al final de cada capítulo se detallan las citas bibliográficas utilizadas, enumeradas en orden alfabético, según las normas de la American Chemical Society (ACS).

El desarrollo de este trabajo de Tesis dio lugar a las siguientes publicaciones en revistas científicas, números especiales de revistas y libros de resúmenes de eventos científicos:

- Marine pharmacognosy: brown seaweeds from Golfo San Jorge (Argentina) with potential application in health. Miriam D. Escobar Daza, Guillermo Ojeda, Diana Quezada, Elisabet Braidot, Mónica Becerra, Graciela Pinto Vitorino, Mauricio Reyna Jeldes, Caroline Weinstein-Oppenheimer, Osvaldo L. Córdoba, María L. Flores, *International J. of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)*, 2015, 170-171 (E-ISSN: 0975-8232; P-ISSN: 2320-5148).
- Estudio fitoquímico y actividad biológica *in vitro* de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae) colectada en el norte y centro del Golfo San Jorge. Miriam Delma Escobar Daza, Diana Paula Quezada, Elisabet Braidot, María Luján Flores, Osvaldo León Córdoba. *Naturalia patagónica*, 9: 61-75, 2016.
- Brown seaweed from the San Jorge Gulf, Patagonia Argentina, as potential sources of bioactive products. Flores ML, Becerra MB, Escobar Daza MD, Quezada DP, Pinto Vitorino G, Smirlis D, Kritsanida M, Grougnet R, Michel S, Córdoba OL. *Drug Discovery for Neglected Diseases International Congress 2018. 4th Scientific Meeting of ResNet NPND, 2018, 111-112* (ISBN: 978-987-47034-0-8).

El trabajo desarrollado dio lugar también a presentaciones en eventos científicos Nacionales e Internacionales:

- Perfil químico y bioactividad del alga parda *Undaria pinnatifida* (Alariaceae) colectada en el Golfo San Jorge. Miriam D. Escobar Daza, Mónica B. Becerra, María L. Flores y Osvaldo L. Córdoba. *SINAQO*, Villa Carlos Paz, Córdoba, 11/2011.
- *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae), especie invasora del Golfo San Jorge: ¿una amenaza ambiental aprovechable como recurso? Escobar Daza,

M.D.; Becerra, M.B.; Flores, M.L.; Córdoba, O.L. Comunicación Oral. *CLABA III*, Concepción, Chile, 01/2012.

- Estudios farmacognósticos de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringer (Alariaceae) colectada en el Golfo San Jorge. Escobar Daza MD, Flores ML & Córdoba OL. *Jornadas de Ciencias del Mar y Coloquio Internacional de Oceanografía*, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina, 12/2012.

- Avances en la investigación de *Undaria pinnatifida* (Alariaceae), un alga parda invasora de Patagonia. Quezada, D.; Escobar Daza, M. D.; Flores, M. L., Córdoba, O. L. *XVI Reunión de la Comisión Permanente, XI Asamblea General y V Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas de la COIFFA*, 06/2013.

- Metabolitos, capacidad tintoria y actividad biológica de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringer (Alariaceae) colectada en el Golfo San Jorge. Escobar Daza MD, Quezada D, Ojeda GA, Flores ML, Córdoba OL. *IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal*, Florianópolis, Brasil, 11/2013.

- Aspectos morfoanatómicos e histoquímicos de *Undaria pinnatifida* (Alariaceae), un alga parda invasora del Golfo San Jorge. Montenegro Herrera A, Rondini F, Escobar Daza M, Córdoba O, Flores M. *Reunión de la Com. Permanente y VII Congreso Iberoamericano de Cs. Farm. de la COIFFA*, Córdoba, Argentina, 11/2015.

- Metabolitos de la pared celular fibrilar del alga parda *Undaria pinnatifida* (Alariaceae) colectada en el Golfo San Jorge. Rondini F, Montenegro A, Escobar Daza MD, Flores ML, Córdoba OL. *Reunión de la Com. Permanente y VII Congreso Iberoamericano de Cs. Farm. de la COIFFA*, Córdoba, Argentina, 11/2015.

- Variaciones espacio temporales en la composición química y actividad biológica de la especie invasora *Undaria pinnatifida* (Alariaceae) colectada en el Golfo San Jorge, Argentina. Miriam Escobar Daza, Florencia Rondini, Diana Quezada, María L. Flores, Osvaldo L. Córdoba. *X Congreso Chileno de Micro y Macroalgas*, Coquimbo, Chile, 07/2017.

- Investigación integral de *Undaria pinnatifida* (Alariaceae) colectada en primavera en el Golfo San Jorge, Argentina: química, bioactividad, toxicidad y aplicación. Escobar Daza, Miriam Delma; Becerra, Mónica B.; Arancibia, Luz

Alejandra; Wilson, Erica; Choi, Young H.; Reyna Jeldes, Mauricio; Weinstein-Oppenheimer, Caroline; Flores, María Luján; Córdoba, Osvaldo León. *CLABA 2017*, Lima, Perú, 10/2017.

- Estudio comparativo de alginatos de sodio de dos algas pardas del Golfo San Jorge, Patagonia Argentina, y su aplicación en la elaboración de micropartículas. Becerra, Mónica B.; Escobar Daza, Miriam D.; Córdoba, Osvaldo L.; Flores, María L. Seleccionado para Comunicación Oral. *CLABA 2017*, Lima, Perú, 10/2017.

- Estudio farmacognóstico de *Mytilus edulis* (Mytilidae) en su interacción habitacional con *Undaria pinnatifida* (H.) Suringar (Alariaceae) en el Golfo San Jorge, Patagonia Argentina. Florencia Rondini, Miriam D. Escobar Daza, Diana P. Quezada, María L. Flores, Osvaldo L. Córdoba. *X J. Nac. de Ciencias del Mar 2018, XVIII Coloquio Nac. De Oceanografía*, CABA, Argentina, 08/2018.

- Integrando las ciencias marinas a la currícula farmacéutica y bioquímica. Desde una perspectiva regional. Flores, María Luján; Escobar Daza, Miriam D.; Quezada, Diana P.; Becerra, Mónica B.; Namuncurá, María S.; Uhrich, Analía V.; Pinto Vitorino, Graciela; Córdoba, Osvaldo L. *1º Jorn. Nac. de Enseñanza de Farmacia y Bioquímica*, Córdoba, Argentina, 09/2018.

- Brown seaweed from the San Jorge Gulf, Patagonia Argentina, as potential sources of bioactive products. Flores ML, Becerra MB, Escobar Daza MD, Quezada DP, Pinto Vitorino G, Smirlis D, Kritsanida M, Grougnet R, Michel S, Córdoba OL. *Drug Discovery for Neglected Diseases International Congress 2018. 4th Scientific Meeting of ResNet NPND, Buenos Aires, Argentina, 12/2018.*