

INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°:

BECA DE Perfeccionamiento

PERIODO 01/04/2012 a 31/03/2015

1. **APELLIDO:** Espino

NOMBRES: María Laura

Dirección Particular: Calle: **N°:**

Localidad: **CP:** **Tel:**

Dirección electrónica (donde desea recibir información): mlespino@mdp.edu.ar

2. **TEMA DE INVESTIGACIÓN** (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

Efectos de aditivos dietarios y la salinidad sobre las defensas antioxidantes y el nivel de estrés oxidativo en *Artemesia longinaris* y *Pleoticus muelleri*, expuestos a compuestos nitrogenados inorgánicos

3. **OTROS DATOS** (Completar lo que corresponda)

BECA DE ESTUDIO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01/04/2012

2º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01/04/2013

BECA DE PERFECCIONAMIENTO: 1º AÑO: *Fecha de iniciación:* 01/04/2014

2º AÑO: *Fecha de iniciación:*

4. **INSTITUCIÓN DONDE DESARROLLA LOS TRABAJOS**

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional de Mar del Plata

Facultad: Ciencias Exactas y Naturales

Departamento: Ciencias Marinas

Cátedra: Fisiología de Crustáceos

Otros: Grupo de Investigación Acuicultura

Dirección: Calle: Funes **N°:** 3350

Localidad: Mar del Plata **CP:** 7600 **Tel:** 475-2426

5. **DIRECTOR DE BECA**

Apellido y Nombres: Díaz Ana Cristina

Dirección Particular: Calle: **N°:**

Localidad: **CP:** **Tel:**

Dirección electrónica: acdiaz@mdp.edu.ar

6. EXPOSICIÓN SINTÉTICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO. (Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material).

El objetivo general del primer año de beca de estudio fue determinar los efectos fisiológicos provocados por la exposición ambiental al nitrito en el langostino *Pleoticus muelleri*. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos: 1) Determinar la LC50 al nitrito y caracterizar sus efectos sobre las defensas antioxidantes de dicha especie; 2) Analizar la presencia de radicales propios y/o persistentes en el tejido hepatopancreático de langostinos expuestos a diferentes concentraciones de nitrito y 3) Identificar el daño tisular producido por la exposición al nitrito mediante el examen histológico del hepatopáncreas y las branquias.

1) Toxicidad aguda al nitrito y caracterización de las defensas antioxidantes:

En los sistemas de cultivo intensivo de crustáceos, la elevada densidad de animales puede provocar la acumulación de altas concentraciones de desechos nitrogenados altamente tóxicos, como por ejemplo el nitrito. La exposición a altas concentraciones de este poluyente, puede afectar la fisiología general y provocar el incremento de la mortalidad de los organismos acuáticos. Un desequilibrio en la generación de radicales libres, es considerado un factor de estrés fisiológico; por lo tanto, la medición de la capacidad antioxidante total (AT) puede ser utilizada para estimar los efectos sobre las defensas antioxidantes en estos animales. Los objetivos de este estudio fueron determinar la concentración letal media (LC50) al nitrito y caracterizar sus efectos sobre las defensas antioxidantes totales en el langostino *Pleoticus muelleri*.

Con el fin de obtener la LC50, se llevaron a cabo por triplicado ensayos estáticos de toxicidad aguda a concentraciones crecientes de nitrito (100; 200; 300; 400; 500; 750; 1000; 1250 y 1500mg/l), utilizando como controles individuos mantenidos en agua libre de nitritos. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis Probit. Finalizados los ensayos, el tejido hepatopancreático de los sobrevivientes fue utilizado para la determinación de la capacidad AT, que fue estimada mediante espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR) empleando, como método de análisis, la capacidad de los radicales presentes en el tejido para reaccionar con un radical estable, el 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

La LC50 determinada para el nitrito a las 96 horas del ensayo estático fue 170,56mg/l, observándose una disminución de este valor ante el incremento del tiempo de exposición. El grado de confiabilidad de estos resultados se estableció mediante el test Chi-cuadrado. La capacidad AT se midió en individuos expuestos a 100; 200; 400 y 500mg/l de nitrito. Todos los tratamientos testeados mostraron capacidad de scavenging de radicales, que se evidenció por su habilidad para reaccionar con el radical DPPH. El porcentaje de decaimiento en función del tiempo fue mayor en los langostinos expuestos a concentraciones de nitritos cercanas a la LC50 (100 y 200mg/l). Sin embargo, en todos los casos se determinaron diferencias significativas respecto del control.

En conclusión, se puede decir que en *P. muelleri* la toxicidad al nitrito incrementa con el tiempo de exposición y que la presencia de concentraciones subletales de nitrito en el medio aumenta la actividad del sistema de defensas antioxidantes. A partir de los resultados obtenidos en este estudio, la medición de la capacidad AT puede ser propuesta como biomarcador de polución por nitritos.

Estos resultados fueron presentados en el XIV Congreso y XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Casilda, 29 y 30 de noviembre de 2012.

2) Análisis de la presencia de radicales propios en el hepatopáncreas de langostinos expuestos a nitrito:

La presencia de sustancias tóxicas en el ambiente puede estimular la formación intracelular de radicales libres. Para equilibrar esta respuesta, los organismos vivos disponen de una serie de sistemas de defensas antioxidantes que contrarrestan la generación de radicales libres. Estos sistemas están formados por componentes enzimáticos y no enzimáticos. En condiciones fisiológicas normales, los mecanismos de defensa antioxidantes mantienen una baja concentración de especies reactivas del oxígeno y radicales libres en la célula; el equilibrio entre su producción y las defensas antioxidantes determina el grado de estrés oxidativo. Por lo tanto, la existencia de un pool de radicales in vivo dependerá del balance entre diversos procesos: aquellos que conducen hacia la formación de sustancias protectoras, los que liberan radicales reactivos y los que generan radicales persistentes.

El objetivo de este estudio fue analizar la presencia de radicales persistentes en el tejido hepatopancreático del langostino *Pleoticus muelleri*, expuesto a diferentes concentraciones de nitrito ambiental. Langostinos juveniles de ambos sexos fueron sometidos, por triplicado a concentraciones de nitrito de 0; 100; 200; 400 y 500mg/l de nitrito durante 96 horas. Finalizados los ensayos, los hepatopáncreas de los sobrevivientes se congelaron y posteriormente se liofilizaron. La presencia de radicales persistentes se determinó mediante espectroscopia de resonancia paramagnética utilizando un espectrómetro Bruker Xepr V1.0. Para las mediciones se utilizaron alícuotas de 100µl de homogenatos preparados con 20mg de liofilizado y 200µl de cloroformo. Se realizan mediciones por duplicado y a distintos tiempos. Un análisis de varianza fue empleado para evaluar las diferencias entre los tratamientos.

En todas las muestras se registró una amplia señal que sugirió la presencia de radicales persistentes en el tejido. Se estimó una concentración de entre 10^{-4} y $10^{-5}M$ en cada uno de los tratamientos; sin embargo el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las concentraciones de nitrito utilizadas. En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede decir que el sistema de defensas antioxidantes de *P. muelleri* es capaz de mantener la concentración del pool de radicales propios en condiciones de estrés, provocado por la exposición al nitrito.

3) Estudio histológico de los efectos del nitrito sobre el hepatopáncreas y las branquias: Para evaluar el daño tisular producido por la exposición al nitrito se realizó el examen histológico de branquias y hepatopáncreas del langostino *Pleoticus muelleri*. Se utilizaron animales provenientes de un ensayo estático de toxicidad aguda de 96hs de duración, a concentraciones crecientes de nitrito (0; 100; 200; 300; 400; 500; 750 y 1000mg/l). El cefalotórax de cada individuo se fijó en el fluido Davison durante 12 hs (etanol, formol, ácido acético y agua) (Bell & Lightner, 1988), posteriormente se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, alcohol butílico y se incluyeron en butil-parafina y parafina. Se efectuaron cortes de 5 µm, que fueron coloreados con hematoxilina-eosina.

Para la evaluación de los cambios histológicos en el hepatopáncreas, se utilizaron las caracterizaciones realizadas Cuartas et al. (2002). En el caso de las branquias, previamente se realizó una breve descripción de su morfología e histología en estado salvaje.

a) Hepatopáncreas:

El hepatopáncreas es un glándula tubular compuesta, cada túbulo está formado por un epitelio simple con cuatro tipos celulares, que según su función se diferencian células embrionarias (E), fibrilares (F); absorptivas (R) y digestivas (B).

La histología del hepatopáncreas es muy estudiada en animales expuestos a distintos estresantes, ya que además de realizar funciones digestivas, es el órgano encargado de la detoxificación de muchos compuestos. En este estudio, tanto en el tratamiento control como en el de 100mg/l de nitrito no presentaron alteraciones tisulares. La

exposición de los langostinos a 200mg/l de nitrito provocó un incremento en el número de células B, que presentaron su característica vesícula de gran tamaño llena de secreción, además de presentar un complejo vacuolar apical; también se observaron zonas con hiperplasia. El incremento de nitrito ambiental, 300 y 400mg/l, acentuó la hiperplasia y provocó la distorsión de la estructura tubular; en cuanto a la citología, las células comenzaron a perder su identidad, observándose algunas células en forma de botella. A concentraciones superiores de nitrito, aparecen espacios intertubulares, las células presentan una mayor vacuolización dando la apariencia de células foamy, además de observarse protrusión citoplasmática hacia la luz tubular; sólo las células F pueden ser claramente identificables debido a que mantienen su citología característica. A 1000mg/l de nitrito no pueden ser identificados ninguno de los distintos tipos celulares debido a la pérdida de la identidad celular.

b) Branquias:

El langostino *Pleoticus muelleri* realiza el intercambio gaseoso a través de estructuras especializadas denominadas dendrobranquias, ellas se disponen a los lados del cefalotórax en la base de los apéndices torácicos (maxilípedos y periópodos). Estas branquias, consisten de un eje central de tejido conectivo donde se disponen las laminillas branquiales, las mismas se ramifican en filamentos primarios y secundarios.

Cada laminilla consta de un septo de tejido conectivo que separa el canal aferente del eferente, y de un epitelio simple con al menos dos tipos celulares. Uno de ellos posee un núcleo comprimido y una considerable expansión lateral, dando un aspecto de epitelio escamoso en la zona del canal marginal. El otro tipo celular, conecta las dos superficies cuticulares de la laminilla y limita los espacios lagunares que definen el flujo hemolinfático, cumpliendo una función de sostén. Según Taylor y Taylor (1992), las características mencionadas anteriormente concuerdan con las llamadas Thin cells, en el caso del primer tipo celular y Pillarcells en el segundo caso.

El tratamiento con nitrito provocó desorganización epitelial y plegamiento de la cutícula, ambos efectos se acentúan con el incremento de este poluyente. En la exposición a 400mg/l de nitrito se observan los canales marginales distorsionados. Además de estas histopatologías, se observa edematización de la laminilla con el tratamiento de 500mg/l de nitrito. Concentraciones superiores de nitrito ambiental produjeron, además de la presencia de lagunas subcuticulares, el colapso de la laminilla. A 1000mg/l de nitrito se detectó interrupción de la cutícula con el consiguiente deterioro de la laminilla branquial, este efecto se evidencia por la pérdida de la estructura epitelial.

Los cambios tisulares observados en el hepatopáncreas y las branquias de *P. muelleri* permiten establecer que el análisis de histológico de estos órganos puede ser utilizado como un biomarcador de polución por nitrito en dicha especie.

El objetivo de este segundo año de Beca de Estudio fue testear el estrés oxidativo mediante el estudio de la actividad antioxidante total (AT) y las variables metabólicas hemolinfáticas en camarones penaeoideos sometidos a diferentes condiciones de cultivo. Para ello se plantearon las siguientes estrategias metodológicas: 1) Incorporación de extractos del alga *Undaria pinnatifida* en la dieta de *Artemesia longinaris* y *Pleoticus muelleri*; 2) Exposición al nitrito de langostinos aclimatados a diferentes salinidades.

1) Extracto de *Undaria pinnatifida* como suplemento dietario para camarones penaeoideos

El estado fisiológico de los crustáceos y de muchos organismos acuáticos depende de los factores del medio que los rodea, entre los cuales el alimento es uno de los principales por aportar las moléculas base: glucosa, proteínas y lípidos, utilizadas como

fueron fuente de energía y de moléculas estructurales. En los camarones, estos metabolitos son transportados por la hemolinfa, que además de ser el tejido de transporte, es uno de los principales tejidos de reserva de estos nutrientes, por lo que pueden ser utilizados como indicadores del estado nutricional. El metabolismo básico de un organismo aerobio involucra la formación de radicales libres (RL) y especies reactivas del oxígeno (ROS). Para controlar esa producción, los sistemas biológicos cuentan con mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Sin embargo, una pequeña proporción (2-3%) de RL y ROS pueden evadir esta protección, provocando daño celular. La incorporación de antioxidantes, sustancias que atrapan o inhiben la generación de ROS y RL, en la dieta de estos organismos puede mejorar su estado fisiológico general. Recientemente, los extractos de muchas algas marinas mostraron poseer propiedades antioxidantes, que se atribuyen a la presencia de polisacáridos. *Undaria pinnatifida*, es un alga parda utilizada en muchas partes del mundo como recurso alimenticio; sin embargo, aún no se ha estudiado los efectos de la utilización de sus extractos como aditivos en las dietas de camarones.

El objetivo de este estudio fue determinar los efectos de la incorporación de extractos del alga *U. pinnatifida* en las dietas de *A. longinaris* y *P. muelleri* sobre la concentración de metabolitos y la actividad antioxidante total (AT).

A partir de la harina *U. pinnatifida* se prepararon los extractos siguiendo el método de Fujiki et al. (1992). Langostinos y camarones juveniles fueron alimentados durante 4 semanas con dietas suplementadas con los extractos de *U. pinnatifida* (Dieta 1: 1g de extracto/100g de dieta; Dieta 2: 2g de extracto/100g de dieta), como controles fueron utilizados animales alimentados con una dieta sin aditivos. Transcurrido este periodo, fue extraída aproximadamente 200-300µl de hemolinfa para la cuantificación de los metabolitos (glucosa, proteínas, triglicéridos, colesterol); la hemolinfa se colocó en solución anticoagulante de citrato de sodio al 10% y se centrifugó a 600g durante 15 minutos. Además, el hepatopáncreas fue aislado y utilizado para el análisis de la AT, que fue estimada mediante espectroscopia de resonancia electrónica paramagnética (EPR) empleando, como método de análisis, la capacidad de los radicales presentes en el tejido para reaccionar con un radical estable, el 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Para comparar y determinar el grado de significación de los resultados obtenidos en cuantificación de metabolitos se realizó un análisis de ANOVA y una correlación de Pearson; y en los ensayos de AT se llevó a cabo un análisis de co-varianza (ANCOVA). El estudio de las variables hemolinfáticas determinó que no existe correlación entre la concentración de los metabolitos analizados y la concentración de aditivo dietario, en ninguna de las especies. En la Figura 1 (Anexo I), se puede observar que la Dieta 1 provoca el incremento de los niveles de todos los metabolitos en *A. longinaris*, si bien la cuantificación sólo determinó diferencias significativas en la concentración de las proteínas y del colesterol. En el caso de los langostinos, no hubo diferencias significativas entre la concentración de las variables metabólicas de las dietas suplementadas con extractos de *U. pinnatifida* y la dieta control (Tabla 1, Anexo I).

Todos los tratamientos mostraron actividad antioxidante evidenciada por la capacidad de reaccionar con el radical DPPH, lo que indica que el tejido es un antioxidante natural. Para todas las dietas, dicho radical fue consumido casi por completo en ambas especies; sin embargo, el tiempo transcurrido fue de 30' en *A. longinaris* y de 16 minutos en *P. muelleri*. En los camarones, ambas dietas provocaron el incremento de la AT respecto del control, a su vez la Dieta 2 mostró mayor actividad que la Dieta 1, detectándose a los 20 minutos un porcentaje remanente de DPPH del 29; 10 y 2%, respectivamente. En el caso de los langostinos, la AT a los 3 minutos fue similar para la Dieta 1 (57%) y la dieta control (46%); sin embargo, se determinó una mayor capacidad antioxidante con la adición de concentraciones superiores del extracto de *U. pinnatifida* (Dieta 2: 31% DPPH remanente).

En conclusión, el extracto de *U. pinnatifida* se propone como suplemento dietario para estimular las defensas antioxidantes y mejorar el estado nutricional de *A. longinaris* y *P. muelleri*. Futuros estudios determinarán si la incorporación de concentraciones superiores de este aditivo, son requeridos para lograr optimizar sus efectos.

2) Influencia de la salinidad sobre la toxicidad del nitrito en *Pleoticus muelleri*

Debido al gran interés comercial que existe actualmente por el cultivo intensivo de peneidos en la Argentina, el langostino *Pleoticus muelleri* está siendo sometido a experiencias de acuicultura. En estos sistemas de cultivo intensivo, la elevada densidad de animales puede provocar la acumulación de altas concentraciones de desechos nitrogenados, altamente tóxicos. El más común de los compuestos nitrogenados es el nitrito, el cual incrementa sus niveles como resultado de un desbalance de la actividad de las bacterias nitrificantes. La exposición a altas concentraciones de este compuesto, puede afectar la fisiología general y provocar el incremento de la mortalidad de los organismos acuáticos. Uno de los factores que afectan la toxicidad del nitrito en los ambientes acuáticos es la salinidad. El estrés provocado por la exposición a los compuestos nitrogenados inorgánicos como así también cambios en la salinidad, pueden afectar la concentración de metabolitos tales como glucosa, lípidos y proteínas, además de provocar estrés oxidativo.

El objetivo de este estudio fue establecer el efecto sobre las variables metabólicas y la AT, en langostinos aclimatados a diferentes salinidades y expuestos a nitrito.

Langostinos de ambos sexos fueron aclimatados durante 3 semanas a 25ups y 30ups de salinidad, como controles se utilizaron animales mantenidos a 33ups de salinidad. Posteriormente, los individuos fueron expuestos a 0; 50 y 100mg/l de nitrito por 96hs. Finalizado el ensayo, se les extrajo, a los sobrevivientes, el hepatopáncreas para la determinación de la AT mediante espectroscopía de resonancia magnética y 200-300µl de hemolinfa para la cuantificación de los metabolitos con kits comerciales.

La medición de la AT determinó que el tejido hepatopancreático de *P. muelleri* es un antioxidante natural, debido a la de reacción del tejido con el radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). La capacidad antioxidante, de los langostinos mantenidos a 33ups de salinidad, no fue afectada por la exposición al nitrito (Figura 1A, Anexo II). Por el contrario, la presencia de nitrito en el ambiente provocó variaciones de las defensas antioxidantes de los animales aclimatados a 30ups y a 25ups de salinidad. En el primer caso, la exposición a 50mg/l de nitrito mostró un incremento de la AT respecto del control; sin embargo, el aumento del nitrito ambiental a 100mg/l produjo una disminución de la capacidad antioxidante. En el segundo caso, a 25ups de salinidad la presencia de nitrito causó el aumento de la AT, detectándose a los 6 minutos de reacción un 6% de DPPH remanente, en ambos tratamientos con nitrito, y un 47% en el control (Figura 1B y C, Anexo II).

El análisis de Pearson determinó que existe correlación entre la concentración de alguno de los metabolitos estudiados y el incremento de los niveles ambientales de nitrito, de los ejemplares mantenidos en las diferentes salinidades. En los langostinos mantenidos a 33ups de salinidad, los triglicéridos mostraron correlación negativa con el nitrito; en el caso de los aclimatados a 30ups la correlación fue positiva para los niveles de glucosas y proteínas; y en los animales aclimatados a 25ups fue negativa para la glucosa (Tabla 1, Anexo II).

En conclusión, independientemente de las condiciones osmóticas del medio, la exposición de *P. muelleri* al nitrito modifica los niveles hemolinfáticos de los metabolitos estudiados. Por el contrario, el sistema de defensas antioxidantes es afectado en condiciones hiposmóticas. En base a los resultados obtenidos, se puede decir que la medición de AT puede ser propuesta como biomarcador estrés osmótico y de polución por nitrito; sin embargo, el análisis de las variables metabólicas sólo puede ser utilizado como indicador de exposición al nitrito.

Las actividades realizadas durante el primer año de Beca de Perfeccionamiento se enfocaron en dos objetivos generales: 1) Analizar la composición química del extracto de polisacáridos extraídos del alga parda *Undaria pinnatifida* y 2) evaluar los efectos de la incorporación de dicho extracto de polisacáridos en la dieta de camarones peneidos.

1) Caracterización del extracto de polisacáridos obtenido del alga parda *Undaria pinnatifida*

El extracto se obtuvo a partir de 10 gramos de harina del alga parda *U. pinnatifida* disueltos en 300ml de agua desionizada. La mezcla se calentó a ebullición con refrigerante a reflujo durante 3 horas. Posteriormente se filtró utilizando un filtro de vidrio sinterizado N° 3 (40-15µm). El filtrado se concentró con la ayuda de un rotavapor, a 50°C (Fujiki et al., 1992).

Se plantearon dos objetivos particulares: 1.1) identificar los principales polisacáridos por espectroscopía infrarroja (FTIR); y 1.2) determinar la actividad antioxidante total del extracto por espectroscopía de resonancia electrónica paramagnética (EPR).

1.1) FTIR como herramienta para identificar polisacáridos del extracto de *U. pinnatifida*

La técnica de espectroscopía de absorción molecular en el infrarrojo (FTIR) es una herramienta muy útil que permite la caracterización preliminar de un compuesto orgánico, a partir de ciertas bandas específicas de absorción que aparecen en el rango de frecuencias de 4000-650 cm⁻¹ (número de onda) del espectro infrarrojo. Debido a que no existen, teóricamente, dos compuestos que absorban exactamente en las mismas frecuencias, esta técnica ha permitido la identificación de los principales polisacáridos asociados a la pared celular y a los espacios intercelulares de las algas pardas. Por tal razón, el objetivo de este estudio fue caracterizar los polisacáridos del extracto del alga parda *U. pinnatifida*, a través de la identificación grupos funcionales utilizando la técnica FTIR.

Se utilizaron pastillas de bromuro de potasio (KBr) hechas mezclando 1mg del extracto con 200mg de KBr molido y seco. Posteriormente se presionó la mezcla hasta obtener un disco o pastilla transparente. Como blanco se utilizó una pastilla de KBr. Las medidas se realizaron utilizando un espectrofotómetro FTIR Perkin Elmer modelo Spectrum BX, midiendo en el rango de 4000-400 cm⁻¹. Con el fin de identificar los grupos funcionales de los polisacáridos de algas pardas, se ha recurrido a la información que ya está publicada en la bibliografía.

En la figura 1 (Anexo III) se muestra el espectro FTIR del extracto de polisacáridos de *U. pinnatifida*, el mismo muestra bandas características de grupos funcionales pertenecientes a polisacáridos denominados alginatos y fucoidanos. Las bandas que son comunes a ambos grupos son la 1258,41 correspondiente al grupo éster sulfato (S=O) y la 825,49 del grupo sulfato en posición ecuatorial. Además, estas bandas se observan algunas específicas de los fucoidanos como la banda a 1744,81 cm⁻¹ que corresponde al grupo éster ácido carboxílico (C=O), la banda a 966,11 del residuo (CH₃)-Fucosa, acético, (COS); la banda del enlace tipo-beta (S=O) a 890,04; y la banda a 844,39 del grupo sulfato en posición C-4 axial, propio del fucoidan.

El análisis del espectro FTIR ha permitido obtener una aproximación sobre composición general del extracto de polisacáridos, a través de la identificación de alginatos y fucoidanos.

1.2) Actividad antioxidante del extracto

Las algas como organismos fotosintéticos, están expuestas a una combinación de luz y altas concentraciones de oxígeno, que pueden provocar la formación de radicales libres y otros agentes oxidantes fuertes, pero la ausencia de daños oxidativos en sus membranas sugiere que han desarrollado potentes mecanismos de protección. Muchos autores han comprobado que los extractos de algas marinas presentan en su

composición química cantidades apreciables de compuestos antioxidantes, entre los que se encuentran compuestos lipofílicos como ácidos grasos insaturados, clorofila y carotenoides; y compuestos hidrofílicos como polifenoles y vitamina C y polisacáridos. En los últimos años, se ha demostrado que los polisacáridos de las algas desempeñan un papel importante como agentes secuestrantes de radicales libres y antioxidantes, para la prevención del daño oxidativo en organismos vivos. Se ha visto que polisacáridos presentes en algas pardas como fucoïdanos, laminaranos y ácido algínico, presentan actividad antioxidante *in vitro*, pudiendo ser considerados como potentes antioxidantes potenciales. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad antioxidante total del extracto de polisacáridos del alga parda *Undaria pinnatifida*.

La capacidad antioxidante del extracto fue estimada mediante espectroscopia de resonancia electrónica paramagnética (EPR) empleando, como método de análisis, la capacidad de los polisacáridos del extracto para reaccionar con un radical estable, el 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH: $1,91 \times 10^{-5} M$). Para ello se homogeneizó 0,02gr del mismo con 1ml de cloroformo; alícuotas de 50µl de la muestra se mezclaron con 50µl de DPPH. Las mediciones se realizaron con espectrómetro Bruker ELEXSYS E 500 T. El extracto mostró capacidad antioxidante, evidenciada por su habilidad para reaccionar con el radical DPPH. La concentración de este radical disminuyó al incrementar el tiempo de reacción, hasta alcanzar un 60% de DPPH remanente a los 60 minutos (Figura 2, Anexo III).

En conclusión, los polisacáridos presentes en el extracto actuaron como agentes secuestradores del radical DPPH. Debido a su potencial antioxidante, se puede sugerir la utilización del extracto de polisacáridos del alga parda *U. pinnatifida* como aditivo dietario.

2) Extracto de polisacáridos de *Undaria pinnatifida* como suplemento dietario para camarones *penaeoideos*

Para evaluar los efectos de la incorporación del extracto de polisacáridos del alga parda *U. pinnatifida* en la dieta de los camarones *peneidos*, *Artemesia longinaris* y *Pleoticus muelleri*, se plantearon los siguientes objetivos particulares: 2.1) analizar la composición proximal de las dietas; 2.2) determinar la digestibilidad de dietas suplementadas con distintas cantidades extracto de *U. pinnatifida* en ambas especies; y 2.3) estudiar el efecto de estas dietas sobre la actividad antioxidante total en el camarón *A. longinaris* expuestos a nitrito. Para la realización de estos objetivos, se formularon piensos secos conteniendo 0; 1; 2 y 3 gramos de extracto de polisacáridos del alga parda *U. pinnatifida*, denominadas control, D1, D2 y D3, respectivamente. Los piensos se prepararon utilizando el método de extrusión en frío (Díaz & Fenucci, 2004).

2.1) Composición proximal de las dietas

La formulación de una dieta artificial para todo tipo de animal criado en forma intensiva, es la parte más importante dentro del proceso de producción de una determinada especie. La salud del animal depende de que se vean satisfechas sus necesidades fisiológicas de crecimiento y desarrollo. Por tal razón, es importante conocer la cantidad de cada uno de los nutrientes que aporta la dieta formulada, es decir cuánto de proteínas, lípidos, humedad, etc. Las formulaciones se realizaron de acuerdo a la composición química de los subproductos a fin de obtener dietas isoproteicas e isolipídicas. La composición química de los alimentos formulados se confirmó mediante el análisis proximal (Tabla 1, Anexo III) (AOAC, 1990).

2.2) Digestibilidad de dietas suplementadas con extracto de polisacáridos del alga *U. pinnatifida*.

En los cultivos semi-intensivos e intensivos de camarón, la alimentación representa el 50% de los gastos de operación. Muchos de estos costos derivan de la fuente de proteína utilizada proveniente de harinas de pescado, soja, calamar y cabeza de camarón, entre otros. Sin embargo, no basta que la proteína u otro elemento se encuentren en altos porcentajes en el alimento, sino que debe ser digerible para que pueda ser asimilado y, en consecuencia, aprovechado por el organismo que lo ingiere. Por ello, actualmente se orienta la búsqueda de aditivos alimentarios que actúen sobre la salud de los animales cultivables. En este sentido, las macroalgas pueden constituir una alternativa interesante en virtud de sus propiedades nutritivas. Ellas contienen polisacáridos específicos, tanto estructurales como de reserva, que no están presentes en otros vegetales terrestres. La mayor parte de estos polisacáridos pueden ser considerados como fibra, ya que no son digeridos por el equipo enzimático, aunque en parte son degradables por las bacterias intestinales.

La digestibilidad in vivo es uno de parámetros utilizados para medir el valor nutricional de las dietas acuícola. El conocimiento de la digestibilidad aparente de los alimentos balanceados para camarón tiene como objetivo la búsqueda del contenido nutrimental del alimento, permite realizar una formulación más precisa de la dieta pudiendo disminuir la cantidad de proteína o bien utilizar fuentes de proteína de menor costo, reduciendo así substancialmente el precio del alimento.

El objetivo fue determinar la digestibilidad de dietas suplementadas con extractos de polisacáridos de *U. pinnatifida* en *Artemesia longinaris* y *Pleoticus muelleri*.

Para la determinación de la digestibilidad aparente de proteínas, se utilizaron los piensos adicionados con 0,5% de óxido de cromo como indicador inerte. Los experimentos se realizaron por triplicado y tuvieron una duración de tres semanas, en las cuales los langostinos (*P. muelleri*) fueron alimentados con las dietas control, D1 y D2; y en el caso de los camarones (*A. longinaris*) con las dietas control, D1, D2 y D3. Después de un período de 7 días de adaptación a las nuevas condiciones y dietas, se comenzó con la recolección de las heces, las que se enjuagaron con agua destilada para eliminar el exceso de sales. La materia fecal de cada acuario se agrupó y se congeló a -20°C para su análisis. La digestibilidad aparente fue estimada de acuerdo a Fenucci et al. (1980):

$$\text{Eficiencia de asimilación relativa} = 100 - \left[\frac{100 \times \%Cr_2O_3 \text{ dieta} \times \%Proteínas \text{ cruda en heces}}{\%Cr_2O_3 \text{ heces} \times \%Proteínas \text{ cruda dieta}} \right]$$

Un análisis de ANOVA de una vía fue empleado para estimar y comparar la significancia de los resultados obtenidos.

En la Tabla 2 (Anexo III) se detallan los coeficientes de digestibilidad aparente de proteínas para *P. muelleri* y *A. longinaris* alimentados con las diferentes dietas.

Ambas especies mostraron diferencias significativas en los coeficientes de digestibilidad aparente de proteínas. La incorporación de extracto de polisacáridos del alga parda *U. pinnatifida* favorece la digestibilidad aparente en el langostino *P. muelleri*, observándose un incremento del 10% en la eficiencia de asimilación tanto para D1 como D2. En el caso del camarón *A. longinaris*, la adición de 1 gramo de extracto no modificó la digestibilidad de las proteínas, sin embargo se determinó una disminución en la digestibilidad de las dietas suplementadas con 2 y 3 gramos de extracto respecto de la dieta control; lo cual indicaría que la incorporación de este extracto, en cantidades superiores a 1 gramo, interfiere en la absorción de las proteínas.

En conclusión, se propone al extracto de polisacáridos de *U. pinnatifida* como aditivo dietario para mejorar el rendimiento de los piensos formulados para el langostino *P. muelleri*. En el caso del camarón *A. longinaris*, la incorporación de dicho extracto sólo es recomendable en proporciones menores al 1%.

2.3) Efecto de las dietas suplementadas con extracto de polisacáridos de *U. pinnatifida*, sobre la actividad antioxidante total en el camarón *A. longinaris* expuestos a nitrito.

En los sistemas de cultivo intensivo, la elevada densidad de animales puede provocar la acumulación de altas concentraciones de desechos nitrogenados, altamente tóxicos. El más común de estos compuestos es el nitrito, el cual incrementa sus niveles como resultado de un desbalance de la actividad de las bacterias nitrificantes. La exposición a altas concentraciones de este poluyente, puede afectar la fisiología general de los animales a través de producción de radicales libres (RL).

Los aditivos alimentarios son sustancias adicionadas intencionalmente a los alimentos para impartirle determinadas características. Sin embargo, actualmente se orienta la búsqueda hacia aditivos que actúen, no sólo sobre las cualidades del alimento sino también sobre la salud de los animales cultivables. En este sentido, las macroalgas pueden constituir una alternativa interesante en virtud de sus propiedades; debido a que en su pared celular poseen sustancias bioactivas como polisacáridos sulfatados y polifenoles con actividad antioxidante, lo cual les otorga un gran potencial como suplemento en la alimentación acuícola.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad antioxidante total (AT) en el hepatopáncreas del camarón *A. longinaris* alimentados con dietas suplementadas con extracto de polisacáridos del alga parda *U. pinnatifida* y posteriormente expuestos a distintas concentraciones de nitrito.

Los camarones fueron alimentados durante 4 semanas con la dieta control y la D3 (Tabla 1, Anexo III). Posteriormente, los camarones fueron expuestos durante 96 horas a concentraciones crecientes de nitrito (0; 100; 150; 200 y 250mg/l). Transcurrido este periodo, el hepatopáncreas fue aislado y utilizado para el análisis de la AT, que fue estimada mediante espectroscopia de resonancia electrónica paramagnética (EPR) empleando, como método de análisis, la capacidad de los radicales presentes en el tejido para reaccionar con un radical estable, el 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Para comparar y determinar el grado de significación de los resultados obtenidos se llevó a cabo un análisis de co-varianza (ANCOVA).

Todos los tratamientos mostraron actividad secuestradora de radicales, evidenciada por el decaimiento de la concentración del DPPH. En la Fig. 3 (Anexo III) se muestra la AT de *A. longinaris* alimentados con la dieta control y expuestos a nitrito. En los camarones expuestos a 100mg/l de nitrito ambiental, se determinó una AT superior respecto de aquellos que no fueron expuestos al nitrito, observándose a los 6 minutos un 15 y un 47% de DPPH remanente, respectivamente. Pero a 250mg/l de nitrito, los animales exhiben la menor actividad, detectándose un 60% de DPPH para el mismo tiempo de reacción. Estos resultados demuestran que la presencia de nitrito en el ambiente provoca la formación excesiva de radicales libres en el hepatopáncreas. Además indican que concentraciones de 100mg/l de nitrito activan las defensas antioxidantes del camarón *A. longinaris*; sin embargo, concentraciones más elevadas de nitrito provocarían una inhibición del sistema antioxidante interfiriendo con la actividad secuestradora de los radicales formados por la exposición a este poluyente.

La Fig. 4 (Anexo III) muestra la AT de *A. longinaris* alimentados con la dieta suplementada con extracto de polisacáridos de *U. pinnatifida* y expuestos a nitrito. Al igual que en los animales alimentados con dieta control, la exposición a nitrito de los camarones alimentados con la dieta suplementada provoca la producción de RL y una elevada actividad antioxidante en los camarones expuestos a 100mg/l de nitrito, evidenciada por el decaimiento de la concentración de DPPH en un 81% a los 6'. Sin embargo, el aumento de la concentración ambiental de nitrito a 150 y 200mg/l, provocó la disminución de la AT detectándose una actividad similar al control durante los primeros 12 minutos de reacción. A 250mg/l de nitrito la AT incrementó significativamente, observándose un 45% de DPPH remanente a los 6', lo cual indica que el sistema de defensas antioxidantes fue activado nuevamente.

En conclusión, la presencia de bajas concentraciones de nitrito en el agua activan el sistema de defensas antioxidantes en el camarón *A. longinaris*. A concentraciones elevadas de nitrito la incorporación de extracto de polisacáridos de *U. pinnatifida* en la dieta es necesaria para la activación de las defensas antioxidantes.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN REALIZADOS O PUBLICADOS EN EL PERIODO.

7.1. PUBLICACIONES. Debe hacerse referencia, exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se halla hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC. (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo, en el mismo orden que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde; asignándole a cada uno un número. En cada trabajo que el investigador presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación.

-Díaz, A.C; Velurtas, S.M; Espino, M.L. & Fenucci, J.L. 2014. Effect of Dietary Astaxanthin on Free Radical Scavenging Capacity and Nitrite Stress Tolerance of Postlarvae Shrimp, *Pleoticus muelleri*. *J. Agric. Food Chem*; 62, 12326–12331.

En actas de Congresos:

1-Espino ML, Díaz AC, Cuartas EI. 2012. Metabolic and histological effects of the nitrite to different salinities on shrimp *Palaemonetes argentinus*. *Biocell*, 35(3):A191- A306. ISSN 0327 – 9545.

2-Espino ML, Velurtas SM, Díaz AC, Fenucci JL. 2013. Effects of nitrite on antioxidants defenses of shrimp *Pleoticus muelleri* (CRUSTACEA, SOLENOCERIDAE). *Biocell*, 37(2): A86. ISSN 0327 – 9545.

3- Espino, M.L.; Díaz, A.C. & Fenucci, J.L. 2014. Histopathology alterations of the shrimp *Pleoticus muelleri* by effect of the environmental nitrite. *Biocell*, 38(2):A1-A124 ISSN 0327-9545.

7.2. PUBLICACIONES EN PRENSA. (Aceptados para su publicación. Acompañar copia de cada uno de los trabajos y comprobante de aceptación, indicando lugar a que ha sido remitido. Ver punto 7.1.)

Effects of exposure to nitrite on the antioxidant enzymes activity and the histopathological response of prawn *Palaemonetes argentinus*.

Espino, M.L.; Díaz, A.C. & Velurtas, S.M.

7.3. PUBLICACIONES ENVIADAS Y AUN NO ACEPTADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar copia de cada uno de los trabajos. Ver punto 7.1.)

7.4. PUBLICACIONES TERMINADAS Y AUN NO ENVIADAS PARA SU PUBLICACIÓN. (Adjuntar resúmenes de no más de 200 palabras)

7.5. COMUNICACIONES. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores)

7.6. TRABAJOS EN REALIZACIÓN. (Indicar en forma breve el estado en que se encuentran)

8. OTROS TRABAJOS REALIZADOS. (Publicaciones de divulgación, textos, etc.)

8.1. DOCENCIA

8.2. DIVULGACIÓN

8.3. OTROS

9. ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS. (Se indicará la denominación, lugar y fecha de realización y títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas)

1-XXIX Congreso Argentino de Química, "Centenario de la asociación química argentina", Mar del Plata, 3 al 5 de octubre de 2012.

*ESPINO, M. L.; VELURTAS, S.M. & DIAZ, A. C. Efectos del nitrito sobre las defensas antioxidantes del camarón *Palaemonetes argentinus* expuestos a diferentes condiciones osmótica.

2-XIV Congreso y XXXII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario, Casilda, 29 y 30 de noviembre de 2012.

*ESPINO, MARÍA LAURA; VELURTAS, SUSANA M.; DÍAZ, ANA CRISTINA; FENUCCI, JORGE L. Efectos del nitrito sobre las defensas antioxidantes del langostino *Pleoticus muelleri* (Crustacea, Solenoceridae).

3- XV Jornadas anuales de la Sociedad Argentina de Biología, "A 60 años de la descripción de la estructura del ADN", Chascomús, 4 al 6 de diciembre de 2013.

*ESPINO, M.L.; DÍAZ, A.C. & FENUCCI, J.L. Alteraciones histopatológicas del langostino *Pleoticus muelleri* por efecto del nitrito ambiental.

4- Aquaculture American 2014, Seattle, Washington, 9 al 12 de febrero de 2014.

*ESPINO, M.L.; DÍAZ, A.C. VELURTAS, S.M. & FENUCCI, J.L. Effects of *Undaria pinnatifida* polysaccharide extracts on antioxidant activity of the penaeoid shrimp.

5- Acuaulture American 2015, New Orleans, Louisiana, 19 al 22 de febrero de 2015.

*ARZOS, N.S.; ESPINO, M.L.; DÍAZ, A.C.; VELURTAS, S.M. & FENUCCI, J.L. Effects of the inclusion of polysaccharides seaweed *Macrocystis pyrifera* extract in the diet of shrimp *Artemesia longinaris*.

*ESPINO, M.L.; DÍAZ, A.C.; VELURTAS, S.M. & FENUCCI, J.L. Acute toxicity of nitrite on *Pleoticus muelleri* at different salinity.

*MARCOVAL, A.; DÍAZ, A.C.;VELURTAS, S.M; ESPINO, M.L. & FENUCCI, J.L. Combinedeffects of temperature and UVR on the survival of *Artemesia longinaris* and *Pleoticus muellere* from South American coastal waters.

10. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. (Señalar características del curso o motivo del viaje, duración, instituciones visitadas y si se realizó algún entrenamiento)

-Bioseguridad. Docentes responsables: Dra. Graciela Lidia Salerno; Dra. Susana B. Goldstein de Fink; Dra. Carmen Graciela Stanganelli y Dr. Horacio G. Pontis. Cursado del 4 al 8 de junio de 2012. UNMdP. O.C.A. N°: 741/11. Otorga: 2 UVAC.

-Epistemología. Docente responsable: Dr. Denegri Guillermo María. Cursado del 2 al 7 de julio de 2012. UNMdP. O.C.A. N°: 576/11; 833/11. Otorga: 2 UVAC.

-Espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (EPR): Teoría y Aplicaciones. Docente responsable: Dra. Grela María Alejandra. Cursado del 30 de julio al 10 de agosto de 2012. UNMdP. O.C.A. N°: 1195/12. Otorga: 3.5 UVAC.

-Biología de Crustáceos: un enfoque actual. Docentes responsables: Díaz, A. Cristina y Obenat, Sandra. Cursado del 22 al 27 de octubre de 2012. UNMdP. O.C.A. N°: 1202/12. Otorga: 3 UVAC.

-Bioindicadores: Evaluación y monitoreo de ambientes acuáticos impactados por medio de organismos. Docentes responsables: Elías, Rodolfo y Vallarino, Eduardo A. Cursado del 10 al 14 de diciembre de 2012. UNMdP. O.C.A. N°: 1370/12. Otorga: 3 UVAC.

- Ecotoxicología acuática e investigación del impacto ecológico. Docente responsable: Stephan Pflugmacher. Cursado del 18 al 22 de marzo de 2013. UNMdP. O.C.A. N°: OCA 1551/12. Otorga 2 UVAC.
- Ecofisiología de crustáceos. Docente responsable: Ana Cristina Díaz. Cursado del 9 al 14 de diciembre de 2013. UNMdP. OCA N°: 1878/13. Otorga: 3 UVACs.
- Maricultura. Docente responsable: Juan Carlos Mayo. Cursado en el primer cuatrimestre del año académico 2014. Otorga: 4 UVACs.
- Fisiología bioquímica, integrativa y comparada: aspectos básicos y aplicados de las respuestas a la salinidad ambiental en crustáceos decápodos y peces teleósteos. Docentes responsables: Dra. Alejandra Antonia López Mañanes; Dr. Juan Miguel Mancera Romero. Cursado del 15 al 19 de septiembre de 2014. UNMdP. OCA N°: 2415/14. Otorga: 2,5 UVACs.
- La Bioética en la sociedad del conocimiento. Docente responsable: Dra. Nélide Susana La Rocca. Cursado dos veces por semana desde el 8 de septiembre al 10 de octubre de 2014. UNMdP. OCA N°: OCA 1775/13. Otorga: 2 UVACs.
- Hidrogeoquímica de contaminantes inorgánicos. Docente responsable: Dra. Alicia Fernández Cirelli. Cursado el 2 de diciembre de 2014. ADUM.

11. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO

12. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO

- Auxiliar adscripto a la docencia durante el segundo cuatrimestre del año académico 2012, en la materia Química Orgánica (B09). O.C.A. n°: 1397. UNMdP.
- Auxiliar adscripto a la docencia durante el segundo cuatrimestre del año académico 2013, en la materia Química Orgánica (B09). O.C.A. n°: 2003. UNMdP.
- Colaboración en la cátedra Tópicos selectos de Biología Marina en el segundo cuatrimestres del año 2013.
- Auxiliar adscripto a la docencia durante el segundo cuatrimestre del año académico 2014 (29/07/14 al 29/11/14), en la materia Anatomía Humana. O.C.A. N°: 021, UNMdP.

13. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES (Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período)

1- Dirección en práctica de investigación:

-Bargas Peñas, R. Práctica de investigación en proyecto de investigación. Fisiología, nutrición y cultivo de crustáceos. En el segundo cuatrimestre del año académico 2014, durante 4 meses (6 horas semanales). FCEyN. Tutora. OCA N°: 2740/14.

2-Dirección de Tesis de Grado:

-Arzo, N.S. 2015. Efectos de la inclusión de extracto de polisacáridos del alga *Macrocystis pyrifera*, en la dieta del camarón *Artemesia longinaris*. Tesis de grado para optar al título de Lic. en Ciencias Biológicas. UNMdP. Subdirectora.

14. TITULO DEL PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PERIODO DE PRORROGA O DE CAMBIO DE CATEGORÍA (Deberá indicarse claramente las acciones a desarrollar)

Condiciones de Presentación

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:

- a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
- b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe
- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

Nota: El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.

.....
Firma del Director

.....
Firma del Becario