

Naturalia

ISSN 0327-8050
ISSN 0327-5272

Patagónica

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

VOLUMEN 9 (2016)



Homonota fasciata. Foto: B. Blotto

NATURALIA PATAGONICA
Volumen 9 – 2016
Facultad de Ciencias Naturales
Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

Director

Dr. Osvaldo León Córdoba

Secretaria de Redacción

Dra. María Luján Flores

Tesorera

Dra. Mabel Sandra Feijóo

Editor

Dr. Osvaldo León Córdoba

Comité Editor

Dra. Graciela Pinto Vitorino
Lic. María del Rosario Carballo
Dra. Nerina Iantanos
Dra. Mónica Casarosa
Dra. Ofelia Iris María Katusich

Evaluable

Dr. Lorenzen Sievert
Dra. Estela Lopretto
Dra. Marta Collantes
Dr. Fernando Novas
Dr. Néstor J. Cazzaniga
Dra Susana Inés Bezzi
Dr. Juan Carlos Mallo
Dr. Carlos Passera
Dr. Gabriel Oliva
Dr. Juan Manuel Sayago
Ing. Agr. Antonio D. Dalmaso
Dr. Eduardo Vallarino
Dr. Leonardo Salgado
Dra. Graciela Ferraro

Dra. Mirta Arriaga
Dra. Claudia Anesini
Dra. Martha Gattuso
Dra. Susana Gattuso
Dra. Cristina de Villalobos
Dr. Carlos Arturo Stortz
Dr. Diego Pol
Dr. Daniel Delamo
Dra. Ana María Giulietti
Dra. Isabel Moreno Castillo
Dra. Ana Salazar
Dra. Laura Beatriz López
Dra. Mirta E. Valencia
Dra. Milka Brodtkorb

Dr. Arturo Tabeada
Lic. Gabriel M. Martín
Dr. Marcelo F. Tejedor
Dra. Alicia Boraso
Dra. María Cecilia Rodríguez
Dr. Eduardo A. Musacchio[†]
Dra. Nilda Weiler
Dra. Ana M. Srur
Dr. Raúl A. C. González
Prof. Fernando Videla
Dra. Julieta Gomez Otero
Dra. Teresita Montenegro
Dra. María Cristina Matulewicz

EDITORIAL

Estimados lectores

Con este número se realiza la entrega del Tercer Número Electrónico de nuestra revista *Naturalia Patagónica*, correspondiente al Noveno Volumen desde el relanzamiento realizado en el año 2002.

Este número comprende Trabajos Originales tanto en formato Trabajo Completo, como Nota Corta, además de resúmenes de Tesis Doctorales, de alumnos y docentes de nuestra Facultad.

La excelente recepción que tuviera nuestro primer número electrónico a impulsado éste nuevo número, además de un nuevo número especial que se publicará a la brevedad como siempre en nuestra dirección web <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/naturalia/>.

Actualmente se continúa transformando al formato digital los números anteriores, incluyendo los correspondientes a la primera etapa de la revista, los cuales se pondrán a disposición de los lectores en nuestra página web. Al respecto, destacamos también que estamos a disposición de todas las consultas y/o sugerencias que el lector desee hacernos llegar ya que seguramente serán beneficiosas para la revista.

Agradecemos nuevamente el apoyo y el espacio en la web otorgado por la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

Confiamos en la buena receptividad de *Naturalia Patagónica* entre nuestros lectores habituales y entre los lectores en general, que se interesen por la problemática de las ciencias naturales en el ámbito de la región, invitando además a que se sumen autores al envío de su producción para nuestro siguiente número, ya que de esa forma contribuyen al crecimiento y consideración general de la revista.

Dirección, Secretaría y Comité Editorial

CONTENIDO

ARTICULOS CIENTIFICOS.

- Vivien Pentreath, Elena González & Mónica Stronati. *Anarthrophyllum desideratum*: Efectos del déficit hídrico y la salinidad durante la germinación y el desarrollo temprano01-15
- Silvia Estevao Belchior, Darío Guevara, Natalia Nuñez, Ariel Roge, Verónica Rietschel. Análisis bacteriológico de aguas y mejillones de la bahía San Julián, Santa Cruz, Argentina.....16-29
- Cynthia C. González, Magdalena Llorens. Clave de campo para reconocer hierbas y arbustos frecuentes del monte patagónico, Argentina30-49
- S.B. Gonzalez, L.T. Contardi, N.M. Pasquini. Reproducción de *Adesmia boronioides*, especie aromática y medicinal actualmente cosechada de poblaciones naturales en Patagonia50-60
- Miriam Delma Escobar Daza, Diana Paula Quezada, Elisabet Braidot, María Luján Flores & Osvaldo León Córdoba. Estudio fitoquímico y actividad biológica *in vitro* de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae) colectada en el norte y centro del Golfo San Jorge61-75

NOTAS CORTAS.

- Emilio Marguet, Marisol Vallejo. Folin, Denis, Looney, Ciocalteu: historia y méritos76-80
- José Alejandro Scolaro y Amanda Manero. Primer registro de *Homonota fasciata* en la provincia de Santa Cruz (Reptilia, Sauria, Phyllodactylidae)81-84
- Gabriel Punta. Primera medición de las superficies y estimación poblacional de las colonias de Cormorán Imperial (*Phalacrocorax atriceps*) de Isla Chata, Provincia de Santa Cruz, Argentina (aves: Phalacrocoracidae)85-91

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

- Luz Alejandra Arancibia. Estudio químico y actividad biológica de derivados sesquiterpénicos presentes en especies patagónicas del género *Senecio*92-97
- Mónica Beatriz Becerra. Obtención de productos de importancia farmacéutica biosintetizados por especies de algas pardas de las costas del Golfo San Jorge98-103

Cecilia Alejandra Crovetto Expresión y Caracterización Estructural y Bioquímica de Lb-FABP en merluza, <i>Merluccius hubbsi</i>.....	104-107
Martín Alejandro Hernández. Potencial de bacterias oleaginosas para la producción de biodiesel: estudio del metabolismo de triglicéridos en bacterias del género <i>Rhodococcus</i>.....	108-115
Alfio Zambon. La noción de sustancia básica en la conceptualización y clasificación de los elementos químicos.....	116-121
Nadia Soledad Arias Respuestas morfo-fisiológicas a bajas temperaturas y disponibilidad de agua en variedades de <i>Olea europaea</i> L.....	122-126
Ornella Marisa Herrero. Utilización de residuos orgánicos para la producción de lípidos con bacterias oleaginosas del género <i>Rhodococcus</i>: metabolismo del glicerol.....	127-133
María Soledad Villalba. Modificaciones del proceso de producción de triacilglicéridos intracelulares y extracelulares en bacterias del género <i>Rhodococcus</i>.....	134-137
Sandra Marcela Alcalde Bahamonde. Actividad Farmacológica y Estudio Fitoquímico de <i>Chilotrimum diffusum</i> (Asteraceae).....	138-142

CONTENTS

RESEARCH ARTICLES.

- Vivien Pentreath; Elena González & Mónica Stronati. *Anarthrophyllum desideratum*: Water deficit and salinity effects during germination and seedling growth01-06
- Silvia Estevao Belchior, Darío Guevara, Natalia Nuñez, Ariel Roge, Verónica Rietschel. Bacteriological analysis of samples of water and mussels collected from San Julian bay, Santa Cruz, Argentina16-29
- Cynthia C. González, Magdalena Llorens. Field key for recognizing frequent herbs and shrubs of the monte patagónico, Argentina30-49
- S.B. Gonzalez, L.T. Contardi, N.M. Pasquini. Reproduction of *Adesmia boronoides*, a medicinal and aromatic plant currently harvested from natural populations in Patagonia Argentina.....50-60
- Miriam Delma Escobar Daza, Diana Paula Quezada, Elisabet Braidot, María Luján Flores & Osvaldo León Córdoba. Phycochemical study and biological *in vitro* activity of the *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae) collected in north and central of the San Jorge Gulf 61-75

SHORT NOTES.

- Emilio Marguet, Marisol Vallejo. Folin, Denis, Looney, Ciocalteu: history and merits.....76-80
- José Alejandro Scolaro y Amanda Manero. First record of *Homonota fasciata* in Santa Cruz province (Reptilia, Sauria, Phyllodactylidae)81-84
- Gabriel Punta. First surfaces measurement and population assessment of the Imperial Cormorant colonies (*Phalacrocorax atriceps*) of Chata Island, Santa Cruz Province, Argentina (aves: Phalacrocoracidae)85-91

THESIS (DOCTOR DEGREE) OF RESEARCH OF THE FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA SAN JUAN BOSCO.

- Luz Alejandra Arancibia. Chemical study and biological activity of sesquiterpenoids derivatives present in patagonic species of genus *Senecio*92-97
- Mónica Beatriz Becerra. Obtaining products of pharmaceutical importance synthesized by brown algae species of the San Jorge Gulf coasts98-103

Cecilia Alejandra Crovetto Expression, structural and biochemistry characterization of Lb-FABP in merluza, <i>Merluccius hubbsi</i>.....	104-107
Martín Alejandro Hernández. Potential of oleaginous bacteria for Biodiesel production: study of the metabolism of triglycerides in bacteria of the <i>Rhodococcus</i> genus.....	108-115
Alfio Zambon. The notion of basic substance in conceptualizing and classification of chemical elements.....	116-121
Nadia Soledad Arias Morpho-physiological responses to drought and low temperatures in <i>Olea europaea</i> L. varieties.....	122-126
Ornella Marisa Herrero. Use of organic waste for lipid production by oleaginous bacteria belonging to <i>Rhodococcus</i> genus: glycerol metabolism.....	127-133
María Soledad Villalba. Modifications of the intracellular and extracellular triacylglycerol production process in bacteria belonging to <i>Rhodococcus</i> genus	134-137
Sandra Marcela Alcalde Bahamonde. Pharmacological Activity and Phytochemical Study of <i>Chilotrimum diffusum</i> (Astereaceae).....	138-142

***Anarthrophyllum desideratum*: Efectos del déficit hídrico y la salinidad durante la germinación y el desarrollo temprano**

***Anarthrophyllum desideratum*: Water deficit and salinity effects during germination and seedling growth**

Vivien Pentreath^{*1}, Elena González¹ & Mónica Stronati¹

¹ Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.
Correspondencia: vivienpentreath@yahoo.com.ar

Resumen: *Anarthrophyllum desideratum* es una especie endémica de la estepa Patagónica que se distribuye en un área geográfica extensa, con características ecológicas muy diversas. Por ser muy escasas las investigaciones realizadas sobre la flora nativa de la Patagonia árida, este trabajo resulta valioso para enriquecer el conocimiento de base de la especie, al evaluar su comportamiento durante el desarrollo temprano, frente a situaciones de déficit hídrico y salinidad. Se seleccionaron tres poblaciones para evaluar la respuesta de la especie. Se calculó el porcentaje final y la tasa de germinación, para lo cual se combinaron cuatro factores: iluminación, temperatura, escarificación de la cubierta seminal y osmolaridad del medio, utilizando soluciones de NaCl y manitol. La emergencia se analizó con cuatro valores de humedad edáfica. La supervivencia se llevó a cabo a la intemperie, bajo condiciones semicontroladas, estableciendo tratamientos con tres niveles de contenido hídrico. Al finalizar el ensayo se determinó: longitud de la raíz principal, número de ramificaciones de la raíz mayores de 1 cm, peso fresco y peso seco de la parte aérea y radical y se analizó la presencia de nódulos. Los datos obtenidos se sometieron al análisis de Anova y el Test de Tuckey para la comparación a posteriori, utilizando el programa Statistica. 6. La germinación se vio favorecida principalmente por la escarificación de la cubierta seminal. La emergencia tuvo una correlación inversa respecto de la humedad del suelo. La supervivencia de las plántulas no disminuyó al reducirse la humedad del suelo. Se considera éste el primer reporte de presencia de nódulos radicales en la especie.

Palabras clave: *Anarthrophyllum desideratum*, déficit hídrico, salinidad, germinación, emergencia, nodulación.

Abstract: *Anarthrophyllum desideratum* is an endemic specie of the Patagonian steppe, distributed over a large geographical área, with very different ecological characteristics. Due to the few research about native flora of the arid Patagonia, this work is valuable to enrich the knowledge base of the species, assessing their behavior during early development, in situations of water deficit and salinity. Three populations were selected to evaluate the response of the species. Four factors were combined to calculate final percentage and germination rate: lighting, temperature, seed coat scarification and osmolarity of the medium, using NaCl solutions and mannitol. The emergence was analyzed with four values of soil moisture. Survival was carried out outdoor, under semi controlled conditions, setting treatments with three levels of water content. At the end of the test it was determined: the main root length, number of branches of the root longer than 1 cm, fresh and dry weight of roots and aerial parts, and the presence of nodules was analyzed. Data obtained was subjected to Anova and Tuckey test analysis to their posterior comparison, using the program Statistica.6. Germination was mainly benefited by scarification of the seed coat. The emergence had inverse correlation with soil moisture. The seedling survival not declined with soil moisture decreasing. This is considered the first report of the presence of root nodules in the specie.

Keywords: *Anarthrophyllum desideratum*, water deficit, salinity, germination, emergence, nodulation.

Introducción

El género *Anarthrophyllum* es exclusivamente argentino-chileno, con 15 especies perennes de regiones frías y secas como la Patagonia. En Argentina sus especies se extienden desde la provincia de Catamarca hasta Tierra del Fuego, en Chile habitan en algunas regiones centrales y en la región de Magallanes (Burkart, 1952).

Anarthrophyllum desideratum (DC) Bentham ex. B.D.Jackson (Fabaceae) es

una especie endémica de la estepa Patagónica que se distribuye geográficamente en un área extensa de considerable heterogeneidad ambiental, incluyendo diversas áreas ecológicas identificadas como unidades ambientales dentro de la región (Oliva *et al.*, 2001).

En Argentina, se la encuentra a lo largo de 1000 Km desde los 43°10' hasta los 51°60' de latitud Sur, mientras que en Chile está restringida a la porción continental más austral, en el Parque

Nacional Torres del Paine (51°00'S, 72°50'O).

Fitogeográficamente, la especie ocupa principalmente la provincia Patagónica, que incluye las zonas áridas y semiáridas de la estepa y sólo parte de la provincia Subantártica, donde está presente en los pastizales subandinos, pero no en el bosque (Roig, 1998). Esta región presenta una importante diversidad ambiental, con elevaciones que varían desde el nivel del mar hasta los 900 m de altitud, marcados gradientes climáticos, una gran variedad topográfica y edáfica y áreas ecológicas muy diversas, definidas en función del clima, el suelo y la vegetación (Oliva *et al.*, 2001).

A. desideratum es un arbusto bajo, hemisférico, densamente ramificado y hojoso, conocido como "Mata de fuego" por la presencia de flores rojo-anaranjadas (Soraru, 1974; Correa, 1984) que dan al arbusto un aspecto encendido. Correa (1984) menciona la existencia de tres variedades en la provincia del Chubut.

En las provincias de Chubut y Santa Cruz se distribuye sobre laderas de mesetas, dentro de una comunidad integrada mayoritariamente por *Fabiana nanna* (Speg.) Arroyo, *Frankenia patagonica* Spegazzini, *Pappostipa humilis* Cavanilles, *Nassauvia ulicina* (Hook.) Macloskie y *Chuquiraga aurea*

Skottsberg. Es polinizado por aves Passeriformes, sin embargo dentro de su rango de distribución presenta ensambles de visitantes florales variables (Paiaro *et al.*, 2012).

En los ambientes áridos, el éxito de la supervivencia de las plántulas está fuertemente ligado a la capacidad hídrica del suelo (Bertiller *et al.*, 1996; Padilla Ruiz, 2008). Las plantas de regiones áridas, que han logrado eficiencia para desarrollarse en dichos ambientes, favorecen el proceso de restauración de las comunidades de las cuales forman parte, por ello son consideradas adecuadas para ser utilizadas en programas de recuperación de áreas degradadas. Si bien los factores abióticos son los fundamentales para controlar su funcionamiento, hay evidencias que demuestran la importancia de los factores bióticos sobre los abióticos, a escalas locales, como reguladores del funcionamiento de los ecosistemas áridos (Flores & Jurado, 2003). Los parches de vegetación de mayor densidad que comprenden uno o varios individuos, de una o varias especies de arbustos generalmente leguminosos, y las plantas establecidas bajo su copa podrían constituir unidades básicas de control de los procesos del funcionamiento del ecosistema, influyendo en la productividad y diversidad de especies

del ecosistema según el tipo de isla que se forme (Perroni Ventura, 2007).

Las zonas áridas y semiáridas son difíciles de recuperar una vez que han sido degradadas, ya que las condiciones ambientales extremas que las caracterizan dan lugar a una baja capacidad natural de recuperación, aún si el agente causante de la perturbación ha sido removido del ambiente (Bainbridge, 2007). Por lo tanto la búsqueda de especies aptas a climas semi-desérticos, en particular arbustos, constituye un importante aporte para la recuperación de áreas desertificadas. Por ser muy escasas las investigaciones realizadas sobre la flora nativa de la Patagonia árida, esta investigación resulta valiosa para enriquecer el conocimiento de base de la especie, al evaluar su comportamiento durante el desarrollo temprano frente a situaciones de déficit hídrico y salinidad.

Materiales y Métodos

Localización de las poblaciones

Se seleccionaron tres poblaciones para evaluar el comportamiento de la especie. Las poblaciones naturales de *A. desideratum* (**Fig. 1**) estudiadas fueron localizadas en: i) Rada Tilly, dentro de la reserva Punta del Marqués (45° 58' S 67° 34' O), sobre el borde de la meseta, a 178 m.s.n.m.; ii) Parque Eólico Antonio Morán, Cerro Arenales, dentro del ejido urbano de Comodoro Rivadavia (45° 52' S 67° 28' O) y iii) Río Chico (45° 19' S 67° 47' O), distante 60 km al NO de Comodoro Rivadavia. Integran una comunidad constituida mayoritariamente por especies como *Fabiana nanna*, *Frankenia patagonica*, *Pappostipa humilis*, *Nassauvia ulisina*, *Chuquiraga aurea*.



Figura 1: Color de las flores de *A. desideratum*
Figure 1: Flower color of *A. desideratum*

Se identificaron aleatoriamente diez individuos en cada población, se marcaron y se colectó material para los ensayos.

En enero se recogieron las semillas, se secaron y fumigaron para evitar la proliferación de parásitos y se mantuvieron separadas en bolsas de papel. El material herborizado se depositó en el Herbario Regional Patagónico (HRP) de la Facultad de Ciencias Naturales, de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, con los siguientes números: Rada Tilly 1/12/01 (HRP 6011); Cerro Arenales 1/12/01 (HRP 6010); Río Chico 1/12/01 (HRP 6009).

Germinación

Para determinar las condiciones óptimas de germinación se realizaron protocolos combinando cuatro factores: iluminación (presencia-ausencia); temperatura (13°C – 21°C); escarificación de la cubierta seminal (química, mecánica, sin escarificar) y osmolaridad del medio (0; -0,2; -0,4; -0,6; -0,8 y -1 MPa), utilizando soluciones de NaCl y manitol. Se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento, con 20 semillas por placa. Los resultados fueron registrados diariamente, durante un mes y se calculó el porcentaje final y la tasa de germinación (Maguire, 1962),

considerando germinada la planta cuando asomó la radícula 1 mm.

Emergencia

Para evaluar el efecto del estado hídrico del suelo sobre la emergencia se analizaron cuatro valores de humedad edáfica: 27, 21, 15 y 9%. El riego de los envases se realizó el día previo a la siembra, dejando 24 hr para que se homogenice la humedad del suelo. Se utilizaron envases herméticos, de plástico, con diez repeticiones por tratamiento y 20 semillas por envase, previamente escarificadas. Las condiciones de la cámara de cultivo fueron: fotoperíodo 12 hs y temperatura día/noche de 21/13 °C. El registro de las plántulas emergidas (cuando los cotiledones asomaron de la superficie del suelo) se realizó diariamente durante un mes.

Supervivencia

La supervivencia a la intemperie, durante las primeras etapas del crecimiento, se evaluó bajo condiciones semicontroladas, protegiendo las plantas de la lluvia con una cubierta impermeable. Se prepararon recipientes con 1.500 g de suelo conteniendo seis semillas por envase; de las cuales, una vez emergidas, se seleccionó una planta por recipiente. El suelo se mantuvo cercano a la capacidad de campo durante 60 días y cuando las plántulas mostraron dos hojas verdaderas,

mediante un diseño totalmente aleatorizado, se establecieron los tratamientos correspondientes a tres niveles de contenido hídrico: 27% (capacidad de campo), 17% y 9%, con 20 individuos y 2 repeticiones. Los envases se regaron con agua destilada y se midió periódicamente: longitud del tallo, número de hojas y número de ramificaciones. Al finalizar el ensayo se determinó: longitud de raíz principal, número de ramificaciones de la raíz mayores de 1 cm, peso fresco y peso seco (en estufa a 68 °C durante 48 hs) de la parte aérea y radical.

Para caracterizar la capacidad de nodulación se observó: presencia, número y morfología de los nódulos bacterianos.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se sometieron al análisis de Anova y el Test de Tuckey para la comparación a posteriori, utilizando el programa Statistica.6. Los datos utilizados fueron previamente normalizados y homogeneizados.

Resultados

Germinación

El porcentaje final y la tasa de germinación fueron favorecidos fundamentalmente por la escarificación de la cubierta seminal (**Tabla I**). Las diferencias significativas del porcentaje final de germinación se apreciaron en la interacción de

escarificación y temperatura (**Tabla II**), específicamente en el tratamiento sin escarificación. Las semillas de *A. desideratum* no presentaron diferencias significativas en su respuesta a los tratamientos con o sin luz, por lo que serían fotoblásticamente indiferentes (**Tabla II**). La proporción de semillas germinadas disminuyó, al igual que la tasa de germinación, al aumentar la osmolaridad de las soluciones (**Fig. 2**). Ambos

parámetros presentaron diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) en la interacción de los tratamientos osmóticos con los potenciales hídricos decrecientes (**Tabla III**).

Un valor representativo de esta respuesta es CI_{50} , (Concentración de inhibición 50), que indica la reducción del 50% de la germinación con respecto al control. La CI_{50} se halló a partir de -0,6 MPa para las soluciones de NaCl y manitol (**Fig. 2**).

Tratamiento		Temperatura °C	% Germinación	Tasa Germinación
Escarificación	Luz			
-	+	21	14 ($\pm 4,8$)	0,33 ($\pm 0,3$)
-	+	13	3,8 ($\pm 2,5$)	0,08 ($\pm 0,1$)
-	-	21	11 ($\pm 4,8$)	0,15 ($\pm 0,2$)
-	-	13	5 ($\pm 4,1$)	0,20 ($\pm 0,2$)
química	+	21	99 ($\pm 2,5$)	14,10 ($\pm 0,5$)
química	+	13	96 ($\pm 4,8$)	6,01 ($\pm 2,9$)
química	-	21	96 ($\pm 4,8$)	13,50 ($\pm 0,5$)
química	-	13	98 (± 5)	2,85 (0,3)
mecánica	+	21	96 ($\pm 4,8$)	10,07 ($\pm 1,4$)
mecánica	+	13	98 ($\pm 2,9$)	5,46 ($\pm 0,3$)
mecánica	-	21	98 ($\pm 2,9$)	8,54 ($\pm 1,5$)
mecánica	-	13	95 ($\pm 4,1$)	8,83 ($\pm 1,5$)

Tabla I: Germinación en diferentes condiciones ambientales.

Table I: Germination under different environmental conditions.

Tratamiento	MS	F	p
Escarificación	41714,58	2477,072	0,000000*
Luz	4,69	,278	,601021
Temperatura	117,19	6,959	,012242*
Esc x Luz	0,00	0,000	1,000000
Esc x Temp.	75,00	4,454	,018696*
Luz x Temp.	4,69	,278	,601021
Esc. x Luz x Temp.	18,75	1,113	,339485

Tabla II: Análisis multifactorial del porcentaje final de germinación. * indica diferencias significativas ($\alpha < 0,05$).

Table II: Multivariate analysis of the final percentage of germination. * indicate significant differences ($\alpha < 0,05$).

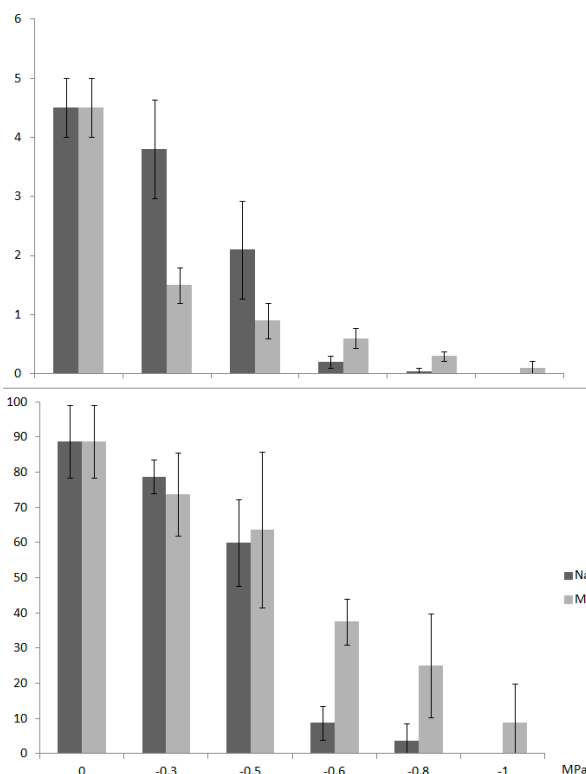


Figura 2: a) Porcentaje y b) tasa de germinación de *A. desideratum* en soluciones osmóticas de potencial hídrico decreciente de NaCl y manitol.

Figure 2: a) Percentage and b) rate of germination of *A. desideratum* in osmotic solutions of water potential decreasing of NaCl and mannitol.

Tratamiento	MS	F	p
Soluto	,799523	23,62566	,000000*
Potencial Hídrico	2,608358	77,07616	,000000*
Soluto x Pot. H	,094156	2,78227	,007556*

Tabla III: Análisis multifactorial del porcentaje final de germinación, en soluciones osmóticas de manitol y NaCl, con potenciales hídricos decrecientes. * indica diferencias significativas ($\alpha < 0,05$).

Table III: Multivariate analysis of final germination percentage, in osmotic solutions of mannitol and NaCl, with water potential decreasing. * indicate significant differences ($\alpha < 0,05$).

Emergencia

La disminución de la emergencia tuvo una correlación inversa respecto de la humedad del suelo. Los valores oscilaron entre 23,5 y 56%, resultando significativamente mayor la emergencia en un suelo con 9% de humedad (**Fig. 3**).

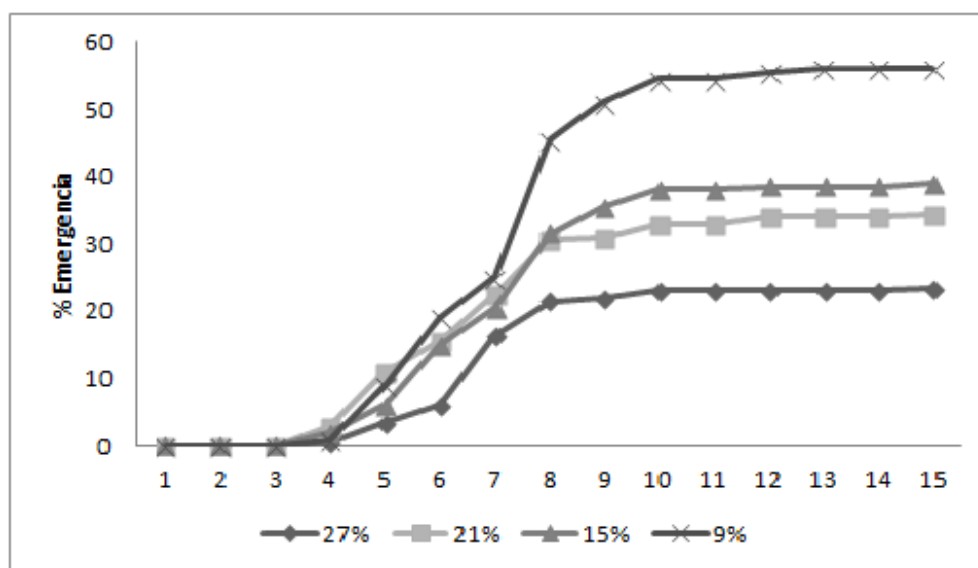


Figura 3: Porcentaje de emergencia en diferentes niveles de humedad del suelo

Figure 3: Emergence percentage at different levels of soil moisture.

Supervivencia

El desarrollo de las plantas expuestas a la intemperie fue lento, con un estadio de cotiledón prolongado. La supervivencia de las plántulas no disminuyó al reducirse la humedad del suelo y no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos (**Tabla IV**). Los valores de longitud de tallo, número de hojas y de ramificaciones son significativamente menores ($\alpha < 0,05$) cuando la disponibilidad de agua fue de 9 % (**Tabla IV**).

La raíz principal se presentó con pocas

ramificaciones, delgadas, de color claro y en su mayoría de primer orden. En la base de la raíz apareció una zona suberificada pardo-rojiza.

La relación tallo/raíz, en peso seco, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos de variación de humedad del suelo. En todos los casos, la relación favoreció la parte aérea (**Tabla IV**). La biomasa radical y aérea se redujo de manera significativa ($p < 0,05$) en el menor nivel de humedad del suelo.

Humedad del suelo (%)	Supervivencia (%)	Largo de tallo (cm)	Largo de raíz (cm)	Biomasa aérea (gr)	Biomasa radical (gr)	Relación tallo/raíz
27	41,17 ^a	5,37 ^a	38,6 ^a	0,134 ^a	0,066 ^a	2,29 ^a
17	68,75 ^a	6,48 ^a	36,2 ^a	0,101 ^a	0,064 ^a	2,15 ^a
9	64,28 ^a	4,04 ^b	23,76 ^a	0,052 ^b	0,028 ^b	2,06 ^a

Tabla IV: Parámetros de crecimiento de las plantas cultivadas en distintos niveles de humedad del suelo. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0,05$).

Table IV: Growth parameters of plants grown in different soil moisture levels. Different letters indicate significant differences ($\alpha < 0,05$).

Se detectó por primera vez la presencia de nódulos radicales en esta especie. *A. desideratum* noduló en todos los niveles de humedad de suelo (**Fig. 4**). Los nódulos detectados, de color parduzco y crecimiento indeterminado, aparecieron sésiles sobre las raíces de primer y segundo

orden, en número de 2-3 por planta. El corte transversal mostró que están constituidos por una corteza y un tejido masivo más claro y translúcido hacia el centro, que correspondería a la región del tejido bacteriano.



Figura 4: a) Detalle del nódulo y b) planta completa.

Figure 4: a) Nodule detail and b) complete plant.

Discusión

La principal causa de latencia reportada en semillas de arbustos que habitan en desiertos con invierno frío es fisiológica (Baskin & Baskin, 2004), sin embargo *A. desideratum* presentó una latencia física, al igual que *A. rigidum* (Pentreath *et al.*, 2001) y la mayoría de las *Fabaceae* (Peláez *et al.*, 1992; Ortega Baes *et al.*, 2002; Camargo Ricalde *et al.*, 2004; Masini, 2011), que poseen una testa dura e impermeable. Este hecho según Van Staden *et al.* (1989) se asocia al proceso

de desecación de la semilla durante su maduración.

Así como la dormancia de *Anarthrophyllum capitatum* se rompió mediante escarificación química (Masini *et al.*, 2012), o como en el caso de *Prosopis alba* y *P. flexuosa*, que no mostraron diferencias significativas durante la germinación, entre los tratamientos de escarificación mecánica y química (Vilela & Ravetta, 2001); se pudo interrumpir la latencia de *A. desideratum* mediante escarificación mecánica y química, logrando la germinación de la mayoría de las semillas. En su ambiente natural el viento, la lluvia y el tránsito de animales serían los factores que provocarían el desgaste de la cubierta seminal.

La tasa de germinación de esta especie presentó resultados relativamente bajos, comparados con los obtenidos en otras leguminosas leñosas, como *Prosopis argentina* y *P. alpataco* (Villagra 1997). Este hecho podría colocar en situación de desventaja el éxito reproductivo de *A. denudans* debido a que el inicio de los procesos germinativos, en las semillas de especies de zonas áridas, se relaciona más con eventos independientes que con una sumatoria de pulsos variables e impredecibles de precipitación (Jara *et al.*, 2006).

La germinación de semillas en soluciones de diferente osmolaridad coincide con los

efectos descritos por Villagra (1997) en las semillas de *P. alpataco* y *P. argentina*, sometidas a estrés osmótico durante la etapa de germinación: retardo en el inicio del proceso de germinación, reducción de la tasa y de los porcentajes finales de germinación.

A. desideratum mostró escasa tolerancia a la elevada osmolaridad del medio en comparación con el comportamiento de las especies halófitas descrito por Myers & Morgan (1989), según el cual se halla entre -0,3 MPa y -1 a -1,5 MPa. La respuesta la aproximaría más al tipo de especies glicófitas, debido a que su germinación disminuye a medida que aumenta la salinidad del medio (Ungar, 1978; Rubio Casal *et al.*, 2003). Este hecho podría constituir una limitante en el proceso inicial de establecimiento de la planta ya que la tolerancia a la salinidad del suelo, durante el proceso de germinación, es crítica para lograr la supervivencia de la vegetación (Harper, 1977; Chambers, 1987).

La reducción de biomasa aérea y radical en los ensayos con déficit hídrico a campo, coincide con el comportamiento de otras leguminosas leñosas, como *Prosopis caldenia* (Villalobos & Peláez 2001), en la cual la falta de agua podría limitar el crecimiento de las plantas, llegando a reducir su probabilidad de establecimiento o con la respuesta de *P. chilensis* y *P.*

flexuosa (López Lauenstein *et al.*, 2012), donde la disponibilidad de agua afectó a todas las variables relacionadas con la producción de biomasa.

Se destaca que esta es la primera cita de presencia de nódulos radicales en *A. desideratum*, los cuales se encontraron en distintos niveles de humedad edáfica. La facultad de nodular y, consecuentemente, de fijar nitrógeno aumentaría el aporte de un elemento esencial para el sistema, lo que podría favorecer la posibilidad de establecimiento de ésta y otras especies, constituyendo la agregación de vegetación en parches, típica de comunidades de clima árido (Henderson *et. al.*, 1988). La vegetación asociada a parches depende de plantas individuales que asisten el arribo o llegada de semillas; su establecimiento, ofreciendo microsítios favorables y su supervivencia (Witford & Ludwig Wade, 2002). Según Wilson & Agnew (1992) el desarrollo de los parches sigue un modelo de instalación primaria de especies leguminosas que enriquecen el suelo. Si las plantas individualmente operan un cambio importante en los ambientes desérticos cambiando sitios desnudos por áreas con vegetación, *A. desideratum* constituiría un recurso valioso en los procesos de restauración. Entre las técnicas de restauración activa utilizadas para la recuperación de las comunidades vegetales, se encuentran la reintroducción

de plantas producidas en vivero, la siembra directa a campo y el traslado de bancos de semillas (Bainbridge, 2007), para lo cual es necesario conocer las estrategias de germinación y las técnicas de cultivo de éstas especies (Ulian *et al.*, 2008; Rovere & Masini, 2011).

Bibliografía

Bainbridge, D. 2007. A Guide for Desert and Dryland Restoration: New hope for Arid Lands. Island Press. Washington. USA. 391pp.

Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 2004. Determining Dormancy-Breaking and Germination Requirements from the Fewest Seeds. In Guerrant Jr., E. O.; K. Havens y M. Maunder (eds) *Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*, Island Press, United States of America. 162-179.

Bertiller, M.B.; Zaixso, P; Irisarri, M.P.; Bredan, E.R. 1996. The Establishment of *Festuca pallescens* in arid grasslands in Patagonia (Argentina): the effect of soil water stress. *Journal of Arid Environments*. **32**:161-171.

Burkart, A. 1952. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. *Acme Agency*. "Ed. Buenos Aires. 312-315.

Camargo-Ricalde, S. L.; Dhillion, S. S. & García-García, V. 2004. Phenology, and seed production and germination of seven endemic *Mimosa* species (Fabaceae-Mimosoideae) of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Journal of Arid Environments* **58(4)**: 423-437.

Chambers, J.C.; McMahon, J.A. & Brown, R.W. 1987. Germination characteristics of alpine grasses and forbs: A comparison of early and late seral dominants with reclamation potential. *Reclamation and Revegetation Research*. **6**: 235-249.

Correa, J.L. 1984. Flora patagónica. IV-b *Col.Científica*: 161-175. T° VIII INTA. BsAs.

Flores, J. & Jurado, E. 2003. Are nurse-protégé interactions more common among plants from arid environments? *J. Veg. Sci.***14**: 911-916.

Harper, J.L. 1977. *Population Biology of Plants*. Academic Press. London. 891 pp.

Henderson, C. B., Petersen, K. E., & Redak, R. A. 1988. Spatial and temporal patterns in the seed bank and vegetation of a desert grassland community. *Ecol.* **76**: 717-728.

Jara, P.A.; Arancio, G.; Moreno, R. & Carmona, M.R. 2006. Factores abióticos que influyen la germinación de seis especies herbáceas de la zona árida de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* **79**: 309-319.

- Lopez Lauenstein, D.; Fernández, M.E. & Verga, A. 2012. Respuesta diferenciada a la sequía de plantas jóvenes de *Prosopis chilensis*, *P. flexuosa* y sus híbridos interespecíficos: implicancias para la reforestación en zonas áridas. *Ecol. Austral* [online]. 2012, vol.22, n.1 [citado 2015-12-30], pp. 43-52. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1667-782X2012000100005&lng=es&nrm=iso. ISSN 1667-782.
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation of seedling emergence and vigor *Crop Science*. **2**: 176-177.
- Masini, A.C.A. 2011. Germinación de especies nativas del norte neuquino: Provincias fitogeográficas del Monte y Patagónica (Distrito de la Payunia), e implicancias para la rehabilitación de zonas áridas degradadas. Tesis de Licenciatura, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina. 40 pp.
- Masini, A.C.A.; Rovere, A.E. & Pérez, D.R. 2012. Requerimientos pregerminativos de dos especies leñosas: *Anarthrophyllum capitatum* Sorarú y *Anarthrophyllum elegans* (Gillies ex Hook. & Arn.) F. Philippi Quebracho *Vol.20(1,2)*: 85-96.
- Myers, B.A. & Morgan, W.C. 1989. Germination of the salt-tolerant grass *Diplachne fusca*. II*. Salinity Responses. *Australian Journal of Botany*. **37**: 239-251.
- Oliva, G.E.; González, L.; Rial, P. & Livraghi, E. 2001. El ambiente en la Patagonia Austral. *En: Borrelli, P. & G. E. Oliva (eds.), Ganadería sustentable en la Patagonia Austral*. INTA, Río Gallegos. 41-82.
- Ortega Baes, P.; de Viana, M.L. & Sühring, S. 2002. Germination in *Prosopis ferox* seeds: effects of mechanical, chemical and biological scarification. *Journal of Arid Environments* **50(1)**: 185-189.
- Padilla Ruiz, F.M. 2008. Factores limitantes y estrategias de establecimiento de plantas leñosas en ambientes semiáridos. Implicaciones para la restauración. Tesis Doctoral. *Ecosistemas* **17(1)**: 155-159.
- Paiaro, V., Oliva, G.E., Cocucci, A.A. & Sérsic, A.N. 2012. Caracterización y variación espacio-temporal del néctar en *Anarthrophyllum desideratum* (Fabaceae): Influencia del clima y los polinizadores. *Bol. Soc. Argent. Bot.* **47(3-4)**: 375-387.
- Peláez, D.V.; Bóo, R.M. & Elia, O.R. 1992. Emergence and seedling survival of calden in the semiarid region of Argentina. *Journal of Range Management* **45(6)**: 564-566.

- Pentreath, V.; González, E.; Stronati, M.; Giullietti, G.; D'Ambrogio A. & Frayssinet N. 2001. Ensayos de Germinación y Análisis Cariotípico de *Anarthrophyllum rigidum* y *A. desideratum*. Boletín Sociedad Argentina de Botánica. **36**: 106.
- Perroni Ventura, Y. 2007. Islas de fertilidad en un ecosistema semiárido: nutrimentos en el suelo y su relación con la diversidad vegetal. Tesis de doctorado en Ciencias en Ecología y Manejo de Recursos Naturales. Xalapa, Veracruz, México. Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/3989/2/24845.pdf>
- Roig, F.A. 1998. La vegetación de la Patagonia. In: Correa, M. N. (ed.), *Flora Patagónica*. INTA. Vol 8, Parte 1, 48-166.
- Rovere, A.E. & Masini, A.C.A. 2011. Diferentes enfoques de la restauración ecológica en las III Jornadas Argentinas de Ecología de Paisajes. Revista de la Asociación Argentina de Ecología de Paisajes **2(2)**: 95-99.
- Rubio Casal, A.E.; Castillo, J.M.; Luque, C.J. & Figueroa, M.E., 2003. Influence of salinity on germination and seeds viability of two primary colonizers of Mediterranean salt pans. Journal of Arid Environments, **53**: 145-154.
- Soraru, S.B. 1974. Revisión de *Anarthrophyllum*, género argentino-chileno de Leguminosas. Darwiniana. T **18**: 3-4.
- Ulian, T.; Rovere, A.E. & Muñoz, B. 2008. Taller sobre conservación de semillas para la restauración ecológica. Ecosistemas **17(3)**: 147-148.
- Ungar, I.A. 1978. Halophyte seeds germination. Botanical Review. **44**: 233-264.
- Van Staden, J., Manning, J.C. & Kelly, K.M. 1989. Legume seeds, the structure: function equation. In CH Stirton & JL Zarucchi (Eds.) Advances in Legume Biology Monography of Botanical Garden. **29**: 417-450.
- Vilela, A.E. & Ravetta, D.A. 2001. The effect of seed scarification and soil-media on germination, growth, storage, and survival of seedlings of five species of *Prosopis* L. (Mimosaceae). Journal of Arid Environments. **48**: 171-184.
- Villagra, P.E. 1997. Germination of *Prosopis argentina* and *P. alpataco* seeds under saline conditions. Journal of Arid Environments. **37**: 261-267.
- Villalobos, A.E. & Peláez, D.V. 2001. Influences of temperature and water stress on germination and establishment of *Prosopis caldenia* Burk. Journal of Arid Environments. **49**: 321-328.
- Wilson, J.B. & Agnew, A.D.Q. 1992. Positive-feedback switches in plant communities. Adv. Ecol. Res. **23**: 263-336.
- Witford, W. & Ludwig Wade, E. 2002. Ecology of Desert Systems. Elsevier. 343

pp.

<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780127472614>

Análisis bacteriológico de aguas y mejillones de la bahía San Julián, Santa Cruz, Argentina.

Bacteriological analysis of samples of water and mussels collected from San Julian bay, Santa Cruz, Argentina.

Silvia Estevao Belchior^{1*}, Darío Guevara¹, Natalia Nuñez¹, Ariel Roge², Verónica Rietschel².

¹Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico Tecnológico (CRIDECIT). Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Km 4, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina. (2) ANLIS-INEI “Dr Carlos Malbran”, Av. Vélez Sarsfield 563 (C1282AFF) Buenos Aires, Argentina.

*Correspondencia: sbelchior@unpata.edu.ar

Resumen: El objetivo de este trabajo analizar la calidad bacteriológica de aguas y mejillones en áreas potencialmente aptas para acuicultura, de la Bahía de San Julián, provincia de Santa Cruz, Argentina. Se realizaron 4 campañas estacionales de muestreo, entre Septiembre de 2006 y Junio de 2007. Se analizaron muestras de aguas superficiales y de mejillones aplicando el método de NMP para coliformes totales (CT, termotolerantes (Ctt) y *Escherichia coli*. Los resultados, de los recuentos promedios se transformaron a logaritmo (base 10). Además, en mejillones se determinó la presencia de *Salmonella* sp.. En cada campaña, se procesaron muestras de agua de 11 puntos de la bahía y se cosecharon mejillones de 6 sitios diferentes de la costa. En agua se registraron valores de NMP/100ml entre 0,027 y 0,75 para CT; 0,002 y 0,51 para Ctt y recuentos promedios de 0,30 y 0,51 se obtuvieron para *E. coli* durante el verano y otoño respectivamente. Los recuentos en agua fueron semejantes en todos los sitios de la bahía ($p > 0,05$). En mejillones, los rango de los valores promedios de recuentos de NMP/100g fueron para CT entre 1,71 y 2,54; para Ctt 1,15 y 2,02 y *E. coli* entre 1,15 y 1,88. Los valores de Ctt y *E. coli* fueron superiores en mejillones cosechados en las cercanías de la ciudad. Se determinó la presencia de *E. coli* en el 39 % y 65 % de muestras de agua y mejillones respectivamente, y *Salmonella Enteritidis* en el 9 % de muestras de mejillones. Los resultados cumplieron con los criterios microbiológicos establecidos por las reglamentaciones vigentes en Argentina, tanto para los bivalvos y como en las agua de extracción. Los sitios estudiados serian clasificados aptos como zonas de producción de

moluscos bivalvos, considerándose apropiada la aplicación de termoprocesos previos al consumo de los mismos.

Palabras claves: calidad bacteriológica, moluscos bivalvos, recuento de coliformes, *Salmonella* sp.

Abstract

The aim of this study was analyze bacteriological quality of the seawater and mussels from the Bay of San Julian, Santa Cruz, Argentina, in areas potentially suitable for aquaculture. Four seasonal sampling campaigns between to September 2006 and June 2007, were realized. In seawaters and mussel samples, the total (TC) and thermotolerant (ttC) coliforms, and *Escherichia coli* load were determined by most probable number (MPN) method. While in mussel samples a detection of *Salmonella* sp. were made. Average counts were transformed to logarithm. For each campaign, water samples from eleven areas into the bay and mussel samples from six different areas along the coast, were analyzed

Seawater samples presented counts data of TC between to 0.027 and 0.75 MNP/100ml, of ttC between 0.002 and 0.51 MNP/100ml and averages of 0.30 and 0.51 MNP/100ml were obtained for *E. coli* during the summer and autumn respectively. Levels of MNP in water samples were similar at all areas of the bay ($p > 0.05$). The MNP counts in mussel samples, showed values of CT between 1.71 and 2.54 NMP/100g, of ttC count between 1.15 and 2.02 NMP/100g and *E. coli* between 1.15 and 1.88 NMP/100g. The levels of ttC and *E. coli* were higher in harvested mussels near the city. We determined the presence of *E.coli* in 39 % and 65 % of water and mussel, respectively. *Salmonella Enteritidis* was identified in 9 % of mussel samples. The results met the microbiological criteria established by the regulations in force in Argentina for both bivalves and water. The sites studied would be classified as suitable production areas of bivalve molluscs, properly considered the application of thermal processes previous their consumption.

Keyword: bivalve molluscs, coliform count, bacteriological quality, *Salmonella* sp.

Introducción

Las costas patagónicas constituyen un reservorio natural de plantas vasculares de marisma, macroalgas del intermareal y submareal, invertebrados infaunales intermareales, bancos de mitílidos, peces, aves migratorias y mamíferos marinos (Zaixso *et al.*, 2015).

Entre los mitílidos, los moluscos bivalvos, son consumidos como un alimento saludable por su alto contenido en proteínas y minerales y bajo de lípidos. Los mejillones, son organismos de la familia *Mitilidae*, se fijan a las superficies rocosas que presentan las costas patagónicas y constituyen una fuente de alimentos de diferentes poblaciones con hábitos y costumbres según sus nacionalidades (Zaixso *et al.*, 2015, Cifuentes Lemus *et al.*, 1997). Estos organismos se alimentan por medio de filtración no selectiva del agua que los rodea, utilizando el plancton como principal fuente de alimento (Muñoz *et al.*, 2008). Esta forma de alimentación, favorece la contaminación de los mejillones, por microorganismos de distintos orígenes que se encuentren en las aguas que bañan las costas donde se desarrollan (García, 2010).

En ocasiones los desagües cloacales son eliminados sin el debido tratamiento a lo largo de las costas en donde crecen naturalmente los moluscos (Muñoz *et al.*,

2008). Los sitios de desembocadura, de estos desagües, están sujetos a procesos de depuración natural como son los de absorción por los animales marinos, sedimentación, aglomeración sobre las partículas en suspensión, luz solar incidente, temperatura, salinidad y productos bactericidas (Wood, 1979). Como consecuencia, los organismos bivalvos se convierten en potenciales reservorios de microorganismos patógenos de origen fecal o no. Tales como, los que pertenecen a la familia Vibrionaceae: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Aeromonas*, u otros como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y virus entéricos. Estos patógenos se encuentran íntimamente relacionados a casos de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), provocando gastroenteritis agudas y otras complicaciones sistémicas (García, 2010; Barris, 2005).

La bahía de San Julián, en la provincia de Santa Cruz, Argentina incluye una gran variedad de ambientes aptos para la maricultura. Sin embargo, estas aguas podrían estar contaminadas por la influencia de aves de la región y el hombre. Este ecosistema, donde se sitúa la ciudad de San Julián, incluye un sector interno de marismas y un sector externo con islas en las que se hallan colonias de aves marinas, principalmente pingüinos y

cormoranes, y abundantes poblaciones intermareales de mejillones (Zaixso *et al.*, 2015). Los bancos de mariscos allí ubicados, principalmente de mejillones, no han sido evaluados microbiológicamente.

Dada la importancia de los bivalvos, como rubro representativo de grandes perspectivas futuras de explotación y comercialización y los antecedentes que los involucran en brotes de afecciones entéricas asociadas a su consumo, se planteó como objetivo, analizar la calidad bacteriológica de aguas y mejillones en áreas potencialmente aptas para acuicultura, de la bahía de San Julián, provincia de Santa Cruz, Argentina.

Materiales y métodos

Área de estudio.

La ciudad de Puerto San Julián se sitúa en la bahía homónima. Este accidente

geográfico mide 20 Km. de largo por 8,8 Km en su parte más ancha aproximadamente. Es una entrada de mar profunda ubicada entre cabo Curioso y Punta Desengaño en la provincia de Santa Cruz, Argentina. La bahía termina en su parte interna en un amplio saco que queda mayormente expuesto durante la marea baja. La zona terrestre aledaña se puede definir como una vasta estepa con un régimen de lluvias escaso (Roig, 1998).

Se realizaron 4 campañas estacionales de muestreo, entre Septiembre de 2006 y Junio de 2007 en el área de la bahía San Julián. En cada estación del año, se analizaron muestras de agua en 11 sitios de la bahía localizados en los puntos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 17 y 18 (**Fig. 1**).

Se cosecharon mejillones en puntos preestablecidos por la existencia de bancos naturales de mejillones (**Tabla I**).

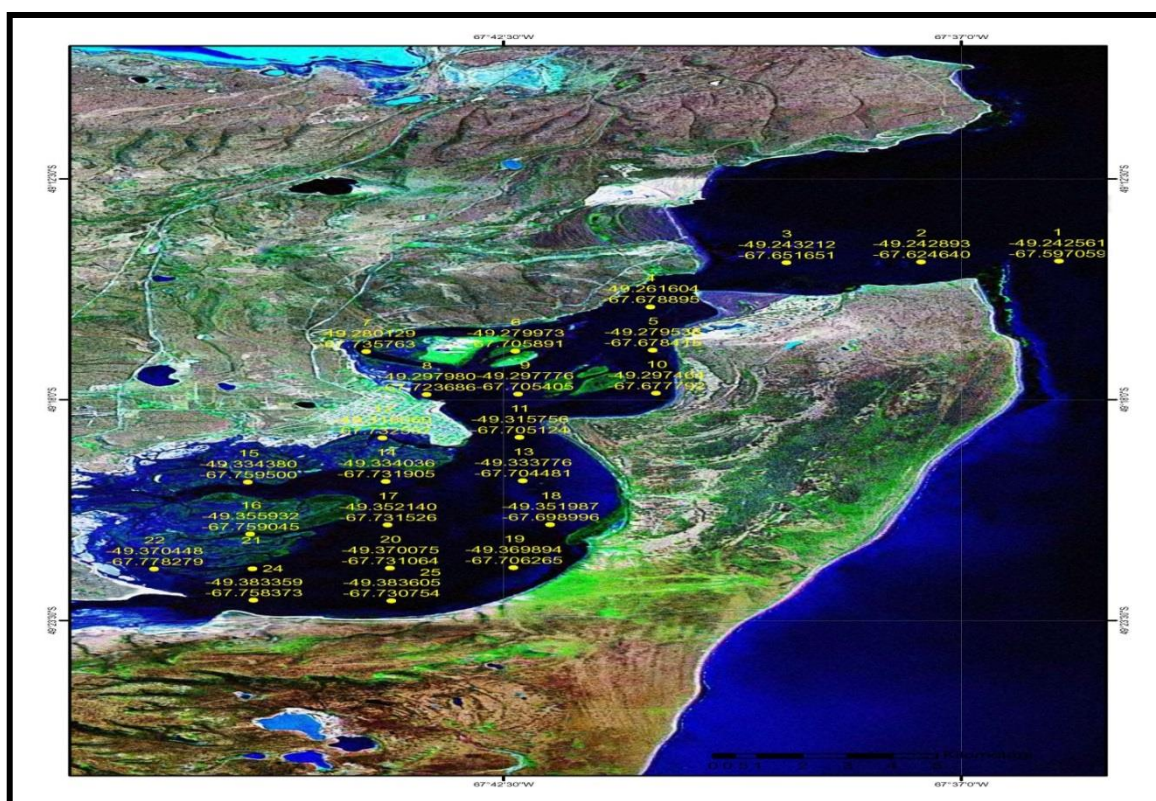


Figura 1. Distribución de los sitios muestreados del área de la Bahía San Julián.
Figure 1. Distribution of sampled sites from San Julian Bay.

Tabla I. Coordenadas geográficas de las estaciones de muestreo de mejillones.
Table I. Geographical coordinates of the mussel sampling stations locations.

Sitio de muestreo	Identificación del sitio	Coordenadas Latitud Sur Longitud Oeste
6	Frigorífico	45° 49' 261604 67° 67' 705891
7	La Mina	45° 49' 280129 67° 67' 735763
8	Punta Caldera	45° 49' 297980 67° 67' 723666
9	Pilotes del Puerto (Muelle)	45° 49' 297776 67° 67' 705405
10	Baliza Cascada	45° 49' 297464 67° 67' 677792
11	Banco Cadena	45° 49' 315758 67° 67' 705124
12	Banco Justicia	45° 49' 297980 67° 67' 732567

Toma y Procesamiento de Muestras

Agua de mar

Para la recolección de las muestras de agua se utilizaron colectores estériles (100 ml), sumergiendo los mismos a 30-40 cm aproximadamente, por debajo de la superficie del agua. Las muestras fueron conservadas y procesadas dentro de las 24 horas.

Se realizaron recuentos de número más probable (NMP) de bacterias coliformes totales, termotolerantes y de *E. coli*. Para ello se aplicó el método de fermentación en tubos múltiples según las técnicas normalizadas por APHA (1994). Los resultados se expresaron como NMP por 100 ml de agua de mar. Se confirmó la presencia de *E. coli*, mediante aislamiento en EMB e identificación de sus características fenotípicas (ICMSF, 1980).

Mejillones

Se colectaron al azar por cada área, muestras de mejillones de 50 unidades muestrales cada una. La longitud mínima de cada mejillón fue de 8 cm. Los mismos fueron colocados en bolsas plásticas estériles con cierre hermético rotuladas y transportadas en refrigeración. Las mismas fueron procesadas dentro de las 24 horas.

Se efectuaron los siguientes análisis bacteriológicos de mejillones y líquido intervalvar:

Determinación de coliformes totales, termotolerantes y E. coli en 100 g de mejillones: Se limpiaron las valvas para eliminar restos de material depositados sobre ellas y se removió su contenido. Se procesaron 100g de carne y líquido intervalvar. La preparación de las muestras y la metodología para la determinación de coliformes totales y termotolerantes, se realizaron de acuerdo a las especificaciones de Donovan *et al.* (1998), utilizando caldo lauril sulfato y verde brillante respectivamente. A partir de este último se confirmó la presencia de *E. coli* aplicando la misma metodología que para agua y se obtuvo el NMP/100g.

Determinación de Salmonella: Se determinó la presencia, en 25 g de marisco, mediante técnicas de preenriquecimiento y enriquecimiento en caldo lactosado y tetrionato respectivamente (ICMSF, 1980). Para el aislamiento fueron utilizados los medios: agar Hektoen y agar Verde Brillante. Las colonias típicas y de interés se transfirieron a medios de identificación preliminar. A cada cepa seleccionada se la identificó bioquímicamente y

mediante pruebas serológicas para determinar el serotipo.

Clasificación de las zonas de producción

Los resultados obtenidos se interpretaron en función de los niveles establecidos por la legislación vigente, para las áreas de extracción de moluscos bivalvos. La resolución SAGPyA N° 829/2006 numeral 23.24.2.4 determina las áreas de extracción de los moluscos bivalvos (MB) en zonas A, B y C según los parámetros microbiológicos (**Tabla II**).

La misma resolución en el numeral 23.24.4 dispone los requisitos de higiene para la extracción y comercialización de MB. Para el aspecto microbiológico, establece valores de recuentos de *E coli* ≤ 230 NMP/100g y ausencia de *Salmonella* sp. en 25 g de carne de molusco. Se suma a este criterio de clasificación el análisis de compuestos químicos: pesticidas, derivados del petróleo, fosforados, clorados y metales pesados y biotoxinas (Gentile *et al.*, 2012).

Tabla II. Destino de los moluscos bivalvos según la clasificación de la zona de extracción en Argentina.
Table II. Destination of bivalve molluscs according to the extraction zone classes, in Argentina.

Zona	<i>Escherichia coli</i>	Destino
A	≤ 230 NMP/100g	Extracción de moluscos bivalvos para el consumo humano directo
B	≤ 4600 NMP/100g	Comercialización como moluscos bivalvos previo paso por centro de depuración o zona de reinstalación*
C	≤ 46000 NMP/100g	Comercialización como moluscos bivalvos tras su reinstalación durante un periodo prolongado que asegure su inocuidad*.

Referencias: * Los productos provenientes de zonas B o C pueden destinarse al consumo humano previo tratamiento térmico.

Análisis estadístico

Para el análisis, los datos se transformaron a logaritmo en base 10 (log₁₀ NMP/100 g o 100 ml). Los mismos se expresaron como promedios ± desviación estándar (DS).

Para examinar el grado de asociación existente entre las densidades de los grupos bacterianos estudiados, se realizó un análisis de correlación. Se calcularon

los coeficientes de correlación no paramétricos de Spearman`s y Kendall`s. El nivel de significación escogido fue de 0,05 (α= 0,05). De acuerdo a la distribución de las variables, paramétricas y no paramétricas, se aplicó el test de ANOVA. La probabilidad p<0.05 se consideró estadísticamente significativa (Pagano & Gauvreau, 2001).

Mapas de isolíneas

Aplicando los Sistemas de Información Geográfica (SIG) como herramienta, se aplicó un programa de interpolación de los resultados para la obtención de mapas de isolíneas de concentración. Se ubicaron los puntos geográficamente de acuerdo a la concentración de coliformes termotolerantes y se trazaron isolíneas de máxima concentración bacteriana en aguas de la Bahía San Julián en color rojo y de mínima en verde.

Resultados

La distribución estacional de los recuentos promedios, de los grupos bacterianos estudiados, se observan en la **Tabla III**.

Los recuentos en agua no mostraron diferencia significativas entre los sitios analizados en la bahía ($p > 0,05$). Se determinó la presencia de *E.coli* en el 39% de las muestras de agua analizadas.

Los resultados en agua de mar, se reflejaron en un gráfico de isolíneas de

concentración de bacterias, que permitió observar la disminución de las concentraciones de coliformes termotolerantes desde la costa hacia el mar abierto (**Fig. 2**). Las isolíneas de máxima muestran áreas de mayor concentración bacteriana en acuíferos.

Por otra parte, en mejillones, los valores de coliformes termotolerantes y *E.coli* fueron significativamente diferentes según el lugar de procedencia ($p < 0,05$), siendo superiores en los cosechados en las cercanías de la ciudad.

En el 65 % de muestras de mejillones fueron cosechadas en sitios cercanos a las desembocaduras cloacales existentes en la ciudad de Puerto San Julián. En ellas se confirmó la presencia de *E. coli*.

Por otra parte, en el 9 % del total de muestras de mejillones se aisló *Salmonella Enteritidis*. Este patógeno se aisló en dos de 7 muestras analizadas durante la campaña desarrollada en primavera en los sitios denominados Frigorífico y La Mina.

Tabla III. Distribución estacional de los recuentos de coliformes totales, termotolerantes y *E. coli*.
Table III. Seasonal distribution of total and thermotolerant coliforms and *E. coli* counts.

Estación	Agua (\log_{10} del NMP/100ml)				Mejillones (\log_{10} del NMP/100g)			
	Invierno	Primavera	Verano	Otoño	Invierno	Primavera	Verano	Otoño
Temperatura Promedio °C	5	9.7	14,2	6	5	9.7	14,2	6
Número de muestras	11	11	11	11	5	7	5	6
Coliformes totales	0,75	0,027	0,69	0,57	1,71	2,54	2,17	1,88
Coliformes termotolerantes	0,02	SD	0,37	0,51	1,70	1,44	2,02	1,15
<i>E.coli</i>	SD	SD	0,30	0,51	1,60	1,44	1,88	1,15

Referencia: SD, sin desarrollo.

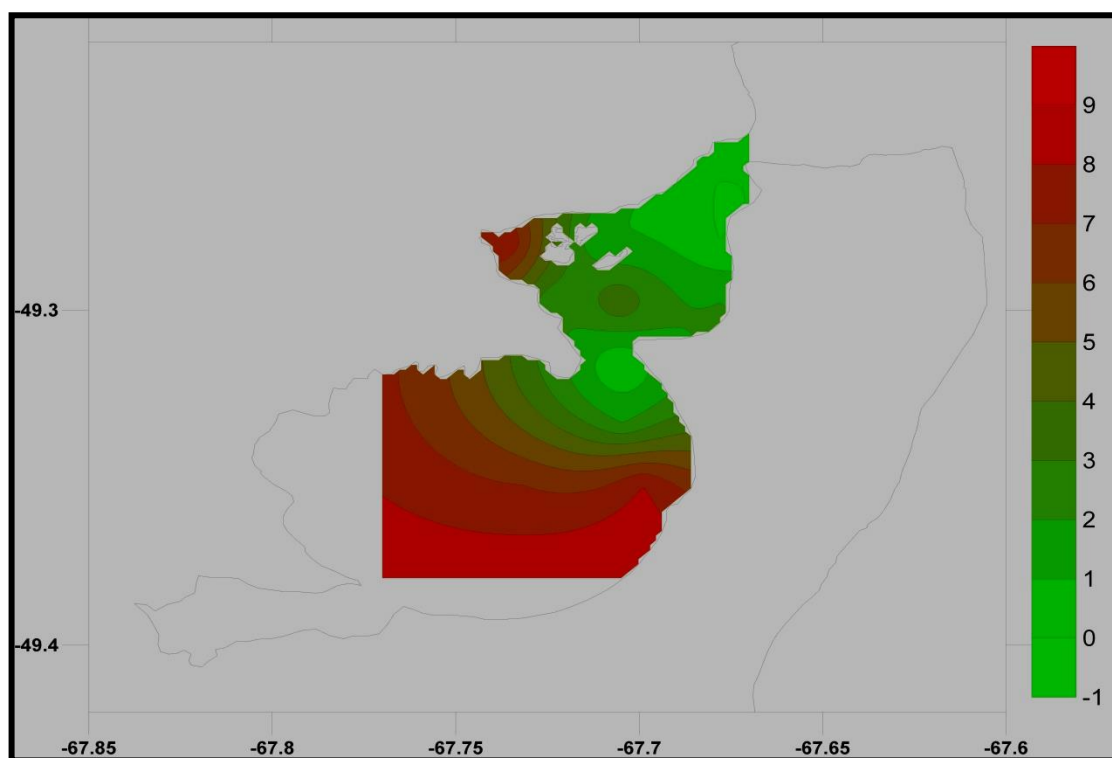


Figura 2. Isolíneas de concentraciones de coliformes termotolerantes en agua de la bahía San Julián.
Figure 2. Concentration isolines of thermotolerant coliforms present in samples of water collected from San Julian Bay.

Discusión

Los coliformes termotolerantes son indicadores de contaminación fecal y junto a los recuentos de *E.coli* en 100 g de carne de mejillón se utilizan para clasificar las zonas de extracción de bivalvos (SAGPYA, 2006). El gráfico de isolíneas permitió mapear datos puntuales y mostrar el aumento y disminución de la concentración de coliformes termotolerantes. Se registraron los niveles más elevados en las zonas cercanas al puerto, que coincidentemente fue la más cercana al desagüe de los efluentes líquidos de la ciudad, que se observaron en los sitios 6, 7, 8, 9 y 10. Sin embargo, los valores de NMP no exceden los admitidos por la reglamentación Nacional vigente para calificar a la bahía en conjunto como zona de extracción de moluscos bivalvos para el consumo humano directo, categoría A (SAGPyA, 2006).

Además, la contaminación costera existente a lo largo de las costas de la bahía debido a la actividad antrópica, se vio reflejada en los niveles de coliformes termotolerantes en mejillones que fueron, en general, entre 2 y 6 veces superiores a los valores de agua. De igual manera, esto se expone en otros estudios realizados previamente en los que se asocia este efecto a la bioconcentración en bivalvos debido a sus mecanismos de

alimentación (Alvarez *et al.*, 2002). Otros autores han estimado que el factor de concentración de microorganismos, en carne de moluscos bivalvos alcanza entre 7 y 15 veces a las medidas en agua (Muñoz *et al.*, 2008; García, 2010).

Por otra parte las fluctuaciones observadas en los valores de recuento de coliformes totales y termotolerantes en las distintas muestras, podrían deberse a la influencia de otras variables como: cambios habituales de las condiciones ambientales (la temperatura, las mareas, la irradiación, la salinidad, el pH, el oxígeno disuelto o productos químicos) o bien a variaciones temporales de las cargas bacterianas contaminantes que se eliminan en las costas (Alvarez *et al.*, 2002). Por lo tanto se podría considerar que otras variables, no controladas en este estudio, podrían haber influido en las diferencias observadas en los recuentos a lo largo de este estudio.

El consumo de bivalvos frescos, sin previa cocción, es muy común en algunas comunidades extranjeras principalmente de hábitos y costumbres trasandinas, pudiendo significar un riesgo potencial de brotes por enfermedades gastrointestinales. Por ello es importante el control microbiológico en los sitios de cosecha de mejillones (Cifuentes *et al.*, 1997).

Durante este trabajo no se detectó la presencia de *Vibrio* y *E.coli* O157:H7 en ninguna de las muestras, mediante los procedimientos de enriquecimiento y aislamiento desarrollados.

Sin embargo, se recuperaron diferentes miembros de la familia Enterobacteriaceae considerados en la bibliografía como patógenos verdaderos y oportunistas (Basualdo *et al.*, 2006). Entre los microorganismos enteropatógenos de importancia clínica se pudo aislar en mejillones, extraídos durante la campaña realizada en primavera en los sitios denominados frigorífico y La Mina, la presencia de *Salmonella Enteritidis*. La escasa recuperación de este patógeno *Salmonella* y otros como *Vibrio* podría asociarse a su ausencia o a que estos mismos estarían en bajos niveles y que el método utilizado no fue efectivo para detectarlos o bien, que se encontraban en estado viable no recuperable (Barris, 2005).

Se ha demostrado que la mortalidad de los coliformes, de *E.coli* y de las salmonelas varía según las condiciones ambientales, ya que aumenta con la luz solar incidente y la temperatura. Los informes señalan que los valores de T_{90} (tiempo necesario para la reducción del 90 % de una población bacteriana) varían entre media hora y 20 horas, según las condiciones. Además la salinidad del

agua del mar y los productos metabólicos del fitoplancton ejercen un efecto bactericida sobre los gérmenes termotolerantes. Estos últimos están sujetos a diversos procesos de absorción por los animales marinos, sedimentación, aglomeración sobre las partículas en suspensión y acción de la luz solar incidente (Wood, 1976).

De acuerdo a las concentraciones, expresadas en N.M.P / 100g de mejillones, 87 % de las muestras cumplieron con los requisitos de higiene para la extracción y comercialización de moluscos bivalvos. Las restantes podrían destinarse al consumo humano previo tratamiento térmico.

Considerando las reglamentaciones utilizadas para la interpretación de la calidad microbiológica de bivalvos y agua de extracción, los mismos serían clasificados aptos como zonas para el ejercicio de la acuicultura, contraponiéndose con la detección de patógenos verdaderos y oportunistas para el hombre.

Las notables diferencias observadas entre las muestras de mejillones y agua, demuestran la importancia de ambos estudios en paralelo para mejorar la calidad y complementar el control de la salubridad en las zonas de producción.

Por lo expresado, sería prudente la continuidad de los controles con una

frecuencia quincenal, según establece la reglamentación, dado que las variaciones antes mencionadas pueden hacer que la clasificación de las zonas puedan fluctuar, por lo que es necesario un estricto control en el tiempo de los lugares de cosecha.

Conclusiones

Los resultados del análisis bacteriológico para los mejillones y de las agua de extracción de los mismos, en la bahía San Julián, cumplirían con los requisitos de higiene establecidos por las reglamentaciones vigentes, en Argentina. Los sitios estudiados serían clasificados aptos como zonas de producción de moluscos bivalvos, considerándose apropiada la aplicación de termoprocesos previos al consumo de los mismos.

Agradecimientos

Al Dr. Héctor Zaixso (QEPD), por su colaboración en la interpretación estadística de los resultados.

Bibliografía

Alvarez C., Gomez J., Garcia A., Juanes JA., Puente A. y Revilla JA. 2002. Desarrollo de un criterio aplicable a la vigilancia de la calidad bacteriológica de las aguas de las zonas de producción de moluscos de la Bahía Santander. *Boletín del Inst. Español de Oceanog.*, **18**: 67-73.

American Public Health Association (APHA), the American Water Works Association (AWWA) & the Water Environment Federation (WEF). 1994. Standard Methods for the examination of water and wastewater. Franson M.A. (ed), American Public Health Assoc., Washington, D.C.

Barris Y. F. 2005. Determinación del Perfil Microbiológico de la Almeja (*Lucina Pectinata Gmelin*, 1791), del Ostión de Mangle (*Crassostrearhizophorae Guilding*, 1828) y las Aguas de Extracción de Bivalvos de la Zona Suroeste de Puerto Rico. Tesis de Maestría. Universidad de Puerto Rico.

Basualdo J., Coto C. y De Torres R. 2006. Microbiología Biomédica. Editorial Atlante. 2ª edición. Argentina. 36-57pp.

Cifuentes Lemus J. L., Torres García P. & Frías M. 1997. Procesos de adaptación de los organismos marinos para la fijación y la locomoción. En: El océano y sus recursos IV. Las ciencias del mar: oceanografía y biología. México. Disponible en

<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/menú.htm/>

Donovan T. J., Gallacher S., Andrews N. J., Greenwood M. H., Gram J., Russell J. E., Roberts D. & Lee R. 1998. Modification of the standard method used in the United Kingdom for counting *Escherichia coli* in live bivalve molluscs. *Communic. Dis. and Public Health*, **1**: 188-196.

García R.S. 2010. Niveles de coliformes totales y *Escherichia coli* en bivalvos de interés comercial *Ostrea columbiensis* y *Mytella guyanensis* (Molusca: bivalvia) como bioindicador de contaminación microbiológica en el estero Puerto Hondo, Provincia del Guayas – Ecuador. Tesis de Magister en Ciencias con Énfasis en Manejo Sustentable de Recursos Bioacuáticos y Medio Ambiente. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Guayaquil.

Gentile C., Alvarez M. & Duffard R. 2012. Manual de buenas prácticas de manufactura (BPM) para Moluscos Bivalvos. Consejo Federal de Inversiones. Argentina.

International Commission of Microbiological Specifications for food (ICMSF). 1980. Microorganismos de los alimentos. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas. Ed. Acribia, Zaragoza, España.

Muñoz D., Graü de Marín C. Villalobos L.B., Martínez C. & Zerpa A. 2008. Indicadores bacterianos en los mejillones de *Perna perna* (LINNÈ, 1758) y *P. viridis* (LINNÈ, 1758) y en las aguas de extracción de bivalvos procedentes de la costa norte y sur del estado de Sucre, Venezuela. *Rev. Científ., FCV-LUZ*, **18**: 595-606.

Pagano M. & Gauvreau K. 2001. Fundamentos de Bioestadística. International Thomson Editores S.A. México

Roig F. A. 1998. La vegetación de la Patagonia. En Correa M. N. (ed.). Flora Patagónica (Parte I). Colección Científica Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria 8, Buenos Aires.48-166 pp. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPYA). 2006. Decreto 4238, Capitulo XXIII, Reglamento Sanitario de Explotación y Comercialización de Moluscos y Bivalvos Vivos para el Consumo Humano, Resolución N° 829/2006. Argentina.

Wood P. C. 1979. Manual de higiene de los mariscos. Editorial Acribia. Zaragoza. España.

Zaixso H.E., Boraso A., Pastor C., Lizarralde Z.I., Dadón J. & Galván D. 2015. El bentos costero patagónico. En H. Zaixso & Boraso de Zaixso A. (eds), La zona costera patagónica argentina:

comunidades biológicas y geología.

EDUPA, Eds, Argentina: 43-152 pp.

Clave de campo para reconocer hierbas y arbustos frecuentes del monte patagónico, Argentina

Field key for recognizing frequent herbs and shrubs of the monte patagónico, Argentina

Cynthia C. González¹, Magdalena Llorens^{1,2}

¹ Laboratorio de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales, UNPSJB-Sede Trelew. 9 de julio y Belgrano, 3er piso, CP 9100, Trelew, Chubut, Argentina

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

Correspondencia: cynthiacgonzalez@yahoo.com.ar

Resumen: La presente clave proporciona una herramienta para el reconocimiento a campo de las especies más frecuentes del Monte Patagónico. Abarca 108 especies del monte austral, que comprende las regiones del noreste de Chubut y el sudeste de Río Negro, y fue elaborada en base a las formas biológicas que presentan las plantas y los caracteres vegetativos y reproductivos de mayor relevancia. Permite reconocer 1 especie de gimnosperma, 3 especies de helechos, 86 especies de eudicotiledóneas (incluyendo 5 especies de cactus y 3 árboles) y 18 especies de monocotiledóneas.

Palabras clave: Clave, Flora, Monte, Patagonia.

Abstract: This key provides a tool for recognition field of the most common species of Patagonian Mont. It covers 108 species of the southern mountain, comprising the northeastern regions of Chubut and Southeast Black River, and was developed based on biological forms that present plants and vegetative and reproductive traits more relevant. We can recognize 1 species of gymnosperms, 3 species of ferns, 86 species of eudicotyledoneas (including 5 species of cactus and 3 species of trees) and 18 species of monocots.

Keywords: Flora, Patagonia, Monte, Key

Introducción

El Monte es una provincia biogeográfica que se extiende por el Oeste de Argentina, desde el Valle de Santa María en Salta hasta el Noreste de Chubut. Abarca el centro de Catamarca y La Rioja, centro y Este de San Juan, Mendoza, Neuquén y Río Negro, Oeste de La Pampa, y Noreste de Chubut. El rasgo climático sobresaliente en esta vasta área es la aridez, y en particular, en la zona más austral del monte las precipitaciones varían entre 80 y 200 mm anuales, superando raramente estos valores (Cabrera, 1971, 1994).

A pesar de la extensión que presenta esta provincia biogeográfica y la heterogeneidad de suelos, la vegetación es muy uniforme tanto en su fisonomía como en su composición florística. El tipo de vegetación predominante es el matorral o estepa arbustiva xerófila. También hay bosquecillos de algarrobos o de sauces, que se desarrollan en las márgenes de los cursos de agua o en valles con napas freáticas poco profundas (Cabrera, 1971; León *et al.*, 1998).

En cuanto a las especies que caracterizan el Monte, se destaca la presencia constante de las “jarillas”, arbustos pertenecientes a la familia Zygophyllaceae. Las especies con mayor

distribución en el Monte son *Larrea divaricata* Cav. (jarilla hembra), *Larrea cuneifolia* Cav. (jarilla macho) y *Larrea nitida* Cav. (jarilla fina). Estas plantas alcanzan uno o dos metros de altura, crecen esparcidas, dejando claros donde se desarrollan hierbas en las épocas propicias (Forcone y González, 2014). Además de las especies de jarillas citadas, en el Monte Patagónico crece también *Larrea ameghinoi* Cav. (jarilla rastrera).

En el Monte, las jarillas se encuentran asociadas entre sí y con otros arbustos como el *Prosopis alpataco* Phil. (alpataco), *Monttea aphylla* (Miers.) Benth & Hook (mata sebo), *Bougainvillea spinosa* (Cav.) Heimerl (monte negro), *Senna aphylla* (Cav.) Irwin & Barneby (pichana) y *Chuquiraga erinaceae* Don. (chirriadora), entre otros. Otros componentes importantes del Monte son las Cactáceas, gramíneas y otras plantas herbáceas, algunas de ellas geófitos.

La bibliografía disponible suele resultar inaccesible y de difícil comprensión para las personas no especializadas en la temática (Correa, 1969, 1971, 1978, 1984a-b, 1988, 1998, 1999; Zuloaga *et al.*, 1994; Zuloaga y Morrone, 1996, 1999a-b; Zuloaga, Belgrano y Anton,

2012, 2014 a y b; Anton y Zuloaga, 2012 a y b, 2013; Zuloaga, Rugolo y Anton, 2012; Zuloaga, Morrone y Belgrano, 2008). Esta clave de campo pretende constituir una herramienta de fácil acceso y comprensión para todas aquellas personas interesadas en reconocer las especies nativas de la región.

Materiales y Métodos

Para la elaboración de la clave de campo se recorrió el noreste del Chubut y el sureste de Río Negro, realizando identificación de especies en diferentes estaciones de año a fin de detectar cuáles son los caracteres más comunes de observar, y con utilidad sistemática. El material colectado fue ingresado al Herbario Trelew, perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco con Sede en la ciudad de Trelew (Chubut), que se encuentra registrado en el *Index Herbariorum* bajo la sigla HTW. Además, se revisaron ejemplares registrados en dicho herbario, sumando un total de 1554 especímenes estudiados.

Los especímenes estudiados corresponden a 109 especies distribuidas en 37 familias botánicas. Los mismos se incluyen en 2 familias de Monilophyta: Pteridaceae (5 especímenes) y

Blechnaceae (3 especímenes); 1 familia de Gnetophyta Ephedraceae (42 especímenes); y Anthophyta, con 4 familias de Monocotilénneas: Alliaceae (1 especímen), Iridaceae (2 especímenes), Amaryllidaceae (1 especímen) y Poaceae (118 especímenes), y 30 familias de Eudicotilédneas: Amaranthaceae (56 especímenes), Anacardiaceae (22 especímenes), Apiaceae (19 especímenes), Asteraceae (416 especímenes), Boraginaceae (30 especímenes), Brassicaceae (9 especímenes), Cactaceae (12 especímenes), Calceolariaceae (14 especímenes), Calyceraceae (11 especímenes), Capparaceae (4 especímenes), Euphorbiaceae (31 especímenes), Fabaceae (182 especímenes), Frankeniaceae (12 especímenes), Geraniaceae (13 especímenes), Loasaceae (19 especímenes), Lythraceae (6 especímenes), Malvaceae (20 especímenes), Nyctaginaceae (22 especímenes), Oleaceae (20 especímenes), Onagraceae (15 especímenes), Orobanchaceae (9 especímenes), Plantaginaceae (42 especímenes), Polygalaceae (28 especímenes), Rhamnaceae (26 especímenes), Rosaceae (27 especímenes), Santalaceae (23 especímenes), Solanaceae (77

especímenes), Tropaeolaceae (32 especímenes), Verbenaceae (84 especímenes) y Zygophyllaceae (100 especímenes). Para consultar detalles de los especímenes, ver **Tabla 1**.

Para la identificación de las plantas se utilizaron los nombres de las familias aceptados en el Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (Zuloaga *et al.*, 2008). Las designaciones tradicionales para los nombres de las familias: Compositae, Cruciferae, Gramineae, Leguminosae, Umbelliferae, han sido reemplazadas por las aceptadas en publicaciones más recientes (Judd *et al.* 2007; Thorne, 2008; APG IV, 2016) como Asteraceae, Brassicaceae, Poaceae, Fabaceae y Apiaceae, respectivamente.

En los sistemas de clasificación más recientes el género Calceolaria, antiguamente dentro de la familia Scrophulariaceae, ha sido reubicado en la familia Calceolariaceae (Zuloaga *et al.*, 2008), y la familia Chenopodiaceae se ubica dentro de Amaranthaceae (Judd *et al.* 2007; Thorne, 2008; APG IV, 2016).

Las especies seleccionadas para el presente trabajo fueron las más frecuentes y abundantes observadas durante las tareas de campo.

La clave presentada es un clave artificial ya que no refleja un orden sistemático, en todos los casos se alcanza hasta nivel de

especie excepto en la familia Poaceae donde se presentan 3 taxones de rango genérico (*Bromus* spp. y *Hordeum* spp.) por exhibir una gran cantidad de especies, difíciles de determinar a campo.

Resultados y Discusión

Se presenta una clave de campo para reconocer arbustos y hierbas frecuentes del monte austral (Noreste de Chubut y Sureste de Río Negro), basada en caracteres vegetativos y reproductivos. Los principales caracteres utilizados de cada una de las especies, consideran, su forma biológica (hierba, arbusto o árbol), color de tallos, presencia/ausencia de espinas, forma de las hojas, color de las flores, tipo de inflorescencia y tipos de frutos.

Fueron incluidos un total de 108 especies que representan a 37 familias botánicas, distribuidas en las divisiones Monilophyta (2 familias y 3 especies), Gnetophyta (1 familia y 1 especie), Anthophyta con Monocotilénneas (4 familias y 18 especies) y Eudicotiledóneas (30 familias y 86 especies), **Tabla 1**.

La familia mejor representada por el mayor número de especies es Asteraceae (26 especies), acompañada por Fabaceae (7 especies), Zygophyllaceae (5 especies) y Verbenaceae (4 especies).

Tabla1: Lista de especies y especímenes estudiados para la elaboración de la clave.

Familia	Especie	Especímenes
Pteridaceae	<i>Adiantum chilense</i> Kaulfuss	Forcone s/n; Ayestarán s/n; González 413; Mavrek 11294
	<i>Cheilantes glauca</i> (Cav.) Mettenius	González 419
Blechnaceae	<i>Blechnum hastatum</i> Kaulfuss	González 335, 414, 418,
Ephedraceae	<i>Ephedra ochreate</i> Miers	Forcone 367, 696 y 755; González 1, 151, 163, 174, 300, 519 y 782; Mavrek 133, 215, 4445, 4600, 4601, 5436, 5576, 5577, 5614, 5615, 5756, 6089, 6570, 8238, 8276, 8212, 8276, 8286, 8350, 8398, 8399, 9045, 9185, 9248, 9333, 9352, 9876, 9922, 10057, 10207, 10208, 10324.
Alliaceae	<i>Tristagma patagonicum</i> (Bak) Tranb.	Forcone 1357
Iridaceae	<i>Olsynium junceum</i> (E. Mey. ex C. Presl) Goldblatt	Forcone 19; González 30
Amaryllidaceae	<i>Rhodophiala mendocina</i> (Wright) Traub	Forcone 621
Poaceae	<i>Bromus</i> spp.	González 12, 319, 351; Mavrek 575, 578
	<i>Bromus berteroi</i> Colla	Mavrek 8446
	<i>Bromus catharticus</i> var. <i>rupestris</i> (Speg.) Planchuelo et Peterson	Ayestarán 22; Forcone 773; Mavrek 178, 8340, 8216, 8240, 8588, 9161
	<i>Bromus catharticus</i> Vhal. var. <i>catharticus</i>	Forcone 129; Mavrek 177, 8655
	<i>Bromus coloratus</i> Steud.	González 462, 596
	<i>Bromus setifolius</i> Presl.	González 546, 595
	<i>Bromus tectorum</i> L.	Mavrek 8445
	<i>Cortadeira sellowiana</i> (Schult. Y Schult.) Asch. et Graebn	Mavrek 78
	<i>Distichlis scoparia</i> (Kunth.) Arechav.	Ayestarán 11, 12; González 360, 506, 727, 851, 862
	<i>Distichlis spicata</i> (L.) Greene	Ayestarán 8; González 952
	<i>Sporobolus rigens</i> (Trin.) Desv.	Aramayo 4418; Mavrek 82, 489, 577
	<i>Eremium erianthus</i> (Phil.) Seberg et Linde-Laursen	Forcone 772; González 14, 377, 860; Mavrek 8217, 8241, 8250, 8602, 8720, 9162
	<i>Nassella tenuis</i> (Philippi) Barkwotr	Ayestarán 21, 28; Forcone 484, 776; González 299, 381; Mavrek 83
	<i>Pappostipa humilis</i> (Cav.) Romanchesco	Forcone 727, 770; González 455, 607, 826
	<i>Pappostipa speciosa</i> (Tin. et Rupr.) Romaschenko	Ayestarán 20, 27, 30 Forcone 359, 768, 769; González 456, 471, 818, 829, 951, 953; Mavrek 85
	<i>Jarava neaei</i> Nees ex. Steudel	Forcone 728, 771; González 380, 560; Mavrek 84, 9134
	<i>Schismus barbatus</i> (L.) Tell.	Mavrek 8222, 8266, 8352, 8362, 8451, 8889, 8931
	<i>Poa ligularis</i> Nees ex. Steud.	Forcone 774, 726; González 152; Mavrek 8041
	<i>Poa lanuginosa</i> Poir.	Ayestarán 19, 26; González 459; Mavrek 8144
	<i>Hordeum</i> spp.	González 21
<i>Hordeum comosum</i> Presl.	Forcone 767, González 451, 469, 853	
<i>Hordeum jubatum</i> L.	Mavrek 8641	
<i>Hordeum murinum</i> L.	Mavrek 79, 443. 490, 491, 492, 8202, 8218, 8314, 8341, 8447, 8589	
<i>Hordeum patagonicum</i> (Hauman) Covas	Mavrek 8929	
<i>Hordeum procerum</i> Nevski	Mavrek 181	

	<i>Hordeum stenostachys</i> Godron	Ayestarán 29; Forcone 551
	<i>Vulpia australis</i> (Nees ex. Steud) Blom	González 16, 861, Mavrek 8191, 8477, 8450
Amaranthaceae (incluye Chenopodiaceae)	<i>Atriplex lampa</i> (Gill. et Moq.) Dietrich	Forcone 141, 413, 542; González 36, 37, 201, Mavrek y González 7347, 7288; Mavrek 4527, 4528, 4570, 4638, 4845, 4946, 5366, 5476, 6452, 7432, 7469
	<i>Atriplex sagittifolia</i> Speg.	Forcone 325, 1537, 1538, 1596; González 206, 427, 8028, Mavrek y González 7290, Mavrek 340, 747, 4421, 4503, 5085, 5411, 5654, 3580, 7470, 8924
	<i>Atriplex semibaccata</i> R. Brown*	Forcone 1333; Mavrek 10700
	<i>Suaeda divaricata</i> Moquin	Forcone 140, 394; González 38; Mavrek 127, 372, 2288, 4391, 4398, 4573, 3407, 5453, 8313; Mavrek y González 5010, 7337
	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin y Clemants	Mavrek 1856, 3270, 4777
Anacardiaceae	<i>Schinus johnstonii</i> Barkley	Forcone 409, 538, 618; González 124, 161, Mavrek 502, 1223, 1503, 1855, 2267, 2402, 7241, 7278, 7303, 7428, 7435, 8701, 8869, 9067, 9099, 10245, 10650, 11295.
Apiaceae	<i>Mulinum spinosum</i> (Cav.) Pers.	Forcone 49, 690, 775, 2164, González 64, 368, 676; Mavrek 503, 1225, 1917, 2120, 4744, 5464, 5600, 5682, 5723, 6031, 6130, 6428
	<i>Baccharis darwinii</i> Hooker et Arnott	Forcone 774, 1081, 1234, 1436, 1489; González 86, 573, 883; Mavrek 4355, 5430, 5793, 5817, 5873, 6068, 6448, 7437, 9125, 9810, 9914, 10091, 10154, 10195, 10249, 10286; Mavrek y González 10573
	<i>Baccharis divaricata</i> Haumann	Forcone 278; Mavrek 562, 1750, 4174, 5118, 5119, 5157, 8767, 8768, 9038, 9056, 9057, 9292, 9339, 9799
	<i>Baccharis salicifolia</i> (Ruiz et Pavon) Person	Forcone 668; Mavrek 106, 368, 396, 809, 4754, 5182, 5404, 10813
	<i>Baccharis spartioides</i> (Hook. et Arn.) Rémy	Mavrek 174, 358, 1456, 1602, 3387, 3390, 4745, 4753, 7381, 8060, 10822
	<i>Brachyclados lycioides</i> Don	Forcone 741; González 948; Mavrek 2193, 2376, 3495, 4116, 4213, 4589, 4614, 4798, 5524, 5565, 5604, 5661, 5687, 5728, 6018, 8390, 8769, 8841, 8941, 8967, 9202, 10092
	<i>Brachyclados megalanthus</i> Speg.	Forcone 297, 1206; González 94, 198, 627, 881, 943; Mavrek 6440, 8608, 8770, 8808, 8872, 8899, 9101, 10191, 10250; Mavrek y González 8196
	<i>Chuquiraga aurea</i> Skottsberg	González 550, 878; Mavrek 4828, 2876, 5686, 5845, 5944, 5987, 6070, 6242, 7439, 6103, 8177, 9068, 9079, 9102, 9242, 9995; Mavrek y González 6453, 6583, 6596
	<i>Chuquiraga avellanadae</i> Lorentz	Forcone 207, 399, 368, 508; González 173, 545, 582, 871, 873; Mavrek 1753, 1924, 4067, 4230, 4240, 4250, 4590; Mendoza 2449; Sandoval 4631
	<i>Chuquiraga erinacea</i> D. Don ssp. <i>erinacea</i> Don	Forcone 591; Mavrek 1217, 1264, 1983, 4128, 4965, 7465, 10765, 10784, 10794, 10815
	<i>Chuquiraga gaerinacea</i> D. Don ssp. <i>hystrix</i> (Don) C. Ezcurra	González 674, 684, 869; Mavrek 162, 511, 711, 1240, 1685, 2377, 4188, 4799, 4829, 4861, 7244, 10124, 10297
	<i>Cyclolepis genistoides</i> Don	Forcone 459; González 93, 153, 194, 870, 872, 8197; Mavrek 151, 505, 739, 792, 1922, 2268,

		3388, 3477, 3528, 2569, 4068, 4591, 4615, 5489, 5644, 5662, 8368, 8576, 8744
	<i>Grindelia brachystephana</i> Griseb.	Forcone 398, 667, 192, 513, 1639; González 876; Mavrek 355, 583, 958, 1241, 4247, 4658, 8056, 8116, 8306, 8746, 8753, 9084, 9795, 10655; Mavrek y González 5001, 9144
	<i>Grindelia chilensis</i> (Cornel.) Cabrera	Forcone 139, 397, 702, 1282 González 92, 200, 513, 900; Mavrek 465, 542, 564, 1506, 1927, 1955, 3493, 4150, 5732, 5733, 5852, 6157
	<i>Grindelia patagonica</i> Bartoli et Tortosa	González 96, 428, 877, 882; Mavrek 7378, 8024, 8901, 9058, 9083, 9104, 9176, 9227, 9276, 9340b, 9813, 10096, 10187, 10539,
	<i>Gutierrezia solbrigii</i> Cabrera	Beeskow y Duró 8061, 8063; Forcone 1539; Mavrek 2379, 5466, 5511, 5525, 5541, 5567, 5608, 5664, 6033, 6096, 6449, 7466
	<i>Hyalis argentea</i> Hook. et Arn.	Forcone s/n, 787 Mavrek 1270, 8775, 10709, 10795
	<i>Hysterionica jasionoides</i> Willdenow	Forcone 1277; Mavrek 4736, 4958, 4970, 5603, 8612, 8903, 9842, 10090, 10253, 10698, 10722, 10731, 10785
	<i>Mutisia retrorsa</i> Cav.	Forcone 295, 458, 747, 1620; González 78, 215, 304, 554, 8573; Mavrek 213, 4257, 4801, 5735, 6106, 8811, 8944, 9040, 9107, 9710
	<i>Nardophyllum chiliotrichoides</i> (Remy) Gray	Forcone 296, 705, 753, 1214; González 843, 889; Mavrek 90, 2345, 4152, 4595, 5421, 6021, 6072, 6133, 6207, 8945, 9041, 9108, 9207; Sandoval 4632
	<i>Nassauvia chubutensis</i> Speg.	González 901; Mavrek 201, 1698, 3455, 5184, 6063, 6245, 9230; Mendoza 3276
	<i>Nassauvia glomerulosa</i> (Lag. Ex Lindl.) D. Don	Forcone 689, 722, 745; González 781 Mavrek 512, 388, 2083, 3970, 4726, 4802, 4862, 9042; Mendoza 2454; Sandoval 4633
	<i>Nassauvia ulicina</i> (Hook.) Macloskie in Scott	Forcone 746, 943; González 90; Mavrek 111, 732, 1509, 1926, 1960, 2084, 3971, 4069, 4086, 4118, 4522, 4616, 5491, 5542, 4659, 6004, 6073, 6292
	<i>Perezia recurvata</i> (Vahl) Less.	Forcone 757; González 91, 164, 544, 630, 879; Mavrek 1236, 2347, 3972, 4733, 5322, 6176, 9934, 10924
	<i>Senecio filaginaoides</i> D.C.	Forcone 138, 627, 713, 714, 715, 716; González 85, 611, 880, 899; Manriquez 1492; Mavrek 131, 719, , 3575, 4596, 6166, 6324, 6893
	<i>Senecio subulatus</i> Don	Forcone 1276, 1633; Mavrek 1582, 1581, 5513
	<i>Senecio subulatus</i> var <i>erectus</i> Hook. et Arn.	Mavrek 3558, 5611, 5649, 5692
	<i>Senecio subulatus</i> var <i>subulatus</i> Don ex Hook. et Arn.	Mavrek 565, 4168, 4175, 5512
Boraginaceae	<i>Amsinkia calycina</i> (Morris) Chatter	Beloso 8078; Beeskow y Duró 8096; Forcone 144, 625; González 106, 213, 548; Mavrek 122, 404, 470, 4415a, 5055, 5088, 5693, 10099
	<i>Pectocarya linearis</i> (Ruiz et Pavón) D.C.	Forcone 549; González 83, 338, 350; Mavrek 121, 547, 3425, 7309, 8260, 8394, 8348, 5150, 5695, 10202, 10289
Brassicaceae	<i>Lepidium draba</i> L. *	Beloso y Duró 8106; Forcone 104, 319, 674, 1474; González 115, 369, 392; Mavrek 7982
Cactaceae	<i>Austrocactus patagonicus</i> (Weber)	González 988

	Backeb.	
	<i>Gymnocalycium gibbosum</i> (Haw) Pfeiffer	Forcone 1275; González 989; Mavrek 5697
	<i>Maihuenia patagonica</i> (Phil.) Britton et Rose	Forcone 721; Mavrek 7333, 10388
	<i>Maihueniopsis darwinii</i> (Hansl.) Ritter	Mavrek 6158, 6159, 8184, 9089
	<i>Pterocactus australis</i> (Web) Backeberg	Mavrek 5744
Calceolariaceae	<i>Calceolaria polyrrhiza</i> Cav.	González 70, 530; Mavrek 3520, 3521, 4514, 3522, 5219, 7271, 7319, 7341, 9752, 9761, 10394, 10591
Calyceraceae	<i>Boopis anthemoides</i> Jessieu	Forcone 111; González 73, 875; Mavrek 152, 515, 714, 745, 797, 3529, 5544, 8814
Capparaceae	<i>Capparis atamisquea</i> Kuntze	Forcone 584, 788; Mavrek 4119, 4132
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia collina</i> Phil.	Forcone 628, 720; González 100, 171, 203, 549, 578, 944; Mavrek 1248, 2521, 2476, 3347, 7367, 10291, 10302
	<i>Colliguaja integerrima</i> Gilles et Hooker	Forcone 751, 1082; González 162, 431, 934; Mavrek 436, 1703, 4029, 4215
	<i>Stillingia patagonica</i> (Speg.) Pax et Hoffmann	González 99, 499, 10552, 10568; Mavrek 8974, 10303, 10304
Fabaceae	<i>Adesmia candida</i> Hook.	Forcone 13,14, 29, 69, 294, 711, 718, 734, 1607; L.M.S. s/n°; Mavrek 148, 478, 750, 3507, 4061, 4602, 4547, 4504, 4832, 5368, 5398, 5413, 5496, 5669, 5704, 6453, 7472, 7488, 5991, 8058, 9211a, 10213, 10265, 10327; Sandoval 4643
	<i>Cercidum praecox</i> Hams.	Forcone 1601; González 687; Mavrek 3563, 3585, 4120
	<i>Geoffroea decorticans</i> (Gill.) Burkt.	Forcone 1450; Mavrek 1275, 1791, 4135, 10701; Oistel R. 3967
	<i>Glycirrhiza astragalina</i> Gillies ex Hook. et Arn.*	Forcone 185, 282, 381, 638; Mavrek 5389, 9014, 1732
	<i>Hoffmannsseggia erecta</i> Phil.	Forcone 291, 455, 626, 1602; González 98, 180, 628; Mavrek 4975, 5313, 5498, 5515, 5531, 5548, 5581, 5633, 5670, 5705, 5757, 5993, 6009, 6111, 6138
	<i>Hoffmannsseggia glauca</i> Eifert	Cabeza G. 3728; González 678, 969; Mavrek 1616, 1984, 2387, 3583, 4974
	<i>Hoffmannsseggia trifoliata</i> Cav.	Forcone 41, 42, 28, 73, 135, 395, 761, 1608; González 97, 976; Mavrek 5370, 5499, 5549, 5671, 5758, 5805, 5824, 5994, 6010, 6077, 6112, 6188, 6298, 6313
	<i>Prosopidastrum striatum</i> (Benth.) Palacios et Hoc	Forcone 371, 785, 786; González 7, 8, 155, 706; Mavrek 2406, 4145, 4251, 4447, 4506, 4619, 5500, 5532, 5550, 5582, 5616, 5706, 5995, 6139
	<i>Prosopis alpataco</i> Phil.	Forcone 370, 389; González 32, 178, 705; Mavrek 1274, 1518, 1690, 1934, 2386, 3509, 4134, 4603, 4576, 4976, 5478, 5707
	<i>Prosopis denudans</i> Bentham	Forcone 562, 748, 1213; González 33, 707, 708; Mavrek 4734, 4865, 4866, 4867, 4868, 4869, 4881, 4882, 5414, 5583, 5708; Sandoval 4642
<i>Senna aphylla</i> (Cav.) H. S. Irwing et Barneby	Forcone 132, 781; González 65, 179, 210; Mavrek 108, 518, 589, 1588, 2061, 3549, 4144, 4191, 5312, 5477, 5497, 5547, 5985, 8372; Rukavina 2061	
Frankeniaceae	<i>Frankenia patagonica</i> Speg.	Forcone 50, 323, 1621; González 984, 10341; Mavrek 4883, 5551, 7406, 7449, 9851, 9951,

		9975
Geraniaceae	<i>Erodium cicutarium</i> (L.) L Her ex Aiton*	Forcone 114, 412, 550, 670, 1563; González 119; Mavrek 421, 480, 728, 801, 2035, 2091, 2156
Loasaceae	<i>Blumenbacchia dissecta</i> (Hook. et Arn.) Weigend et Grau	Forcone 732, 1211, 1564; Mavrek 167, 6189, 6266, 8977, 9790
	<i>Loasa bergii</i> Hieronymus	Beloso y Duró 338; Forcone 731, 1408; González 344; Mavrek 3517, 4507, 5124a, 5440, 6217b, 7450, 9018,
Lythraceae	<i>Pleurophora patagonica</i> Speg.	Mavrek 6142, 6191, 9049, 9074, 9318; Sandoval, F. 4646
Malvaceae	<i>Lecanophora chubutensis</i> (Speg.) Rodrigo	Forcone 390, 765; González 10, 8133; Mavrek 204, 8784, 8978, 9020, 10307
	<i>Sphaeralcea mendocina</i> Philippi	Beloso y Duró 8091; Forcone 148; González 958, 8627; Mavrek 208, 2112, 7491, 9159, 9923, 9311, 10771
Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea spinosa</i> (Cav.) Heimerl in Engler	Forcone 25, 26, 760, 1205; González 41, 441, 625, 626, 784; Mavrek 530, 2113, 3532, 4217, 4449, 4531, 4466, 4510, 4647, 5792, 6080, 10219; Sandoval 4647
Oleaceae	<i>Menodora robusta</i> (Benth.) A. Gray	Forcone 15, 16, 117, 461, 673; González 68, 185; Mavrek 134, 753, 1520, 3442, 4450, 4532, 4605, 7408, 8143, 8424, 9075, 9884, 9976
Onagraceae	<i>Oenothera odorata</i> Jacquin	Forcone 28, 67, 264 González 122, 442, 8134; Mavrek 521, 2523, 4765, 5268, 5298, 8134, 8405, 8886, 9191
Orobanchaceae	<i>Orobanche chiensis</i> (Phil.) Beck	Forcone 686; González 189, 581, 677; Mavrek 722, 4884, 4937, 9299, 9357
Plantaginaceae	<i>Plantago patagonica</i> Jacquin	Forcone 33, 315, 698, 785; González 71, 207, 238, 431, 633, 785; Mavrek 135, 484, 571, 754, 783, 1253, 1521, 4136, 4423, 4606, 4452, 4533, 4511, 4620, 4668, 5153, 5329
	<i>Monttea aphylla</i> (Miers) Benth et Hook.	Forcone 586, 784, 1181, 1283; González 69, 8625; Mavrek 5658, 8355, 8375, 7454, 8384, 8821, 8863, 10721, 10810
Polygalaceae	<i>Bredemeyera microphylla</i> (Griseb.) Hieron	Forcone 24, 157, 1565; González 10172; Mavrek 3539, 4084, 4456, 4470, 5212, 7452, 9723, 9926, 10136, 10270
	<i>Moninna dyctiocarpa</i> Grisebach	González 42, 231, 345, 632, 942; Mavrek 4183, 4512, 5485, 8410, 8427, 8910, 10162, 10228, 10334
Rhamnaceae	<i>Condalia microphylla</i> Cav.	Forcone 565, 783, 1280; Mavrek 2375, 3587, 4138, 4245, 4550, 4985, 5592, 8117, 8224, 8244, 8328, 8354, 8373, 8374, 8759, 8861, 8956, 10229, 10703, 10772
	<i>Discaria americana</i> Gilles et Hooker	Forcone 737; Mavrek 4225, 5112
Rosaceae	<i>Tetraglochin alatum</i> (Gill. ex Hook. et Arn.) Kuntze	Forcone 723, 775; González 517, 10452, 10453; Mavrek 9026, 10230, 10232, 10355
	<i>Tetraglochin caespitosum</i> Philippi	Forcone 704; González 117, 160, 890; Mavrek 1259, 2307, 2320, 3540, 4075, 8225, 8245, 8290, 8329, 8428, 9053, 9217, 9360; Mavrek y González 8203
Santalaceae	<i>Arjona tuberosa</i> Cav.	Forcone 38, 39, 40, 763; González 118, 123, 147, 202, 343, 518, 675, 933, 946; Mavrek 2199, 2262, 4513, 5241, 5419, 5510, 5554, 5780, 5842, 5868
Solanaceae	<i>Fabiana denudate</i> Miers	Forcone 64, 298, 676, 688, 762; González 212
	<i>Lycium ameghinoi</i> Speg.	Forcone 539, 632, 672; Mavrek 4541, 5177, 6304, 8145, 8159, 8170, 8269, 8321, 8330,

		8430
	<i>Lycium chilense</i> Miers ex Bertero	Forcone 352, 429, 648, 791, 792, 928; González 233, 985; Mavrek 56, 137, 377, 1792, 9065, 9098
	<i>Lycium chilense</i> var <i>chilense</i> Miers.	Forcone 697; González 695; Mavrek 428a, 762, 813, 4387, 5381b, 7273, 8291
	<i>Lycium chilense</i> var <i>comberi</i> Bernar.	Mavrek 6319, 6347, 6363, 6399, 7320, 9908, 9953, 9963; Mendoza 2432
	<i>Lycium chilense</i> var <i>descolei</i> Barkley	Mavrek 1706, 4238, 4254, 7506, 9076; Sandoval 4651
	<i>Lycium chilense</i> var <i>filifolium</i> Bernar.	Mavrek 4253, 4384, 4542, 4551, 4560, 4586, 4587, 4791, 4986, 5381a, 5403a
	<i>Lycium chilense</i> var <i>minutifolium</i> Barkley	Forcone 131; Mavrek 716, 802, 4870, 5178, 8226, 8331, 9219, 9304
Tropeolaceae	<i>Tropaeolum porifolium</i> (Cav.) L. Anderson et S. Anderson	Forcone 65, 780; González 40, 4414, 8128, 8127; Mavrek 2043, 2106, 4426, 4427, 4459, 4517, 4518, 5038, 5039, 5062, 5063, 5099, 5100, 5179, 5220, 5784, 5785, 7301, 7302, 7352, 8127, 8271, 9763, 10167, 10412, 10596
Verbenaceae	<i>Acantholippia seriphioides</i> (A. Gray) Moldenke	Forcone 218, 404, 687, 1600; González 102, 169, 182, 236, 341, 683; Mavrek 2371, 3484, 3525, 4460, 4472, 6320, 6437, 7481, 8961, 8984, 9122, 9197, 9220, 9364, 9901, 10619
	<i>Junellia seriphioides</i> Moldenke	Mavrek 1988, 8150, 8895, 9939, 10637
	<i>Junellia tonini</i> (Kuntze) Moldenke var. <i>mulinoides</i> (Speg.) Múlgura et P. Peralta	Forcone 692, 764; González 805; Mavrek 114, 383, 528, 763, 764, 2115, 4545, 4871, 5018, 5222, 5333, 5627, 5789, 5639, 6148, 7353, 7427, 8151, 8152
	<i>Mulguraea ligustrina</i> (Lag.) N. O'Leary et P. Peralta var. <i>ligustrina</i>	Forcone 1, 4, 5, 22, 47, 123, 411, 612; González 67, 228, 239, 574; Mavrek 107, 382, 432, 527, 1260, 1531, 2398, 4405, 4462, 4474, 4519, 8792, 8866, 8985, 9054, 9123, 9169, 9221, 10462,
Zygophyllaceae	<i>Larrea ameghinoi</i> Speg.	Forcone 487, 629; González 3, 487, 629, 964, 10139; Mavrek 3485, 4184, 4520b, 4735, 4811, 4847, 4857, 4888, 4950, 5224, 5640, 6017, 6456, 8386, 9223, 9252, 9728, 9946, 9967, 10314
	<i>Larrea cuneifolia</i> Cav.	Forcone 1027, 1180, 1613; González 141; Mavrek 1794, 4123, 4165, 4171, 4953, 8365, 8381, 8825, 8867, 10802
	<i>Larrea divaricata</i> Cav.	Forcone 75, 76, 164, 372, 507, 563, 1605; González 2, 184, 216, 367, 429, 724, 783; Mavrek 1787, 1795, 2400, 4430, 4624, 4750, 4792, 4837, 4954, 5560, 5597, 5629, 5641, 5659, 5679, 4097, 6002, 7460, 7483
	<i>Larrea nitida</i> Cav.	Forcone 70, 72, 115, 700, 1453; González 4, 211, 430, 685, 686; Mavrek 116, 4859, 4889, 4955, 5309, 5598, 5642, 5719, 5790, 6170, 9253, 7355, 7461, 7483, 9365, 9730

Las 3 especies indicadas con * corresponden a especies introducidas, que fueron incluidas en la clave por encontrarse naturalizadas y ser muy frecuentes en toda la región.

Clave de campo

- 1-Árboles, arbustos, subarbustos ocactus: **2**
- 2- Arbustos, subarbustos o cactus: **3**
- 3- Plantas suculentas, cactus: **4**
- 4- Tallos cilíndricos, más altos que su diámetro. Flores rosadas:
Austrocactus patagonicus
- 4'- Tallos hemisféricos, ovoides o cilíndricos de menos de 5 cm dediámetro: **5**
- 5- Plantas en cojines densos: **6**
- 6- Tallos ovoides en artejos. Flores anaranjadas: *Maihueniopsis darwinii*
- 6'- Tallos cilíndricos, nunca ovoide en artejos. Flores blancas o rosadas. Nunca anaranjadas: *Maihuenia patagónica*
- 5'- Plantas nunca en cojines: **7**
- 7- Aréolas con gloquidios. Espinas cilíndricas: *Pterocactus australis*
- 7'- Aréolas sin gloquidios: *Gymnocalycium gibbosum*
- 3'- Plantas no suculentas. Arbustos o subarbustos: **8**
- 8- Plantas con tallos verdes fotosintetizantes: **9**
- 9- Arbustos con estróbilos microsporangiales o megasporangiales (dioicos), sin fruto, con tallos fotosintetizantes provistos de hojas escuamiformes: *Ephedra ochreatea*
- 9'-Arbustos con flores y frutos: **10**
- 10- Arbustos espinosos: **11**
- 11- Arbustos con flores en cabezuela, fruto legumbre: *Prosopidastrum striatum*
- 11'- Arbustos con flores nunca en cabezuela: **12**
- 12- Arbustos con flores amarillas: **13**
- 13- Plantas de 100 a 300 cm de altura. Fruto legumbre: *Cercidum praecox*
- 13'- Plantas hasta 100cm de altura. Fruto cápsula:
Bredemeyera microphylla
- 12'- Arbustos con flores blanquecinas. Tallos terminando en una espina.
- Aspecto articulado: *Discaria americana*
- 10'- Arbustos nunca espinosos: **14**
- 14-Con inflorescencia en umbela, flores amarillas, hojas divididas en tres segmentos espiniformes: *Mulinum spinosum*
- 14'-Inflorescencia nunca en umbela, con otro tipo de inflorescencia: **15**
- 15- Flores en capítulos: **16**

- 16 - Plantas con tallos estriados, con líneas verdes y grises:
Cyclolepis genistoides
- 16´ - Plantas con tallos nunca estriados. Completamente verdes: **17**
- 17- Flores marginales liguladas blancas, y flores del disco tubulosas amarillas:
Gutierrezia solbrigii
- 17´ - Todas las flores tubulosas blanquecinas ó amarillentas: **18**
- 18- Plantas de 50 a 100 cm de altura: *Baccharis spartioides*
- 18´ - Plantas de 30 a 50 cm de altura: **19**
- 19-Plantas áfilas.Capítulos sésiles: *Baccharis divaricata*
- 19´ - Plantas hojosas. Capítulos pedunculados: *Baccharis darwinii*
- 15´ - Flores nunca en capítulos: **20**
- 20- Flores en espigas axilares: *Stillingia patagónica*
- 20´ - Flores nunca en espigas axilares: **21**
- 21- Plantas con flores amarillas, o blanquecinas: **22**
- 22-Fruto legumbre: *Senna aphylla*
- 22´ - Fruto nunca legumbre: **23**
- 23- Tallos rígidos, cubiertos por puntos: *Menodora robusta*
- 23´ - Tallos nunca rígidos, flores tubulares blanquecino-amarillentas ubicadas en el extremo de las ramas: *Fabiana denudata*
- 21´ - Plantas con flores de color violeta: *Monttea aphylla*
- 8´ - Arbustos con tallos grises, blancos, marrones o rojos. Nunca verdes: **24**
- 24- Plantas espinosas: **25**
- 25- Espinas foliares: **26**
- 26- Plantas sin crecimiento heteroblástico: **27**
- 27- Ápice de las hojas terminando en 3 espinas: *Nassauvia chubutensis*
- 27´ - Ápice de las hojas terminado en una única espina: **28**
- 28- Hojas lanceoladas u ovadas con espinas axilares:
Chuquiraga avellanadae
- 28´ - Hojas cilíndrico-aciculares, margen involuto, sin espinas axilares: **29**
- 29- Plantas de más de 100 cm de altura. Capítulos cilíndricos solitarios pseudo-axilares, con 5 a 10 flores: *Chuquiraga erinacea*
- 29´ - Plantas bajas, hasta 50 cm de altura. Capítulos ovoides solitarios en el extremo de las ramas con 12 o más flores: *Chuquiraga aurea*
- 26´ - Plantas con crecimiento heteroblástico: **30**

30- Planta de hasta 15-20 cm de altura:	
	<i>Junellia tonini</i> var. <i>mulinoides</i>
30'- Plantas de 50 a 80 cm de altura:	<i>Junellia seriphioides</i>
25'- Espinas caulinares:	31
31- Espinas bífidas:	<i>Bougainvillea spinosa</i>
31'- Espinas nunca bífidas:	32
32- Plantas hasta 50 cm de altura:	33
33- Plantas con hojas compuestas:	<i>Adesmia candida</i>
33'- Plantas con hojas simples:	34
34- Capítulos con 1 a 3 flores:	<i>Nassauvia ulicina</i>
34'- Capítulos con 5 flores:	<i>Nassauvia glomerulosa</i>
32'- Plantas de más de 1 m de altura:	35
35- Fruto baya o drupa:	36
36- Fruto baya de color rojo:	37
37- Ramas espiniformes rígidas y rectas, hojas carnosas.	
Corola tubulosa:	<i>Lycium ameghinoi</i>
37'- Ramas flexibles inermes poco espinosas, hojas no carnosas. Corola infundibuliforme:	<i>Lycium chilense</i>
36'- Fruto drupa:	38
38- Arbusto resinoso. Hojas dimórficas (redondeadas, ovobadas u oblongas) con nervadura central inconspicua:	<i>Schinus johnstonii</i>
38'- Arbusto no resinoso. Hojas isomorfas (elípticas a elíptico-ovobadas) con nervadura central conspicua:	<i>Condalia microphylla</i>
35'- Fruto legumbre:	39
39- Una espina por nudo:	<i>Prosopis denudans</i>
39'- Dos espinas por nudo:	<i>Prosopis alpataco</i>
24'- Plantas no espinosas:	40
40- Flores agrupadas en capítulos:	41
41- Plantas resinosas:	42
42- Plantas de 30 a 100 cm de altura:	43
43- Hojas ovobadas, espatuladas:	<i>Grindelia patagonica</i>
43'- Hojas ovadas, lanceoladas:	<i>Grindelia chilensis</i>
42'- Plantas de 25 a 40 cm de altura:	<i>Grindelia brachystephana</i>
41'- Plantas no resinosas:	44

- 44- Arbustos con ramas rígidas, densamente hojosos: **45**
 45- Planta de 10-60 cm de altura. Involucro menor a 10
 mm de diámetro: ***Brachyclados lycioides***
 45´- Planta de 100-150 cm de altura. Involucro de 20 a 28
 mm de diámetro: ***Brachyclados megalanthus***
 44´- Arbustos con ramas delicadas: **46**
 46- Plantas de 50 a 100 cm de altura: **47**
 47- Plantas con hojas y tallos de color grisáceo:
Senecio filaginaoides
 47´- Plantas con hojas y tallos de color verde:
Senecio subulatus
 46´- Plantas de 100 a 200 cm de altura:
Baccharis salicifolia
 40´- Flores nunca agrupadas en capítulos: **48**
 48- Plantas resinosas o con látex blanco: **49**
 49- Hojas simples, fruto cápsula:
Colliguaja integerrima
 49´- Hojas lobuladas, fruto esquizocárpico: **50**
 50- Hojas con dos lóbulos, fruto con
 pelos blancos: ***Larrea divaricata*** (lóbulos profundamente divididos), y ***Larrea cuneifolia***
 (lóbulos levemente divididos).
 50´- Hojas multilobuladas, fruto sin
 pelos blancos: **51**
 51- Plantas de hasta 10 cm de altura:
Larrea ameghinoi
 51´- Plantas de 150 a 200 cm de
 altura: ***Larrea nitida***
 48´- Plantas nunca resinosas, ni con látex: **52**
 52- Hojas de color ceniciento. Fruto
 contenido entre dos brácteas: **53**
 53- Hojas plegadas sobre el nervio central
 y con el eje arqueado: ***Atriplex lampa***
 53´- Hojas nunca plagadas sobre el nervio
 central: **54**

- 54- Plantas de hasta 100cm de altura:
Atriplex sagittifolia
- altura: 54'- Plantas tendidas de < 20cm de
Atriplex semibaccata *
- 52'-Hojas de color verde, fruto nunca
 contenido entre dos brácteas: **55**
- 55- Flores en capítulos:
Nardophyllum chiliotrichoides
- 55'- Flores nunca en capítulos: **56**
- 56- Plantas de más de 100 cm de altura: **57**
- 57- Ramas rígidas de sección tetragona.
 Hojas nunca cilíndricas. Flores tubulares amarillo-rojizas:
Mulguraea ligustrina
- 57'- Ramas divergentes. Hojas
 semicilíndricas. Flores poco visibles: *Suaeda divaricata*
- 56'- Plantas de 10 a 50 cm de altura: **58**
- 58-Hojas glandulosas: **59**
- 59-Hojas 3 lobadas, aromáticas:
Acantholippia seriphioides
- 59'- Hojas no lobuladas,
 romboidales: *Frankenia patagonica*
- 58'- Hojas no glandulosas: **60**
- 60- Flores pequeñas, inconspicuas: **61**
- 61- Planta de 4-20 cm de altura:
Tetraglochin caespitosum
- altura: 61'- Planta de hasta 100 cm de
Tetraglochin alatum
- 60'- Flores llamativas, rosadas o
 violáceas: **62**
- 62- Flores rosadas, delicadas,
 fruto cápsula: *Pleurophora patagonica*
- 62'- Flores violeta, fruto sámara:
Moninna dyctiocarpa
- 2'- Arboles o arbustos extremadamente grandes (3-4 mts de altura): **63**

63- Corteza exfoliante:	<i>Geoffroea decorticans</i>	
63´- Corteza no exfoliante:		64
64- Tallos verdes fotosintetizantes:	<i>Cercidium praecox</i>	
64´- Tallos nunca verdes:	<i>Capparis atamisquea</i>	
1´-Hierbas:		65
65- No forman flores, ni tienen semilla:		66
66- Esporangios sobre el margen reflexo de las hojas (pseudoindusio):	<i>Adiantum chilense</i>	
66´- Esporangios nunca ubicados sobre el margen de las hojas:		67
67- Esporangios en el extremo o porción distal de las venas. Peciolos castaño oscuro, lustrosos:	<i>Cheilantes glauca</i>	
67´- Esporangios en soros bien definidos (cenosoros) con indusio lateral que se abre hacia el centro de la pinna:	<i>Blechnum hastatum</i>	
65´- Plantas con flores y frutos:		68
68 -Flores en capítulos:		69
69- Flores amarillas o blanquecinas:		70
70-Enredadera, flores grandes amarillas. Hojas runcinadas:	<i>Mutisia retrorsa</i>	
70´- Nunca enredadera, hojas nunca runcinadas:		71
71-Hierba rizomatosa:	<i>Perezia recurvata</i>	
71´- Hierba no rizomatosa:	<i>Hysterionica jasionoides</i>	
69´- Flores violáceas:	<i>Hyalis argentea</i>	
68´- Flores nunca en capítulos:		72
72-Hierbas sin clorofila, blanquecina. Holoparásita:	<i>Orobanche chilensis</i>	
72´- Hierbas con clorofila, verdes:		
73 -Hojas simples:		74
74 - Plantas con pelos urticantes:	<i>Amsinkia calycina</i>	
74´- Plantas sin pelos urticantes:		75
75 - Plantas con látex:	<i>Euphorbia collina</i>	
75´- Plantas sin látex:		76
76 - Fruto en forma de X con ganchos:	<i>Pectocarya linearis</i>	
76´- Fruto nunca en forma de X:		77
77 - Geófitas:		78
78 - Flores anaranjadas:	<i>Rodophyala mendocina</i>	
78´- Flores blancas, con líneas violáceas:	<i>Tristagma patagonicum</i>	

77'- Nunca geófitas:	79
79- Plantas de hojas no envainadoras:	80
80- Corola amarilla, con labios inflados y cóncavos:	
	<i>Calceolaria polyrrhiza</i>
80'- Corola blanca, nunca inflada:	81
81- Inflorescencia en espiga. Hierba arrosetada:	
	<i>Plantago patagonica</i>
81'- Inflorescencia nunca en espiga:	82
82 -Flores con perigonio tubuloso:	<i>Arjona tuberosa</i>
82'- Flores no tubulosas:	83
83- Hierba rizomatosa. Fruto aquenio:	<i>Olsynium junceum</i>
83'- Hierba no rizomatosa:	84
84- Flores amarillas, grandes, con hebras de viscina	
(aspecto apolillado):	<i>Oenothera odorata</i>
84'- Flores blancas, pequeñas, sin hebras de viscina:	
	<i>Lepidium draba</i> *
79'- Plantas de hojas envainadoras, lineares en muchos casos involutas, inflorescencia compleja cuya unidad es la espiguilla (uni o multiflora), fruto cariopse:	85
85-Plantas robustas, mayores a 150cm de altura:	
	<i>Cortadeira sellowieana</i>
85'- Plantas hasta 100 cm de altura:	86
86- Vainas abiertas:	87
87- Vainas imbricadas: <i>Distichlis spicata</i> (de 15 a 40 cm de altura) y <i>Distichlis scoparia</i> (de 5 a 15 cm de altura)	
87'- Vainas no imbricadas:	88
88- Laminas planas con aurículas:	<i>Eremium erianthus</i>
88'- Láminas plegadas, nunca planas ni con aurículas:	89
89 – Laminas junciformes, lígula pestañosa:	
	<i>Sporobolus rigens</i>
89'- Laminas nunca junciformes:	90
90- Laminas convolutas:	91
91- Vainas blanquecinas:	92
92- Lígula de borde truncado:	<i>Nassella tenuis</i>

	92´- Lígula nunca de borde truncado:	
		<i>Pappostipa humilis</i>
	91´- Vainas rojizas, violáceas:	93
	93-Con rizoma y estolones:	<i>Jarava neaei</i>
	93´- Sin rizoma ni estolones:	
		<i>Pappostipa speciosa</i>
	90´- Láminas involutas:	<i>Schismus barbatus</i>
	86´- Vainas cerradas:	94
	94-Vainas completamente cerradas:	95
	95- Vainas pubescentes, láminas planas, lígula muy desarrollada:	<i>Bromus spp.</i>
	95´- Vainas glabras, láminas plegadas: <i>Poa ligularis</i> (en cojines) y <i>Poa lanuginosa</i> (nunca en forma de cojín)	
	94´- Vainas cerradas sólo en las bases:	96
	96- Láminas planas, pubescentes:	<i>Hordeum spp.</i>
	96´- Láminas plegadas, glabras:	<i>Vulpia australis</i>
	73´- Hojas compuestas:	97
	97- Con pelos urticantes:	98
	98- Pétalos amarillo-verdosos:	<i>Blumenbacchia dissecta</i>
	98´- Pétalos anaranjado-amarillentos:	<i>Loasa bergii</i>
	97´- Sin pelos urticantes:	99
	99- Enredadera, flores amarillas, hojas profundamente divididas:	
		<i>Tropaeolum porifolium</i>
	99´- Hierba erecta o postrada, nunca enredadera:	100
	100- Flores reunidas en capítulo:	<i>Boopis anthemoides</i>
	100´- Flores nunca en capítulo:	101
	101- Fruto legumbre:	102
	102- Flores rosadas o violeta:	<i>Glycirrhiza astragalina</i> *
	102´- Flores amarillo-anaranjadas, dispuestas en racimos:	
		<i>Hoffmansseggia spp.</i>
	101´- Fruto nunca legumbre:	103
	103- Flores sin cálculo:	104
	104- Flores de color rosado o liláceas:	105

- 105- Fruto sobre una expansión del receptáculo en forma de plato. Presenta pelos estrellados: *Lecanophora chubutensis*
- 105'- Fruto nunca sobre un plato, esquizocarpico.
- Mericarpos se separan desde el ápice. Sin pelos estrellados: *Erodium cicutarium* *
- 104'- Flores amarillo-verdosas:
- Dysphania ambrosioides*
- 103'- Flores con cálculo: *Sphaeralcea mendocina*

Bibliografía

- Angiosperm Phylogeny Group. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* Volume 181, Issue 1, pages 1–20.
- Anton, A. y Zuloaga, F.O. (Eds.) 2012a. Flora Argentina (Vol. 8) Brassicaceae. IBODA-IMBIV-CONICET-INTA, Córdoba: 271 pp.
- Anton, A. y Zuloaga, F.O. (Eds.) 2012b. Flora Argentina (Vol. 14) Verbenaceae. IBODA-IMBIV-CONICET-INTA, Córdoba: 219 pp.
- Anton, A. y Zuloaga, F.O. (Eds.) 2013. Flora Argentina (Vol. 13) Solanaceae. IBODA-IMBIV-CONICET-INTA, Córdoba: 349 pp.
- Cabrera, A. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. *Bol. Soc. Arg. Bot.* XIV (1-2): 1-30.
- Cabrera, A. 1994. En Dimitri (Dir.) Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería T: 2. Regiones Fitogeográficas Argentinas, Edit. Acmé S.A.C.I. 85 pp.
- Correa, M.V. (Dir.) 1969. Flora Patagónica. Parte II. Typhaceae a Orchidaceae. Colección Científica INTA. Buenos Aires. República Argentina 219 pp.
- Correa, M.V. (Dir.) 1971. Flora Patagónica. Parte VII. Compositae. Colección Científica INTA. Buenos Aires. República Argentina 450 pp.
- Correa, M.V. (Dir.) 1978. Flora Patagónica. Parte III. Gramineae. Colección Científica INTA. Buenos Aires. República Argentina 563 pp.
- Correa, M.V. (Dir.) 1984 a. Flora Patagónica. Parte IVa. Dicotiledóneas Dialipétalas (Salicaceae a Cruciferae). Colección Científica INTA. Buenos Aires. República Argentina 559 pp.
- Correa, M.V. (Dir.) 1984 b. Flora Patagónica. Parte IVb. Dicotiledóneas Dialipétalas (Droseraceae a Leguminosae). Colección Científica INTA. Buenos Aires. República Argentina 309 pp.
- Correa, M.V. (Dir.) 1988. Flora Patagónica. Parte V. Dicotiledóneas. Dialipétalas (Oxalidaceae a Cornaceae). Colección Científica INTA. Buenos Aires. República Argentina 381 pp.
- Correa, M.V. (Dir.) 1998. Flora Patagónica. Parte I. Introducción, Clave general de familias, Pteridophyta y Gimnospermae.

- Colección Científica INTA. Buenos Aires. República Argentina 391 pp.
- Correa, M.V. (Dir.) 1999. Flora Patagónica. Parte VI. Dicotiledóneas Gamopétalas (Ericaceae a Calyceraceae) Colección Científica INTA. Buenos Aires. República Argentina. 536 pp.
- Forcone, A. 2004. Hierbas y arbustos frecuentes en el valle inferior del río Chubut. Una guía ilustrada para su reconocimiento. 1ª Edición. Editorial Universidad Nacional del Sur.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg E.A., Stevens, P.F. y Donoghue, M.J. 2007. Plant systematic. 3º Edición. Sinauer.
- León, R., Bran, D., Collantes, M., Paruelo, J. M. y Soriano, A. 1998. Grandes unidades de vegetación de la Patagonia extra andina. *Ecología Austral* **8**: 125-144.
- Thorne, R. F. 2007. An Updated Classification of the Class Magnoliopsida ("Angiospermae"). *The Botanical Review* **73(2)**: 67-182.
- Zuloaga, F.O., Rugolo, Z., Anton, A. (Eds.) 2012. Flora Argentina (Tomo 3, Vol. I y II) Poaceae. IBODA-IMBIV-CONICET-INTA, Córdoba: 1011 pp.
- Zuloaga, F.O., Belgrano, M. J. y Anton, A. (Eds.) 2014a. Flora Argentina (Tomo 7, Vol. 1). Asteraceae. IBODA-IMBIV-CONICET-INTA, Córdoba: 546 pp.
- Zuloaga, F.O., Belgrano, M. J. y Anton, A. (Eds.) 2014b. Flora Argentina (Tomo 7, Vol. 3). Asteraceae. IBODA-IMBIV-CONICET-INTA, Córdoba: 308 pp.
- Zuloaga, F.O., Belgrano, M. J. y Anton, A. (Eds.) 2015. Flora Argentina (Tomo 15). IBODA-IMBIV-CONICET-INTA, Córdoba: 118 pp.
- Zuloaga, F.O., Nicora, E.G., Rugolo de Agrasar, Z.E., Morrone, O.E., Pensiero, J., Cialdella, A.M. 1994. Catálogo de la Familia Poaceae en la República Argentina. *Monographs of Systematics Botany from the Missouri Botanical Garden* N° 47: 188 pp.
- Zuloaga F.O. y Morrone, O.E. (Eds.) 1996. Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina. Pteridophyta, Gymnospermae y Angiospermae (Monocotyledoneae). *Monographs of Systematics Botany from the Missouri Botanical Garden*, N° 60, 323 pp.
- Zuloaga F.O. y Morrone, O.E. (Eds.) 1999 a. Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina. II. Acanthaceae-Euphorbiaceae (Dicotyledonae). *Monographs of Systematics Botany from the Missouri Botanical Garden*, N° 74, 621 pp.
- Zuloaga F.O. y Morrone, O.E. (Eds.) 1999 b. Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina. II. Fabaceae-Zygophyllaceae (Dicotyledoneae). *Monographs of Systematics Botany from the Missouri Botanical Garden*, N° 74, 622-1269 pp.
- Zuloaga, F.O., Morrone, O. y Belgrano, M. J. 2008. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur de Sudamérica. *Monographs of Systematics Botany from the Missouri Botanical Garden*.

Reproducción de *Adesmia boronioides*, especie aromática y medicinal actualmente cosechada de poblaciones naturales en Patagonia

Reproduction of *Adesmia boronioides*, a medicinal and aromatic plant currently harvested from natural populations in Patagonia Argentina

S.B. Gonzalez¹, L.T. Contardi^{2*}, N.M. Pasquini³.

¹ Cát.de Química Orgánica, Fac.Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia S.J.Bosco (UNPSJB) quim-esq@unpata.edu.ar

^{2*} Universidad Nacional de la Patagonia S.J.Bosco (UNPSJB) - Centro de Investigación y Extensión Andino Patagónico (CIEFAP) lcontardi@ciefap.org.ar.

³Laboratorio Análisis de Semillas, Universidad Nacional de la Patagonia S.J.Bosco (UNPSJB – CIEFAP). UNPSJB, Ruta 259, Km4, (9200) Esquel, Chubut, Argentina.

Resumen: *Adesmia boronioides* Hook f, “paramela” crece en Patagonia Argentina, desde Neuquén hasta Tierra del Fuego. Es una planta que se destaca por su apariencia, olor agradable y extendido uso medicinal en toda la región. El follaje de poblaciones silvestres está siendo recolectado en volúmenes importantes para la extracción de sus aceites esenciales, sin embargo su cultivo no ha sido estudiado. Los objetivos de este estudio fueron generar información sobre la calidad de las semillas y la propagación de la especie. Se recolectaron frutos de dos poblaciones en cercanías de Esquel (Chubut) y se obtuvieron las semillas. Éstas fueron sometidas a una serie de test para determinar características físicas como forma, color, tamaño, peso de mil y número de semillas por kilo, siguiendo la metodología de las normas ISTA (2009). Se aplicaron distintos tratamientos de pre-siembra en laboratorio, se determinó su influencia en el poder germinativo y se obtuvieron plantas en vivero. Las semillas son de forma reniforme, aplanadas; la cubierta seminal es lisa, lustrosa y dura, con manchas negras sobre un verde oliváceo a amarillo ocre. El pretratamiento más efectivo para romper la dormancia de las semillas fue su inmersión en agua a 80 °C. Las plantas cultivadas en vivero a los seis meses de la siembra tenían alturas promedio entre 19 y 23 cm., y diámetros de cuello de 2,3 a 2,6 mm. Esta especie nativa se adapta a ser propagada mediante su cultivo, por la calidad de las semillas y el comportamiento de las plantas obtenidas en etapa de viverización.

Palabras clave: *Adesmia boronioides*, calidad de semillas, paramela, Patagonia, tratamiento pregerminativo.

Abstract: *Adesmia boronioides* Hook. f., “paramela” grows in Argentinian Patagonia, from Neuquén to Tierra del Fuego. Its appearance is remarkable, nice smell and very widespread medicinal use in the region. The aerial parts from natural populations are being used industrially to obtain essential oil, nevertheless its cultivation has not been yet evaluated. The seeds qualities and propagation of this specie has been analysed in this contribution. Fruits from two populations nearby Esquel (Chubut) were collected and the seeds where obtained. These were tested through ISTA rules (2009) about physical characteristics, like shape, colour, sizes, one thousand weigh and number of seed per kilogram. Pre-sowing treatments were applied in laboratory and its germinations influence determined, and nursery plants were obtained. Seeds are kidney-shape, flattened with smooth, bright and hard covering. They are coloured from yellow to olive green with black spots. The most effective pre-sowing treatment to break dormancy was hot water immersion (80 °C). The cultivated plants in nursery were 19 to 23 cm in height and 2.3 to 2.6 mm in stem diameter. It would be feasible to out-planting this native species because of its seeds quality and the healthy seedlings obtained in nursery.

Keywords: *Adesmia boronioides*, paramela, Patagonia, pre-sowing treatment, seed quality.

Introducción

Adesmia boronioides Hook. F, (Fabaceae), es una especie aromática y medicinal nativa de la región Patagónica. En Argentina crece desde Neuquén hasta Tierra del Fuego; formando densas poblaciones, en zonas con altitudes que van desde los 0 a los 1.480 m.s.n.m. (Ulibarri y Burkart, 2000, González et al., 2014). Recibe distintos nombres comunes como paramela, yagneu, té pampa, té silvestre, yerba carmelita (Correa, 1984; Ulibarri y Burkart, 2000). Es un arbusto resinoso de 0.40 a 2 m de altura con glándulas crateriformes notables. Posee un raquis foliar con pelitos erguidos, breves; con folíolos de 4 a 6 mm, obovados, carnosos, glabros, brillantes, con glándulas crateriformes especialmente en el margen y en el envés. Las flores son amarillas, perfumadas, de hasta 10 mm de largo, agrupadas en racimos terminales. Los frutos son lomentos glandulosos, articulados con istmos angostos, integrados por 3 a 5 artejos semicirculares, dehiscentes (Dimitri, 1974; Correa, 1984).

A.boronioides es una planta de uso medicinal popular muy extendido en la región Patagónica, a la que se le atribuyen numerosas y variadas propiedades. Ha sido utilizada para los dolores reumáticos, la caída del cabello (Martínez Crovetto, 1980), sahumero

para las vías respiratorias, como agente digestivo (Silva et al, 2004), para aliviar malestares menstruales y como afrodisíaco (Montes y Wilkomirsky, 1985). Por testeo en laboratorio fue posible comprobar su actividad antiinflamatoria, que daría sustento a uno de sus usos tradicionales para los dolores reumáticos (González, 2003).

Es una planta de aspecto atractivo y de olor muy agradable, por lo que algunas personas la han trasplantado a su jardín, lo cual indicaría su potencial como ornamental. Su valor forrajero es limitado, pero el hecho de ser consumida por los ovinos y equinos demostraría que no es una planta tóxica para el ganado (González S., 2005). En primavera es forraje apetecido por los caballos (Silva et al, 2004).

Los pobladores de los parajes rurales la recolectan para uso propio, por las propiedades anteriormente mencionadas, pero además, desde hace unos años ha comenzado a cosecharse para extraer sus aceites esenciales con fines comerciales. El material vegetal se cosecha en poblaciones naturales de la provincia de Santa Cruz, y la destilación se realiza en la Unidad de destilación de aceites esenciales de la UNPSJB con un ritmo continuo en los últimos años, para usar los aceites esenciales en perfumería.

Cuando se aprovechan poblaciones silvestres de plantas aromáticas y medicinales, como en este caso se debería lograr un uso sustentable en su medio natural, sin poner en riesgo su conservación. En caso contrario los métodos extractivos empleados con frecuencia al recolectar estos recursos etnobotánicos, pueden poner en riesgo su diversidad genética empobreciendo los ecosistemas (Gattuso, 2013; Soria y Basualdo, 2015). Por esta razón es indispensable conducir esfuerzos técnicos en acciones de domesticación de especies útiles, con el propósito de conservar los recursos de la región. Las técnicas de domesticación deben implementar metodologías que logren el manejo de las especies en condiciones similares a su hábitat original.

Las semillas de las especies de leguminosas, como las del género *Adesmia*, se caracterizan por presentar semillas con dormición impuesta por las cubiertas seminales duras que dificultan la germinación. Este sería un mecanismo adaptativo para sobrevivir a condiciones extremas. Aplicando tratamientos de escarificación mecánicos o químicos que eliminen o reduzcan la impermeabilidad de los tegumentos seminales se puede promover la germinación de este tipo de semillas (Parera y Ruiz, 2003; Muñoz y col. 2009). Para la especie *A. boronioides*,

no se cuenta con reportes o antecedentes sobre tratamientos para incrementar la de germinación de las semillas y su posterior manejo agronómico en cultivo, si bien algunos pobladores manifiestan poder tener plantas en su jardines o huertas (Eyssartier y col., 2009). En este artículo se dan a conocer avances sobre la capacidad de germinación de semillas de *A. boronioides* cosechadas en dos sitios cercanos a Esquel (Chubut) y la obtención de plantas en vivero.

Metodología

Obtención y evaluación de las semillas

El material empleado en el proyecto fue cosechado en dos sitios próximos a la localidad de Esquel (Chubut): Cerro La Hoya (42° 50' 28" LS y 71° 15' 21" LO) y Estancia El Refugio (43° 01' 52" LS y 71° 12' 47" LO). Se colectó material durante la fenofase de fructificación, entre febrero y marzo de los años 2010 y 2011.

La cosecha se realizó en forma manual, cortando las ramas fructíferas con tijeras de podar. Los frutos se dispusieron sobre bandejas para su secado a temperatura ambiente en una habitación ventilada, durante al menos una semana. Cuando las legumbres alcanzaron una consistencia papirácea, se procedió a la molienda de las mismas, permitiendo la liberación de las semillas. Posteriormente, mediante un conjunto de tamices se realizó la

separación de los componentes: semillas y materia inerte. Las semillas así obtenidas se conservaron en heladera en recipientes con tapa hasta el momento de su utilización.

Por observación visual, lupa y calibre se realizó la caracterización morfológica de semillas (forma, tamaño y color) y plántulas.

Para estudiar los atributos de calidad de las semillas, se determinó el peso de 1000 semillas, número de semillas por kilo y poder germinativo con evaluación de plántulas. En estos ensayos, se adoptó la metodología general prescripta en las Reglas ISTA (2009). Para eliminar la dormancia de las semillas, se probaron los siguientes tratamientos pregerminativos:

- 1) Testigo: imbibición en agua fría durante 24 hs.
- 2) A80°: agua a 80 °C inicial, manteniendo la imbibición por 24 hs.
- 3) A95°: agua a 95 °C inicial, manteniendo la imbibición por 24 hs.
- 4) S50/1: inmersión en ácido sulfúrico diluido (50%) durante una hora, luego enjuague con abundante agua fría.
- 5) S50/24: inmersión ácido sulfúrico diluido (50%) durante

24 hs. luego enjuague con abundante agua fría.

Posteriormente se sembraron 4 repeticiones de 100 semillas por tratamiento, en bandejas sobre un sustrato de arena esterilizada. Se mantuvieron en cámara de germinación con temperaturas alternas de 25 °C - 20 °C y luz durante 16 horas.

Los datos resultantes se analizaron con ANOVA y para la comparación de medias entre los tratamientos, se aplicó el Test de Tukey, mediante el software estadístico InfoStat (2012).

Obtención de plantines

Para la obtención de plantas en vivero se llevó a cabo una siembra en septiembre de 2010 y otra en noviembre de 2011. En ambas fechas se realizó en almacigueras plásticas, con la metodología tradicional utilizada en la zona para el cultivo de especies y tamaño de semillas afines. El sustrato utilizado fue una mezcla de turba y arena volcánica (proporción 50/50). El método de siembra fue en surcos. Las bandejas se dispusieron en un invernadero. Finalizada la etapa de emergencia, se procedió al trasplante de las plántulas a bandejas de cultivo con celdas individuales. Transcurrida la primera temporada de crecimiento los plantines se trasplantaron nuevamente, para lograr un mayor desarrollo de

raíces. Con el lote sembrado en 2010 se evaluó el repique en otoño a surcos al aire libre; en cambio los plantines del lote de 2011 se trasplantaron a macetas plásticas individuales. Se tomaron datos de alturas y diámetros de cuello.

Registro fenológico en poblaciones silvestres

En el sitio de cosecha La Hoya (Esquel, Chubut) se realizó el seguimiento fenológicos de la población silvestre de *A.boronioides* desde septiembre de 2009 hasta abril de 2012. Se llevaron a cabo observaciones visuales y registros, de un número mínimo de 10 individuos, con una frecuencia quincenal. Las fenofases

registradas fueron: reposo vegetativo, foliación, brotación, floración y fructificación.

Resultados

Obtención y evaluación de las semillas

Las semillas tienen una forma reniforme a obovada, aplanada. La superficie de la cubierta seminal es lisa, lustrosa y dura, con manchas negras sobre un verde oliváceo a amarillo ocre, según la madurez. Las dimensiones promedio son: 2 mm x 3 mm (**Fig. 1.a**).

Los resultados de la **Tabla 1** reflejan el menor tamaño de las semillas de El Refugio y una mayor heterogeneidad del lote para la cosecha del año mencionada.



Figura 1. *Adesmia boronioides*: a) Semillas; b) Plántulas (escala en cm).

Figure 1. *Adesmia boronioides*: a) Seeds; b) Seedlings (scala in cm).

Tabla 1. Peso de 1.000 (g) y número de semillas por kilogramo de *Adesmia boronioides* procedentes de dos sitios cercanos a Esquel (Chubut). Cosecha 2011.

Table 1. 1000 weight and number of seeds per kilogram of *Adesmia boronioides* from two sites near Esquel. Lot harvested in 2011.

Sitio de cosecha	Peso de 1.000 semillas (g)	Nº semillas /kilo
El Refugio	7,0	142.857 ± 5.000 (CV 3,5 %)
La Hoya	7,8	128.205 ± 1.920 (CV 1,5%)

*Germinación en Laboratorio.
Tratamientos pre-germinativos*

En la **Tabla 2** se muestran los porcentajes de plantas germinadas de *A.boronioides*, según los tratamientos pre-germinativos aplicados a las semillas. Para la población “La Hoya” hubo diferencias significativas entre el testigo y la imbibición en agua caliente a 80 °C y 95 °C. El máximo Poder Germinativo (PG) (85 %) se logró con agua a 80 °C. El remojo en ácido

sulfúrico diluido no tuvo efectos positivos sobre el porcentaje de PG. Asimismo, para la población El Refugio el mejor tratamiento fue el remojo en agua a 80 °C. Según se expresa en la columna 4, los tratamientos con agua caliente aplicados sobre las semillas tuvieron el mismo efecto sobre ambas poblaciones, mejorando los porcentajes de germinación.

Tabla 2. Poder germinativo (PG %) de dos poblaciones de *Adesmia boronioides*, resultante de la aplicación de los distintos tratamientos pre-germinativos en laboratorio.

Table 2. Germination capacity of two populations of *Adesmia boronioides*, resulting from the application of the various pretreatments for germination in laboratory.

Tratamientos	La Hoya % PG	El Refugio % PG	Diferencias entre las Poblaciones (p ≤ 0,05)
Testigo	18 a	27 a	Dif.Sig
A80°	85 c	78 c	NoSig
A95°	67 b	62 bc	NoSsig
S50/1	21 a	41 ab	DifSig
S50/24	Sin datos	39 ab	----

Medias con una letra común entre tratamientos (columnas) no son significativamente diferentes (p≤0,05).

Descripción de las plántulas:

Las plántulas tienen una raíz primaria de apreciable longitud, delgada y con una reducida zona terminal de escasas raíces secundarias (**Fig. 1.b**). El hipocótilo es de color verde a veces rojizo, glabro, de pocos mm de longitud. Cotiledones con pecíolo breve a ausente, lámina obovada, carnosa, glabra, margen entero, nervio central perceptible en el en el envés. Primera hoja pinnada, 4 – 6 pares de folíolos ovados, borde dentado con glándulas crateriformes; raquis también glanduloso.

Obtención de plantines

Emergencia: entre los siete y diez días, posteriores a la siembra en las almacigueras, se registró la emergencia de las plántulas, tanto en 2010 como en 2011. La germinación de esta especie es epigea. Se observó la aparición de los

cotiledones, y una semana más tarde comenzó la aparición de las primeras hojas. A los 30 días finalizó esta etapa. El primer trasplante de las plántulas desde las almacigueras a las bandejas de cultivo con celdas individuales, tuvo una buena sobrevivencia permitiendo el desarrollo del sistema radicular (**Fig. 2.a**). Al final de la primera temporada de crecimiento la altura promedio de las plantas fue de 21 cm y el diámetro de cuello promedio de 2,4 mm (**Tabla 3**).

El segundo trasplante a surcos al aire libre en otoño, no fue propicio para el desarrollo de las plantas, no logrando sobrevivir en dichas condiciones. En cambio sí se adaptaron cuando el segundo trasplante se realizó a macetas individuales y fueron mantenidas en invernáculo (**Fig. 2.b**), lográndose de este modo un stock que posteriormente se llevara a plantación definitiva.

Tabla 3. Alturas (cm) y diámetros (mm) al final de la primer temporada de crecimiento de plantas de *Adesmia boronioides* de ambas poblaciones.

Table 3. Heights (cm) and diameters (mm) at the end of the first growing season of seedling *Adesmia boronioides* of both populations.

	La Hoya		El Refugio	
	Altura (cm)	Diámetro de cuello (mm)	Altura (cm)	Diámetro de cuello (mm)
Media	19,3	2,2	22,7	2,6
Desv.std	6,2	0,4	7,4	0,6
Valor mín.	9,0	1,5	9,0	1,1
Valor máx.	32,0	3,2	44,0	4,0



Figura 2. *Adesmia boronioides*: a) Plántulas trasplantadas a bandejas con celdas individuales; b) Plantas trasplantadas a macetas individuales, al iniciar la segunda temporada de crecimiento.

Figure 2. *Adesmia boronioides*: a) Seedlings transplanted into trays with individual cells; b) Plants transplanted into individual pots when starting the second growing season.

Calendario fenológico

Reposo vegetativo: desde abril a fin de Septiembre.

Foliación y brotación: desde la primera quincena de Octubre a la segunda quincena de Noviembre.

Floración: desde la primera semana de Noviembre hasta la última semana de Enero.

Fructificación y dispersión de semillas: primera semana de Enero hasta fines de Marzo.

Discusión

La calidad de las semillas de *A. boronioides* obtenida mediante la determinación de sus atributos físicos y fisiológicos, se considera muy adecuada y provechosa para la producción de plantas de ésta especie nativa. Las semillas presentan cierto grado de dormición, por lo cual es aconsejable aplicar algún

pretratamiento para incrementar la germinación. La inmersión en agua caliente a 80 °C fue el tratamiento más efectivo para lograr los porcentajes de germinación (85 % y 78 %) más elevados en laboratorio, de las dos poblaciones en estudio.

La especie se adapta bien al cultivo, teniendo en cuenta utilizar sustratos sueltos e inertes en las primeras etapas debido a su susceptible sistema radicular y protecciones contra temperaturas extremas, tanto cálidas como frías. De acuerdo a los resultados aquí obtenidos en el trasplante en surcos y al aire libre, las plantas 1+0 y a raíz descubierta no resultan lo suficientemente rústicas para superar el estrés en esta etapa.

Se constató un largo periodo de floración. La fenofase de fructificación también es prolongada, pero como coincide con días

de viento fuerte gran parte de las semillas se dispersa tempranamente.

Para sistematizar su cultivo se deberían profundizar las experiencias en vivero que permitan lograr un protocolo de propagación, y ensayar el comportamiento en terreno de las plantas obtenidas a través del cultivo.

Agradecimientos

Las autoras agradecen a la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Uiv.Nac. de la Patagonia S.J.Bosco, que a través del Programa CIPANCO financio parte de las actividades del proyecto. También agradecen a los alumnos Sebastián Pintos y Mariana Elbaum, por su colaboración en las actividades de laboratorio y vivero.

Bibliografía

Correa, M. N. (1984). *Flora patagónica*. Parte IV-b. Dicotiledóneas dialipétalas. Colección científica del INTA. Ed. INTA. Buenos Aires.

Dimitri, M. (1974). *Pequeña Flora Ilustrada de los Parques Nacionales Andino-Patagónicos*. Anales de Parques Nacionales, Buenos Aires. Tomo XIII: 1-122.

Eyssartier C, Ladio AH, Lozada M. (2009). “Uso de plantas medicinales cultivadas en una comunidad semi-rural de la estepa patagónica”. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*. **8**: 77-85.

Gattuso, M. (2003). “Las plantas medicinales en Latinoamérica”. *Dominguezia* **29** (2): 5-6

González, S.B. (2005). “*Adesmia boronioides* Hook. f.: una especie aromática y medicinal nativa de la Patagonia”. *Naturalia Patagónica* **2** (1) 85-91.

González, S.B.; Guerra, P.; Troncoso, O.; Gastaldi, B.; Mazzoni, A.; Sa. Marino, L.; Humano, G.; van Baren C.; Di Leo Lira, P.; Retta, D.; Bandoni, A.L. (2014). “Diversidad química y morfológica de *Adesmia boronioides* Hook.f. Caracterización de sus componentes volátiles y de las estructuras de tallos y hojas”. En Actas: IV Con.Iberoamericano de Productos Naturales en Patagonia: La Diversidad Química y Biológica, Río Gallegos. 38-39 p.

González, S.B.; Houghton, P. y Hoult, J. (2003). “The activity against leukocyte eicosanoid generation of essential oil and polar fractions of *Adesmia boronioides* Hook. F”. *Phytotherapy Research* **17**, 290-293

ISTA. (2009). *International Rules for Seed Testing*. International Seed Testing Association, Zürich, Switzerland.

Martínez-Crovetto, R. (1980). *Apuntes sobre la vegetación de los alrededores del Lago Cholila*. Publicación Técnica N° 1. Facultad de Ciencias Agrarias. Corrientes, Argentina; 1-22.

- Montes, M.y Wilkomirsky, T. (1985). *Medicina tradicional chilena*. Editorial de la Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- Muñoz, B.C.; Sánchez, J. A.; Montejo, L. A; González, Y.; Reino J. (2009). “Valoración germinativa de 20 accesiones de leguminosas almacenadas en condiciones desfavorables”. *Pastos y Forrajes* **32** (3): 1- 15.
- Parera, C.A. and M. Ruiz. (2003). “The physiology of germination and emergence of *Adesmia subterranea* Clos and the effects of presowing treatments”. *J. Range Management* **56**:273-276.
- Silva, F.; Ullrich, T.; Hartman, P.; Medina, H.; Moraga, L.;Saini, G. (2004). “Plantas medicinales de la región de Aysen, Chile”. *BLACPMA*. **3** (2): 36-45.
- Soria, N.; Basualdo, I. (2015). “Recursos fitogenéticos. Conservación de las especies medicinales en Paraguay (Parte I)”. *Dominguezia* **31**(1): 41-47.
- Ulibarri, E.; Burkart, A. (2000). “Sinopsis de las especies de *Adesmia* (Leguminosae, Adesmiae) de la Argentina”. *Darwiniana* **38**(1-2): 59-126.

Estudio ficoquímico y actividad biológica *in vitro* de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae) colectada en el norte y centro del Golfo San Jorge

Phycochemical study and biological *in vitro* activity of the *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae) collected in north and central of the San Jorge Gulf

**Miriam Delma Escobar Daza¹, Diana Paula Quezada¹, Elisabet Braidot¹,
María Luján Flores^{1*} & Osvaldo León Córdoba²**

¹Farmacognosia y ²Química Biológica II; Grupo de Investigación en Química, Bioactividad y Metabolismo de Recursos Naturales Patagónicos (GQBMRNP-CRIDEDECIT); Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Km 4, s/N°, 9000, Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.
Correspondencia: okyflores@yahoo.com.ar

Resumen: *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae, Laminariales, Phaeophyta), “wakame”, es un alga parda alóctona para las costas patagónicas, que fue detectada en 1992 extendiéndose rápidamente hacia el sur de la Patagonia. Es originaria del este de China, Corea, Japón y sureste de Rusia en donde es utilizada en alimentación y medicina tradicional. Para este trabajo se colectaron ejemplares en primavera en las costas de Comodoro Rivadavia y de Bahía Bustamante, Golfo San Jorge, Chubut, Argentina. Las frondas secas y reducidas a polvo se extrajeron con etanol y se analizaron en su composición química y actividad biológica. El estudio químico evidenció para ambas zonas de colecta, hidratos de carbono, fenoles, péptidos, lípidos y esteroides; además en el material colectado en Comodoro Rivadavia se detectó el grupo cardenólido, mientras que el colectado en Bahía Bustamante evidenció quinonas y alcaloides. Los lípidos contenían ácidos grasos insaturados, sulfolípidos y glicósidos de esterol. Se detectó además fosfatidilcolina, marcador quimiotaxonómico de Scytosiphonales y Laminariales. La capacidad antioxidante fue importante para el extracto de Bahía Bustamante, con un 92 % de inhibición del DPPH y una $SC_{50} < 150 \mu\text{g/ml}$. El ensayo de inhibición del desarrollo radicular de trigo que presume actividad antitumoral, evidenció para la especie de Bahía Bustamante 34,7 y 83,5 % de inhibición para las diluciones al 0,05 y al 0,5 %, respectivamente. Los resultados obtenidos constituyen una base importante para el

conocimiento integral de la especie invasora de las costas patagónicas, a la vez que permitirán diseñar futuras aplicaciones, fundamentalmente en salud, utilizar el recurso racionalmente y contribuir así al control de su propagación.

Palabras claves: alga parda invasora; bioactividad; ficoquímica; Golfo San Jorge; *Undaria pinnatifida*; wakame.

Abstract: *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae, Laminariales, Phaeophyta), "wakame", is an allochthonous brown algae from Patagonian coasts, that was detected in 1992, reproduced quickly to the south of Patagonia. It originates in eastern China, Korea, Japan and southeast Russia where it is used in food and traditional medicine. Specimens were collected in spring on the Comodoro Rivadavia and Bahía Bustamante coasts, Golfo San Jorge, Chubut, Argentina. Dried and powdered fronds were extracted with ethanol and analyzed for its chemical composition and biological activity. The chemical analysis evidenced in both collection areas, carbohydrates, phenols, peptides, lipids and steroids. Material collected in Comodoro Rivadavia showed the cardenolide group, while that material collected in Bahía Bustamante showed quinones and alkaloids. Lipids contained unsaturated fatty acids, sulfolipids and sterol glycosides. Phosphatidylcholine, a chemotaxonomic marker of Scytosiphonales and Laminariales were also detected. Antioxidant capacity was important in Bahía Bustamante extract, it showed 92 % inhibition of DPPH and an $SC_{50} < 150 \mu\text{g} / \text{ml}$. The inhibition test of wheat root development, which presumes antitumor activity, showed in Bustamante coasts species 34.7 and 83.5 % inhibition for the 0.05 and 0.5 % dilutions, respectively. These results obtained constitute an important basis to the integral knowledge of the invasive species of the Patagonian coasts, while its will allow to design future applications, mainly in health, to use the resource rationally and to contribute to the control of its propagation.

Keywords: kelp brown seaweed, bioactivity, phycochemistry, San Jorge Gulf, *Undaria pinnatifida*; wakame.

Introducción

La introducción de especies alóctonas en ambientes marinos es reconocida como una

potencial amenaza para estos ecosistemas, con posibles efectos importantes sobre el hábitat, la biodiversidad, la productividad y la pesca (Carlton, 1999; Bax *et al.*, 2001).

El alga parda *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae, Laminariales, Phaeophyta) es una especie originaria del este de China, Corea, Japón y sureste de Rusia (Funahashi, 1966; Akiyama y Kurogi, 1982). En Argentina, fue detectada por primera vez en 1992 en el Golfo Nuevo (al norte de la provincia de Chubut), donde su ingreso fue atribuido al transporte por medio del agua de lastre de buques internacionales (Piriz y Casas, 1994; Casas y Piriz, 1996). De allí continuó expandiéndose hacia el sur alcanzando en pocos meses el Golfo San Jorge. Más recientemente, en la primavera de 2005, fue registrada en el interior de la Ría Deseado (provincia de Santa Cruz), aumentando notablemente su límite de distribución. Este último registro puso de manifiesto la progresiva expansión de la especie, la cual podría estar relacionada al tránsito de embarcaciones pesqueras y de transporte entre los puertos costeros de la Patagonia, como así también podría tratarse de un nuevo ingreso de la especie a través de buques provenientes de puertos internacionales (Martín y Cuevas, 2006).

La alta capacidad invasora de *U. pinnatifida* se atribuye en gran parte al hecho de que, tal como ocurre con otras especies oportunistas, posee una fase gametofítica longeva y resistente, que puede mantenerse en estado de latencia largos períodos de tiempo (hasta dos años), en diversas condiciones ambientales

(temperaturas de 0 hasta más de 20 °C; pH ácido u alcalino), a la espera de reproducirse (Hay, 1990). Por otro lado, está demostrado que los gametofitos se ven estimulados tanto en crecimiento como en maduración sexual, por las variaciones estacionales de temperatura e irradiación lumínica (Morita *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2005), lo que hace pensar que, según dónde se encuentren, su cronología del desarrollo y maduración será distinta.

Teniendo en cuenta la alta capacidad invasora, lo cual también ha sido indicado en otras regiones del mundo (Stuart, 2004; Minchin y Nunn, 2014), así como la imposibilidad de erradicación de la especie, iniciamos un estudio integral que permita determinar la potencialidad para aplicaciones biotecnológicas y planificar un aprovechamiento racional del recurso. En este trabajo presentamos resultados generales del análisis químico y de actividad biológica *in vitro* del alga colectada en el norte y en el centro del Golfo San Jorge.

Materiales y Métodos

Material algal

Los ejemplares de *Undaria pinnatifida* (*Up*) se colectaron manualmente en primavera, en las playas de Bahía Bustamante (45° 05' S, 66° 25' W), *UpBB* 2008, y de Comodoro Rivadavia (45° 52' S, 67° 30' W), *UpCR* 2011, correspondientes al norte y centro del

Golfo San Jorge, respectivamente, en la provincia de Chubut, Argentina.

El material de ambas colectas fue seleccionado y clasificado; un ejemplar de Comodoro Rivadavia se depositó en el Herbario Regional Patagónico bajo el registro HRP N° 7096. El resto de material fue secado a temperatura ambiente bajo techo al abrigo de la luz directa y posteriormente, reducido a polvo en un molinillo de paletas provisto de un tamiz de malla 20 (RetschMühle, Dietz-Motorem).

Extracción

Las frondas reducidas a polvo de **UpBB** fueron tratadas con etanol de 96°, a 65 °C durante 150 min, con agitación mecánica (agitador Decalab S.R.L.). En cuanto a **UpCR**, se empleó etanol al 80 % (v/v) con agitación magnética durante 24 h y posteriormente se maceró en heladera a 4 °C durante 24 h más. Los extractos (**EOHBB** y **EOHCR**, respectivamente) fueron recuperados mediante centrifugación a 4000 r.p.m., a 4 °C durante 15 min, utilizando una centrifuga refrigerada (Hettich Mod. Rotina 38 R) y se concentraron en un evaporador rotatorio Büchi R11, a presión reducida con temperatura del baño de 40 °C (**Fig. 1**).

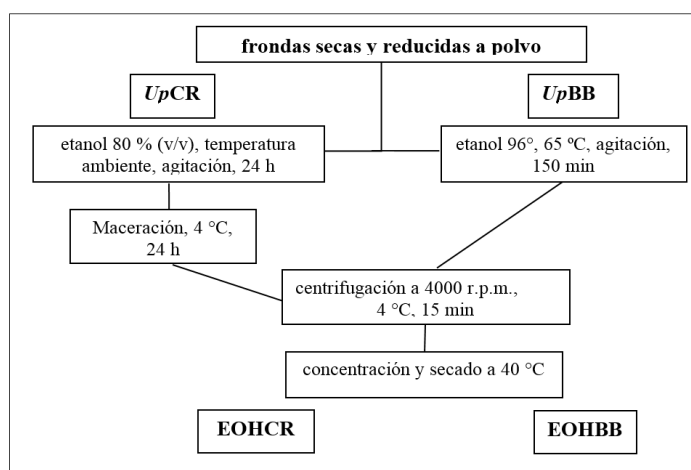


Figura 1. Obtención de los extractos alcohólicos de *Undaria pinnatifida* colectada en primavera en Comodoro Rivadavia (**EOHCR**) y Bahía Bustamante (**EOHBB**), Chubut, Argentina.

Figure 1. *Undaria pinnatifida* ethanolic extracts from Comodoro Rivadavia (**EOHCR**) and Bahía Bustamante (**EOHBB**), Chubut, Argentina.

Screening ficoquímico

La composición química de los extractos etanólicos obtenidos según el esquema presentado como **Figura 1**, fue analizada mediante reacciones cualitativas usuales de

identificación de grupos químicos (Rondina y Coussio, 1969; Pinto Vitorino *et al.*, 2004). Se empleó Molisch (hidratos de carbono), Shinoda (flavonoides), FeCl₃ al 1 % (oxhidrilos fenólicos), solución

acuosa de gelatina al 2 % (taninos), Ninhidrina al 0,2 % (aminoácidos, péptidos, proteínas), Liebermann-Burchard (esteroides y/o triterpenos), Kedde (cardenólidos), vapores de I₂ (lípidos), Bornträger (quinonas), Dragendorff y Mayer (alcaloides).

Estudio preliminar de lípidos

La extracción de lípidos se realizó siguiendo la metodología descrita por Folch *et al.* (1957). Para ello se trabajó con 0,3311 y 1,0000 g de frondas secas y reducidas a polvo de *UpBB* y *UpCR*, respectivamente. Ambos materiales fueron macerados en cloroformo – metanol (2:1) durante 24 h, a temperatura ambiente y con agitación magnética continua (agitador Decalab S.R.L.), protegidos de la luz. Los extractos **EFBB** y **EFCR** fueron recuperados por centrifugación a 4000 r.p.m., a 4 °C durante 20 min, empleando la centrífuga refrigerada indicada más arriba, y se concentraron en el evaporador rotatorio también indicado antes, a presión reducida con temperatura del baño de 40 °C.

Cromatografías analíticas de lípidos

Se emplearon sistemas cromatográficos bidimensional y monodimensional, utilizando cromatofolios de Sílicagel G60 F₂₅₄, activados en estufa a 110 °C por 5 min (Hellebust y Craigie, 1978).

Las muestras **EFBB** y **EFCR** se analizaron por separado para el sistema bidimensional utilizando como primera fase móvil HCCl₃ - CH₃OH - NH₄OH (65:25:5) y como segunda fase móvil HCCl₃ - (CH₃)₂CO - CH₃OH - CH₃COOH - H₂O (50:20:10:10:5).

En el sistema monodimensional el cromatofolio una vez activado, fue saturado con una solución acuosa de sulfato de amonio al 2 %. Posteriormente se dejó secar y se sembraron, en bandas de 2-3 mm, ácido palmítico en etanol (estándar), **EOHCR**, **EOHB**, **EFCR** y **EFBB**, desarrollando la cromatografía en forma ascendente con (CH₃)₂CO - C₆H₆ - H₂O (91:30:8) como fase móvil.

El revelado para ambos sistemas se efectuó con luz natural, UV a 254 y 365 nm y vapores de yodo, en ese orden.

Análisis cuantitativo

Se realizó la determinación cuantitativa de los grupos de metabolitos más destacados presentes en los extractos etanólicos.

Los azúcares totales se determinaron por el método colorimétrico del fenol – ácido sulfúrico a 482 y 490 nm (Dubois *et al.*, 1956; Flores, 2000).

El porcentaje de sulfato total se determinó por turbidimetría a 360 nm, con el reactivo BaCl₂ / gelatina, previa hidrólisis de las muestras con HCl 1 M, a 110 °C durante 4,5 h (Dodgson, 1961; Dodgson y Price, 1962).

Para fenoles totales, se empleó el reactivo de Folin y Ciocalteu (1927) y para péptidos y proteínas, la técnica de Lowry *et al.*, 1951.

Actividad biológica

Determinación de actividad antioxidante

Se utilizó el método de inhibición del DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo), descrito por Koleva *et al.* (2002).

Determinación de la SC₅₀

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.

Determinación de la actividad antitumoral

Se empleó el ensayo de inhibición de la elongación de las raíces de trigo empleando semillas de *Triticum sativum* var. Klein pegaso y var. Biointa 3006, para los extractos **EOHBB** y **EOHCR**, respectivamente (Desmarchelier *et al.*, 1995).

Resultados y Discusión

El screening químico realizado mediante la aplicación de la secuencia de la **Figura 1** (ver apartado 2.2. de Materiales y Métodos) a los extractos etanólicos de las frondas colectadas en primavera en Comodoro Rivadavia y en Bahía

Bustamante, mostró los resultados que se presentan en la **Tabla I**.

Ambos extractos evidenciaron una proporción importante de hidratos de carbono, fenoles, aminoácidos y/o péptidos. En cambio, en ninguno de los casos se obtuvo reacción positiva para flavonoides ni para taninos.

En otros estudios se ha descrito la presencia de flavonoides en distintas especies de algas marinas (Yoshie *et al.*, 2002; Yoshie *et al.*, 2003; Córdoba *et al.*, 2008). En *U. pinnatifida* otros autores ha indicado la presencia de rutina, quercitrina y morina, además de catequinas constituyentes de taninos de tipo condensados (Yoshie *et al.*, 2003). Sin embargo en este trabajo no hemos detectado tales metabolitos, lo cual sugiere variaciones espacio-temporales tal como hemos determinado recientemente en otras especies de algas marinas (Uhrich *et al.*, 2016).

Se evidenció además la presencia de esteroides en ambos extractos; en cambio el grupo cardenólido resultó positivo sólo para el procedente del material colectado en Comodoro Rivadavia (**Tabla I**).

Los otros grupos químicos determinados en el alga colectada en Bahía Bustamante fueron quinonas y alcaloides (**Tabla I**). Este último grupo resultó muy interesante y pareciera estar en proporciones importantes dado que se observó no sólo con el reactivo de Dragendorff (muy

sensible), sino también con el reactivo de Mayer que detecta cantidades apreciables. Los alcaloides son los grupos menos descritos en algas marinas, pero representan un conjunto de sustancias con importantes actividades biológicas. Además son responsables de la toxicidad de muchos productos naturales, por lo que su presencia en algas de consumo en alimentación debe ser considerada. Por otra parte, los alcaloides actúan como defensas químicas frente a depredadores

naturales por lo que podrían contribuir a favorecer la colonización de *U. pinnatifida*. En cuanto a las quinonas, fundamentalmente las antraquinonas, constituyen un grupo químico que actúa estimulando el peristaltismo intestinal por lo que también debe ser tenido en cuenta cuando se va a utilizar el alga para consumo, especialmente en niños, adultos mayores y/o presencia de patologías crónicas (Uhrich *et al.*, 2016).

Tabla I. Composición química de los extractos etanólicos de *Undaria pinnatifida* colectada en primavera en Comodoro Rivadavia (EOHCR) y en Bahía Bustamante (EOHBB), Chubut, Argentina.

Table I. Chemical composition of ethanolic extracts from *Undaria pinnatifida* collected in spring in Comodoro Rivadavia (EOHCR) and Bahía Bustamante (EOHBB), Chubut, Argentina.

Grupo químico	EOHCR	EOHBB
hidratos de carbono	+++	++
flavonoides	-	-
fenoles	++ (amarillo)	++ (amarillo)
taninos	-	-
aminoácidos, péptidos	+++	+++
esteroides	+	+
cardenólidos	+++	-
lípidos	++	+
quinonas	-	+
alcaloides	-	++

(+ positivo: + moderado, ++ intenso, +++ muy intenso; - negativo)

Los lípidos resultaron importantes en ambos extractos etanólicos, destacándose en el de Comodoro Rivadavia (**Tabla I**). Además se prepararon extractos según la metodología de Folch (**EF**), cuyos rendimientos fueron de 13,6 y de 36,6 % para *UpBB* y *UpCR*, respectivamente. Boulom *et al.* (2014) informaron variaciones del 17 al 45 % en la proporción

de lípidos totales obtenidos mediante Folch, a partir de la especie colectada en distintos meses en las costas de Nueva Zelanda. Otros estudios han informado que esta especie biosintetiza una baja proporción de lípidos (< 5 %) constituidos fundamentalmente por ácidos grasos poliinsaturados, destacándose C18:4 ω 3 y C20:4 ω 6 (Li *et al.*, 2002; Sánchez-

Machado *et al.*, 2004; Dawczynski *et al.*, 2007). Nuevamente debe ser considerada aquí una posible variación espacio-temporal de estos metabolitos.

Al efectuar el análisis cromatográfico del perfil de lípidos constituyentes de los extractos etanólicos y de Folch, los resultados fueron idénticos entre sí para los extractos equivalentes de la especie procedente de ambas zonas de colecta. La **Figura 2 A** presenta el perfil cromatográfico bidimensional del extracto de Folch en donde se observa una composición compleja y la **Figura 2 B**, el perfil monodimensional correspondiente al extracto de Folch y al etanólico. En ambos casos los cromatogramas corresponden a los obtenidos a partir de las muestras procedentes de la especie colectada en Bahía Bustamante.

En la **Tabla II** se muestran los resultados de la cromatografía monodimensional obtenidos mediante el cálculo de los Rf correspondientes y la comparación con estándares y bibliografía (Hellebust y Craigie, 1978).

Resultó destacable la fuerte y persistente coloración que se obtuvo al revelar con vapores de yodo, lo cual permite sugerir proporciones considerables de los grupos

de lípidos separados y la presencia de ácidos grasos insaturados. Estos últimos son motivo de numerosas investigaciones debido a que resultan esenciales para la nutrición de seres humanos y animales (Uki *et al.*, 1986); además son de interés en biotecnología y en cosmética para la protección de la piel (Servel *et al.*, 1994).

Diversos grupos de lípidos son también utilizados como marcadores quimiotaxonómicos, destacándose la fosfatidilcolina (PC) que ha sido descrita para diferenciar dos grupos de algas pardas; uno que la contiene, constituido fundamentalmente por Scytosiphonales y Laminariales, y otro grupo que no. Nuestros resultados concuerdan en ubicar a *U. pinnatifida*, perteneciente a las Laminariales, en el primer grupo (**Tabla II**).

La presencia de sulfolípidos y glicósido de esterol en los extractos etanólicos también resultó interesante, guardando relación en el caso del esterol, al menos en parte, con la reacción positiva obtenida para el grupo esteroide (**Tabla I**). Los esteroides han sido descritos para la especie mostrando variaciones espacio-temporales (Boulom *et al.*, 2014).

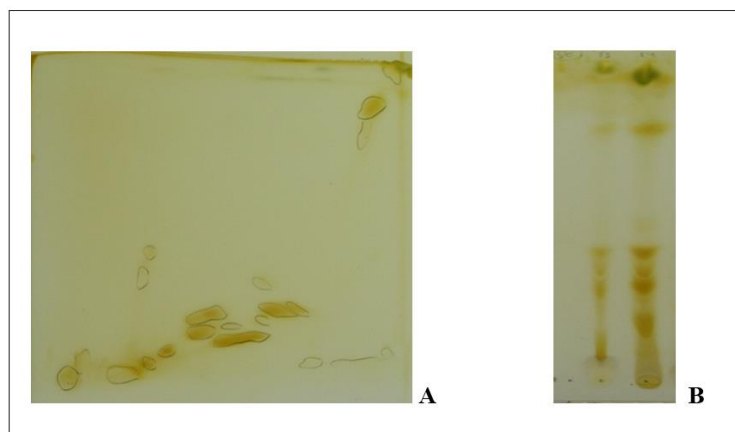


Figura 2. Análisis cromatográfico de lípidos de *U. pinnatifida* colectada en primavera en Bahía Bustamante, Chubut, Argentina. **A**, perfil bidimensional del extracto de Folch; **B**, perfil monodimensional de **EFBB** (calle 13) y de **EOHBB** (calle 14).

Figure 2. Lipids chromatography analysis of *U. pinnatifida* from Bahía Bustamante, Chubut, Argentina. **A**, bidimensional profile of Folch's extract (**EFBB**); **B**, monodimensional profile of **EFBB** (line 13) and **EOHBB** (line 14).

Tabla II. Análisis de lípidos mediante cromatografía monodimensional en los extractos etanólicos (EOH) y en los extractos de Folch (EF) de *Undaria pinnatifida* colectada en primavera en Comodoro Rivadavia y en Bahía Bustamante, Chubut, Argentina.

Table II. Lipids monodimensional chromatography analysis of ethanolic (EOH) and Folch's extracts (EF) from *Undaria pinnatifida* collected in spring in Comodoro Rivadavia and Bahía Bustamante, Chubut, Argentina.

Lípidos	<i>Undaria pinnatifida</i> , primavera			
	EOHCR	EFRCR	EOHBB	EFBB
fosfatidilcolina	+	+	+	+
fosfatidiletanolamina	+	+	+	+
sulfolípidos	+	-	+	-
digalactosil diacilglicérido	+	+	+	+
glicósido de esteroles	+	-	+	-
fosfatidilglicerol	+	-	+	-
monogalactosil diacilglicérido	+	+	+	+
pigmentos y lípidos neutros	+	+	+	+
ácido fosfatídico	-	-	-	-
fosfatidilserina	-	-	-	-

Se determinaron además mediante perfiles cromatográficos 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.

En cuanto a la proporción de los principales constituyentes de naturaleza polar de los extractos etanólicos, **EOHBB** mostró en todos los casos un mayor porcentaje (**Tabla III**).

Tabla III. Análisis cuantitativo de grupos químicos polares presentes en los extractos etanólicos de *U. pinnatifida* colectada en primavera en Comodoro Rivadavia (EOHCR) y en Bahía Bustamante (EOHBB), Chubut, Argentina.

Table III. Quantitative analysis of polar chemistry groups in the ethanolic extracts from *U. pinnatifida* collected in spring in Comodoro Rivadavia (EOHCR) and Bahía Bustamante (EOHBB), Chubut, Argentina.

Extracto	Hidratos de carbono (%)	Proteínas (%)	Fenoles (%)	Sulfatos (%)
EOHCR	1,2	2,6	0,2	-
EOHBB	2,2	13,6	2,4	2

En cuanto a la actividad biológica *in vitro*, el estudio de la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de *U. pinnatifida* colectada en primavera, evidenció para **EOHCR** un 1,4 % de inhibición del DPPH, es decir resultó prácticamente sin actividad. En cambio **EOHBB** mostró resultados interesantes, con un 92 % de inhibición del DPPH y una $SC_{50} < 150$ μ g/ml. Estos resultados para el extracto de Bahía Bustamante, superaron los valores obtenidos por otros investigadores que han informado que extractos metanólicos de *U. pinnatifida* inhibían un 35,8 % al DPPH (Han *et al.*, 2002).

Para la actividad inhibitoria del desarrollo radicular de trigo, que presume actividad antitumoral, se trabajó con diluciones al 0,05 y 0,5 %, de ambos extractos etanólicos.

Los resultados fueron muy interesantes y de tipo dosis dependiente para la especie colectada en Bahía Bustamante ya que para la dilución preparada al 0,05 % se obtuvo un 34,7 % de inhibición del desarrollo radicular, mientras que para la dilución

diez veces más concentrada, la inhibición fue del 83,5 % (**Tabla IV**). Además se observó protuberancia en una raíz, semejante a las producidas por el control positivo vinblastina, un antitumoral de amplia utilización (**Tabla IV**).

En cuanto a la actividad de la especie colectada en Comodoro Rivadavia, resultó leve a la mayor concentración empleada (dilución al 0,5 %), evidenciando raíces débiles (**Tabla IV**).

En la **Figura 3 A** se pueden observar las placas correspondientes al extracto etanólico de Bahía Bustamante, mientras que en **C** se muestran los resultados del extracto de Comodoro Rivadavia. En **B** se observan en forma comparativa, la raíz más larga de cada dilución de EOHBB, la obtenida con el control positivo vinblastina y la del control negativo, agua corriente.

Nuestros resultados conciden con los de otros investigadores que han descrito a *U. pinnatifida* con efectos antitumorales, además de otras actividades biológicas (Zhang *et al.*, 2014).

Tabla IV. Resultados del ensayo de inhibición de la elongación radicular de trigo para los extractos etanólicos de *U. pinnatifida* colectada en primavera en Comodoro Rivadavia (EOHCR) y en Bahía Bustamante (EOHBB), Chubut, Argentina.

Tabla IV. Results of radicular elongation inhibition assay for ethanolic extracts from *U. pinnatifida* collected in spring in Comodoro Rivadavia (EOHCR) and Bahía Bustamante (EOHBB), Chubut, Argentina.

Extracto	Concentración (%)	Inhibición (%)	Observaciones
EOHCR	0,05	5,6	Raíces débiles
	0,5	27,5	
EOHBB	0,05	34,7	Protuberancia en una raíz
	0,5	83,5	

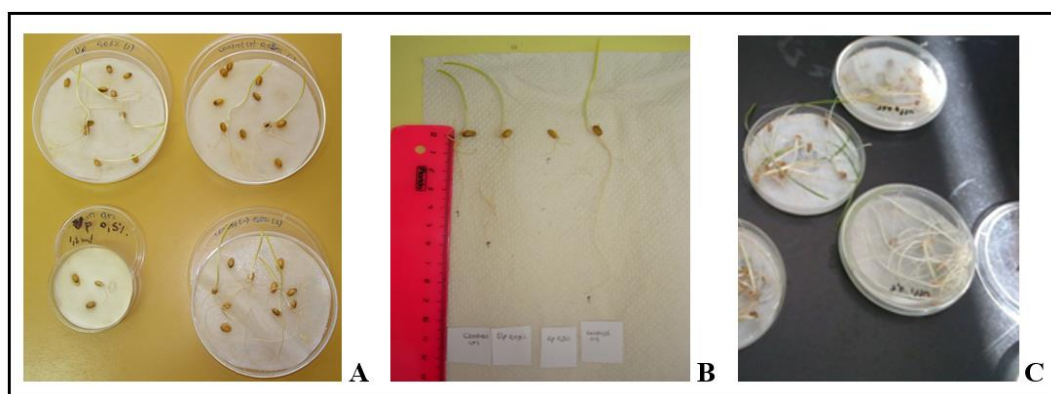


Figura 3. A. Resultados del estudio de inhibición radicular de EOHBB; **B.** Comparación de las raíces más largas obtenidas con cada dilución de EOHBB, con el control positivo vinblastina y con el control negativo agua corriente; **C.** Resultados del estudio de inhibición radicular de EOHCR.

Figure 3. A. Results of the radicular inhibition study of the EOHBB; **B.** Comparison of the long roots obtained with each dilution of EOHBB, positive control vinblastine and negative control water top; **C.** Results of the radicular inhibition study of EOHCR.

Las algas son fuentes importantes de diversos compuestos bioactivos con diferentes efectos en la salud humana. Muchos de ellos poseen actividades antioxidantes, antimicrobianas y antivirales que son también importantes para la protección de las algas en condiciones de estrés, pudiendo contribuir además a la capacidad invasiva de las especies (Cardozo *et al.*, 2007; Pal *et al.*, 2014).

U. pinnatifida es una especie invasora a nivel mundial, utilizada como alimento en Japón, China y Korea (Kolb *et al.*, 2004). Aporta proteínas, minerales, vitaminas, yodo. Contiene además hidratos de carbono que contribuyen a la protección de la mucosa gastrointestinal por lo que es utilizada en Japón para el tratamiento de úlceras y para proteger el tracto digestivo del desarrollo de células cancerígenas. También se han aislado fucosterol, ácidos

grasos insaturados y otros metabolitos que contribuyen a su importancia farmacológica (Zhang *et al.*, 2014).

Conclusiones

Las algas marinas constituyen un recurso natural valioso para el ecosistema que habitan ya que proveen de nutrientes, protección y defensa para otros organismos merced a los metabolitos que biosintetizan, en donde los hidratos de carbono, fenoles, lípidos y sustancias nitrogenadas juegan un rol importante. A la vez tales metabolitos constituyen recursos potenciales para su aplicación en diversas industrias, entre ellas la farmacéutica. Los grupos químicos detectados en *Undaria pinnatifida* resultan interesantes por su potencial aplicación en Salud. Son además importantes como defensas químicas para la especie alóctona, contribuyendo con la capacidad de supervivencia. Nuestros resultados contribuyen al conocimiento de la especie que habita las costas del Golfo San Jorge, a la vez que constituyen un estímulo para futuras aplicaciones biotecnológicas considerando la potencialidad y la variabilidad espacio temporal de los metabolitos biosintetizados.

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el marco de los proyectos de investigación PNUD ARG 02/018 BB34, ANPCYT PICTO GSJ 36871, Gobierno de la Provincia de Chubut

y UNPSJB. Los autores agradecen a la Dra. María Elena Arce (HRP, FCN, UNPSJB) por su contribución en la identificación de la especie.

Bibliografía

- Akiyama, K. & Kurogi, M. 1982. Cultivation of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, the decrease in crops from natural plants following crops increase from cultivation. *The Bulletin of Tohoku Regional Fisheries Research Laboratory*, **44**: 91-100.
- Bax, N.; Carlton, J.T.; Mathews-Amos, A.; Haedrich, R.L.; Howarth, F.G.; Purcell, J.E.; Rieser, A. & Gray, A. 2001. The control of biological invasions in the world's oceans. *Conserv. Biol.*, **15**: 1234-1246.
- Boulom, S.; Robertson, J.; Hamid, N.; Ma, Q. & Lu, J. 2014. Seasonal changes in lipid, fatty acid, α -tocopherol and phytosterol contents of seaweed, *Undaria pinnatifida*, in the Marlborough Sounds, New Zealand. *Food Chem.*, **161**: 261-269.
- Cardozo, K.H.M.; Guaratini, T.; Barros, M.P.; Falcao, V.R.; Tonon, A.P.; Lopes, N.P.; Campos, S.; Torres, M.A.; Souza, A.O.; Colepicolo, P. & Pinto, E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Phys. C*, **146**: 60-78.
- Carlton, J.T. 1999. Scale and ecological consequences of biological invasions in the world's oceans. En: O.T. Sandlund, P.J.

- Schei & A. Viken (eds.), *Invasive Species and Biodiversity Management*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland: 195-212.
- Casas, G. & Piriz, M. 1996. Surveys of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Golfo Nuevo, Argentina. *Hydrobiologia*, **326/327**: 213-215.
- Choi, C.W.; Kim, S.C.; Hwang, S.S.; Choi, B.K.; Ahn, H.J.; Lee, M.Y.; Park, S.H. & Kim, S.K. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay- guided comparison. *Plant Science*, **163**: 1161-1168.
- Choi, H.G.; Kim, Y.S.; Lee, S.J.; Park, E.J. & Nam, K.W. 2005. Effects of daylength, irradiance and settlement density on the growth and reproduction of *Undaria pinnatifida* gametophytes. *J. Appl. Phycol.*, **17**: 423-430.
- Córdoba, O.L.; Mrla, C.J.; Rico, A. & Flores, M.L. 2008. Aspectos químicos y actividad biológica de extractos de *Stictosiphonia hookeri* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Naturalia patagónica*, **4**: 93-102.
- Dawczynski, C.; Schubert, R. & Jahreis, G. 2007. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chem.*, **103**: 891-899.
- Desmarchelier, C.; Mongelli, E.; Coussio, J.; Giuletti, A. & Ciccía, G. 1995. Etnobotánica y bioactividad de plantas medicinales utilizadas por un grupo indígena *Takana* de la Amazonia peruana. *Acta Farm. Bon.*, **14**: 195-208.
- Dodgson, K. 1961. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochem. J.*, **78**: 312-319.
- Dodgson, K. & Price, R. 1962. A note on determination of ester sulfate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.*, **84**: 106-110.
- Dubois, M.; Gilles, J.; Hamilton, P.; Rebers, P. & Smith, F. 1956. Colorimetric method of determination of sugars and substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-356.
- Flores, M.L. 2000. Estudio de los polisacáridos de la pared celular del alga roja *Iridaea undulosa* Bory, *Tesis doctoral*, FCN, UNPSJB.
- Folch, J.; Lee M. & Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**: 497-509.
- Folin, O. & Ciocalteu, V. 1927. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, **73**: 627.
- Funahashi, S. 1966. Marine algae from Vladivostok and its vicinity. *Bull. Japan. Soc. Phycol.*, **14**: 127-145.
- Han, J.; Kanga, S.; Chouea, R.; Kimb, H.; Leemc, K.; Chungd, S.; Kimd, C. & Cheng, J. 2002. Free radical scavenging effect of *Diospyros kaki*, *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida*. *Fitoterapia*, **73**: 710-712.

- Hay, C.H. 1990. The dispersal of sporophytes of *Undaria pinnatifida* by coastal shipping in New Zealand, and implications for further dispersal of *Undaria* in France. *Brit. Phycol. J.*, **25**: 301-313.
- Hellebust, J. & Craigie, J. 1978. *Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press, 512 pp.
- Kolb, N.; Vallorani, L.; Milanovi, N. & Stocchi, V. 2004. Evaluation of Marine Algae Wakame (*Undaria pinnatifida*) and Kombu (*Laminaria digitata japonica*) as Food Supplements. *Food Technol. Biotechnol.*, **42**: 57-61.
- Koleva, I.I.; Van Beek, T.A.; Linssen, J.P.H.; Groot, A. & Evstatleva, L. 2002. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study of Three Testing Methods. *Phytochem. Analysis*, **13**: 8-17.
- Li, X.; Fan, X.; Han, L. & Lou, Q. 2002. Fatty acids of some algae from the Bohai Sea. *Phytochemistry*, **59**: 157-161.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.N.; Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Martin, J.P. & Cuevas, M. 2006. First record of *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta) in Southern Patagonia, Argentina. *Biological Invasions*, **8**: 1399-1402.
- Minchin, D. & Nunn, J. 2014. The invasive brown alga *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar, 1873 (Laminariales: Alariaceae), spreads northwards in Europe. *BioInvasions Records*, **3**: 57-63. doi: <http://dx.doi.org/10.3391/bir.2014.3.2.01>
- Morita, T.; Kurashima, A. & Maegawa, M. 2003. Temperature requirements for the growth and maturation of the gametophytes of *Undaria pinnatifida* and *U. undarioides* (Laminariales, Phaeophyceae). *Phycol. Res.*, **51**: 154-160.
- Pal, A.; Chandra Kamthania, M. & Kumar, A. 2014. Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds - A Review. *Open Access Library Journal*, **1**: e752. doi: <http://dx.doi.org/10.4236/oalib.1100752>.
- Pinto Vitorino, G.; Toledo, I.B.; Córdoba, O.L.; Flores, M.L. & Cabrera, J.L. 2004. Análisis fitoquímico de *Colliguaya integerrima* (Hook.) Gill. et Hook. (Euphorbiaceae), una planta de la Patagonia Argentina. *Acta Farm. Bon.*, **23**: 459-465.
- Piriz, M. & Casas, G. 1994. Occurrence of *Undaria pinnatifida* in Golfo Nuevo, Argentina. *J. Appl. Phycol. Forum*, **10**: 4.
- Rondina, R.V.D. & Coussio, J.D. 1989. Estudio fotoquímico de plantas medicinales Argentinas (1). *Rev. Invest. Agropec.*, **IV**: 351-366.
- Sánchez-Machado, D.I.; Lopez-Cervantes, J.; Lopez-Hernandez, J. & Paseiro-Losada, P. 2004. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem.*, **85**: 439-444.

- Servel, M.O.; Claire, C.; Derrien, A., Coiffard, L. & De Roeck-Holtzhauer, Y. 1994. Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry*, **36**: 691-693.
- Stuart, M.D. 2004. Review of research on *Undaria pinnatifida* in New Zealand and its potential impacts on the eastern coast of the South Island. *DOC Science Internal Series* 166, 41 pp.
- Uhrich, A.V.; Córdoba, O.L. & Flores, M.L. 2016. Especies de *Ulva* del Golfo San Jorge, Patagonia Argentina: variaciones bioquímicas estacionales - espaciales y su relación con la producción de metabolitos bioactivos. *Ars Pharmaceutica*, **57**: 67-75. doi: <http://dx.doi.org/10.4321/S2340-98942016000200005>.
- Uki, N.; Sugiura, M. & Watanabe, T. 1986. Dietary value of seaweeds occurring on the pacific coast of Tohoku for growth of the abalone *Haliotis discus hannai*. *Bull. Japan Soc. Sci. Fish.*, **52**: 257.
- Yoshie, Y.; Wang, W.; Hsieh, Y. & Suzuki, T. 2002. Compositional Difference of Phenolic Compounds between Two Seaweeds, *Halimeda* spp. *J. Tokyo University of Fisheries*, **88**: 21- 24.
- Yoshie-Stark, Y.; Hsieh, Y. & Suzuki, T. 2003. Distribution of flavonoids and related compounds from seaweeds in Japan. *J. Tokyo University of Fisheries*, **89**: 1-6.
- Zhang, H.; Pang, Z. & Han, C. 2014. *Undaria pinnatifida* (Wakame): A Seaweed with Pharmacological Properties. *Science International*, **2**: 32-36. doi: [10.17311/sciintl.2014.32.36](https://doi.org/10.17311/sciintl.2014.32.36).

Folin, Denis, Looney, Ciocalteu: historia y méritos.

Folin, Denis, Looney, Ciocalteu: history and merits.

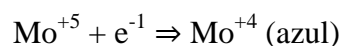
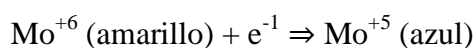
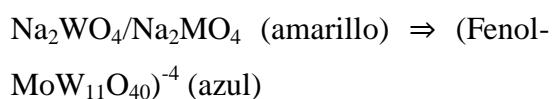
Emilio Marguet^{1*}, Marisol Vallejo¹

¹Laboratorio de Biotecnología Bacteriana, Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Inmigrantes 58, Trelew (C.P.: 9100), Argentina.

*Correspondencia: emarguet@yahoo.com.ar

El reactivo de Folin-Ciocalteu (Folin y Ciocalteu, 1927) es ampliamente utilizado para determinar la concentración de proteínas solubles según el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). En la última década ha resurgido uno de los objetivos originales que consistió en su aplicación para determinar la concentración de fenoles, anteriormente en líquidos biológicos y en la actualidad como un método para ensayar la capacidad antioxidante en alimentos (Agbor *et al.*, 2014).

El trabajo original de Folin-Ciocalteu data del año 1927 y se basa en 2 anteriores que el mismo Folin publicó con Denis en 1912 (Folin y Denis, 1912) y con Looney en 1922 (Folin y Looney, 1922). En los 3 casos el principio de la reacción se basa en la presencia de fenoles que reducen al molibdeno y tungsteno como se indica a continuación:



No existen diferencias básicas entre los 3 trabajos en lo que respecta a las reacciones químicas, sino más bien en la elección de distintos compuestos de molibdeno y tungsteno en función de su estabilidad y solubilidad.

La fórmula de Folin-Denis utilizaba tungstato de sodio (Na_2WO_4), ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$), ácido fosfórico (H_3PO_4) y un tratamiento posterior de ebullición durante 2 horas. Los dos solutos utilizados son solubles en agua en presencia de ácido fosfórico, pero con tendencia a precipitar través del tiempo.

En el caso del reactivo de Folin-Looney los autores reemplazan el Mo^{+6} contenido en el ácido fosfomolibdico por una reacción previa entre hidróxido de sodio (NaOH) y óxido molibdico (MoO_3), que origina molibdato de sodio (Na_2MoO_4). Una curiosidad de este trabajo es la recomendación de los autores de mantener la ebullición de la reacción

citada hasta la desaparición de olor a amoniacal, lo que sugiere la baja calidad de las drogas utilizadas en ese momento. Para acentuar esta sospecha es necesario poner de manifiesto que la reacción entre el hidróxido de sodio y el óxido molíbdico es instantánea a 100 °C, inodora y sin precipitados visibles.

El reactivo utiliza además tungstato de sodio y ácido fosfórico, pero en esta oportunidad, diferenciándose del trabajo de 1912, se agrega ácido clorhídrico (HCl). El protocolo indica una ebullición de 10 horas y el agregado de agua de bromo para decolorar (sic) la solución. La referencia a “decolorar” es algo confusa debido al color amarillo intenso de la mezcla, creemos que el tratamiento con agua de bromo debió estar destinado a eliminar la turbidez más que a decolorar, como se especifica en el posterior trabajo de 1927.

Siguiendo la formulación del reactivo de Folin–Looney, hemos comprobado que resulta innecesario el tratamiento térmico descrito ya que 1 a 5 minutos de ebullición son suficientes para lograr una completa disolución. También obviamos el uso de agua de bromo, como indicaba la fórmula original, no sólo por su alta peligrosidad sino porque la solución obtenida se presentaba límpida.

En el trabajo definitivo publicado en 1927 por Folin en colaboración con Ciocalteu, se reemplaza la reacción previa entre hidróxido de sodio y óxido molíbdico directamente por molibdato de sodio. Luego del agregado de ácido fosfórico y ácido clorhídrico se somete la mezcla a ebullición durante 10 horas. Concluido el tratamiento térmico se agrega sulfato de litio (Li_2SO_4) y agua de bromo con el propósito de eliminar los problemas de turbidez. Un detalle que llama la atención de este trabajo, es la recomendación de los autores de observar el aspecto final del reactivo que no debe exhibir “coloración verdosa”, lo que indica la probable contaminación de algunos de los reactivos con sustancias reductoras.

En nuestro laboratorio hemos realizado ensayos respetando esta fórmula y en forma paralela, obviando el agregado sulfato de litio. En ambos casos se evitó el uso de agua de bromo por las razones anteriormente expuestas. Como control se utilizó un reactivo de Folin-Ciocalteu comercial (Sigma). Como en el caso del reactivo de Folin-Looney, no fue necesario el tratamiento térmico sugerido, 5 minutos de ebullición fueron suficientes para disolver totalmente los solutos.

En los 3 casos, los resultados obtenidos para la determinación de proteínas

solubles según el método de Lowry, no mostraron diferencias significativas. Utilizando albumina bovina como patrón; las pendientes de las líneas de tendencia, los coeficientes de extinción y las máximas concentraciones alcanzadas respetando la ley de Lambert y Beer, resultaron comparables.

La experiencia se repitió con los 3 reactivos para determinar la concentración de fenoles, utilizando como patrones ácido gálico y ácido tánico. Los resultados, como en el caso de la determinación de proteínas solubles, no mostraron diferencias significativas.

Los autores ponen de manifiesto expresamente haber resuelto el problema de la turbidez mediante el agregado de sulfato de litio sin embargo, los resultados obtenidos en nuestras experiencias nos permiten poner en duda esta afirmación, la omisión de esta sal no tuvo influencia en la solubilidad o turbidez del reactivo final. Todos los reactivos, protegidos adecuadamente de la luz natural o artificial, permanecen estables por largos períodos y con resultados comparables a través del tiempo. Resulta interesante esta observación ya que el sulfato de litio constituye aproximadamente el 40% del costo del reactivo de Folin-Ciocalteu.

La pureza de las drogas utilizadas fue un problema habitual durante las primeras décadas del siglo XX; muchos trabajos de la época describían en forma detallada como evitar la contaminación de las sales con productos que interferían en las reacciones. Un ejemplo paradójico es el último trabajo de Folin publicado en el año 1943, poco tiempo antes de su muerte: “La preparación de tungstato de sodio libre de molibdato, junto con un proceso simplificado para la correcta elaboración del reactivo de ácido úrico” (Folin, 1934).

Esta nota tuvo como propósito repetir y comprobar protocolos de trabajo que datan de principios del siglo XX y a su vez, poner de manifiesto la gran contribución de estos científicos al servicio de lo que hoy denominamos bioquímica clínica. Este término fue acuñado por el mismo Otto Folin (1867-1934), de origen sueco y nacionalizado estadounidense quien, desde 1897 hasta 1943 publicó más de 100 trabajos y libros referidos a métodos analíticos para la determinación de metabolitos en muestras biológicas (Shaffer, 1952). Su método para la determinación de creatinina utilizando un colorímetro Duboscq es señalado como la introducción de la colorimetría en los procesos bioquímicos.

Vintila Ciocalteu (1890-1947) co-autor del clásico de 1927, era de origen rumano y trabajó junto a Folin durante los años 1926 y 1927 en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Harvard. En nuestra búsqueda bibliográfica no logramos encontrar otros trabajos escritos por Ciocalteu, sin embargo, en su país natal es más reconocido como poeta que como científico (Zeletin, 2002).

Con respecto a Joseph M. Looney, desconocemos datos biográficos a excepción de las escasas referencias hechas a través de la Facultad de Medicina de Harvard donde se lo destaca como un profesor de bioquímica dedicado a la neuroendocrinología. Publicó una serie de trabajos referidos a parámetros en sangre y fluido espinal, especialmente en pacientes con trastornos psiquiátricos.

Creemos necesario un apartado especial para Willey Denis (1879-1929); nacida en Nueva Orleans y considerada la primera mujer en ingresar al campo de la bioquímica clínica. Como se indica en su resumida biografía publicada en *Chemical Chemistry*, mucho tuvo que luchar para ser considerada en un ámbito donde “la profesión científica y médica estaba marcada por un flagrante chauvinismo machista” (Meites, 1985).

Trabajó con Folin en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Harvard desde 1910 hasta 1920, convirtiéndose en su principal colaboradora. Durante esa década publicó 73 trabajos, 41 en colaboración con Folin, entre ellos el de 1912 donde describen la reacción para determinar fenoles, que desde nuestro punto de vista representa un hito en la historia de los métodos analíticos.

Bibliografía

Agbor G. A., Vinson J. A. & Donnelly P. E. 2014. Folin-Ciocalteu reagent for polyphenolic assay. *Int. J. Food Sci.Nutr. Diet.*, **3(8)**: 147-156.

Folin O. 1934. The preparation of sodium tungstate free from molybdate, together with a simplified process for the preparation of a correct uric acid reagent (and some comments). *J. Biol. Chem.*, **106**: 311-314.

Folin O. & Ciocalteu V. 1927. Tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, **73**: 627-650.

Folin O. & Denis W. 1912. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.*, **12**: 239-243.

Folin O. & Looney J. 1922. Colorimetric methods for the separate determination of tyrosine, tryptophane,

and cystine in proteins. *J. Biol. Chem.*, **51**: 421-434.

Lowry O. H , Nira J., Rosebrough N. J., A. Lewis Farr A. & Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.

Meites S. 1985. Willey Glover Denis (1879-1929), pioneer woman of clinical chemistry. *Clin. Chem.*, **31(5)**: 774-778.

Shaffer P. A. 1952. Otto Folin (1867-1934). A biographical memoir. National Academy of Sciences.

Zeletin C. D. 2002. Excursus bibliográfica: Vintilă Ciocalteu. Romania literara, **6**:1

Primer registro de *Homonota fasciata* en la provincia de Santa Cruz (Reptilia, Sauria, Phyllodactylidae).

First record of *Homonota fasciata* in Santa Cruz province (Reptilia, Sauria, Phyllodactylidae).

José Alejandro Scolaro^{1*} y Amanda Manero²

¹Facultad de Ciencias Naturales, Sede Trelew, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco y CENPAT-CONICET, Puerto Madryn, Chubut.

²Universidad Nacional de la Patagonia Austral. Unidad Académica Rio Gallegos, Rio Gallegos, Santa Cruz.

*Correspondencia: scolaro@cenpat-conicet.gob.ar

Palabras Clave: *Homonota fasciata*, Reptiles, Santa Cruz, gecko.

Keywords: *Homonota fasciata*, Patagonian Reptiles, geographic distribution, gecko, anthropological dispersion, taxonomy.

Homonota fasciata (Duméril y Bibron 1836), comúnmente conocida como Gecko de las Sierras, Ututo nocturno o Geco Salamanca, es una pequeña lagartija nocturna de la familia Phyllodactylidae, con una amplia distribución geográfica desde el sur de Bolivia, Oeste de Paraguay y Mato Grosso en Brasil, hasta el alto y medio valle del Río Negro, en la Patagonia norte (Cabrera 2015).

Una actualización de los registros documentados de la distribución más austral de esta especie (Pérez *et al* 2008) incluye el centro norte de Río Negro en el área rural de Chichinales y Villa Regina (39° 46'S; 67° 18'W) y centro-este de Neuquén, en el complejo de la represa de

El Chocón-Cerros Colorados (38° 29'S; 68° 56'W).

En la presente nota se comunica el registro de la especie, en la localidad de Koluel Kaike (46° 42'57" S; 68° 13'30" W), en el centro-norte de la Provincia de Santa Cruz; A. Manero Col. 05-11-2005, Ejemplar N° JAS-DC 2324. J.A. Scolaro-Diagnostic Collection, Centro Nacional Patagónico, IDEAus, CONICET.

Esta localidad se encuentra situada a 25 km aproximadamente hacia el oeste de Pico Truncado y al norte de la gran cuenca del Río Deseado. En la **Fig. 1** se ilustra el ejemplar registrado en la Colección, junto con un ejemplar vivo de la misma especie (Merlo, San Luis) a los efectos comparativos.



Figura 1. *Homonota fasciata*. Arriba: ejemplar N° 2324 JAS-DC de Koluel Kaike, Santa Cruz (Foto: J.F. Escobar, 15-11-2013). Abajo: ejemplar de Merlo, San Luis (Foto: B. Blotto, 15-08-2005).

Es una lagartija pequeña (LHC = 60 mm) pero robusta, coloración de fondo grisáceo cremoso con grandes manchas irregulares cuadrangulares de color pardo oscuro que dejan estrechas bandas bilaterales claras en el dorso. Ambas bandas claras y oscuras, se ensanchan hacia la cola dándole un aspecto de anillado. Lo notable de esta especie son sus escamas dorsales grandes muy aquilladas entremedio de otras más pequeñas y que le dan un peculiar aspecto rugoso o granular. Su coloración es variable por efecto de los cromatóforos, exhibiendo cambios de tonalidad posiblemente como respuesta a cambios ambientales (Cabrera, 2015). Tiene cinco dedos con escamas infradigitales en laminillas, que le favorecen su adhesión en superficies verticales.

Considerada como una especie típica de las regiones ecológicas Chaqueña y del Monte, su amplia distribución geográfica la presenta como una especie sumamente plástica en sus requerimientos de biotopo. Es además muy frecuente encontrarla habitando en viviendas y construcciones humanas (filoantropía) (Scolaro, 2006).

Se conocen algunos aspectos de su biología. Su reproducción es ovípara, y durante los meses de octubre a diciembre se ha registrado la postura tanto de uno o dos huevos, como de varios huevos, esto último seguramente atribuible a posturas

comunales (Cabrera, 2015). Los nacimientos ocurren entre diciembre y marzo, y la actividad reproductiva de los machos parece corresponder a un ciclo continuo. Es insectívora generalista. Se refugia bajo rocas, lajas, troncos y hasta en cortezas de árboles (Scrocchi *et al.*, 2010).

El registro comunicado constituye un sorprendente hallazgo en un área inusual, que muestra una notable discontinuidad en la ampliación del área de distribución de la especie. Entre el sitio más austral previamente documentado y este nuevo hallazgo, distantes aproximadamente 800 km, no se conocen hasta el presente registros de presencia de la especie en latitudes intermedias, considerando la extensa longitud que comprenden las provincias de Chubut y Río Negro.

Tomando en cuenta que la localidad del hallazgo está comprendida dentro de una región de abundantes campamentos de explotación petrolífera, donde resultan frecuentes los traslados de máquinas, herramientas, bultos y mobiliario, y la natural predisposición de la especie a habitar construcciones humanas, no habría que descartar que su presencia se deba a un involuntario traslado de origen antrópico. Posiblemente desde otras regiones de explotación petrolera (cf. alto valle del Río Negro y Neuquén), donde la

especie es más frecuente y encuentra su hábitat más favorable.

Una futura exploración más exhaustiva del área podrá arrojar luz sobre la colonización de esta especie en esta área marginal de su rango de distribución.

Bibliografía

Cabrera, M.R. 2015. Reptiles del centro de la Argentina. Ed. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. 298 pp.

Pérez, C.H.F., Frutos, N., Morando, M. & M. Kozykariski 2008. Southernmost

records for *Homonota fasciata* (Dumèril & Bibron, 1836) in northern Patagonia, Argentina. *Herpetozoa*, **20(3/4): 182-184.**

Scolaro, J.A. 2006. Reptiles Patagónicos Norte. Una guía de campo. Ed. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Comodoro Rivadavia. 112 pp.

Scrocchi, G.J., Abdala, C.S., Nori, J. & H. Zaher 2010. Reptiles de la Provincia de Río Negro, Argentina. Museo Patagónico de Ciencias Naturales. Viedma. 252 pp.

Primera medición de las superficies y estimación poblacional de las colonias de Cormorán Imperial (*Phalacrocorax atriceps*) de Isla Chata, Provincia de Santa Cruz, Argentina (aves: Phalacrocoracidae).

First surfaces measurement and population assessment of the Imperial Cormorant colonies (*Phalacrocorax atriceps*) of Chata Island, Santa Cruz Province, Argentina (aves: Phalacrocoracidae).

Gabriel Punta^{1,2}

¹Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco Facultad de Ciencias Naturales Sede Trelew Julio A. Roca 115, 1° Piso, (U9100AQC) Trelew, Chubut, Argentina.

²Subsecretaría de Pesca y Acuicultura de la Provincia del Chubut Avenida Libertad 279 (U9103HEC) Rawson, Chubut.

Correspondencia: gabriel.punta@ gmail.com

Resumen: El día 8 de enero de 1989 por la mañana se efectuó una visita de alrededor de tres horas de duración a la Isla Chata (47° 55' 07" S y 65° 44' 21" O) situada aproximadamente a 1,6 Km de la Punta Norte de la Bahía Oso Marino, Provincia de Santa Cruz. Se encontraron dos colonias de Cormorán Imperial (*Phalacrocorax atriceps*), las cuales se hallaron compuestas por individuos de las dos formas de color (63 % del tipo "atriceps" y 37 % del tipo "albiventer", n= 54). Sus superficies resultaron ser de 4.821 m² y 250 m², para las partes sur y norte, respectivamente. La densidad de nidos arrojó un valor de 2,02 nidos/m². Se estimó que la cantidad de parejas reproductoras en ese momento era de 10.243, siendo la mayor cifra histórica de superficie ocupada y número de cormoranes para cualquier yacimiento de guano de las costas argentinas hasta ese momento. La posterior reducción del tamaño poblacional de las colonias de Isla Chata pudo haber sido causada por la gran perturbación oceanográfica producida por el fenómeno de El Niño, ocurrido entre los años 1990 y 1995.

Palabras clave: Cormorán Imperial, Isla Chata, superficie ocupada, número de nidos.

Abstract: On January 8, 1989, we visited during three hours Chata Island (47° 55' 07" S; 65° 44' 21" W) located approximately 1,6 km from the North Point, Marine Bear Bay, Santa Cruz Province. We found two colonies of Imperial Cormorants (*Phalacrocorax*

atriceps), which were found composed of individuals of the two forms of color (63 % of the type "atriceps" and 37 % of the type "albiventer", n= 54). Their surfaces were found to be 4,821 m² and 250 m², to the south and north colonies, respectively. The density of nests was 2.02 nests/m². The number of breeding pairs at this time was estimated in 10,243, or the highest amount of historic surface occupied and number of cormorants for any deposit of guano of the Argentine coast until that time. The subsequent reduction of the population size of the colonies of Chata Island could have been caused by the great oceanographic perturbation produced by the El Niño phenomenon, which occurred between the years 1990 and 1995.

Key words: Imperial Cormorant, Chata Island, occupied area, nest numbers.

El día 8 de enero de 1989 por la mañana se efectuó una visita de alrededor de tres horas de duración a la Isla Chata (47° 55' 07" Latitud Sur y 65° 44' 21" Longitud Oeste) situada aproximadamente a 1,6 km de la Punta Norte de la Bahía Oso Marino y a unos 21 km al SSE de la Ciudad de Puerto Deseado, Provincia de Santa Cruz. La misma tuvo por objeto evaluar los depósitos de guano de cormorán como así también estimar la cantidad de aves productoras y se llevó a cabo a bordo de un bote neumático con motor fuera de borda. La navegación de los poco más de 3 km realizada fue realmente dificultosa para una embarcación pequeña (3,2 m de eslora) debido al agitado estado del mar, con fuertes escarceos, y al complicado arribo, porque la isla no posee playas aptas para el desembarco.

La isla aparece como un promontorio bajo, de forma aproximadamente

rectangular de unos 800 m de largo por unos 150 m de ancho promedio con su eje mayor orientado en la dirección NNE – SSO. Su superficie total, completamente rocosa y más o menos nivelada, sin elevaciones notorias, es de alrededor de 12 hectáreas. Para la fecha en que se la visitó existían restos de explotación de guano, incluido un galponcito de chapa, partes de unos rieles y un carrito para esas vías, junto con guano acumulado en la porción central de la isla. La estiba de bolsas y los restos de guano eran utilizados por unos pocos Pingüinos de Magallanes (*Spheniscus magellanicus*) para construir sus nidos-cueva, e inclusive en una de ellas observamos un Pingüino de Vincha (*Piposcelis papua*).

Los Cormoranes Imperiales (*Phalacrocorax atriceps*) se hallaron en dos colonias situadas en el extremo norte de la isla separadas por una profunda

grieta (**Fig. 1**), sobre cuyas laderas se observó una colonia de Cormoranes de Cuello Negro (*P. magellanicus*), y mostraron ser de las dos formas de color (*sensu* Siegel-Causey 1986 y Rasmussen 1991). Conteos realizados sobre varias fotografías permitieron determinar que el 63% correspondió al tipo “atriceps” y el 37 % al tipo “albiventer” (n= 54). Ninguno de los nidos tenía huevos, unos pocos tenían pichones chicos (de hasta un mes de edad) y el resto tenía pichones grandes (más de un mes de edad), lo que mostró que el pico de postura durante esa temporada se produjo entre fines de Octubre y principios de Noviembre, dentro del rango habitual para la especie en la Patagonia (Arrighi y Navarro 1998, Punta *et al.* 2003a). Las características del hábitat reproductivo de ambas colonias coincidieron con las descriptas

como típicas para la especie (Punta *et al.* 2003b).

Las superficies, medidas con cinta métrica de acero, resultaron ser de 4.821 m² y 250 m², para las colonias sur y norte, respectivamente. La densidad de nidos se midió en la mayor de las colonias en un cuadrado de 10 m de lado, arrojando un valor de 202 nidos. Por lo tanto se estimó que la cantidad de parejas reproductoras en ese momento era de 10.243, o sea la mayor cifra histórica de superficie ocupada y número de cormoranes para cualquier yacimiento de guano de las costas argentinas hasta ese momento (Carrara 1952, Godoy 1963, Punta 1989). La profundidad promedio de guano, medida con una varilla o sonda metálica graduada dividida en centímetros, se estimó en 55,67 cm por lo que el volumen de guano depositado resultó de 2.823,03 m³.



Figura 1. Ubicación espacial de las colonias de Cormorán Imperial en la Isla Chata.

Sólo existen dos registros comparables para los Cormoranes Imperiales de la Isla Chata. Uno previo, consistente tan sólo en una estimación visual de la cantidad de cormoranes (Devillers y Terschuren 1978). El mismo indicó un valor poco preciso para el tamaño poblacional (entre 5.000 y 10.000 nidos). El otro es posterior, obtenido en noviembre del año 1990 (Yorio y Harris 1997), pero el mismo es confuso. Si bien se menciona que para ese estudio, el rango de variación del tamaño de las colonias de Cormorán Imperial fluctuó entre 30 y 10.300 nidos, en la tabla donde se indica la cantidad de nidos de Cormorán Imperial figura la Isla Chata con 1.030 nidos. Con posterioridad al año 1990 las

estimaciones de la población de cormoranes de Isla Chata son notoriamente menores (Yorio *et al.* 1998, Frere *et al.* 2005) y dan cuenta de una disminución de más del 40% de los reproductores aquí indicados, sin que se hayan podido establecer las razones por las cuales ha sucedido tan drástico descenso.

Disminuciones como la sufrida por la colonia de Cormorán Imperial de Isla Chata, de alrededor del 50% en pocos años, se han observado en otras poblaciones de aves marinas (Newton 2013). Las mismas estuvieron por lo general asociadas a variaciones en la abundancia de las principales presas de las cuales se alimentan, la cual a su vez

puede estar relacionada con cambios en factores oceanográficos (Montevocchi 1993). Durante la visita a la Isla Chata se observaron varios regurgitados de Cormorán Imperial que contenían Sardina Fueguina (*Sprattus fuegensis*) razón por la cual debería prestarse atención a las variaciones en la abundancia de esta especie en el área marina cercana a las costas del norte de Santa Cruz.

El único antecedente de una reducción poblacional semejante en colonias de cormoranes de la Argentina ocurrió en la de Cormorán Imperial de Punta Tombo, donde se pasó de 4.300 nidos (Boswall y Prytherch 1972) al abandono total de la colonia durante la temporada 1982/83 (Malacalza 1984) y luego se ha mantenido en unos pocos cientos de nidos hasta la actualidad (Punta 2012). Es interesante hacer notar que la deserción de la colonia se produjo durante el mes de diciembre de 1982, justamente el momento en el cual se produjo El Niño más intenso de la historia (Wolter y Timlin 1998). El gran descenso observado en el tamaño de las colonias de Isla Chata se verificó entre 1990 y 1995, período durante el cual se produjo El Niño de más duración de la historia (Krebs 2009). Esta gran perturbación oceanográfica puede haber influido en las significativas disminuciones del tamaño de las colonias de la Isla Chata.

Agradecimientos

Deseo agradecer al Sr. Omar Juanola, quien con su experiencia y habilidad de gaucho marino nos facilitó la logística y la navegación para acceder a la isla. Al Sr. José María Gómez por aportar sus conocimientos náuticos de marinero del Crucero General Belgrano. Estas líneas son un homenaje a ustedes dos. Al Sr. Eduardo Hofinger por haber colaborado para que el trabajo se haya podido realizar. ¡Navegamos tantos mares amigo! A todos aquellos que durante más de veinticinco años me impulsaron a escribir esta nota. Al Lic. Ricardo Fondacaro por la lectura crítica del manuscrito. Y siempre a mi compañera Andrea Gallo.

Bibliografía

- Arrighi, A. y Navarro, J. 1998. Ecología reproductiva del Cormorán Imperial (*Phalacrocorax atriceps*) en la Isla Deseada (Santa Cruz, Argentina). *Hornero* **15**: 64-67.
- Boswall, J. y Prytherch, R.J. 1972. Some notes on the birds of Point Tombo, Argentina. *Bulletin of the British Ornithologists' Club* **92**: 118–129.
- Carrara, I.S. 1952. Lobos marinos, pingüinos y guaneras de las costas del litoral marítimo e islas adyacentes de la

- República Argentina. La Plata - Argentina. 191 pp.
- Devillers, P. y Terschuren, J.A. 1978. Relationships between the blue-eyed shags of South America. *Gerfaut* **68**: 53-86.
- Frere, E., Quintana, F. y Gandini, P. A. 2005. Cormoranes de la costa patagónica: estado poblacional, ecología y conservación. *Hornero* **20**: 35-52.
- Godoy, J. C. 1963. Fauna silvestre. C.F.I. Tomo VIII (1 y 2), Buenos Aires. 527 pp.
- Krebs, C.J. 2009. Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance. 6th ed. Benjamin Cummings, San Francisco. 655 pp.
- Malacalza, V.E. 1984. Aves guaneras. Relevamiento de especies en tres cormoraneras continentales de la Provincia del Chubut (Argentina) (Pelecaniformes-Phalacrocoracidae). Centro Nacional Patagónico. Contribución **84**: 1-13.
- Montevecchi, W.A. 1993. Birds as indicators of change in marine prey stocks. Pp. 217-266. En: Furness, R.W. y Greenwood, J.J.D. (Eds). Birds as monitors of environmental change. Chapman & Hall, London.
- Newton, I. 2013. Bird populations. Harper Collins Publishers. London. 596 pp.
- Punta, G. 1989. Guaneras de la Provincia del Chubut. Potencialidad Productiva y Fundamentos para su Manejo Racional. Rawson. Dirección de Impresiones Oficiales: 113 pp.
- Punta, G. 2012. Aspectos de la ecología alimentaria de los Cormoranes Imperial y Cuello Negro en Punta Tombo, Chubut, Argentina. 25° Reunión Argentina de Ecología, Luján, Buenos Aires. Libro de resúmenes p. 95.
- Punta, G., Yorio, P., Herrera, G. y Saravia, J. 2003a. Biología reproductiva de los Cormoranes Imperial (*Phalacrocorax atriceps*) y Cuello Negro (*P. magellanicus*) en el Golfo San Jorge, Chubut, Argentina. *Hornero* **18**: 103-111.
- Punta, G., Yorio, P., Saravia, J. y Garcia Borboroglu, P. 2003b. Breeding habitat requirements of Imperial Cormorants (*Phalacrocorax atriceps*) and Rock Shags (*P. magellanicus*) in central Patagonia, Argentina. *Waterbirds* **26**: 176-183.
- Rasmussen, P.C. 1991. Relationships between coastal South American King and Blue-eyed shags. *Condor* **93**: 825 - 839.
- Siegel-Causey, D. 1986. The courtship behavior and mixed-species pairing of king and imperial blue-eyed shags *Phalacrocorax albiventer* and *P. atriceps*. *Wilson Bull.* **98**: 571-580.
- Wolter, K. y Timlin, M.S. 1998. Measuring the strength of ENSO events: how does 1997/98 rank?. *Weather* **53**: 315-324.

Yorio, P. y Harris, G. 1997. Distribución reproductiva de aves marinas y costeras coloniales en Patagonia: Relevamiento aéreo Bahía Blanca – Cabo Vírgenes, Noviembre 1990. Informe Técnico PMIZCP N° **29**: 1–31.

Yorio, P., Frere, E., Gandini, P. y Harris, G. (Eds) 1998. Atlas de la distribución reproductiva de aves marinas en el litoral Patagónico Argentino. Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica, Fundación Patagonia Natural, Buenos Aires, Argentina. 221 pp.

Estudio químico y actividad biológica de derivados sesquiterpénicos presentes en especies patagónicas del género *Senecio*.

Chemical study and biological activity of sesquiterpenoids derivatives present in patagonic species of genus *Senecio*.

Tesista: **Luz Alejandra Arancibia**

Directora de Tesis: **Dra. Cristina Colloca**. Consejera de estudios: **Dra. Alicia Marchiaro**.

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales en cumplimiento de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Farmacia.

Lugar de realización y lugar de presentación: Comodoro Rivadavia. Facultad de Ciencias Naturales. UNPSJB.

Fecha de la defensa: 12 de abril de 2013. Comodoro Rivadavia. Facultad de Ciencias Naturales. UNPSJB. Número total de páginas de la tesis: 137 páginas.

Palabras clave: *Senecio*, Patagonia, eremofilanos.

Resumen

La estepa patagónica presenta una gran diversidad de flora constituyendo una importante reserva patrimonial de carácter científico. Actualmente se han descrito como constituyentes químicos del género *Senecio* a los siguientes compuestos: alcaloides pirrolizidínicos, sesquiterpenoides, monoterpenoides, diterpenoides, triterpenoides, esteroides, flavonoides, cumarinas, ácidos fenólicos y alcanos según Yang *et al.* (2011). La clasificación de los sesquiterpenoides incluye a compuestos característicos tales como: eremofilanos, cacalolides, bisabolenos etc. todos ellos presentes en el género más grande y complejo de la

familia de las Asteraceae, el género *Senecio* perteneciente a la tribu Senecioneae. Las partes investigadas de las especies del género utilizadas en la medicina popular para el tratamiento de heridas, como antieméticos, anti-inflamatorios y en preparaciones vasodilatadoras, incluyen: raíces, hojas, tallos, flores, y plantas enteras.

Algunos compuestos aislados e incluso extractos crudos de especies de este género son conocidos por su actividad antimicrobiana, antifúngica, antituberculosa, antiulcerosa, antimicótica, insecticida y antialimentaria. Además gran parte de las especies evidencian una toxicidad

importante, la cual ha sido atribuida a la presencia fundamentalmente de alcaloides pirrolizidínicos y a derivados del tipo furanoeremofilanos. Estos últimos han sido aislados de las partes aéreas de especies colectadas en distintos lugares del mundo, tales como *S. aureus*, *S. mauricei*, *S. hypochoerideus*, *S. erosus*, *S. nemorensis*, *S. alatus*, *S. pampse*, *S. rosmarinus*. Se describen a continuación ejemplos de las actividades mencionadas. *S. chionophilus* es un arbusto pequeño, leñoso que crece en la cordillera de los Andes en América del Sur, por encima de 1500 m. La infusión de sus partes aéreas y de raíces se utilizan tradicionalmente en Chile para el tratamiento de resfriados fuertes y rinorrea. Todos los compuestos aislados de esta especie fueron evaluados por su potencial antituberculoso frente a *Mycobacterium tuberculosis*. El presente trabajo de tesis permitió el estudio químico de los constituyentes terpenoides, biosintetizados por especies del género *Senecio* que crecen naturalmente en la Patagonia Central, a saber, *Senecio filaginoides* DC var. *filaginoides*, *Senecio subpanduratus* O. Hoffm y *Senecio mustersii* Speg. var. *mustersii*. De las especies mencionadas, solo *S. filaginoides* ha sido estudiada con mayor profundidad. Respecto de esta última se describen una amplia variedad

de derivados terpénicos que incluyen: eremofilanos, furanoeremofilanos, fukinonas, senberginonas y germacrenos, como sesquiterpenos principales. Todos ellos presentes en las partes aéreas de plantas procedentes de la región central de nuestro país. Considerando lo antes mencionado y con el objetivo principal de estudiar especies autóctonas se enfocó el plan de tesis hacia dos áreas bien definidas: El aislamiento de los derivados sesquiterpénicos más representativos y la búsqueda de actividad biológica primaria de los mismos. En particular, nuestros estudios sobre *Senecio subpanduratus* evidenciaron actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa* y los compuestos aislados a partir de *Senecio mustersii* fueron activos frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y todas las especies de *Candida* ensayadas. En cuanto a citotoxicidad y posibles mecanismos de acción citotóxica, los resultados que presentamos en este trabajo son los primeros para un compuesto aislado de una especie de *Senecio* de la Patagonia Argentina.

Objetivos

Investigar los principales constituyentes terpénicos en tres especies del género *Senecio* (Asteraceae) de la región Patagónica Argentina: *Senecio filaginoides* DC var. *filaginoides*, *Senecio*

subpanduratus O. Hoffm. y *Senecio mustersii* Speg. var. *mustersii*.

Aislar, purificar y elucidar la estructura química de los constituyentes terpénicos hallados, utilizando métodos cromatográficos y espectroscópicos tales como IR, EM, RMN ¹H y RMN ¹³C.

Evidenciar la actividad biológica de los compuestos puros y extractos obtenidos, realizando ensayos microbiológicos, alelopáticos y de toxicidad.

Contribuir a la formación de recursos humanos locales capacitados para la investigación en el área de productos naturales.

Materiales y Métodos

Los ejemplares de herbario de las especies estudiadas se depositaron en el Herbario Regional Patagónico de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. El material colectado se secó a temperatura ambiente y luego fue molido y tamizado en un molinillo de paletas con tamiz de malla 20. Se tomaron porciones de material vegetal con la cual se obtuvieron extractos alcohólicos en frío. A posteriori se realizaron particiones mediante la utilización de mezclas de solventes de distinta polaridad (n-hexano-acetato de etilo).

La separación y purificación de compuestos se realizó mediante la aplicación de distintos sistemas de técnicas de cromatografía. Las estructuras aisladas y purificadas se sometieron a los análisis específicos para cada caso EM, IR, RMN ¹H, RMN ¹³C y posteriormente se realizaron ensayos de actividad antibacteriana, antifúngica y ensayos de interacción alelopática utilizando semillas de especies monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Conclusiones

Análisis Espectral

-Los tres tipos de especies del género *Senecio* estudiadas presentaron una mezcla compleja de furanoeremofilanos de las que se lograron separar 3 compuestos puros: *Sf*, *Sp* y *Sm₁*.

-9-oxo-furanoeremofilano, *Sf* de la especie *S. filaginoides*.

-6-acetiloxi-1-oxo-furanoeremofilano, *Sp* de la especie *S. subpanduratus*.

-1-hidroxi-6-metacriloxi-9-oxo-furanoeremofilano, *Sm₁* de la especie *S. mustersii*.

-El compuesto *Sm₂* no se pudo aislar pero se logró identificar.

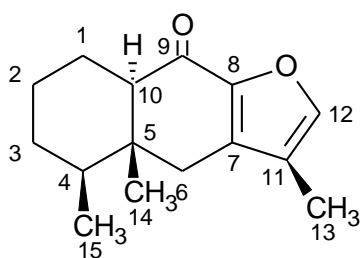
-1-hidroxi-6-isobutiroxi-9-oxo-furanoeremofilano, *Sm₂* de la especie *S. mustersii*.

-Los compuestos *Sm₁* y *Sm₂* no fueron encontrados en la literatura.

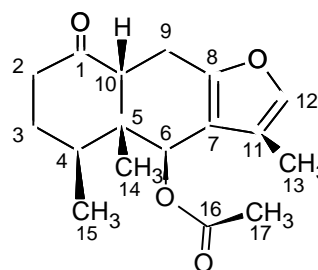
-Todos los compuestos fueron identificados aplicando técnicas espectroscópicas bidimensionales de alta resolución, lo cual permitió asignarles la estructura presentada. Sin embargo en el caso de los compuestos *Sm₁* y *Sm₂* solamente se pudo asignar la orientación de los metilos 13, 14 y 15 de acuerdo a bibliografía, Pinder (1977). Según bibliografía Gu *et al.* (2004) y Oh (2005) se permitió inferir la estereoquímica *trans*

para los anillos A y B del compuesto *Sf* obtenido de la especie *S. filaginoides*. El compuesto *Sf* evidenció en C-9 un grupo carbonilo careciendo de otros sustituyentes. En cambio los otros compuestos *Sp*, *Sm₁* y *Sm₂*, además de la función mencionada presentaron otros grupos representativos en las posiciones 1 y 6, lo cual condice con una estereoquímica del tipo *cis*.

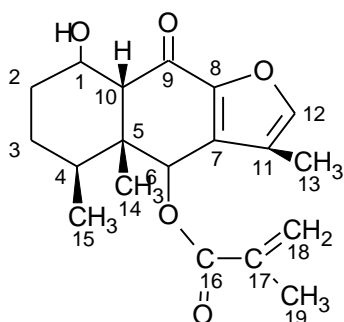
Estructuras de los compuestos: *Sf*, *Sp*, *Sm₁* y *Sm₂*



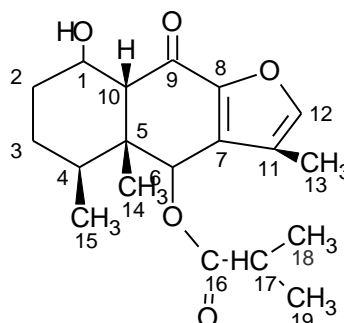
Sf



Sp



Sm₁



Sm₂

-Ninguno de estos compuestos fueron encontrados en las especies descritas para esta tesis con anterioridad por lo tanto constituyen un aporte científico al conocimiento las mismas.

Actividad Biológica

-Los resultados del ensayo de toxicidad contra el patógeno *Botrytis cinerea* indicaron la presencia de actividad fungistática de los compuestos *Sf*, *Sp* y la mezcla (*Sm₁+Sm₂*).

-El compuesto de *Sp* reveló ser más activo que los provenientes de *S. filaginoides*, y *S. mustersii* ya que a una concentración de 8 mg/ml resultó ser el único compuesto con actividad fungicida.

-La característica estructural de la fusión de los anillos A y B descritos para la decalina podría constituir un factor decisivo en la actividad contra el hongo patógeno *B. cinerea*, Arias-Cassará *et al.* (2010). En cuanto a los ensayos de citotoxicidad, la baja ED₅₀, así como el elevado porcentaje de inhibición del MG-ADN, demuestran una prometedora actividad biológica del compuesto aislado denominado *Sp*.

Los resultados de los ensayos microbiológicos permiten inferir dos consideraciones principales: los compuestos *Sf*, *Sp* y la mezcla (*Sm₁+Sm₂*) presentaron actividad antibacteriana positiva contra todas las especies de *Candidas sp* testeadas. El compuesto *Sp* y la mezcla de (*Sm₁+Sm₂*) presentaron actividad antibacteriana positiva frente a la especie *Pseudomonas aeruginosa*.

-Los ensayos de interacción *in vitro* de las semillas de *L. esculentum*, *L. multiflorum* y *L. sativum* con los compuestos *Sf*, *Sp* y la mezcla (*Sm₁+Sm₂*) demostraron que:

-Los compuestos descritos presentaron actividades inhibitorias y/o estimulatorias sobre los crecimientos radiculares y longitud de tallos de plántulas así como también efectos inhibitorios sobre la germinación de semillas.

Bibliografía

- Arias Cassará, M.; Borkosky, S.; González-Sierra, M.; Bardón, A.; Ibarra, M. 2010. Two New furanoeremophilanes from *Senecio santelisis*. *Chem.Biodivers.* **7**: 1-11.
- Gu, J.; Wang, Y.; Franzblau, S.; Montenegro, G.; Timmerman, B. 2004. Constituents of *Senecio chionophilus* with potential antitubercular activity. *J. Nat. Prod.*, **67**:1483-1487.
- Oh H. 2005. Remophilanetriol. A new eremophilane from the Roots of *Rehmannia glutinosa*. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **26**: 1303-1305.
- Pinder, A. R. 1977. The Chemistry of the Eremophilane and Related Sesquiterpenes en *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Herz, W., Grisebach, H., Kirby, G.W.,

(ed.); Springer Verlag, Vienna and New York, 116 pp.

Yang, Y.; Zhao, L.; Wang, Y.; Chang, M.; Huo, C.; Gu, Y.; Shi, Q.; Kiyota, H. 2011. Chemical and Pharmacological Research on Plants from the Genus *Senecio*. *Chem. Biodivers.*, **8**: 13-72.

Publicaciones

Arancibia, L.; Naspi, C.; Pucci, G.; Arce, M. Biological activity of a furanoeremophilane isolated from *Senecio filaginoides* var. *filaginoides*. *BLACPMA*. 2013, **12** (1), 18-23. ISSN: 0717-7917.

Obtención de productos de importancia farmacéutica biosintetizados por especies de algas pardas de las costas del Golfo San Jorge.

Obtaining products of pharmaceutical importance synthesized by brown algae species of the San Jorge Gulf coasts.

Tesista **Mónica Beatriz Becerra.**

Director de Tesis **Dra. María Luján Flores**, Co-Director de Tesis **Dr. Carlos Arturo Stortz.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales en cumplimiento de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Farmacia. Lugares de realización: Farmacognosia, Química Biológica II. GQBMRNP-CRIDEKIT, FCN, UNPSJB; Depto. Qca. Orgánica, FCEN, UBA. Lugar de presentación UNPSJB Fac. Cs. Naturales, 20 de Mayo de 2016. Número total de páginas: 390.

Palabras claves: *Lessonia vadosa*, *Scytosiphon lomentaria*, alginato de sodio, fucosterol, CPC, FSC, Leishmania.

Objetivos

Ampliar el conocimiento de los metabolitos biosintetizados por las algas pardas patagónicas, enfatizando en aquellos con una potencial aplicación en la industria farmacéutica e industrias relacionadas. Para ello se investigaron fundamentalmente los hidratos de carbono de algas pardas del Golfo San Jorge, priorizando *Lessonia vadosa*, a fin de determinar la estructura, enfatizando en la obtención de alginatos de calidad óptima para su aplicación en Salud.

Principales métodos utilizados

Métodos extractivos: solventes a alta presión (PSE) y fluidos supercríticos (SFE). **Métodos cromatográficos:** de partición centrífuga (CPC), de presión media (MPLC), líquida de alta performance (HPLC-UV), líquida de alta performance de intercambio aniónico (HPAEC-PAD), gaseosa con detector de ionización de llama (CGL-FID), gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-MS), en capa fina (TLC), en papel (CP). **Métodos espectroscópicos:** ¹H-RMN,

^{13}C -RMN mono y bidimensional, infrarrojo (FT-IR), difracción de Rayos X. **Métodos de preparación de micropartículas:** gelificación iónica interna y Spray Drying.

Determinaciones de actividad biológica: método del MTT, método de reducción de la resazurina, método de azul de Alamar.

Resultados y Conclusiones

Scytosiphon lomentaria Link (Scytosiphonaceae), fue colectada en verano en Playa Bonita, a 40 km al sur de Comodoro Rivadavia, en la zona central del Golfo San Jorge. Con etanol de 96° se extrajo manitol y polifenoles; entre los últimos se destacaron taninos, confiriéndole una fuerte astringencia y olor característico “estíptico” a los productos. Al progresar las extracciones aumentó el contenido de hidratos de carbono en los productos, destacándose el de ácido clorhídrico, el que también presentó un rendimiento importante. Las proteínas fueron mayoritarias en el extracto de cloruro de calcio en caliente, si bien otros productos también las contenían. Los ácidos urónicos predominaron, como era de esperar, en el extracto de carbonato de sodio, solvente que permite solubilizar el ácido algínico en forma de sal de sodio. Los principales

monosacáridos componentes de los extractos acuosos fueron fucosa, galactosa y ramnosa, además de manosa y xilosa en el producto de ácido clorhídrico. Este último extracto fue purificado mediante cromatografía en columna de intercambio por DEAE Sephadex A-50 diluida con Sephadex G-100, obteniéndose fracciones neutras mayoritarias que evidenciaron una importante complejidad. Si bien la glucosa también fue detectada, la cantidad resultó muy baja lo que podría indicar que, a diferencia de otras algas pardas, *S. lomentaria* no biosintetiza laminaranos en proporciones importantes. Respecto de los lípidos, demostró la presencia de fosfatidilcolina (PC) y monogalactosildiacilglicérido (MGDG), además de lípidos neutros acompañados de pigmentos. La PC es considerada un marcador quimiotaxonómico que diferencia a las algas pardas en un grupo que la contiene y otro grupo que no. Así, las Scytosiphonales y Laminariales pertenecen al primer grupo, mientras que por ejemplo las Fucales no lo evidencian, al menos en proporciones importantes. Por otra parte, en el extracto etanólico se detectó la presencia de ácido palmítico y MGDG, lo cual también coincide con lo publicado para otras algas pardas para las que se describe al ácido palmítico como uno de los componentes de los MGDG.

Fue posible detectar además β -caroteno, clorofila *a* y fucoxantina.

Lessonia vadosa Searles (Lessoniaceae), fue también colectada en el período estival, en la zona denominada La Tranquera, ubicada a 35 km al sur de Comodoro Rivadavia, en la zona central del Golfo San Jorge. Evidenció manitol, fucoidanos y alginatos. Los fucoidanos sólo contienen poco más del 50 % de fucosa, un rasgo que aparece en algunas otras especies, mientras que otras muestran fucosa en forma casi exclusiva. Con respecto a los lípidos, estos metabolitos mostraron un perfil de mayor complejidad para el extracto alcohólico obtenido a 70 °C, evidenciando la presencia de fosfolípidos, glicolípidos, sulfolípidos y restos de lípidos neutros acompañados de pigmentos. Nuestros resultados coincidieron también para esta especie con lo descrito en literatura respecto de la presencia de PC en los órdenes Laminariales y Scytosiphonales, situando a *Lessonia vadosa* (Laminariales) de las costas del Golfo San Jorge, en el grupo de aquellas especies de algas pardas que lo biosintetizan. La fosfatidiletanolamina (PE) estuvo presente en ambos extractos alcohólicos, lo cual resulta coincidente con otros estudios realizados sobre otras Laminariales. Otro grupo a destacar

fueron los glicolípidos que en este caso se vieron representados por DGDG en ambos extractos, detectándose también el ácido palmítico. La presencia de este ácido graso conformando los DGDG ha sido considerado como un marcador quimiotaxonómico para las algas pardas, por lo que nuestros resultados aportan una especie más a los grupos que contienen este tipo de sustancias. Los sulfolípidos fueron detectados sólo en el extracto alcohólico a 70 °C, lo cual condice con la naturaleza polar que le aportan los grupos sulfato a estos metabolitos.

Por otra parte, se diseñó una secuencia extractiva que permitió obtener el alginato de *L. vadosa* con importante rendimiento, entre el 20-30 % (superior a otros publicados para el género) y con una calidad que resulta óptima para aplicaciones farmacéuticas. Presentó ausencia de fenoles y proteínas, 1,5 % de sulfatos, 65 % de ácidos urónicos y peso molecular promedio de 9,1 kDa. Mediante ¹H-RMN se pudo observar las señales características a 4,94 y 4,36 ppm, correspondientes a los hidrógenos enlazados a los carbonos 1 y 5, respectivamente, los cuales se hallan más desprotegidos debido a su cercanía al enlace glicosídico y al grupo carboxilo. También se pudo determinar la relación M/G, cuyo valor fue de 1,08. Mediante

Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR), se observaron las señales características esperadas, destacándose a 951 cm^{-1} la atribuible a la vibración CO del estiramiento de los residuos del ácido α -L-gulurónico y a 895, la correspondiente a la vibración en la región anomérica de residuos de ácido β -D-manurónico. También se efectuaron análisis mediante Difracción de Rayos X, obteniéndose un difractograma característico de un sólido amorfo. Se efectuaron también estudios de reducción del polisacárido a fin de identificar los ácidos urónicos constituyentes. Para ello se aplicaron dos métodos, el conocido como “metanol mágico” y la reducción mediante carbodiimida, pudiéndose comprobar que el alginato poseía un contenido importante de ácido manurónico dado la alta proporción de manosa. Se obtuvieron sus bloques constituyentes tras una hidrólisis parcial; éstos fueron analizados mediante CGL donde fue posible determinar que la manosa era marcadamente mayoritaria en el bloque MG (61,5 % expresado en moles %), mientras que la glucosa en el bloque GG, representó casi un 70 %. Los bloques fueron caracterizados también mediante FT-IR, mostrando las bandas características en cada caso.

Se prepararon **micropartículas** conteniendo paracetamol a través de

Gelificación Iónica Interna y también mediante Spray Drying. Se logró optimizar los parámetros condicionantes del rendimiento y la eficacia de encapsulación, comparando los resultados de ambos métodos; el contenido de principio activo (PCT), fue de 35,9 % para las micropartículas obtenidas por gelificación iónica, y de tan sólo 10 %, para las obtenidas por Spray Drying. Las micropartículas analizadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido, mostraron cierta homogeneidad, con una superficie esférica irregular, rugosa y porosa en el caso de las que contenían paracetamol (PCT). El estudio de liberación *in vitro* de la molécula activa a partir de las micropartículas (Q_{30} : concentración de fármaco solubilizado después de 30 min), obtenidas por ambos procedimientos, y comparando su análisis con los comprimidos comerciales de Tafirol® (PCT), dio una Q_{30} de 57 % para el primer procedimiento, y 100 % por Spray Drying; en el caso de los comprimidos de Tafirol®, un Q_{30} de 98 %. Los resultados indicaron que las micropartículas obtenidas por ambas metodologías, son adecuadas para formulaciones protectoras de la mucosa gástrica, así como también para enmascarar el olor y sabor desagradable del paracetamol y/o para evitar incompatibilidades de este fármaco con

otros componentes de la formulación u otros principios activos.

Se realizó además un estudio a partir de extractos de *L. vadosa* con la finalidad de confirmar la presencia de **fucoesterol**. Para la obtención se efectuaron tanto extracciones convencionales a presión normal con ciclohexano y con acetato de etilo, como aquellas que involucraron equipamiento importante (PSE y FSC). Los extractos fueron analizados mediante TLC, HPLC-UV y CG-MS. Si bien la extracción con PSE resultó de baja selectividad (se extraían también pigmentos) con respecto al uso de FSC, permitió separar un segundo esterol que se encontraba presente en menor proporción, el 24-hidroperoxi-24-vinilcolesterol. Este último fue recuperado tras una segunda purificación, por MPLC. A fin de intentar la purificación del fucoesterol a partir de los extractos obtenidos con PSE y con FSC, se utilizó CPC. A partir del extracto de FSC se recuperó un 93 % del total del fucoesterol. En cuanto al extracto de PSE, la tasa de recuperación resultó también alta, del 92 %, aunque fue necesaria una etapa adicional de cristalización en metanol para eliminar los pigmentos acompañantes, lográndose finalmente un rendimiento del 70 – 75 %.

La evaluación de la **actividad biológica** para los diferentes productos obtenidos

de *S. lomentaria*, permitieron concluir que los extractos alcohólicos demostraron actividad antibacteriana moderada frente a *S. aureus*. Dichos extractos contenían fundamentalmente fenoles, destacándose los taninos. Los extractos de cloruro de calcio mostraron una importante actividad antiviral frente a los virus del Herpes Simplex tipo I y II, estos extractos contenían especialmente proteínas e hidratos de carbono. En cuanto a *Lessonia vadosa*, el alginato de sodio demostró 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 %. Además se mantuvo una inhibición interesante (40 %) a mayores diluciones del extracto (0,125 mg/ml). En cuanto al fucoesterol, presentó frente a la línea celular cáncer de mama MCF-7, una actividad antiproliferativa importante, mostrando un 75,2 % de inhibición a las concentraciones más elevadas. Este producto frente a la línea celular Caco-2, evidenció también una actividad relevante, con un 60 % de inhibición a las diluciones menores evaluadas. También presentó 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 la línea celular

de macrófagos murinos, denominado J774.1.

Publicaciones

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. *Phytochemistry Letters*. 2015, **11**: 418-423.

Becerra, M.B.; Córdoba, O.L.; Ponce, N.M.A.; Stortz, C.A.; Flores, M.L. Micropartículas para la liberación de fármacos utilizando como soporte polimérico alginato de sodio extraído de *Lessonia vadosa* (Lessoniaceae - Phaeophyta) del Golfo San Jorge. Libro de Resúmenes de las JCM ISBN ISBN 978-987-21581-7-0. 2012,1.

Becerra, Mónica B.; Córdoba, Osvaldo L.; Ponce, Nora M.A.; Stortz, Carlos A.; Flores, María L. Caracterización química y aplicación de alginato de sodio extraído de *Lessonia vadosa* (Lessoniaceae - Phaeophyta) del Golfo San Jorge. *Dominguezia*. 2010, 26, 2, 53-54.

Becerra, Mónica B.; Pinto Vitorino, Graciela; Uhrich, Analía V.; Ponce, Nora M.A.; Córdoba, Osvaldo L.; Stortz, Carlos A.; Flores, María L. Estudios

químicos y bioactividad de *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonaceae), un alga parda de las costas patagónica argentinas. *Naturalia patagónica*. 2008, **4**: 46-62.

Bibliografía

Matsuhira, B.; Torres, S.E.; Guerrero, J. Block structure in alginic acid from *Lessonia vadosa* (Laminariales, Phaeophyta). *J. Chil. Chem. Soc.* 2007, **52**: 1.

Orive, G.; Carcaboso, A.M.; Hernandez, R.M.; Gascón, A.R.; Pedraz, J.L. Biocompatibility Evaluation of Different Alginates and Alginate-Based Microcapsules. *Biomacromolecules*. 2005, **6**: 927, 931.

Rodriguez-Llimos, A.; Chiappetta, D.; Szeliga, M.; Fernández, A.; Bregni, C. Micropartículas de alginato conteniendo paracetamol. *Ars Pharmaceutica*. 2003, **44**: 333-342.

Expresión y Caracterización Estructural y Bioquímica de Lb-FABP en merluza, *Merluccius hubbsi*.

Expression, structural and biochemistry characterization of Lb-FABP in merluza, *Merluccius hubbsi*.

Tesista: **Cecilia Alejandra Crovetto.**

Director de Tesis: **Dr. Osvaldo León Córdoba.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales en cumplimiento de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Bioquímica.

Lugar de realización: Departamento de Bioquímica y Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico-Tecnológico (CRIDECIT), Facultad de Ciencias Naturales, UNPSJB. Presentada en la Facultad de Ciencias Naturales, UNPSJB. Defensa: 16 de septiembre de 2015. Número total de páginas de la tesis: 135.

Palabras claves: *Merluccius hubbsi*, FABP, Lb-FABP

Resumen

Las FABPs (Fatty Acid-Binding Proteins), pertenecen a una familia multigénica de proteínas citosólicas de 14 a 16 kDa, que unen en forma no covalente, ácidos grasos, retinol, ácido retinoico y otras moléculas hidrofóbicas.

Son abundantes en tejidos con alto metabolismo lipídico como hígado, intestino, tejido adiposo y corazón.

Han sido estudiadas en numerosos mamíferos identificándose al menos 13 genes que se expresan en ellos, las cuales en general se han nombrado según el tejido donde fueron halladas por primera vez, por ejemplo FABP de tipo intestinal

(I-FABP), hepática (L-FABP), adipocito (A-FABP), cardíaca (H-FABP), etc.

Los estudios estructurales muestran una alta conservación de la secuencia primaria entre FABPs aisladas del mismo tejido de diferentes especies, lo que indica una especialidad de función, pudiendo un tipo de FABP estar expresado en más de un tejido. Así la H-FABP se expresa en riñón, músculo esquelético, aorta, pulmón, glándula mamaria, cerebro, placenta, estómago, testículo. Por otro lado algunos tejidos expresan más de un tipo, por ejemplo el riñón expresa L-FABP y H-FABP.

Presentan una estructura terciaria de barril β , formada por 10 cadenas β

antiparalelas de 4 a 10 aminoácidos cada una, que se disponen formando dos láminas enfrentadas, casi perpendiculares entre sí, levemente cóncavas, unidas por dos cortas α hélices, formando una estructura que por su semejanza a una almeja, recibe el nombre de β clam. Presenta una pequeña cavidad interna, flexible y dinámica, donde se alojan el ligando y algunas moléculas de agua.

Se les atribuye las siguientes funciones:

Unir ácidos grasos de cadena larga, incluyendo su selección, solubilización y compartimentalización.

Proteger las membranas celulares del efecto deletéreo de los ácidos grasos.

Facilitar el ingreso de ácidos grasos al interior celular.

Transportar ácidos grasos hacia caminos metabólicos específicos.

Si bien son capaces de unir ácidos grasos, presentan una serie de diferencias en cuanto al número de sitios de unión, tipo de ligando y afinidad por los mismos.

En el hígado de vertebrados, se han descrito dos grupos parálogos de FABP: la de tipo hepática (L-FABP), extensamente caracterizada en mamíferos, y la de tipo hepática básica (Lb-FABP) que no ha sido encontrada en el hígado de mamíferos pero ha sido identificada y caracterizada en varios vertebrados incluyendo peces, anfibios, reptiles y aves.

El término “básica” se utilizó para nombrar al primer miembro de esta familia identificada en hígado de pollo, debido a que esta proteína presentó un punto isoeléctrico (pI) de 9,0.

La FABP tipo hepática de mamíferos presenta características particulares dentro de la familia de las FABPs. Puede unir más de un ácido graso de cadena larga y, además, es capaz de ligar una variedad de ligandos hidrofóbicos como grupo hemo, bilirrubina, lisofosfolípidos, sales biliares, acil-CoA y prostaglandinas, entre otros.

La Lb-FABP se expresa en el hígado de varias especies de peces.

Con la finalidad de contribuir al descubrimiento de las funciones específicas de Lb-FABP en el hígado de merluza, pez que acumula lípidos en su hígado, se han abordado los siguientes objetivos específicos:

Comparar la secuencia de Me Lb-FABP con Lb-FABP de otras especies y construir un árbol filogenético.

Analizar la expresión de Lb-FABP en tejidos de merluza mediante técnica de Dot Blot, Western blot y ELISA indirecto.

Estudiar la localización de Me Lb-FABP mediante estudios histológicos e inmunocitoquímicos en hígado de *Merluccius hubbsi*.

Realizar estudios de afinidad a ligandos mediante técnicas de fluorescencia.

Mediante el empleo de técnicas cromatográficas nos ha sido posible purificar y caracterizar una FABP en el hígado de merluza.

La determinación de su estructura primaria parcial (72%) mediante espectrometría de masa y secuenciación por degradación de Edman de los péptidos obtenidos por digestión enzimática, mostró que presenta mayor identidad con FABP hepática básica (Lb-FABP).

Su masa molecular fue de 13.853 Da.

El árbol evolutivo mostró que la Lb-FABP de merluza (Me Lb-FABP) posee un alto nivel de homología con la Lb-FABP del hígado de peces teleósteos.

Luego de obtener los anticuerpos específicos, hemos analizado la expresión de Me Lb-FABP en tejidos de merluza con alto metabolismo lipídico como el hígado, corazón, músculo esquelético, intestino y gónadas. Los resultados del Western-Blot indican que su expresión está restringida al hígado, los estudios de ELISA indirecto, que es una proteína muy abundante en el hígado, y los estudios histológicos e inmunocitoquímicos realizados demuestran la localización de la Me Lb-FABP en el citosol, rodeando y sobre las

numerosas vacuolas lipídicas presentes en los hepatocitos.

Los resultados de unión de ligandos muestran que Me Lb-FABP es capaz de unir una sola molécula de ligando por molécula de proteína, y, si bien Me Lb-FABP es capaz de unir ácidos grasos como ácido palmítico, ácido oleico y ácido palmitoleico, presenta afinidad por otras moléculas hidrofóbicas como bilirrubina y fosfolípidos como cefalina y lecitina. Proponemos que Me Lb-FABP tiene funciones de transporte de los lípidos dentro del hepatocito, contribuyendo al transporte diferencial y compartimentación de los fosfolípidos entre las vacuolas lipídicas y el retículo endoplásmico donde se lleva a cabo la biosíntesis de lipoproteínas. Además está implicada en el transporte y protección del efecto deletéreo de la bilirrubina. Se espera la presencia de otra FABP, quizás de tipo cardíaca, que transporte los ácidos grasos con mayor afinidad y por lo tanto más implicada en el metabolismo de los ácidos grasos.

Publicaciones

Crovetto C.A. and Córdoba O.L. 2015 Structural and biochemical characterization and evolutionary relationships of the Fatty Acid-Binding Protein 10 (Fabp10) of hake (*Merluccius*

hubbsi). Fish Physiology and
Biochemistry, **42(1)**: 149-165.

Potencial de bacterias oleaginosas para la producción de biodiesel: estudio del metabolismo de triglicéridos en bacterias del género *Rhodococcus*.

Potential of oleaginous bacteria for Biodiesel production: study of the metabolism of triglycerides in bacteria of the *Rhodococcus* genus.

Tesista: **Martín Alejandro Hernández**

Director de Tesis: **Héctor Manuel Alvarez**

Carrera a la que pertenece la tesis: Doctorado en Bioquímica, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Lugar de realización y presentación: Comodoro Rivadavia. Fecha de defensa: 19 de abril de 2013. Número total de páginas de la tesis: 273 páginas.

Palabras claves: *Rhodococcus*, triglicéridos, biodiesel.

Resumen

La gran demanda energética, sumada a los problemas de cambio climático y contaminación ambiental, han sido una importante motivación en la búsqueda de nuevos recursos naturales renovables. En este contexto, los sistemas bacterianos oleaginosos constituyen fuentes alternativas para la obtención de aceites (triglicéridos o TAG), así como de otros lípidos de interés biotecnológico con potencial aplicación en la industria de cosméticos, biolubricantes y oleoquímicos (Li y col. 2008). Adicionalmente, en años recientes los aceites bacterianos han

despertado un gran interés para la generación de biodiesel mediante el proceso de transesterificación de los TAG (**Fig.1A**).

Las bacterias oleaginosas del género *Rhodococcus* poseen la capacidad de crecer a partir de un amplio espectro de compuestos orgánicos así como de sintetizar grandes cantidades TAG, alcanzando valores que superan el 60% de su peso seco celular (PSC) bajo determinadas condiciones (Alvarez y Steinbüchel 2002). Estas características las convierten en recursos de alto valor para la producción de biodiesel; y posibilitando a

su vez la eliminación de residuos orgánicos contaminantes del ambiente provenientes de diversas actividades antropogénicas.

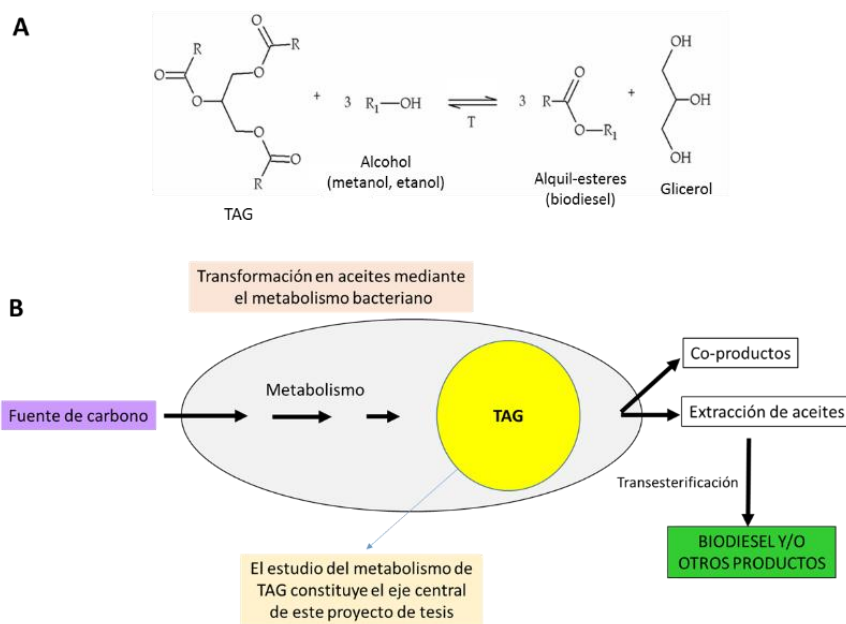


Figura 1: A) Reacción de transesterificación (T) de triglicéridos para la producción de biodiesel. R, R₁: representan grupos alquilo de distintos tamaños y grado de saturación. B) Modelo productivo propuesto para el desarrollo de biodiesel y otros productos a partir de los aceites obtenidos de biomasa bacteriana representada por bacterias del género *Rhodococcus*.

Una producción de aceites bacterianos económicamente viable para la generación de biodiesel, requiere de un entendimiento claro de la bioquímica de acumulación de TAG en estos microorganismos. La identificación de los procesos claves para la síntesis de estos lípidos de interés biotecnológico, de los factores que limitan estos procesos y su integración con el contexto fisiológico en estas bacterias, sirven de base para el desarrollo de diversas estrategias de manipulación metabólica y genética para aumentar la

eficiencia del proceso de producción de tales lípidos.

En este proyecto de tesis doctoral, los objetivos se enfocaron principalmente en adquirir nuevas bases de conocimiento tanto de aspectos fisiológicos como moleculares del metabolismo de TAG en bacterias del género *Rhodococcus* y con el fin de contextualizarlas en un modelo productivo de biodiesel y otros productos de interés biotecnológico (**Fig. 1B**). A tal fin, esta tesis se ha dividido en diversos capítulos y en cada uno de ellos se han

abordado diferentes aspectos particulares del metabolismo de TAG y que se esquematizan y resumen en la **figura 2**.

A continuación se resumen los principales resultados de cada capítulo del presente proyecto de tesis.

Capítulo I: “Análisis de compuestos de reserva en bacterias del género *Rhodococcus* y su relación con el metabolismo de triglicéridos”.

En esta parte de la tesis se analizó la capacidad genética y fisiológica de acumulación de distintos compuestos de

reserva en estos microorganismos y se reportó por primera vez la capacidad de acumulación y degradación de glucógeno y poli-fosfatos en dichas bacterias (**Fig. 3A y B**).

Adicionalmente se demuestra una relación metabólica con implicancia en el flujo del carbono entre las vías de síntesis de glucógeno, PHA y los TAG en estos microorganismos oleaginosos mediante el uso de un inhibidor (cerulenina) específico de lípidos (**Fig. 3C**).

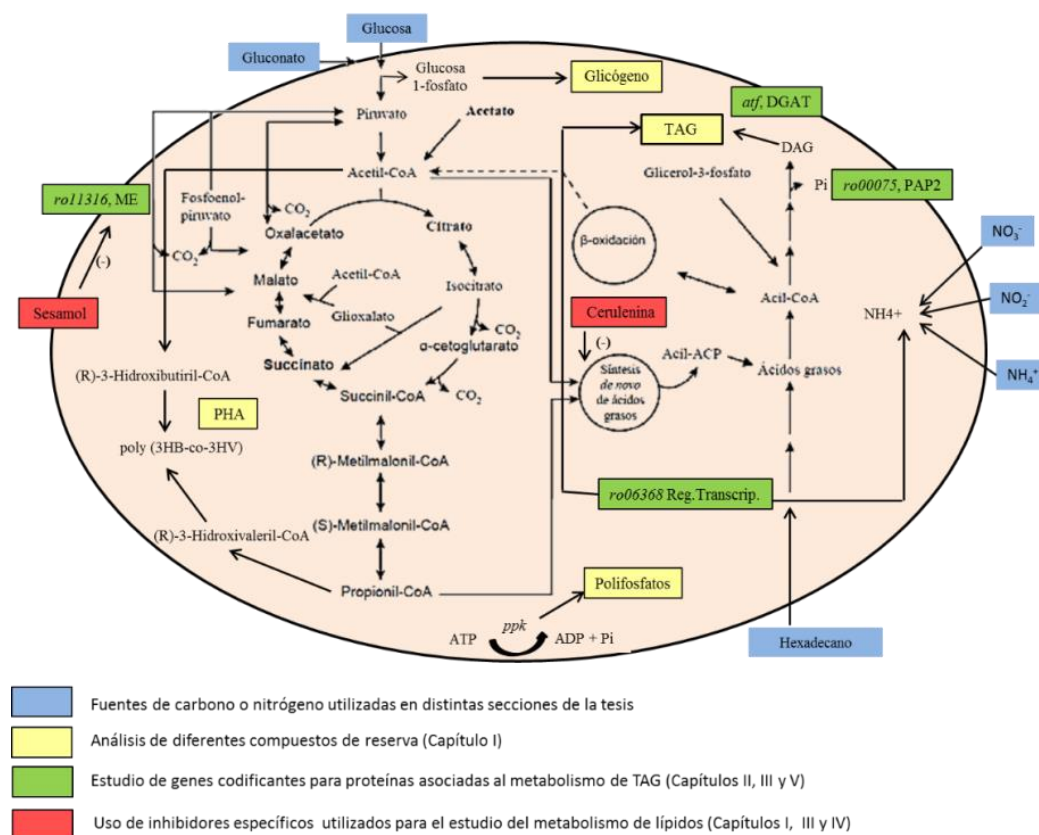


Figura 2: Esquema global simplificado representativo del complejo metabolismo presente en modelos bacterianos del género *Rhodococcus* y en el que se resaltan diferentes puntos de interés analizados en el contexto de esta tesis doctoral.

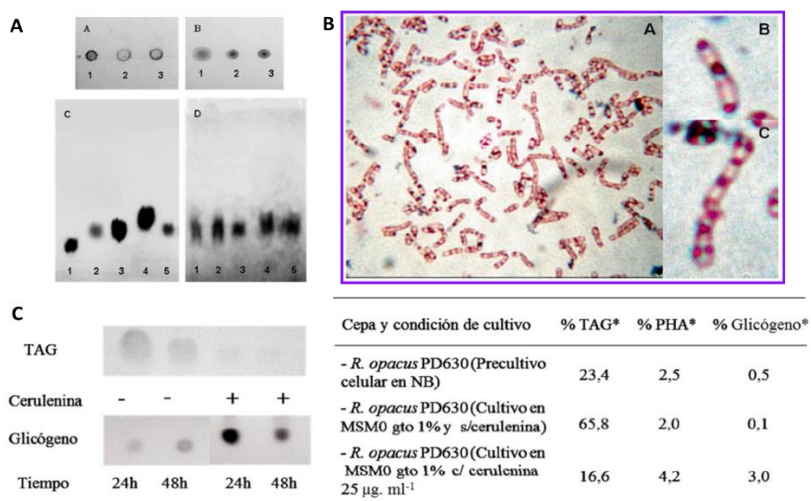


Figura 3: Capacidad fisiológica de acumulación de diversos compuestos de reserva. Detección de glucógeno mediante cromatografía planar (A) y de poli-fosfatos mediante microscopía óptica (B). Efecto de la cerulenina sobre la acumulación de distintos compuestos de reserva en *R. opacus* PD630 (C).

Capítulo II: “Análisis de los genes que codifican para las enzimas diacilglicerol aciltransferasas en bacterias del género *Rhodococcus*: Caracterización del gen *atf2* de *R. opacus* PD630”.

En esta sección se identificó y caracterizó en detalle un nuevo gen denominado *atf2*, que codifica para una enzima diacilglicerol aciltransferasa (DGAT), en la bacteria *R. opacus* PD630.

Mediante varias estrategias experimentales moleculares incluidas la mutagénesis, complementación y sobre-expresión del gen *atf2*; así como de diversos estudios

fisiológicos, se demostró la participación de dicho gen en la acumulación de TAG en *R. opacus* PD630.

Mientras que la mutación del gen *atf2* provocó un descenso del contenido de TAG (reducción del 10-30 % por PSC), su complementación fue capaz de restaurar en parte los niveles de TAG, confirmando su rol en el metabolismo de los mismos. Por otro lado, la sobreexpresión del gen *atf2* resultó en un aumento de aproximadamente el 10 % de TAG por PSC respecto a la cepa salvaje usada como control (**Fig.4A**).

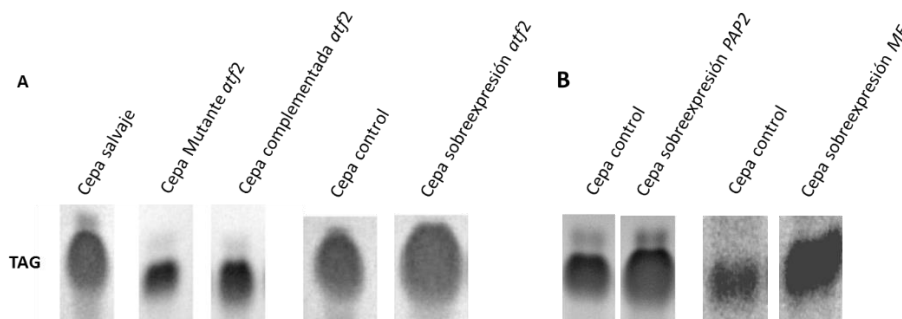


Figura 4: Análisis del contenido de TAG en diferentes cepas recombinantes mediante TLC. A) Estudio del gene *atf2* mediante mutación, complementación y sobreexpresión. B) Estudio de los genes *ro00075* (PAP2) y *ro11316* (ME) mediante sobreexpresión.

Capítulo III: “Estrategias moleculares para la optimización de la producción de triglicéridos en cepas del género *Rhodococcus*: estudio de los genes *ro00075* y *ro11316*”.

A través del estudio del transcriptoma realizado bajo condiciones de déficit de nitrógeno, se identificaron 2 nuevos genes denominados *ro11316* y *ro00075* en la cepa *R. jostii* RHA1 y los cuales codifican para una enzima málica (ME) y una enzima ácido fosfatídico fosfatasa de tipo 2 (PAP2), respectivamente. Ambos genes mostraron estar altamente inducidos bajo estas condiciones e involucrados en la acumulación de TAG a través de diferentes mecanismos. En dicho contexto, la sobreexpresión de los genes *ro11316* y *ro00075* en distintas especies de *Rhodococcus* resultó en un incremento de TAG entre un 10-15 % por PSC respecto a sus respectivos controles (cepas

conteniendo los vectores vacíos) (**Fig. 4B**). Por primera vez se describió el rol de una PAP2 como parte de la ruta de Kennedy (aportando al pool de DAG) para la síntesis de TAG en bacterias del género *Rhodococcus* y este resultado constituye uno de los pocos hallazgos reportados en bacterias hasta el momento.

Capítulo IV: “Transcriptoma de *R. jostii* RHA1 en presencia de cerulenina: identificación de nuevos genes potenciales asociados con el metabolismo de TAG”.

Con el objetivo de detectar nuevos blancos (genes) asociados con el metabolismo de TAG en bacterias oleaginosas del género *Rhodococcus*, y con particular interés sobre posibles genes reguladores, se desarrolló un nuevo estudio de transcriptoma bajo condiciones de déficit de nitrógeno pero en presencia de cerulenina (inhibidor de la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos) en el modelo bacteriano *R. jostii* RHA1. Este

estudio permitió detectar numerosos genes potencialmente asociados con el metabolismo de TAG y entre ellos se destacaron: el gen *ro04182* codificante para una enzima 1-acilglicerol-3-fosfato *O*-aciltransferasa (AGPAT), la cual actúa a nivel de vías comunes de la biosíntesis de fosfolípidos y TAG; y los genes *ro06368* y *ro02105* codificantes para 2 proteínas reguladoras. Todos estos genes estuvieron altamente inducidos bajo condiciones de déficit de nitrógeno pero significativamente reprimidos en presencia de cerulenina, lo cual los vincula con el metabolismo de lípidos. Su relación con el metabolismo de TAG fue luego abordada a través de diversos estudios bioinformáticos y de reconstrucción metabólica.

Capítulo V: “*Caracterización preliminar del gen ro06368 de R. jostii RHA1 y su relación con el metabolismo de triglicéridos*”.

En la parte final de esta tesis, se inició el estudio del gen *ro06368* mediante el desarrollo de una cepa mutante y se comprobó que su producto, una proteína

reguladora presente solo en actinomicetes, formaría parte de la compleja red regulatoria que controla y modula la expresión de algunos genes del metabolismo del nitrógeno (asimilación de nitratos y nitritos) y adicionalmente la síntesis y acumulación de lípidos en la cepa *R. jostii* RHA1. En dicho contexto, la cepa mutante sobre el gen *ro06368* resultó en una asimilación de nitritos y nitratos retardada (**Fig. 5A**) así como en un descenso significativo del contenido de TAG bajo condiciones de déficit de nitrógeno (**Fig. 5B**). Por otro lado, su sobreexpresión resultó en un incremento del contenido de TAG bajo condiciones ricas en nitrógeno, en las cuales normalmente estos lípidos se hallan en muy bajos niveles (**Fig. 5C**). Por primera vez, se describe una proteína reguladora de tipo global que contribuye al menos en parte al metabolismo de TAG en bacterias oleaginosas del género *Rhodococcus*.

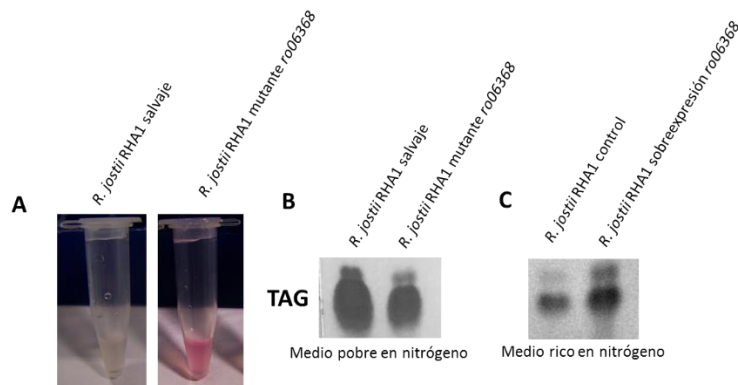


Figura 5: Caracterización del gen *ro06368*: A) asimilación retardada de nitritos en la cepa mutante en el gen *ro06368*. B) descenso del contenido de TAG en la cepa mutante en condiciones deficitarias de nitrógeno. C) Incremento de TAG mediante sobreexpresión del gen *ro06368* en condiciones ricas en nitrógeno.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto de tesis contribuyeron con nuevos conocimientos sobre la fisiología, bioquímica y genética de la biosíntesis y acumulación de TAG en el género *Rhodococcus* aportando nuevos datos de interés para futuros estudios y como plataforma de conocimiento básico para la optimización de la producción de aceites a partir de dichos sistemas bacterianos con fines biotecnológicos, tales como la producción de biodiesel y otros productos manufacturados derivados de aceites.

Bibliografía

Li, Q., Du, W., Liu, D. 2008. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* **80**: 749-756.
 Alvarez, H.M., Steinbüchel, A. 2002. Triacylglycerols in prokaryotic

microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 367-376.

Trabajos publicados surgidos de esta tesis doctoral

Hernández, M.A., Mohn, W.W., Martínez, E., Rost, E, Alvarez, A.F., Alvarez, H.M. 2008. Biosynthesis of storage compounds by *Rhodococcus jostii* RHA1 and global identification of genes involved in their metabolism. *BMC Genomics.*, **12**: 600.

Hernández, M.A., Alvarez, H.M. 2010. Glycogen formation by *Rhodococcus* species and the effect of inhibition of lipid biosynthesis on glycogen accumulation in *Rhodococcus opacus* PD630. *FEMS Microbiol let.*, **312**: 93-99.

Hernández, M.A., Arabolaza, A., Rodríguez, E., Gramajo, H., Alvarez, H.M. 2013. The *atf2* gene is involved in

triacylglycerol biosynthesis and accumulation in the oleaginous *Rhodococcus opacus* PD630. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **97**: 2119-2130.

Hernández, M.A., Comba, S., Arabolaza, A., Gramajo, H., Alvarez, H.M. 2015. Overexpression of a phosphatidic acid phosphatase type 2 leads to an increase in triacylglycerols production in oleaginous *Rhodococcus* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **99**: 2191-2207.

La noción de sustancia básica en la conceptualización y clasificación de los elementos químicos

The notion of basic substance in conceptualizing and classification of chemical elements

Tesista: **Alfio Zambon**

Director de Tesis: **Dr. Martín Labarca** (UNQ-CONICET). Co-directora de Tesis: **Dra. Olimpia Lombardi** (UBA-CONICET).

Tesis para el grado de Doctor en Epistemología e Historia de la Ciencia, realizada en la cátedra de Epistemología y Metodología de la investigación Científica y Tecnológica (Dto. Farmacia, Fac. de Ciencias Naturales, UNPSJB) y el Grupo de Filosofía de la Ciencia (Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, UBA) y presentada en la sede Borges de la Universidad Nacional de Tres de Febrero. Tesis dedicada a la memoria del Dr. Eduardo Musacchio. Defensa: 17 de diciembre de 2015. Número total de paginas 268.

Resumen

Las nociones de átomo, elemento y sustancia son centrales para el edificio teórico de la química, y están profundamente relacionadas entre sí. Sin embargo, en el contexto de la práctica científica, muchas veces son tomadas de una manera superficial y poco rigurosa. En este trabajo, abordaremos la problemática asociada a las nociones de sustancia y elemento desde una perspectiva epistemológica, tanto en lo inherente a su conceptualización como a su clasificación. El término ‘sustancia’ en el campo de la química abarca tanto a las sustancias

elementales como a las compuestas. A las primeras se las denomina elementos químicos, y a las segundas, compuestos químicos. En cuanto al del concepto de “elemento”, presenta distintas naturalezas. Es posible puntualizar el sentido fisicalista del término, también el operacional, y finalmente el sentido abstracto inherente a la noción de elemento. De este modo, no resulta llamativo que la noción de elemento químico y, por ende, la noción de sustancia, sea centro de importantes debates en el campo de la filosofía de la química contemporánea.

Los objetivos generales de este trabajo fueron:

Argumentar acerca de la imposibilidad de reducir a los elementos químicos en los distintos dominios de la química, considerados como sustancias básicas; y presentar una representación original del sistema periódico, basada en la consideración de los elementos como sustancias básicas, tomando como criterio secundario el concepto de tríada de número atómico.

Con este propósito, dividimos el trabajo en dos partes: 1). La conceptualización de los elementos químicos; 2). La clasificación de los elementos químicos. Cada parte a su vez, la dividimos en cuatro capítulos. En la primera parte de este trabajo, tomamos un hilo conductor histórico para abordar la problemática de la conceptualización de los elementos químicos. En el primer capítulo, nos introdujimos en las discusiones filosóficas en torno a nociones como elemento, átomo, sustancia y materia. Presentamos las postulaciones monistas de la escuela de Mileto, que trataron de encontrar un único principio generador de todo lo existente, como también las soluciones pluralistas que plantearon filósofos como Empédocles o Anaxágoras. Mostramos la consolidación de la doctrina

de los cuatro elementos en las filosofías platónica y aristotélica. A partir del Renacimiento se manifestó un profundo cambio en la manera de entender a la naturaleza entre muchas otras cosas llevó al redescubrimiento de la doctrina atómica por parte de Gassendi. Luego abordamos la problemática en torno a la materia, desde las Perspectivas empirista, racionalista y Kantiana. En el segundo capítulo, destacamos los principales aportes desarrollados en torno a las nociones de sustancia y elemento dentro de la historia de la química. Presentamos y discutimos algunos aspectos históricos de la teoría corpuscular propuesta por Boyle. Resaltamos los desarrollos llevados a cabo por Lavoisier, que dieron lugar a una definición de la noción de elemento químico de carácter operacional, cuya influencia llega hasta nuestros días. Recorrimos algunas consideraciones químicas acerca de la teoría atómica y la naturaleza de los elementos propuestas durante el siglo XIX. Finalmente, expusimos la posición dual acerca de la naturaleza de los elementos defendida por Mendeleev. Comenzamos el tercer capítulo, con la crisis la tabla periódica a partir del descubrimiento de los isótopos. Es en ese contexto que Friederich Paneth

presentó sus reflexiones en torno a la noción de elemento químico, resaltando la distinción entre sustancia simple y sustancia básica. Esta distinción será la base de las discusiones actuales dentro de la filosofía de la química. Luego presentamos una síntesis de las posiciones acerca de las nociones de sustancia y elemento, tal como actualmente se debaten dentro del campo de la filosofía de la química. Mencionamos aquéllas que se basan en el doble sentido del concepto de elemento presente en la distinción de Paneth, como las propuestas, si bien con algunas diferencias y enfoques particulares, por Scerri, Ruthenberg y Earley. También describimos algunas perspectivas, como las formuladas por Hendry y Vihalemm, que presentan objeciones a la apelación a la metafísica. Estos autores argumentan que la diferencia entre las nociones de sustancia simple y sustancia básica puede ser abordada mediante relaciones lógicas, y proponen un cambio de denominación. Describimos además posiciones de un filósofo de la química, Needham, y un químico cuántico, Schwartz, quienes defienden soluciones alternativas. Presentamos las dificultades que conlleva la caracterización de la sustancia química, y las discusiones que surgen, desde la

perspectiva ontológica. En el cuarto y último capítulo de la primera parte, abordamos la problemática del concepto de elemento mediante un esquema basado en los tres dominios del mundo químico: macroquímico, microquímico y cuántico. Estudiamos los criterios de identificación en cada uno de estos dominios. Analizamos el enfoque reduccionista tanto en el plano epistemológico como ontológico. A partir de este análisis, argumentamos en contra del enfoque reduccionista y ensayamos la posible articulación entre los diferentes dominios desde la óptica de la sustancia básica.

En la segunda parte de este trabajo nos concentramos en la problemática que la clasificación de los elementos químicos, al igual que la primera, tomamos un hilo conductor histórico. En el primer capítulo de la segunda parte (capítulos cinco) recorrimos los primeros intentos de clasificar a los elementos químicos. Estudiamos los pasos que llevaron a la clasificación periódica por parte de un conjunto de investigadores, entre los que se destacó Dimitri Mendeleev. Al final del capítulo expusimos varios formatos empleados para representar la periodicidad química desarrollados en los años inmediatamente posteriores a su

descubrimiento. En el capítulo seis, reparamos en el estudio de la radiación en sus diversas manifestaciones: rayos catódicos, rayos X, emisiones radioactivas, etc. La radiación conformó el centro de las investigaciones de importantes científicos como Cookes, Röntgen, Bequerel o Curie. A partir de estos trabajos se consolidó la teoría atómica de la materia, y se desarrollaron modelos atómicos como el de Rutherford. Algunas inconsistencias teóricas de ese modelo condujeron a Bohr a aplicar la mecánica cuántica a los sistemas atómicos con singular éxito. De esta manera, la noción química de sustancia simple o cuerpo simple, propuesta por Mendeleev, fue reducida a la noción física de átomo, mientras que la noción de sustancia básica no tuvo lugar dentro de ese sistema, que pregonó la reducción de la química a la mecánica cuántica. Estudiamos también el principio de construcción cuántico y los modelos químicos del átomo. Finalizamos el capítulo con la exposición de la tabla periódica propuesta por Seaborg, base de la tabla periódica estándar actual. En el capítulo siguiente, estudiamos los problemas de la clasificación periódica, especialmente los surgidos al intentar reducir la posición de los elementos

químicos a su configuración electrónica, detallamos puntualmente los problemas para clasificar el hidrógeno, el helio, y otros elementos como los integrantes de los grupos II y III. Abordamos los problemas que presenta la llamada “regla de Madelung”, y las estrategias seguidas por quienes propiciaron la reducción de la tabla periódica a la mecánica cuántica: reducción cualitativa, métodos *ab initio* y densidad del enfoque funcional. Presentamos la recuperación del concepto de tríada propuesta por Eric Scerri, y describimos algunos de los problemas actualmente en discusión como: el papel de las tríadas, el número de elementos totales o el origen del sistema periódico. Finalmente recorrimos varias propuestas de tablas periódicas que buscaron dar respuesta a los problemas que la clasificación periódica como las representaciones de: von Antropoff, Janet, Nekrasov, Emerson, Clarck. Benfley Sanderson, Jensen, entre otros. En el último capítulo, presentamos una nueva tabla periódica (Fig. 1), en cuya construcción se adopta el número atómico como criterio primario, y como criterio secundario a las tríadas de números atómicos. En esta propuesta, partiendo de la postulación de un hipotético elemento de número atómico 0, los demás elementos se organizan según

número atómico creciente en cada período; a su vez, se pasa de un período al siguiente cuando se puede formar una tríada de números atómicos con sentido químico. La tabla presentada incluye la totalidad de los elementos conocidos, el elemento 0, que en su manifestación como sustancia simple se identifica con el neutrón, y los hipotéticos elementos aún no descubiertos, llegándose

mediante este sistema a un hipotético elemento final, cuyo número atómico es compatible con los cálculos mecánico cuánticos publicados recientemente. En esta tabla al poder dar cuenta de la ubicación de todos los elementos químicos, el criterio de las tríadas de número atómico adquiere cabalmente el estatus de criterio secundario de clasificación.

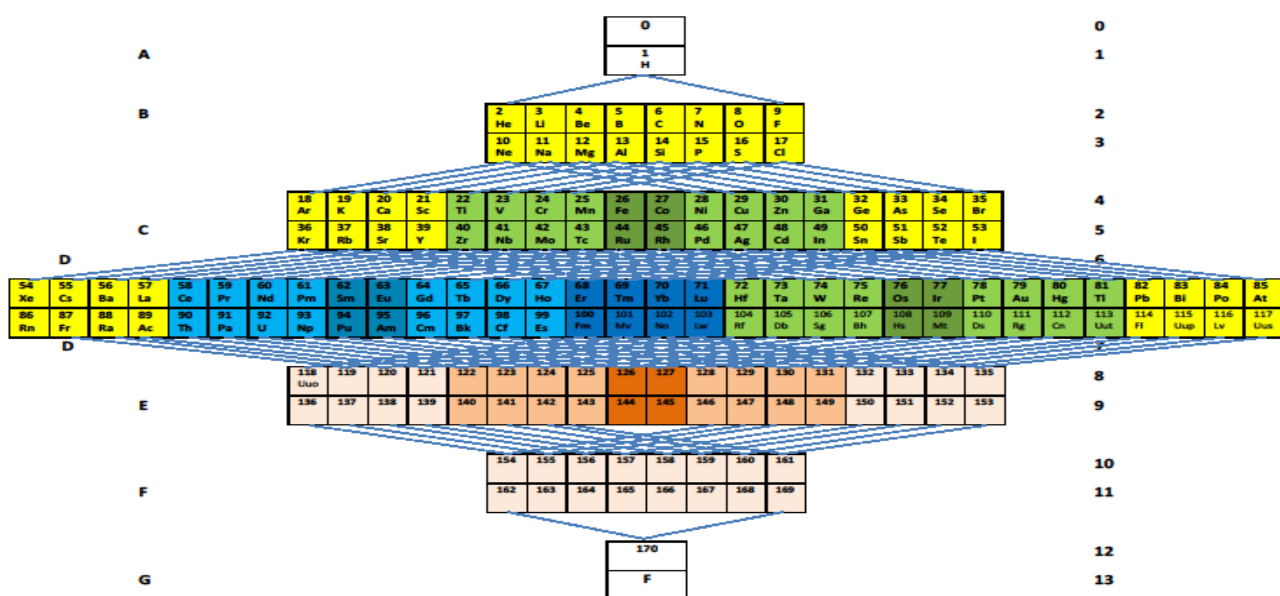


Figura 1. Tabla periódica propuesta

El sistema periódico presentado, al utilizar como criterio primario el número atómico, y como secundario la capacidad de formar triadas de número atómico, se recurre a una única propiedad para ordenar los elementos, en particular, la única propiedad esencial de la sustancia básica en los términos propuestos por Paneth, de esta

manera se afirma la doble naturaleza de los elementos químicos, y la importancia de la clasificación de los mismos como sustancias básicas. Redefinimos el concepto de triadas, y luego introducimos el concepto de “árbol de periodicidad”, estructuras cerradas de triadas anidadas, que permiten relacionar los grupos A y B

de la tabla periódica estándar, y puede ser una alternativa a la idea de grupo. A partir de estas estructuras, formulamos un conjetura falsable acerca de las propiedades de los elementos aún no descubiertos. Esta representación del sistema periódico permite reflejar todas las relaciones contenidas en los grupos de la tabla periódica estándar sin recurrir en absoluto a las configuraciones electrónicas. Esta forma de ordenamiento de los elementos químicos puede constituir un aporte a la discusión acerca de la posibilidad o imposibilidad de reducción de la tabla periódica a la mecánica cuántica, cuestión ésta que se encuentra más allá de los alcances de este trabajo. En este trabajo hemos intentado poner de manifiesto la multiplicidad de facetas que presenta la discusión acerca de los conceptos de elemento químico y sustancia química, tanto diacrónicamente, en la historia de la filosofía y de la ciencia; como sincrónicamente, en los debates actuales acerca de estas nociones, tanto en lo referido a su conceptualización como su clasificación. Por supuesto, nos encontramos apenas en el comienzo de un largo camino, que ha quedado al descubierto con esta tarea. En efecto, a partir de aquí se abren nuevas perspectivas

para definir los conceptos de elemento y sustancia química y profundizar en los aspectos filosóficos de la clasificación periódica. A lo largo de esta investigación y como producto directo de la misma, se publicaron tres trabajos en revistas indexadas: (Labarca y Zambon, 2013), (Córdoba, Labarca y Zambon, 2013) y (Zambon, 2013); cinco capítulos del libro: (Córdoba, Labarca y Zambon, 2010), (Zambon, 2010), (Labarca, González Martínez y Zambon, 2013) (Labarca y Zambon, 2013), (Labarca, Zambon y Quintanilla, 2014) y; una publicación en un sitio especializado de Internet (Zambon, 2014). Se presentaron doce trabajos en congresos especializados (seis internacionales); y actualmente tenemos un trabajo que se encuentra en arbitraje, y uno en la etapa de preparación, además quedan varias líneas derivadas de la investigación que podrán ser continuadas en el futuro.

Respuestas morfo-fisiológicas a bajas temperaturas y disponibilidad de agua en variedades de *Olea europaea* L.

Morpho-physiological responses to drought and low temperatures in *Olea europaea* L. varieties

Tesista: **Nadia Soledad Arias**

Directora de Tesis: **Dra. Sandra J. Bucci** y Co-Director de Tesis: **Dr. Fabián Scholz**.

Tesis para el grado de Doctor en Biología obtenido en la Universidad Nacional del Comahue, Río Negro, Argentina y desarrollada en el Grupo de Estudios Biofísicos y Ecofisiológicos, Departamento de Biología General, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Lugar y fecha de defensa: Universidad Nacional del Comahue, Centro Regional Universitario Bariloche, Río Negro, Argentina el 08 de Julio de 2015. Número total de páginas: 154.
email: ns_arias@yahoo.com.ar

Palabras claves: Ajustes osmóticos y elásticos- Fotosíntesis- Déficit hídrico- Elasticidad de la pared celular- Olivo - Patagonia- Superenfriamiento.

Resumen

El estudio de las respuestas de las plantas a los factores ambientales es clave en la Ecofisiología vegetal, dado que esta disciplina evalúa el funcionamiento de las plantas en su ambiente natural y los factores bióticos y abióticos que determinan su distribución, supervivencia y crecimiento (Lambers et al. 1998). Existe una multiplicidad de mecanismos de resistencia a factores ambientales como sequía y bajas temperaturas y cada especie o variedad puede recurrir a diferentes mecanismos con el fin de resistir algún

factor de estrés (Levitt 1990). En el caso de los cultivos, el riego ha permitido luchar con la escasez de agua para aumentar la producción agrícola en algunos ecosistemas, así como el desarrollo de nuevas variedades más productivas. Sin embargo, frente al cambio climático, será necesario asegurar la producción agrícola bajo condiciones más limitantes, ya sea disminuyendo el riego o extendiendo la producción hacia regiones más áridas para poder solventar la demanda de alimentos. Según el último informe realizado por el Instituto Nacional de Tecnología

Agropecuaria (INTA), Programa Nacional de frutales cadena olivos, las principales zonas productoras de *Olea europaea* L. (olivo) en Argentina se encuentran en la Región de Cuyo; sin embargo recientemente han surgido nuevos proyectos de expansión de este cultivo a otras regiones del país, los cuales se enmarcan dentro de los núcleos socio-productivos estratégicos del Plan Argentina Innovadora 2020. Estos nuevos proyectos han permitido ampliar las zonas de producción y han generado nuevos emprendimientos productivos para las economías locales. *Olea europaea* L. (olivo) es considerada una especie altamente resistente a las condiciones climáticas características de ecosistemas semiáridos con prolongadas sequías de verano, y moderadamente resistente a las bajas temperaturas; sin embargo la resistencia a un determinado factor de estrés puede variar dentro de una especie (entre variedades) y depender de la interacción con otros factores. Por consiguiente, si bien la extensión del cultivo hacia latitudes mayores genera nuevas expectativas, también supone un desafío, ya que estas zonas se ubican en regiones donde las bajas temperaturas y la escasa disponibilidad de agua podrían

afectar negativamente la productividad de las plantaciones.

El proyecto de tesis doctoral, ubicado en la intersección de los campos de las ciencias básicas y aplicadas, propuso caracterizar eco-fisiológicamente cinco variedades de *O. europaea* (Arbequina, Changlot Real, Frantoio, Hojiblanca y Manzanilla) con el objetivo de evaluar los mecanismos por los cuales esta especie responde al déficit hídrico y a las bajas temperaturas y determinar cuál de estas variedades sería la más apta para su cultivo en la Región costera de la Provincia del Chubut. Gran parte de la información inicial disponible para estas variedades provenía de estudios realizados en Europa y Asia con condiciones climáticas diferentes a las de la estepa patagónica y se carecía básicamente de estudios integrales en cuanto al comportamiento eco-fisiológico de las distintas variedades de olivo, en particular para las existentes en Argentina. La información aportada por este trabajo constituye un aporte relevante al conocimiento del comportamiento fisiológico bajo déficit hídrico y bajas temperaturas, el cual podría ser utilizado/aplicado en planes para extender la distribución del cultivo del olivo a latitudes mayores, más áridas y frías.

El estudio se desarrolló en la región del Golfo San Jorge (Comodoro Rivadavia, Chubut, 45° 47'S, 67 ° 30'O) en plantas de *O. europaea* de un año de edad colocadas en contenedores de 20 litros de capacidad bajo condiciones naturales de temperatura y luz. Las variedades utilizadas para todos los ensayos de la tesis fueron: Arbequina, Changlot Real, Frantoio, Hojiblanca y Manzanilla las cuales fueron elegidas según la información disponible proveniente de estudios realizados principalmente en Europa y Asia en cuanto a su precocidad en la entrada en producción, su resistencia a la sequía y a las bajas temperaturas. Estas variedades son cultivadas en otras áreas de la Argentina y fueron obtenidas del vivero productor C.I.A.S.A. (San Juan). Se utilizaron un total de 200 plantas (40 por variedad), las cuales fueron mantenidas bajo riego durante el primer año de estudio y luego fueron sometidas a distintas condiciones de riego (sin déficit hídrico, moderado y alto déficit hídrico).

Durante el primer año de estudio y con frecuencia estacional se midieron las principales variables meteorológicas (temperatura y humedad del aire y del suelo), se midieron variables alométricas y morfológicas en hojas, tallos y raíces, se

determinaron las relaciones hídricas foliares a través de curvas de presión volumen, se midieron los potenciales hídricos foliares mínimos y máximos así como la conductancia foliar y se realizaron análisis térmicos diferenciales y de daño celular del tejido vegetal ante temperaturas congelantes en hojas, tallos y raíces. Bajo condiciones de déficit hídrico y también con frecuencia estacional se determinaron los patrones de asignación de biomasa, la tasa fotosintética, las relaciones hídricas y la temperatura de formación de hielo en los tejidos y el daño celular producto de las bajas temperaturas en hojas y tallos.

Los resultados y conclusiones más relevantes de la tesis mostraron que bajo condiciones de alta disponibilidad hídrica del suelo las plantas exhibieron ajustes estacionales frente al incremento en el déficit de saturación del aire en verano y a las bajas temperaturas en invierno. El control estomático y el ajuste osmótico fueron los principales mecanismos observados frente al aumento en la demanda evaporativa en verano, lo cual evitó la pérdida de turgencia celular durante los periodos del día con potenciales hídricos menores. En esta estación se registraron también las mayores tasas de asimilación de CO₂, eficiencia de uso de

agua y crecimiento. Durante el invierno, y aunque los potenciales hídricos foliares fueron significativamente menores que en verano, la regulación estomática fue relativamente baja. El mecanismo exhibido por todas las variedades de *O. europaea* frente a temperaturas congelantes (hasta -13°C) fue el superenfriamiento del líquido presente en los tejidos. La fracción de agua apoplástica, la rigidez de las paredes celulares y el contenido de solutos fueron determinantes clave de la capacidad de superenfriamiento y de las diferencias observadas entre variedades, siendo Arbequina y Hojiblanca las más resistentes a las bajas temperaturas. Aunque los cambios estacionales en los potenciales osmóticos a máxima turgencia no fueron consistentes con las variaciones en los potenciales hídricos foliares entre verano e invierno, se observó una disminución significativa del potencial osmótico cuando la temperatura del aire se mantuvo por debajo de 0 °C por un largo periodo de tiempo, reflejando posiblemente una hidrólisis rápida y reversible de almidón. Al igual que el aumento en el déficit de saturación del aire, la disminución controlada de la disponibilidad de agua en el suelo durante la estación seca indujo tanto a ajustes osmóticos (pasivos y

activos) y elásticos como a un marcado control estomático de modo de evitar o reducir la deshidratación, aunque con el costo de reducir la tasa fotosintética. La disminución en la tasa de asimilación de CO₂ frente al déficit hídrico redujo el crecimiento en altura de las plantas y afectó los patrones de asignación de biomasa en comparación a los observados en ausencia de déficit hídrico. Los olivos asignaron mayor cantidad de biomasa a las raíces y menor a los tallos y a las hojas en los tratamientos de déficit hídrico y a su vez disminuyeron significativamente la producción total de frutos, particularmente bajo déficit hídrico severo. Manzanilla fue la variedad más resistente al déficit hídrico impuesto en el suelo en verano pudiendo mantener constante la tasa de fotosíntesis y el crecimiento y afectando en menor proporción la producción de frutos. La aplicación de déficit hídrico previo a la estación fría, contribuyó a aumentar significativamente la capacidad de superenfriamiento en todas las variedades. Sin embargo en invierno este efecto no fue tan significativo debido a que la estacionalidad de las precipitaciones equilibró el contenido de agua en el suelo en todos los tratamientos. En consecuencia, este comportamiento resalta la importancia

del proceso de aclimatación en la capacidad de superenfriamiento máxima adquirida por las plantas. Integrando las respuestas observadas a lo largo del año Arbequina y Hojiblanca serían las variedades más aptas para su cultivo en la zona costera de Chubut, fuertemente caracterizada por veranos secos y cálidos e inviernos húmedos y fríos.

Bibliografía

Lambers H., Chapin F.S. y Pons T.L. (1998) Chapin Plant physiological ecology. New York, NY: Springer Science.

Levitt J. (1990) Responses of plants to environmental stresses, Vol. 2., 2nd edn. New York: Academic Press Inc.

Publicaciones alcanzadas por el trabajo de tesis doctoral

Arias N.S., Bucci S.J., Scholz F.G. y Goldstein G. (2015). Freezing avoidance by supercooling in *Olea europaea* cultivars: the role of apoplastic water, solute content and cell wall rigidity. *Plant, Cell and Environment*; 38(10).

Arias N.S. Tesis doctoral Respuestas morfo-fisiológicas a bajas temperaturas y disponibilidad de agua en variedades de *Olea europaea* L. (2015) ResearchGate DOI: 10.13140/RG.2.1.4248.8803

Utilización de residuos orgánicos para la producción de lípidos con bacterias oleaginosas del género *Rhodococcus*: metabolismo del glicerol

Use of organic waste for lipid production by oleaginous bacteria belonging to *Rhodococcus* genus: glycerol metabolism

Tesista: **Ornella Marisa Herrero**

Director de Tesis: **Dr. Héctor M. Alvarez** (UNPSJB, CONICET).

Tesis para el grado de Doctor en Bioquímica realizada y presentada en la Facultad de Ciencias Naturales (UNPSJB). La tesis consta de 201 páginas y fue defendida el 2 de junio de 2016. Email: marisaherrero81@hotmail.com

Palabras claves: Residuos orgánicos, sustratos alternativos, bioconversión, lípidos, *Rhodococcus*.

Resumen

Los lípidos microbianos producidos por microorganismos oleaginosos (levaduras, hongos y bacterias) han cobrado particular interés en la última década debido a su uso potencial como materia prima para la producción de biodiesel y otros productos con alto valor agregado para la industria alimenticia y farmacéutica. En este contexto las bacterias del género *Rhodococcus* poseen la habilidad de crecer a partir de una gran diversidad de compuestos, y producir a partir de ellos importantes variables de lípidos (TAG), los cuales pueden alcanzar en algunos casos más del

80% del PSC (Alvarez *et al.* 1996); éstas características los convierte en sistemas biológicos muy interesantes para la eventual producción de lípidos a escala industrial.

Sin embargo para producir lípidos con estos microorganismos a un precio competitivo es fundamental encontrar materias primas de bajo costo para ser utilizados como sustratos alternativos para el crecimiento celular y síntesis de lípidos, dado que uno de los principales factores que afecta el costo de producción es el medio nutritivo necesario para el cultivo de las células, el cual

generalmente representa entre el 60-75% del costo total (Subramaniam *et al.* 2010). En este sentido, uno de los ejes del presente trabajo fue estudiar y optimizar la utilización de diferentes residuos agroindustriales generados en nuestro país como sustratos para el crecimiento y producción de lípidos en diferentes especies del género *Rhodococcus*, con el objetivo de seleccionar tanto los residuos como las cepas bacterianas más apropiados para futuros escalados del proceso, y encontrar las mejores combinaciones “cepa/residuo”.

Por otro lado, se investigaron aspectos fisiológicos y la dotación genética de diferentes especies del género, relacionadas con el transporte y metabolismo de los principales componentes de los residuos agroindustriales utilizados para la producción de biomasa celular y TAG. Finalmente, se realizaron modificaciones genéticas en algunas cepas que permitieron mejorar la utilización de glicerol como única fuente de carbono y energía, y la producción de lípidos a partir de ese sustrato.

En la primera etapa del estudio diferentes residuos agroindustriales (Fig. 1) entre los que se encuentran el suero lácteo (SL), el residuo de frutas (RF), el residuo de oliva (RO), el residuo orgánico domiciliario (ROD), la vinaza (Vza), el

residuo de pescado (RP), los líquidos residuales (LR) y el glicerol (Gly) fueron optimizados para la preparación de medios de cultivo. Se determinó la concentración de residuo (g/l) a utilizar, forma de cultivo (cultivo sumergidos o en fase sólida), así como diferentes técnicas para reducir la carga microbiana propia de los residuos. Los resultados muestran que no pueden establecerse generalizaciones y que cada material residual requiere de un acondicionamiento y optimización particular para su uso como medio para el cultivo de los microorganismos.

Las cepas de *Rhodococcus* fueron cultivadas a 28 °C en los medios preparados a partir de los residuos, determinando los rendimientos de biomasa y TAG producidos en fase estacionaria.

El residuo de la elaboración de jugos de fruta (RF), el suero lácteo (SL), el residuo de la elaboración de aceite de oliva (RO) y el glicerol (Gly), resultaron los sustratos más apropiados, ya que a partir de los mismos se obtuvieron altos valores de producción de biomasa celular (4,3 a 6,4 g/L) y porcentajes de acumulación de lípidos entre 38-84% (PSC). La combinación de elevados valores de biomasa celular y acumulación de TAG determinaron valores de producción de lípidos de 1,8 a 3,5 g/L.

Para el resto de los residuos (RP, LR, ROD y Vza) se obtuvieron bajos rendimientos de biomasa y/o TAG que limitan su aplicación en un proceso biotecnológico.

El análisis químico de los residuos orgánicos elegidos muestra altos valores de DQO (indicativo de altos contenidos de materia orgánica disponible) y una elevada relación C/N, lo cual genera las condiciones adecuadas para el crecimiento y la producción de lípidos bacterianos.

Las cepas estudiadas pertenecientes a diferentes especies del género mostraron un comportamiento heterogéneo en cuanto a su capacidad de utilizar los residuos y convertirlos en TAG. Las especies *R. opacus*, *R. wratislaviensis* y *R. jostii* resultaron las más eficientes en la utilización de RF y RO para el crecimiento y síntesis de TAG; *R. opacus* y *R. wratislaviensis* para el SL, mientras que las especies *R. fascians* y *R. erythropolis* fueron las más eficientes en la utilización del glicerol como sustrato para el crecimiento y producción de lípidos.

Un exhaustivo análisis bioinformático utilizando la base de datos Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), National Center for Biotechnology Information (NCBI), Rapid Annotation using Subsystem

Technology (RAST), Universal Protein Database (UniProt) permitió clarificar los transportadores y rutas que estarían involucrados en el catabolismo de los principales azúcares presentes en los residuos (glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y galactosa) así como del glicerol en el género *Rhodococcus* (aspecto que hasta el momento no había sido reportado). Dicho análisis reveló además diferencias importantes en la dotación génica entre las diferentes especies estudiadas y una correlación respecto al comportamiento observado frente a estos carbohidratos y a los residuos. Las especies *R. opacus*, *R. wratislaviensis* y *R. jostii* poseen una dotación génica más completa para el catabolismo de gluconato, glucosa, fructosa y sacarosa, que incluyen el conjunto de genes/proteínas necesarias para el transporte, reacciones específicas de degradación y asimilación de estos sustratos, y una mayor redundancia de genes del metabolismo central (vía de Entner-Doudoroff y vía de las pentosas fosfato) en comparación con *R. erythropolis*, *R. fascians* y *R. equi*. Esto explicaría la mayor eficiencia de los miembros de estas especies para crecer y producir TAG a partir de gluconato, glucosa, fructosa y sacarosa, así como también a partir de RF, el cual es rico en estos azúcares.

El análisis de genómica comparativa entre las especies investigadas reveló que *R. opacus* y *R. wratislaviensis* poseen los genes necesarios para el transporte y catabolismo de la lactosa y galactosa (principales componentes del SL), tales como el sistema de transporte (*LacEFGK*), la β -galactosidasa (*LacB*), la α -galactosidasa (*lacA*) y todas las enzimas de la vía de Leloir (*GalK*, *GalU* y *GalE*). En contraste, *R. jostii* RHA1, *R. erythropolis* PR4, *R. fascians* F7 y *R. equi* 103S poseen en sus genomas una pequeña región que incluye únicamente los genes *galK* y *galT*. La ausencia del transportador para lactosa y galactosa, así como de la enzima β -galactosidasa serían responsable de su incapacidad de crecer a partir de éstos azúcares, así como su baja eficiencia en la conversión de SL en biomasa y lípidos en comparación con *R. opacus* y *R. wratislaviensis*.

Cuando se utilizó glicerol como única fuente de carbono y energía, las especies que mostraron mayor eficiencia para crecer y producir TAG fueron *R. erythropolis* y *R. fascians*, las cuales fueron capaces de acumular aproximadamente un 40% (PSC) de TAG luego de 6 días de incubación. Por otro lado, las especies *R. opacus*, *R. wratislaviensis*, *R. jostii* y *R. equi* mostraron una fase *lag* prolongada antes de iniciar el crecimiento a partir de

glicerol, acumulando entre un 30-40% (PSC) de TAG luego de un período de cultivo de aproximadamente 17 días. El análisis genómico demostró que *R. fascians* F7 y *R. erythropolis* PR4 poseen una dotación genética diferente para el metabolismo del glicerol en comparación con *R. opacus*, *R. wratislaviensis*, *R. jostii* y *R. equi*. Mientras que *R. erythropolis* y *R. fascians*, poseen un clúster que contiene los genes que codifican para la proteína facilitadora del transporte de glicerol (*GlpF*), la enzima glicerol quinasa (*GlpK*) y la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (*GlpD*) (designado como *glpFK1D1*), las otras especies poseen un clúster integrado solamente por *glpK* y *glpD* (designado como *glpK2D2*). Por otro lado, también se detectaron algunas diferencias estructurales y filogénicas entre los genes del metabolismo del glicerol en las especies investigadas.

En el presente trabajo se encontraron tres cepas pertenecientes a la especie *R. jostii* (cepas 006, 016 y G212) que fueron incapaces de crecer durante el cultivo con glicerol como única fuente de carbono y energía. La expresión heteróloga del gen *glpK* de *R. opacus* PD630 (*pJAM2-glpK2_{PD630}*) permitió el crecimiento de las tres cepas a partir de glicerol, sugiriendo que la causa del fenotipo glicerol-negativo se debe a algún defecto en la

expresión o en la estructura de *glpK* en esos microorganismos.

En otro ensayo realizado en este trabajo, se mejoró el crecimiento y la producción de TAG en *R. opacus* PD630 mediante la expresión heteróloga de los genes *glpK* y *glpD* de *R. fascians* F7 (pTip-QC2/*glpK1D1*_{F7}). La modificación genética generó un incremento de aproximadamente 10% en la producción de TAG comparado con la cepa control (PD630-pTiP-QC2) y una reducción considerable del tiempo (de aproximadamente 10 días) necesario para alcanzar los máximos rendimientos de biomasa celular (4,4 g/L) y lípidos (41% PSC, 1,8 g/L).

Los resultados de ésta tesis mostraron la gran diversidad catabólica que existe entre especies del género *Rhodococcus* y las bases genómicas relacionadas con estas diferencias, identificando los principales transportadores, enzimas y vías metabólicas que estarían involucrados en la utilización de algunos carbohidratos y del glicerol.

En su conjunto, los resultados permitieron encontrar las especies/cepas del género *Rhodococcus* más eficientes para la producción de biomasa celular y TAG a partir de tres residuos agroindustriales y glicerol. El análisis integrado de los resultados fisiológicos y de genómica comparativa permitió aportar un fundamento para explicar el comportamiento de cada especie con cada uno de los sustratos investigados. A su vez, se demostró que las manipulaciones genéticas de las vías catabólicas de los sustratos (en este caso del glicerol), permiten mejorar el proceso de producción de TAG en estas actinobacterias.

Por último, este trabajo ha permitido poner en valor a dos cepas autóctonas de la Patagonia, *R. fascians* F7 y *R. wratislaviensis* V (identificada en este trabajo), las cuales poseen un gran potencial para el escalado y eventual aplicación biotecnológica para la conversión de residuos agroindustriales en aceites de interés para la industria.

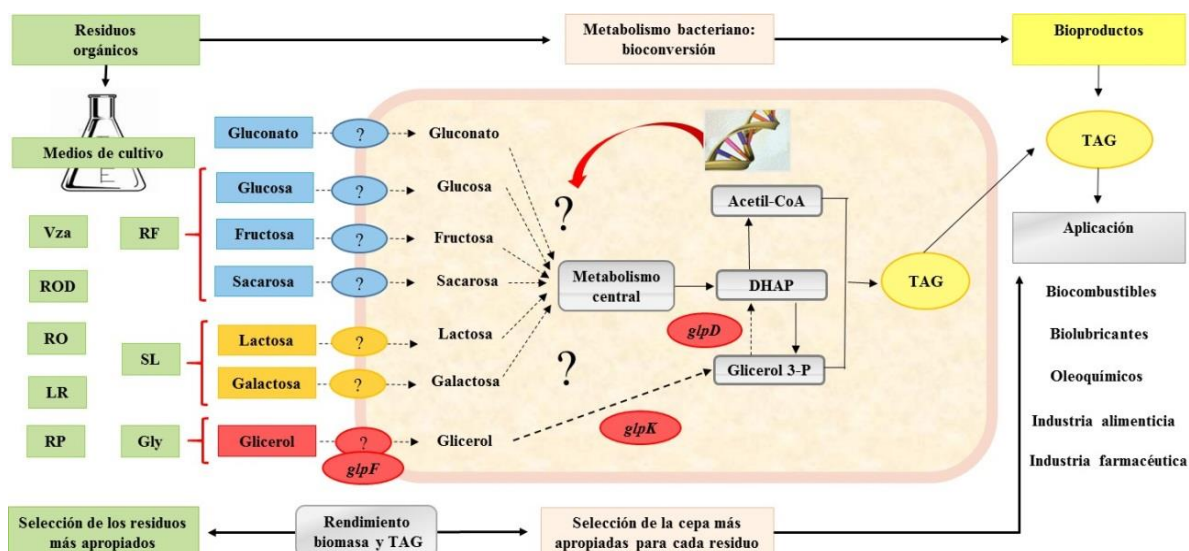


Figura 1: Diferentes aspectos abordados en esta tesis doctoral.

- Residuos utilizados como sustratos para el crecimiento y producción de TAG en bacterias del género *Rhodococcus*. Análisis de rendimientos. Selección de los residuos y cepas más apropiadas para un posible escalado del proceso.
- Estudio fisiológico y bioinformático de la utilización de gluconato y los principales azúcares presentes en el RF. Análisis de rutas catabólicas implicadas.
- Estudio fisiológico y bioinformático de la utilización de los principales azúcares presentes en el SL. Análisis de las rutas catabólicas implicadas. Optimización de las condiciones de cultivo para incrementar la producción de biomasa y TAG a partir de SL.
- Estudio fisiológico y bioinformático de la utilización de Gly. Análisis de rutas catabólicas implicadas en diferentes especies del género *Rhodococcus*. Optimización de las condiciones de cultivo para incrementar la producción de biomasa y TAG a partir de glicerol.
- Estudios moleculares de genes involucrados en el metabolismo de glicerol. Construcción de una cepa recombinante de *R. opacus* PD630 (pTip-CQ2/*glpK1D1*) con mayor eficiencia en el uso de glicerol.

Bibliografía

Subramaniam, R., Dufreche, S., Zappi, M., Bajpai, R. 2010. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **37**: 1271-1287.

Alvarez, H.M., Mayer, F., Fabritius, D., Steinbüchel, A. 1996. Formation of intracytoplasmic lipid inclusions by *Rhodococcus opacus* strain PD630. *Arch Microbiol*. **165**: 377-386.

Publicaciones

Publicaciones en revistas con referato:

Herrero, O.M., Moncalián, G., Alvarez, H.M. 2016. Physiological and genetic differences among *Rhodococcus* species for using glycerol as a source for growth and triacylglycerol production. *Microbiology*. **162**: 384-397.

Herrero, O.M, Alvarez, H.M. 2016. Whey as a renewable source for lipid production by *Rhodococcus* strains: Physiology and genomics of lactose and galactose utilization. *Eur J Lipid Sci Tech*. **118**: 262-272.

Dávila Costa, J.S., Herrero, O.M., Alvarez, H.M., Leichert, L. 2015. Label-

free and redox proteomic analyses of triacylglycerol-accumulating

Rhodococcus jostii RHA1. *Microbiology*. **161**: 593-610.

Alvarez, H.M., Silva, R.A., Herrero, O.M., Hernández, M.A., Villalba, M.S. 2013. Metabolism of triacylglycerols in *Rhodococcus* species: insights from physiology and molecular genetics. *J Mol Biochem*. **2**: 69-78.

Publicaciones de resúmenes en reuniones científicas

Herrero, O.M., Alvarez, H.M. 2010. Utilization of glycerol by *Rhodococcus* species. XLVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Puerto Madryn, Chubut, Argentina.

Herrero, O.M., Alvarez, H.M. 2013. Catabolismo de carbohidratos en diferentes especies del género *Rhodococcus*: diferencias fisiológicas y genéticas. XIII Congreso Argentino de Microbiología (CAM). II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental (CAMAyA). Buenos Aires, Argentina.

Registro de Patentes

Alvarez, H.M, Herrero, O.M. 2014. Un procedimiento para la producción industrial de lípidos a partir de residuos orgánicos utilizando diferentes bacterias

del género *Rhodococcus*. Solicitud nacional patente de invención N° 20140104230. Instituto Nacional de la Propiedad Industrial (INPI), Administración Nacional de Patentes de Argentina.

Alvarez, H.M, Herrero, O.M. 2015. A process for industrial production of lipids from organic residues using different bacteria from *Rhodococcus* genus. Solicitud internacional patente de invención N° PCT/IB2015/058684. World Intellectual Property Organization. European Patent Office.

Modificaciones del proceso de producción de triacilglicéridos intracelulares y extracelulares en bacterias del género *Rhodococcus*

Modifications of the intracellular and extracellular triacylglycerol production process in bacteria belonging to *Rhodococcus* genus

Tesista: **María Soledad Villalba**

Director de Tesis: **Héctor Manuel Alvarez**

Carrera: Doctorado en Bioquímica. Lugar de realización y presentación: UNPSJB- Facultad de Ciencias Naturales- Sede Comodoro Rivadavia. Defensa de tesis: 13 de Abril de 2016. Número de página de tesis: 141.

Resumen

En la actualidad a nivel mundial existe una demanda creciente por nuevos recursos energéticos, basados en procesos de producción sustentables y de bajo impacto ambiental, como por ejemplo la bioenergía proveniente de los biocombustibles. A diferencia de los combustibles tradicionales que provienen de la energía almacenada en los restos fósiles, los biocombustibles provienen de la biomasa o materia orgánica contenida en todos los seres vivos. Argentina es uno de los principales productores mundiales de biocombustibles (biodiesel), producidos principalmente a partir de fuentes vegetales como la soja. La utilización de estos cultivos para la producción de biocombustibles ha generado controversias de tipo éticas por la importancia de estos recursos como base de alimentación para los seres humanos y por la necesidad de disponer

de enormes extensiones de suelo para poder satisfacer las demandas de los mercados, lo cual promueve la deforestación de bosques, entre otros efectos nocivos para el ambiente. Por tales razones, ha surgido en el último tiempo el interés de explorar nuevas fuentes biológicas de lípidos para su utilización en la producción de biocombustibles y productos derivados. En este sentido, los aceites (triacilglicéridos, TAG) producidos por bacterias y otros microorganismos, podrían ser potencialmente utilizados para procesos productivos de biocombustibles, oleoquímicos y derivados.

Las bacterias del género *Rhodococcus* poseen la capacidad de sintetizar y acumular cantidades significativas de TAG a partir de diferentes fuentes de carbono y energía. A fin de explorar el potencial de estas bacterias como fuentes de lípidos para eventuales procesos de producción de biocombustibles o compuestos derivados, se

considera necesario profundizar en el conocimiento y entendimiento de los procesos básicos de la producción de lípidos en estos microorganismos.

Uno de los aspectos abordados en ésta tesis doctoral fue el análisis de la capacidad de diferentes especies del género para liberar TAG al medio extracelular, considerando que la recuperación de los lípidos directamente del medio de cultivo en un eventual proceso industrial podría reducir significativamente los costos de producción. En este trabajo se demostró que todas las cepas investigadas fueron capaces de liberar TAG al medio extracelular, aunque su producción no fue cuantitativamente importante (< de 4% en peso seco celular, psc) comparada con la acumulación de TAG en el medio intracelular, sobre todo en el caso de las cepas oleaginosas (bacterias con la capacidad de alcanzar contenidos de TAG superiores al 20% en psc). Los resultados obtenidos demostraron además que estos lípidos extracelulares no provienen de la lisis de las células, sino que existiría un mecanismo selectivo de excreción de TAG, aún desconocido, conteniendo altas proporciones de ácidos grasos saturados en su estructura. La baja producción de lípidos extracelulares en estas bacterias sugiere que éste proceso de liberación de lípidos al medio debería ser mejorado para poder ser considerado en un potencial proceso biotecnológico.

Por otro lado, en trabajos anteriores se ha obtenido cierta evidencia de que la capacidad de producir y acumular grandes cantidades de TAG por parte de las bacterias del género *Rhodococcus* demanda la participación de una amplia diversidad y funcionalidad de genes/proteínas diferentes, incluyendo enzimas, transportadores, reguladores, etc. Además, se ha sugerido el funcionamiento de procesos celulares contrapuestos en forma simultánea durante la acumulación de los TAG, como los procesos de lipogénesis y lipólisis. Por estos motivos, y a fin de abordar aspectos de la acumulación de TAG en estas bacterias aún desconocidos, en el presente trabajo se realizó un análisis detallado de los genomas en seis especies del género sobre la dotación de genes involucrados en la hidrólisis de los TAG y los fosfolípidos. Los análisis bioinformáticos realizados permitieron hacer una reconstrucción del catabolismo de los lípidos y en estas bacterias confirmaron que la maquinaria de hidrólisis de lípidos está integrada por numerosos genes que codifican para enzimas lipasas, estererasas, fosfolipasas, enzimas de la oxidación de ácidos grasos y del ciclo del glioxilato. Los genes que codifican para lipasas y estererasas putativas fueron muy abundantes especialmente en las cepas oleaginosas del género, tales como *R. opacus* y *R. jostii*. Esta situación redujo la posibilidad de manipulación del proceso de hidrólisis de TAG mediante

estrategias de ingeniería genética para mejorar la productividad de los lípidos. Además de los genes de la hidrólisis de lípidos, se realizó una búsqueda en el genoma de *R. jostii* RHA1 de genes que pudieran codificar para proteínas transportadoras de lípidos, ya que estos también podrían estar formando parte de la compleja red celular involucrada en la dinámica del metabolismo de lípidos en estos microorganismos. En este trabajo se identificó y caracterizó *in vivo* un gen (*ro05645*) que codifica para una proteína transportadora del tipo ABC, que funciona como un importador de ácidos grasos, participando probablemente de la distribución de ácidos grasos a las diferentes rutas metabólicas de lípidos, como por ejemplo la síntesis de TAG, entre otras. El clonado y sobreexpresión de RO05645 en la cepa RHA1 promovió un incremento de aproximadamente tres veces del contenido de TAG intracelular y de seis veces la producción de biomasa celular, durante el cultivo de las células con ácidos grasos como única fuente de carbono y energía. El aumento en el rendimiento de la producción de lípidos a través de la modificación de la expresión del gen *ro05645*, también pudo ser reproducido durante el cultivo de las células con un residuo agroindustrial real con alto contenido en ácidos grasos, como es el residuo proveniente de la elaboración de aceite de oliva, lo cual demuestra que el gen identificado constituye una interesante herramienta

molecular para la mejora del proceso de producción de TAG en estas bacterias.

Por último, en el presente trabajo se enfocaron los estudios en otro de los genes que podría participar del metabolismo de lípidos en la cepa *R. jostii* RHA1, y cuya manipulación de su expresión podría tener un efecto sobre la producción de TAG. Por ésta razón, se realizó la identificación y el estudio del gen *ro02476* que codifica para una enzima fosfolipasa C putativa en la cepa RHA1. La manipulación de la expresión de este gen promovió una modificación en la proporción de las diferentes fracciones de los lípidos neutros, como por ejemplo el incremento de la fracción de DAG. La fracción de TAG se incrementó principalmente cuando se co-expresaron los genes *ro02476* y *atf2* (que codifica para una enzima diacilglicerol aciltransferasa; DGAT, en la cepa *R. opacus* PD630), sugiriendo una acción complementaria entre ambas enzimas, la primera suministrando DAG para la síntesis de TAG por medio de la enzima DGAT.

El desarrollo del presente trabajo permitió contribuir al conocimiento general de la producción de lípidos por medio de bacterias del género *Rhodococcus*, realizando aportes particulares sobre la producción de TAG extracelulares y sobre la conformación de las rutas catabólicas de lípidos y sus componentes en diferentes especies del género. Estos resultados han servido de base para la

caracterización de genes específicos relacionados con estos procesos en el marco de la presente tesis y servirán para los trabajos futuros en la temática. Por otro lado, se han identificado y caracterizado funcionalmente (*in vivo*) dos genes involucrados en la homeostasis y el metabolismo de lípidos en la cepa RHA1. Ambos genes se han utilizado en el presente trabajo, como herramientas de manipulación genética del sistema estudiado para la mejora del proceso de producción de TAG en estas bacterias. La tesis ha permitido generar conocimientos básicos originales en la temática y también conocimientos aplicables a procesos tecnológicos futuros.

Palabras clave: *Rhodococcus*, biocombustibles, triacilglicéridos.

Publicaciones científicas en revistas con referato:

Villalba MS, Hernández MA, Silva RA, Alvarez HM. (2013) Genome sequences of triacylglycerol metabolism in *Rhodococcus* as a platform for comparative genomics. *Journal of Molecular Biochemistry*. 2: 94-105.

Villalba MS, Alvarez HM. (2015) Identification of a novel ATP- binding cassette transporter involved in long-chain fatty acid import and its role in triacylglycerol accumulation in *Rhodococcus jostii* RHA1. *Microbiology* 160: 1523-1532.

Alvarez HM, Silva RA, Herrero M, Hernández MA, Villalba MS. (2013) Metabolism of triacylglycerols in *Rhodococcus* species: insights from physiology and molecular genetics. *Journal of Molecular Biochemistry* 2: 69-78.

Publicaciones de resúmenes en reuniones científicas

Villalba MS, Alvarez HM. (2010) Extracellular lipids produced by different *Rhodococcus* species. XLVI Congreso de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Puerto Madryn, Chubut, Argentina.

Villalba MS, Alvarez HM. (2013) Differential distribution of fatty acids between intracellular and extracellular triglycerides produced by *Rhodococcus opacus* PD630. IX Congreso Argentino de Microbiología General. Rosario, Santa Fe, Argentina.

Alvarez HM, Villalba MS. (2014) Identification of a novel lipid ABC transporter of *Rhodococcus jostii* RHA1 and its role in triacylglycerol accumulation. 12th Euro Fed Lipid Congress. Montpellier- Francia.

Actividad Farmacológica y Estudio Fitoquímico de *Chiliotrichum diffusum* (Asteraceae)

Pharmacological Activity and Phytochemical Study of *Chiliotrichum diffusum* (Astereaceae)

Tesista: **Farm. Sandra Marcela Alcalde Bahamonde.**

Director de Tesis: **Dra. María Lujan Flores** (Farmacognosia, FCN, UNPSJB). Codirector de

Tesis: **Dr. Carlos Alberto Taira** (Farmacología, FFyB, UBA).

Tesis para optar al título de Dr. en Farmacia de la Facultad de Ciencias Naturales (UNPSJB). Fue realizada fundamentalmente en el Departamento de Farmacia, Farmacognosia, dependencias del Grupo de Investigación en Química, Bioactividad y Metabolismo de Recursos Naturales Patagónicos y del Centro Regional de Investigación y Desarrollo Científico Tecnológico (GQBMRNP- CREDECIT), de la Facultad de Ciencias Naturales (UNPSJB). Parte de las actividades relacionadas con Farmacología fueron efectuadas mediante estancias de investigación en el Laboratorio de Farmacología (FFyB, UBA), lugar de trabajo del Codirector de la tesis.

Lugar de presentación: FCN, UNPSJB. Fecha de defensa: 20 de febrero 2014, calificación Sobresaliente 10 (diez). Número total de páginas de tesis: 254.

Resumen

En Argentina, las Asteraceae representan una de las familias más numerosas con 227 géneros y 1400 especies. El mayor número de especies nativas se da en las provincias fitogeográficas Altoandina y Patagónica. En la provincia de Santa Cruz representan el 25 % de las especies.

La especie objeto de estudio en esta tesis doctoral, *Chiliotrichum diffusum* (G. Forst.) Kuntze (Asteraceae), “mata negra”, “kòor” (en lengua shélnam u ona), es autóctona de Santa Cruz, habiéndose efectuado la

colección en la Localidad de 28 de Noviembre, en donde forma estepas arbustivas en suelos fértiles. Ha sido utilizada como muchas otras Asteraceae, en medicina tradicional. Los pueblos onas mencionaban la importancia de sus flores “para aclarar la vista”. Nativos de Chile han descripto también su uso para mejorar la memoria, tratar dolores de cabeza, calambres y várices. Teniendo en cuenta que esta especie forma parte de la rica biodiversidad del sur de nuestro país, su importancia etnomédica, y que no existían antecedentes en literatura

respecto al conocimiento integral de la planta, los objetivos principales de este trabajo de tesis comprendieron su caracterización farmacognóstica y farmacológica y sus posibles relaciones con su uso tradicional de diferentes extractos de esta especie vegetal.

A partir de los objetivos propuestos, en la tesis se desarrollaron siguientes temas:

Una revisión taxonómica del taxón *Plantae*, destacando a las espermatofitas, en particular a las angiospermas y a las Asteraceae, familia en donde se ubica *Chiliotrichum diffusum*, como así también al Género y especie, priorizando caracteres botánicos y distribución geográfica.

Una síntesis de aspectos históricos de las plantas medicinales y su importancia en Salud, abordaje etnofarmacológico como estrategia para la investigación de las plantas medicinales.

Una recopilación de antecedentes fitoquímicos de los productos del metabolismo de las plantas y de actividades farmacológicas *in vitro* e *in vivo* fundamentalmente de compuestos fenólicos, fenoles simples, flavonoides, antocianos y taninos, como así también ejemplos de especies de las Asteraceae que biosintetizan estos grupos de metabolitos.

El material vegetal (partes aéreas totales y flores) fue colectado e identificado taxonómicamente como HRP N° 5305; un ejemplar fue depositado en el Herbario Regional Patagónico de la Facultad de

Ciencias Naturales (UNPSJB). El material fue secado a temperatura ambiente, bajo techo y al abrigo de la luz y reducido a polvo. A partir del material constituido por las partes aéreas totales en polvo, se realizó una extracción exhaustiva con etanol de 96° (HOL). El screening general destacó la presencia de compuestos polares. Tal como sucede con otras Asteraceae de Argentina, flavonoides, hidratos de carbono, proteínas, derivados de antraquinonas y esteroides son biosintetizados en las partes aéreas de *C. diffusum*. Además se detectaron cianoglicósidos, por lo que teniendo en cuenta la toxicidad que pueden generar tales sustancias, ese resultado fue también considerado al momento de decidir con que tipo de extractos profundizar el estudio durante el desarrollo de la tesis.

Los flavonoides resultaron destacables, por lo que, teniendo en cuenta la importancia de estas sustancias desde el punto de vista farmacológico, se definió un fraccionamiento de HOL que permitiera obtener fracciones enriquecidas en ese grupo químico. Así, se destacaron en acetato de etilo, etanol y agua (AE-HOL, ET-HOL y W-HOL), aunque también se detectaron en éter etílico en escasa proporción. Teniendo en cuenta los metabolitos caracterizados y los usos tradicionales de la especie, se profundizó el análisis de las flores a partir de un extracto acuoso que se obtuvo por decocción (DF). Este tipo de extracción constituye una de las formas de preparación usadas por la

comunidad y posibilita una vehiculización adecuada para estudios farmacológicos *in vivo*.

La separación y caracterización de los principales flavonoides y ácidos fenólicos se realizó mediante la aplicación de distintos sistemas cromatográficos planares a escala analítica (bi y monodimensional) y preparativa, como así también cromatografía líquida de alta precisión utilizando un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). Los principales productos fueron caracterizados por espectrofotometría UV-Vis.

Se caracterizaron como principales grupos las flavonas y los flavonoles, particularmente derivados mono y diglicosilados en posición 7, además de algunos en 3. En las fracciones se evidenciaron: la vitexina y un derivado metilado de la quercetina, derivado glicosilado del kaempferol y apigenina-7-*O*-glucósido, dihidroflavonoles hidroxilados en 4', flavonas 7-*O*-monoglicosiladas e isoflavonas-7-*O*-monoglicosiladas, flavonoles hidroxilados en 4', flavonas 7-*O*-monoglicosiladas y con OH en 4', flavonas 7-*O*-diglicosiladas con OH en 4' y flavonoles 7-*O*-diglicosilados con OH en 4'. Resultó destacable la presencia de gossipina, herbacetina-8-metiléter e isoramnetina, sustancias que por no ser de las más representativas en las Asteraceae, aportan un dato interesante a la caracterización química del género *Chiliotrichum*.

En DF (decocto de las flores) se determinó, previo tratamiento en medio ácido y calor, la presencia de taninos hidrolizables de tipo galotaninos en virtud de que contenía ácido gálico, y de otros polifenoles. Se detectaron flavonoles y cianidinas, destacándose 3,7,4'-trihidroxiavililio, apigeninidina y pelargonidina, ácido cafeico, ácido clorogénico, quercetina-3-*O*-β-D-galactósido (hiperósido), quercetina-3-*O*-β-D-glucósido (isoquercitrina), quercetina-3-*O*-β-D-ramnósido (quercitrina), kaempferol-3-*O*-α-L-ramnósido (afzelina), quercetina, apigenina y kaempferol.

A partir de tales resultados se diseñó un fraccionamiento de DF, obteniendo las fracciones de diclorometano (DM-DF), acetato de etilo (AE-DF) y acuosa final (faqfdf). De estas fracciones se separaron apigenina y una flavona-CH₃-éter, miricetina, kaempferol, ramnocitrina, mirecitina-3-*O*-arabinósido y kaempferol-3-*O*-galactósido; además se separó pirogalol, ácidos fenólicos (clorogénico y cafeico), flavonoles (hiperósido, isoquercetina, quercitrina, miricetina, quercetina, kaempferol, kaempferol-6-*O*-metiléter-7-*O*-glucósido y un derivado trisulfatado), quercetina (libre y 7-*O*-glucosilada) y apigenina. Una de las sustancias separadas mediante cromatografía planar preparativa y analizada por ¹H-RMN, evidenció señales correspondientes a la apigenina-7-*O*-glucósido.

Tras el análisis de hidratos de carbono en la fracción acuosa final hidrolizada se identificaron fundamentalmente galactosa, glucosa y xilosa (en otro sistema además se observaron restos de arabinosa y ramnosa). El contenido de fenoles totales fue de un 7,3 % expresado como ácido gálico; los flavonoides representaron un 2,3 % expresados como rutina, mientras que los hidratos de carbono resultaron del 38,6 % expresados como ramnosa y del 27,0 % expresados, como galactosa.

Los estudios de actividad *in vitro* comprendieron la determinación de citotoxicidad (bioensayo de la *Artemia salina*, BST) en el que se evidenció un marcado efecto de HOL. Se evaluó el efecto sobre la elongación de raíces de semillas de trigo para evaluar una probable actividad antitumoral demostrando un efecto importante en las muestras de DF y (faqfdf).

Sólo HOL a la concentración de 250 µg/ml mostró actividad moderada frente a *Staphylococcus aureus*. La actividad antioxidante se evaluó en las diferentes fracciones del extracto hidroalcohólico (EE-HOL, AE-HOL, W-HOL) y del decocto de las flores (DM-DF, AE-DF, faqfdf) el mayor efecto secuestrante de radicales libres correspondió a las de éter etílico y de acetato de etilo de HOL, con 87 y 91 % de inhibición y SC₅₀ de 5,2 y 3,5 µg/ml, respectivamente. La actividad antioxidante de las fracciones procedentes del extracto hidroalcohólico de

las partes aéreas totales y de aquellas obtenidas a partir del decocto de las flores de *C. diffusum* se debería, al menos en parte, a la presencia de quercetina, isoramnetina, kaempferol, apigenina libre, acompañados de derivados monoglicosilados (en C-7) de la apigenina y del kaempferol. También se destacó esta actividad en DF y en faqfdf, pudiendo ser responsables la miricetina, quercetina y quercetagina identificados en esta fracción, además de los taninos en DF.

Las actividades farmacológicas *in vivo* evaluadas fueron vascular, analgésica y antiinflamatoria, teniendo en cuenta sobre todo los principales metabolitos evidenciados en el estudio fitoquímico.

Los ensayos *in vivo* se efectuaron siguiendo las normativas internacionales y locales concernientes al cuidado y uso de animales de laboratorio.

La evaluación de la actividad vascular se realizó en el extracto HOL, DF y fracción acuosa (faqfdf) se obtuvo un efecto hipotensor debido posiblemente, al menos en parte, a los compuestos de naturaleza flavonoide, antocianos y taninos. Así mismo todos mostraron un patrón semejante, esto es en todos los casos la actividad se debió a un mecanismo dual β-adrenérgico y muscarínico. Se demostró que el decocto de las flores (DF) y faqfdf posee actividad antinociceptiva. El extracto demostró también poseer actividad antiinflamatoria mediante el test del edema de pata producido por carragenina.

En ambas muestras se evidenciaron estas actividades por un mecanismo posible de inhibición no selectiva de la ciclooxigenasa, diferenciándose en DF una actividad analgésica central mediada por un posible mecanismo opioide. La quercetina y sus derivados hiperósido e isoquercetina, así como los ácidos clorogénico y cafeico, han demostrado poseer dichas actividades; apigenina y kaempferol han exhibido en modelos *in vitro* e *in vivo*, actividades relacionadas con la respuesta inflamatoria, los cuales fueron representativos en los análisis químicos de los extractos de *C. diffusum*.

Los resultados alcanzados en el estudio fitoquímico de las flores de *C. diffusum*, sumado a los obtenidos en las partes aéreas totales, constituyen un aporte novedoso al conocimiento farmacognóstico de la especie. A la vez, guardan relación con las propiedades medicinales de la planta.

El desarrollo de este trabajo de tesis originó publicaciones en revistas periódicas nacionales e internacionales con referato, así como presentaciones en numerosos eventos científicos. Se presentan trabajos publicados destacados:

Alcalde, S; Taira, C; Córdoba, OL; Flores, ML, “Contribución al conocimiento farmacognóstico de *Chiliotrichum diffusum* (Asteraceae)”. *Naturalia Patagónica*, **4** (1): 37-45, 2008.

Alcalde, SM; Taira, C; Höcht, C, Córdoba, O; Flores, ML, “Fitoquímica y bioactividad de

Chiliotrichum diffusum (Asteraceae) una Especie Nativa de La Patagonia Andina”. *Latin American Journal of Pharmacy*, **29** (2): 284-288, 2010.

Alcalde Bahamonde, SM; Córdoba, OL; Gorzalczany, S; Höcht, C; Taira, C; Flores, ML, “Propiedades farmacológicas de la especie medicinal patagónica *Chiliotrichum diffusum* (G. Forst.) Kuntze (Asteraceae)”. *Revista de Fitoterapia*, **12** (S1), 146, 2012.

Alcalde Bahamonde, SM; Flores, ML; Córdoba, OL; Taira, CA; Gorzalczany, S, “Antinociceptive and anti-inflammatory activities of an aqueous extract of *Chiliotrichum diffusum*”. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **23**, (4): 699-705, 2013.