

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química

Autora: Agustina Cabrera

Directora: Dra. Patricia Boeri

Co-directora: Lic. Daniela Dalzotto



**RÍO NEGRO
UNIVERSIDAD
NACIONAL**

Universidad Nacional de Río Negro

Sede Atlántica

Licenciatura en Ciencias del Ambiente

2023

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química

Título: “Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química”

Datos de la estudiante: Agustina Cabrera, Licenciatura en Ciencias del Ambiente. Sede Atlántica, Universidad Nacional de Río Negro (UNRN).

Datos de Directora: Dra. Boeri Patricia, Universidad Nacional de Río Negro, Centro de Investigaciones, (CIT-Río Negro-CONICET).

Datos del Co-director: Lic. Daniela Dalzotto, Universidad Nacional de Río Negro, Centro de Investigaciones, (CIT-Río Negro-CONICET).

Año: 2023

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Río Negro, por brindarme las herramientas necesarias para formarme como profesional.

A Patricia Boeri, por todas las oportunidades en mi proceso académico, por confiar en mí y enseñarme con pasión y paciencia.

A Daniela Dalzotto, por acompañarme incondicionalmente en este largo proceso, por enseñarme con dedicación y compromiso.

A Patricio Solimano, por su gran disposición y apoyo a lo largo de la carrera.

A Nelen Cedrés, por ser parte de mi aprendizaje y formarme profesionalmente.

A mis padres, Carlos y Laura, por darme la vida y la libertad de explorarla, por apoyarme en todo y no dejarme bajar los brazos nunca.

A mis hermanas, Carla y Laura, por ser mi sustento y compañía, por su aliento y su ternura.

A Farid y Seba, por ser como mis hermanos, por estar siempre y aguantarme.

A mis sobrinos, por ser mi fuente de alegría y motivación a seguir adelante.

A Charly, por acompañarme en todo y compartir nuestros logros, por mantenerme firme y por todo tu amor.

A mis amigas, Euge, Fiore y Valen, por su amistad incondicional y estar siempre para recargar energía.

A mis compañeros y compañeras, por los lindos momentos compartidos tanto dentro como fuera de la universidad, por su humildad y complemento.

A todos ustedes y los que no mencioné, de alguna manera aportaron a mi crecimiento como persona y me incentivaron a cumplir mis objetivos. Sin ustedes no sería la persona que soy hoy y aun así me inspiran a ser una mejor versión cada día. Gracias totales.

Resumen.....	1
Lista de abreviaturas y símbolos	3
Introducción	4
Objetivo General	6
Objetivos específicos	6
Hipótesis.....	6
1. Marco Teórico	6
1.1 Descripción de la especie	10
2. Materiales y métodos	11
2.1 Colecta de material vegetal y sitio de muestreo.....	11
2.2 Acondicionamiento, desinfección de las semillas y evaluación de la germinación para su introducción al CTV.....	12
3. Bioprospección.....	14
3.1 Obtención y cuantificación de los compuestos fenólicos.	14
3.1.1 Extracción de compuestos fenólicos.	14
3.1.2 Cuantificación de polifenoles totales.	15
3.2 Determinación de actividad antioxidante <i>in vitro</i>.....	15
3.3 Análisis estadístico.....	16
4. Resultados y Discusión	17
4.1 Acondicionamiento y desinfección de las semillas para el cultivo de tejidos vegetales.	17
4.2 Bioprospección	21
4.2.1 Cuantificación de polifenoles totales	21
4.2.2 Determinación de la actividad antioxidante <i>in vitro</i>	24
5. Conclusiones	28
6. Bibliografía	29
7. Anexo.....	39

Resumen

En los últimos tiempos a nivel global, el uso indebido del suelo ha desencadenado un conjunto de problemas ambientales asociados a la pérdida de la biodiversidad y con ello, una gran variedad de bienes y servicios ambientales que contribuyen al bienestar de las personas. En la Patagonia, la falta de estudios que permitan conocer la flora nativa representa una amenaza para la biodiversidad regional. Así, llevar a cabo actividades científicas orientadas a la caracterización química y a generar conocimiento sobre la propagación y conservación de las especies nativas permite poner en valor la biodiversidad regional, con una perspectiva de sustentabilidad. Para ello, resulta indispensable complementar las técnicas de bioprospección con las de propagación y conservación a través del Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV). Dado que el género *Larrea* spp. ha sido muy valorado por los pueblos originarios de la Patagonia, actualmente existen diferentes registros bibliográficos que documentan tanto sus aplicaciones y usos como las diversas actividades biológicas asociados a éste. No obstante, *Larrea ameghinoi* es una especie aún poco estudiada por la comunidad científica. Frente al riesgo de pérdida de biodiversidad nativa en los ecosistemas patagónicos, este trabajo tuvo el objetivo de integrar metodologías de CTV y de bioprospección química de *L. ameghinoi* como una estrategia para su domesticación, valoración y uso sustentable. Para ello, se evaluaron diferentes tratamientos de desinfección de las semillas con etanol e hipoclorito de sodio, donde el tratamiento D3 fue el más eficiente, dado que en este no se observaron eventos de contaminación y se obtuvo una Capacidad Germinativa (CG) y un Índice de Velocidad Germinativa (IVG) mayores ($80\pm 12\%$ y $19,16\pm 3,5$ semillas/día, respectivamente), junto con un menor Tiempo Medio de Germinación (TMG) ($0,86\pm 0$ días). Así, los diferentes parámetros germinativos evaluados indican que las semillas de *L. ameghinoi* pueden ser consideradas de alto vigor y buena calidad fisiológica. Por otro lado, se evaluó la obtención de polifenoles a partir de extractos etanólicos, metanólicos y acuosos de hojas y tallos de plantas de campo y de vitroplantas. Los extractos provenientes de hojas presentaron un mayor contenido total de polifenoles (CTP) por el método de Folin-Ciocalteu respecto de los extractos de tallo, donde el etanólico (HE) y metanólico

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

(HM) presentaron mayores valores de CTP ($83 \pm 12,6$ y $78,4 \pm 1,3$ mg eq. GAE/g de muestra PS, respectivamente). En el extracto acuoso proveniente de tallos (TA) se obtuvo el menor valor de CTP ($19 \pm 2,8$ mg eq. GAE/ g planta PS). La actividad antioxidante (AO) de estos extractos demostraron una fuerte correlación con el CTP, siendo los extractos con mayor contenido de polifenoles los que, en general, presentaron mayor AO expresada en equivalente de Trolox (CAET) y en inhibición del 50% de los radicales libres (IC_{50}), a través de los métodos ABTS y DPPH. Así, los extractos HE y HM tuvieron la mayor AO. Finalmente, los resultados obtenidos indican que *L. ameghinoi* tiene un valor potencial y real para ser utilizada en la extracción de polifenoles con actividad antioxidante. Por otro lado, este trabajo constituye el primer reporte de propagación sexual (a través de semillas) mediante técnicas de CTV y de bioprospección química para esta especie.

Palabras clave: biodiversidad, Patagonia, desinfección, germinación, polifenoles, actividad antioxidante.

Lista de abreviaturas y símbolos

- **%**: porcentaje
- **°C**: grados centígrados
- **μM**: micromolar
- **ABTS**: 2,2'-Azino-bis(3-
etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
- **AO**: actividad antioxidante
- **CAET**: Capacidad antioxidante
equivalente Trolox
- **CG**: capacidad germinativa
- **CTP**: contenido total de polifenoles
- **CTV**: cultivo de tejidos vegetales
- **D1**: tratamiento de desinfección uno
- **D2**: tratamiento de desinfección dos
- **D3**: tratamiento de desinfección tres
- **DPPH**: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
- **EG**: energía germinativa
- **eq.**: equivalente
- **g**: gramo
- **GAE**: ácido gálico
- **GDA**: germinación diaria acumulada
- **HA**: extracto acuoso de hojas
- **HE**: extracto etanólico de hojas
- **HM**: extracto metanólico de hojas
- **IC50**: capacidad para estabilizar el
50% de los radicales libres
- **IVE**: extracto etanólico de vitroplantas
- **IVG**: índice de velocidad germinativa
- **Km**: kilómetros
- **l**: litro
- **M1**: sitio de muestreo uno
- **M2**: sitio de muestreo dos
- **mg**: miligramo
- **ml**: mililitro
- **mm**: milímetros
- **msnm**: milímetros sobre el nivel del
mar
- **mM**: milimolar
- **MS**: metabolitos secundarios
- **NaClO**: hipoclorito de sodio
- **NDGA**: nordihidroguaiarético
- **PS**: peso seco
- **SD**: desvío estándar
- **spp**: especie (plural)
- **TA**: extracto acuoso de tallos
- **TE**: extracto etanólico de tallos
- **TM**: extracto metanólico de tallos
- **TMG**: tiempo medio de germinación
- **v/v**: volumen/volumen
- **RL**: radicales libres

Introducción

Durante varios años se han producido cambios globales asociados con el uso inapropiado del suelo que provocaron un conjunto de problemas ambientales y la irreversible pérdida de la biodiversidad. Ésta brinda un conjunto de bienes y servicios que incluye un sinnúmero de materias primas de las cuales depende el bienestar de las personas y que pueden tener múltiples aplicaciones para la industria. A pesar de ello, la degradación de los ecosistemas y de la biodiversidad continúa produciéndose a un ritmo alarmante como consecuencia del rápido crecimiento demográfico y la constante demanda de alimentos, combustible, madera y otros bienes naturales (Assessment, 2005). Como el resto de las regiones áridas y semiáridas del mundo, los ecosistemas desérticos de Argentina son susceptibles a la degradación. Actualmente, alrededor del 84% de la superficie patagónica ha sido afectada por la desertificación, lo cual trae aparejado otro tipo de impactos regionales, como la disminución progresiva de la biodiversidad y de la productividad biológica del ecosistema, la erosión del suelo y la modificación de la estructura de la vegetación (Del Valle *et al.*, 1998).

A pesar de su vulnerabilidad, en estos ecosistemas, donde las condiciones ambientales son hostiles y la disponibilidad de los recursos es baja, las plantas generan diversas estrategias adaptativas entre las que se encuentra la síntesis de metabolitos secundarios (MS). Éstos poseen un gran potencial para los distintos sectores industriales, debido a sus beneficios sobre la salud humana (Bourgaud *et al.*, 2001). De esta manera, la pérdida de biodiversidad incluye, además, la desaparición de un conjunto de insumos de origen natural, muchos de los cuales permanecen aún desconocidos, como es el caso de los MS. De este modo, la biodiversidad patagónica constituye un recurso importante para la supervivencia de los pobladores locales quienes, en su mayoría, utilizan las plantas nativas a pesar de que muchas de ellas aún no hayan sido químicamente caracterizadas. Un ejemplo de ello lo constituyen las jarillas (*Larrea* spp), especies muy valoradas por los pueblos originarios y cuyos usos han sido transmitidos a través del saber popular (Tousarkissian, 1980; Patagonia extraandina, 2002; Alarcón *et al.*, 2004).

En este contexto, el riesgo de pérdida de especies patagónicas constituye una importante motivación para generar investigaciones científicas que profundicen el conocimiento, tanto en términos de la composición química, como de las actividades biológicas que presentan y sus estrategias de propagación (Barboza *et al.*, 2009). Las Larreas argentinas cuentan con numerosos antecedentes de uso tradicional, algunos de los cuales han sido motivo de investigación. Así, en la bibliografía se encuentran diferentes trabajos de la composición química en diferentes especies de jarillas. Sin embargo, *Larrea ameghinoi* Speg., conocida como “jarilla rastrera”, es una de las especies menos conocidas y estudiadas respecto a otras del mismo género. De esta manera, *L. ameghinoi*, constituye una fuente promisoría de compuestos bioactivos con potenciales beneficios para la salud humana, como es el caso de los compuestos fenólicos. No obstante, no es posible concebir ningún aprovechamiento de la biodiversidad si éste no se hace de manera sustentable desde el punto de vista ambiental, económico y social (Quezada *et al.*, 2005). Para ello, resulta indispensable complementar las técnicas de bioprospección, que permitan caracterizar químicamente la especie, con estudios de domesticación y cultivo, lo cual involucra el conocimiento sobre sus sistemas de propagación (Dalzotto, 2019). El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una técnica aplicada para la propagación masiva de plantas y el establecimiento de metodologías de conservación. Además, esta biotécnica puede ser utilizada para la producción controlada y eficiente de MS y su posible inducción a través de elicitores. De esta manera, el CTV permite generar una producción de MS constante durante todo el año y con ciclos de crecimiento menores que los impuestos por la naturaleza (Arias Zabala *et al.*, 2009; Barbulova *et al.*, 2014; Ramírez-Estrada *et al.*, 2016; Halder *et al.*, 2019). Así, el CTV posibilita tanto la producción de metabolitos *in vitro*, como la propagación y conservación *ex situ*, aspectos que adquieren mayor relevancia tratándose de una especie endémica de un área de diversificación de especies vegetales, como son los ambientes de la meseta patagónica.

Objetivo General

- Integrar metodologías de cultivo de tejidos *in vitro* y de bioprospección química de *Larrea ameghinoi* como estrategia para su domesticación, valoración y uso sustentable.

Objetivos específicos

- Establecer un protocolo de desinfección de las semillas de *L. ameghinoi* que permita su introducción al CTV.
- Obtener y cuantificar compuestos fenólicos a partir de diferentes extractos de plantas *in natura* y de vitroplantas de “jarilla rastrera”.
- Determinar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos obtenidos.

Hipótesis

- La bioprospección química de *L. ameghinoi* permite obtener compuestos bioactivos con propiedades biológicas de interés para la industria.
- El abordaje integral del CTV y la bioprospección hacen importantes contribuciones al conocimiento de *L. ameghinoi* para su conservación y uso sustentable.

1. Marco Teórico

En general, la Patagonia presenta un clima frío y seco, cuyas precipitaciones estacionales se concentran durante el invierno y causan un marcado déficit hídrico durante el verano (<300 mm en ~ 80 % de la región). La mayor parte de la superficie patagónica (87%) es considerada como tierras secas (33% áridas, 51% semiáridas y 3% secas subhúmedas). Sumado a esto, las bajas precipitaciones estivales y los persistentes e intensos vientos del oeste ubican a la región dentro del 5% de las tierras más ventosas del mundo (Enriquez *et al.*, 2021). Estas condiciones, junto a los efectos del cambio climático global, agravan la degradación ambiental y comprometen la sostenibilidad de las comunidades rurales, que dependen de ello para su supervivencia.

Dentro de la región patagónica se destacan los ambientes de meseta, cuyas condiciones ambientales condicionan la flora y fauna del lugar y favorecen procesos de diversificación, encontrándose allí especies de distribución restringida e incluso, especies endémicas (López *et al.*, 2021).

Frente a condiciones climáticas adversas como las de la región patagónica, la supervivencia de las plantas depende, en gran medida, de su capacidad de hacer frente a esas limitaciones a través de un conjunto de adaptaciones entre las que se encuentra la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios (Bourgaud *et al.*, 2001; Akula y Ravishankar, 2011; Haminiuk *et al.*, 2012; Tohidi *et al.*, 2017). La diversidad de MS produce perfiles metabólicos diferentes entre especies, miembros de una población e incluso, entre los diferentes órganos de una planta, como parte de su estrategia de adaptación. A su vez, los MS se caracterizan por tener una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, un determinado metabolito se encuentra con frecuencia en una sola especie vegetal o en un grupo de especies taxonómicamente relacionadas (Taiz y Zeiger, 2006; Pérez Urria y Ávalos García, 2011). Los polifenoles o compuestos fenólicos son un diverso grupo de MS que comprende desde moléculas sencillas, como los ácidos fenólicos, hasta polímeros complejos, como los taninos y la lignina. Sus características fisicoquímicas de los polifenoles les permiten participar en distintas reacciones celulares de óxido-reducción y les proporciona la capacidad de actuar como agentes antioxidantes. En este sentido, es sabido que una dieta rica en polifenoles posee efectos benéficos para la salud dada su acción vasodilatadora, antitrombótica, antiinflamatoria, antiapoptótica, cardioprotectora antilipémica, antiteratogénica y antioxidante (Quiñones *et al.*, 2012). Por ello, son utilizados como fármacos, pesticidas, colorantes, saborizantes y aromatizantes (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007). De esta manera, las plantas constituyen una fuente única de compuestos con importantes actividades biológicas de interés alimenticio, cosmético y medicinal (Bourgaud *et al.*, 2001; Yeshi *et al.*, 2022), que pueden ser identificados mediante la bioprospección¹. Ésta permite investigar los recursos florísticos de una región

¹ Búsqueda sistemática, clasificación e investigación de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas, microorganismos y otros productos de valor económico actual o potencial.

para determinar sus potencialidades como fuente de biocompuestos. Una de las estrategias para iniciar la búsqueda de MS, es explorar aquellos grupos taxonómicos que han sido reconocidos por la presencia de los mismos (criterio taxonómico), como es el caso de las jarillas (*Larrea* spp). En este sentido, la etnobotánica ha permitido conocer el potencial medicinal de este género desde hace siglos y, en la actualidad, muchos estudios de investigación pretenden identificar los compuestos responsables de esas propiedades (Carabajal *et al.*, 2020).

Las jarillas patagónicas (*Larrea divaricata*, *L. cuneifolia*, *L. nitida* y *L. ameghinoi*), además de su importancia cultural y simbólica, han sido muy valoradas por los pueblos originarios y sus usos se han transmitido a través del saber popular (Tousarkissian, 1980; Patagonia extraandina, 2002; Alarcón *et al.*, 2004, Ferreyra, 2021). En este sentido, *L. divaricata*, *L. cuneifolia* y *L. nitida* han sido objeto de estudios fitoquímicos en diversas oportunidades. Éstos, junto a los conocimientos de las comunidades rurales, han permitido establecer numerosos usos y aplicaciones de estas especies. Entre ellos, se mencionan diversas preparaciones, como el “té de Jarilla” o los vapores del mismo a partir de la infusión de sus hojas, destacados para el tratamiento de trastornos estomacales, bronquitis y otros problemas respiratorios (Bongiovanni *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2020).

Una de las especies del género más exploradas en materia de bioprospección es *L. divaricata*. En ésta, se ha reportado principalmente la presencia de compuestos fenólicos, como el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), aceites esenciales (limoneno, canfeno, borneol y alcanfor) y numerosos flavonoides, como O-glucósidos de quercetina, miricetina y un C-glucósido de apigenina (Davicino *et al.*, 2011). El NDGA es uno de los compuestos más buscados en esta especie, dado que puede actuar como un eliminador de radicales libres generados durante los procesos inflamatorios (Palacio *et al.*, 2011; Palacio *et al.*, 2012). Recientemente, en Argentina, esta especie adquirió mayor atención debido a un producto comercial elaborado a base de extractos foliares, para ser utilizado en la alopecia no cicatricial (Alonso y Anesini, 2017). Por otra parte, se ha establecido el potencial de *L. divaricata* y *L. cuneifolia* como suplemento dietético y conservante de alimentos debido al contenido de compuestos fenólicos y a sus actividades biológicas

nutricionales (Estomba *et al.*, 2010; Davicino *et al.*, 2011; Lorenzo *et al.*, 2020). Además, diversos autores han investigado el potencial antioxidante de numerosos extractos de hojas de *L. divaricata*, *L. cuneifolia*, *L. nitida* y *L. tridentata* (Ortega *et al.*, 2017; Carbajal *et al.*, 2017; Lorenzo *et al.*, 2020; Gómez *et al.*, 2021; Aliaga Huashuayo, 2021). Así, la presencia de una amplia diversidad de MS, principalmente de naturaleza fenólica, y su actividad antioxidante han sido informados en *Larrea* spp (Tablas 1 y 2 del Anexo) pero, hasta el presente, estas investigaciones no han incluido a *L. ameghinoi*.

Es preciso señalar que otorgar valor utilitario a una especie endémica, como es el caso de la “jarilla rastrera”, podría comprometer su disponibilidad futura, si se produce una presión antrópica continua sobre las poblaciones naturales. De esta manera, para garantizar un aprovechamiento sustentable, es indispensable complementar las técnicas de bioprospección con estudios de multiplicación y conservación *ex situ*. En este sentido, el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* constituye una herramienta poderosa para hacer frente a estos desafíos, no sólo porque representa una estrategia de propagación masiva y conservación de las especies, sino también como parte de una alternativa para la producción de MS bajo condiciones controladas. Cabe destacar que la aplicación de estas biotécnicas depende fundamentalmente de la posibilidad de introducir una especie a las condiciones propias del CTV. Para ello, en primer lugar, se debe seleccionar y acondicionar el material vegetal apropiado, que generalmente consta de estructuras juveniles cuando se trata de especies leñosas, como *L. ameghinoi*. Luego, cuando el cultivo se inicia a partir de semillas, es necesario contar con un método adecuado de germinación que garantice la disponibilidad de órganos juveniles a partir de las vitroplantas generadas. Una vez lograda la introducción efectiva del material vegetal, las alternativas de aplicación del CTV son diversas. Por ejemplo, las células vegetales *in vitro* pueden producir diferentes tipos de respuestas fisiológicas y morfológicas a factores bióticos o abióticos, conocidos como "elicitores". La elicitación es un proceso de inducción o aumento de la síntesis de metabolitos secundarios para asegurar su supervivencia, persistencia y competitividad (Namdeo, 2007). Si bien esta técnica es ampliamente difundida, en algunos casos

la producción requiere del cultivo de órganos diferenciados como brotes y raíces, que pueden establecerse en condiciones estériles, tanto para la multiplicación como para la extracción de metabolitos (Palacio *et al.*, 2012). En este sentido, la producción de MS *in vitro* procedentes de material vegetal ha sido ampliamente demostrada (Karuppusamy, 2009; Palacio *et al.*, 2011; Palacio *et al.*, 2012). De esta manera, el cultivo de CTV del género *Larrea* ya ha sido abordado por diferentes autores para la producción de polifenoles con actividad antioxidante, como el NDGA en *L. divaricata* (Palacio *et al.*, 2008, Estomba *et al.*, 2010, Palacio *et al.*, 2011, Palacio *et al.*, 2012).

Dada la relevancia del género, en los últimos años el interés por la aplicación del CTV para la obtención de MS en *L. divaricata* ha cobrado mayor interés, sin embargo, aún no se han realizado estudios de estas características sobre *Larrea ameghinoi* Speg. En este contexto, la integración del cultivo de tejidos vegetales (CTV) y la bioprospección química, aplicadas a especies nativas, representa una alternativa viable para incrementar el conocimiento y generar valor agregado sobre la biodiversidad regional, mientras se promueve su conservación y uso sustentable.

1.1 Descripción de la especie

El género *Larrea* (*Zygophyllaceae*), está representado por diferentes especies de arbustos desérticos distribuidos a lo largo del Continente Americano, entre las que se encuentra *L. ameghinoi*. En Argentina se encuentran cuatro especies de *Larrea* características de la provincia biogeográfica del Monte, todas crecen en el sector austral de esta formación (Hunziker, 2005; Zuloaga *et al.*, 2008) y, en algunos lugares pueden formar híbridos fértiles (Hunziker, 2005). La “jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.) es una especie endémica de la Patagonia Argentina, que habita los suelos pesados y anegadizos de la Provincia Biogeográfica Patagónica (Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz), entre los 200 y 800 msnm. Esta especie es una planta leñosa, ramosa, postrada, que crece como si estuviera adherida al suelo en toda su extensión. Mide hasta 10 centímetros de altura y sus ramas son torcidas. Posee hojas subsésiles, estipuladas y divididas en 2 o 3 pares de lóbulos (folíolos soldados) (Figura 1). Al igual que las otras jarillas, es una planta resinosa. Sus flores, las cuales surgen entre los meses de octubre y diciembre,

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

contienen 5 pétalos amarillos de 8 a 11 mm de diámetro, libres unguiculados y se presentan en forma solitaria. El fruto es seco y veloso, de tipo esquizocárpico que mide aproximadamente 7-8 mm de diámetro y es fácilmente separable en cinco partes (mericarpas) cada una de las cuales contiene una semilla de entre 1,9 y 3,1 mm.

Como la mayoría de los arbustos patagónicos, las jarillas producen semillas latentes, capaces de inhibir temporalmente la germinación (Palacio *et al.*, 2008, Fernández *et al.*, 2019). Por ello, es necesario realizar tratamientos pre-germinativos de escarificación para interrumpir dicha dormancia y permitir la emergencia del embrión (Palacio *et al.*, 2008, López Dumrauf *et al.*, 2018; Fernández *et al.*, 2019).

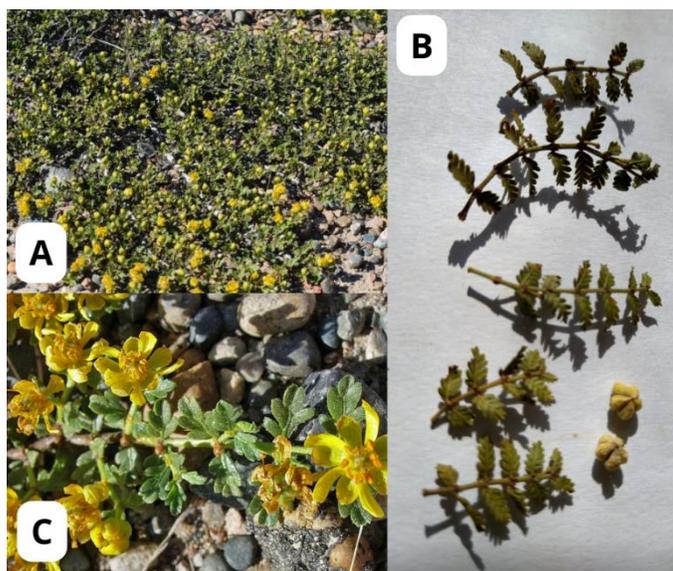


Figura 1: A) Planta en hábitat natural de Meseta. Imagen obtenida de Instituto Darwinion B) Hojas y semillas. Elaboración propia C) Flores. Fuente: Flora argentina - Instituto de Botánica Darwinion (www.darwin.edu.ar).

2. Materiales y métodos

2.1 Colecta de material vegetal y sitio de muestreo.

La colecta del material vegetal (hojas, tallos jóvenes y semillas) se realizó en sitios públicos de la Provincia de Río Negro, sobre las rutas provinciales N°61 y N°5, próximas al Área Natural Protegida “Meseta de Somuncura” (Plan de manejo ANP, 2007). Ésta fue llevada a cabo de manera manual, en un mínimo de 10 y un máximo

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

de 20 individuos para cada sitio de muestreo. Las semillas se colectaron de acuerdo a las normas establecidas por la Guía para Manipulación de Semillas Forestales de FAO (Willian, 1991) en dos sitios de muestreo. El primero (M1) ubicado al Noroeste de la localidad de Sierra Grande (41°13'55"S 65°29'30"O) y el segundo (M2) ubicado al suroeste de la misma localidad (41°39'23"S 65°37'43"O) (Figura 2). Se seleccionaron plantas maduras, de buen porte, aspecto vigoroso y óptimo estado sanitario. Los frutos y semillas fueron debidamente rotulados y almacenados en sobres de papel madera hasta su procesamiento en el laboratorio. Por otra parte, las hojas y tallos jóvenes fueron procesados en el laboratorio a fin de eliminar impurezas y luego, los dos tipos de muestras fueron separadas y secadas a 30°C, en estufa, hasta su posterior utilización.

Cabe destacar que este trabajo fue colectado y bioprospectado con el permiso provincial para el acceso y uso de la flora nativa, según lo estipula el Convenio de Diversidad Biológica y el Protocolo de Nagoya (Res 2022-781-E-GDERNE-SAYCC#SGG, 2/06/2022).



Figura 2: Sitios de colecta del material vegetal. Elaboración propia a través de Google Earth.

2.2 Acondicionamiento, desinfección de las semillas y evaluación de la germinación para su introducción al CTV.

Dado que se utilizaron semillas para la obtención de las vitroplantas, fue necesario realizar un proceso de escarificación mecánica de manera manual, a fin de romper la dormancia y aumentar la germinación. El ajuste del proceso de desinfección se

realizó en forma simultánea con el de la germinación y, para ello, se evaluaron tres tratamientos con diferentes inmersiones en etanol e hipoclorito de sodio (NaClO), como se especifica en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos de desinfección propuestos para las semillas de *L. ameghinoi*.

Tratamiento	Etanol 70% (v/v) (minutos)	NaClO 30% (v/v) (minutos)
D1	5	20
D2	15	20
D3	10	30

Las semillas previamente desinfectadas se enjuagaron en forma reiterada con agua destilada estéril y se incubaron, para su germinación, en un medio nutritivo basal de Murashige y Skoog (1962) estéril, diluido a la mitad de su concentración y adicionado con sacarosa (3%) y agar (7%) como agente gelificante. El experimento se llevó a cabo a través de un diseño aleatorizado con 3 repeticiones de 25 semillas. Los controles se realizaron diariamente, durante 7 días, período a partir del cual no se observaron nuevos eventos germinativos. Para este trabajo, se consideró como semilla germinada a aquella que presentó una radícula de al menos 0,5 mm de longitud (Bewley, 1997). Posteriormente, se evaluó la presencia de contaminación y los siguientes parámetros germinativos relacionados con el vigor de las semillas:

- **Capacidad Germinativa (CG):** porcentaje de germinación total al finalizar el ensayo (Pece, 2010).
- **Índice de Velocidad de Germinación (IVG) o Índice de Maguire's:** este índice propuesto por Maguire (1962) es uno de los más utilizados, se expresa como número de semillas germinadas por día y se obtiene a través de la fórmula:

$$IVG = G_1 + G_2 + \dots + G_n = \sum_{i=1}^n \frac{G_i}{N_i}$$

Dónde: G1, G2, G3,... Gn = número de plántulas normales, germinadas y completas en el primer, segundo, tercer y último conteo de la evaluación, y T1, T2, T3,..., TN es el tiempo en días para cada germinación.

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

- **Germinación diaria acumulada (GDA):** a través de este parámetro se expresa el porcentaje de germinaciones acumulado a lo largo de los días del ensayo y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$GDA = \frac{(n \times 100)}{Nf}$$

Dónde, “n” es el número de semillas germinado por día y “Nf” es el número total de semillas (Trujillo, 1996).

- **Energía Germinativa (EG):** porcentaje de germinación acumulada diaria cuando la tasa de germinación fue la más alta (González *et al.*, 2009). La EG se asocia con una medida del vigor de la semilla y de la plántula que produce.
- **Tiempo Medio de Germinación (TMG):** representado por el número promedio de días utilizados en la germinación. Mide la velocidad y la dispersión del proceso (Ranal y García, 2006).

$$TMG = \frac{((X_1 \cdot d_1) + (X_2 \cdot d_2) + \dots + (X_{12} \cdot d_{12}))}{X_{12}}$$

Dónde X1, X2, X12 son semillas en el día d1, d2, d12, y d1, d2, d12 son los días de incubación.

3. Bioprospección

3.1 Obtención y cuantificación de los compuestos fenólicos.

3.1.1 Extracción de compuestos fenólicos.

Plántulas completas de entre 3 y 4 meses de crecimiento, obtenidas de la germinación *in vitro*, fueron secadas en estufa a 30°C. Luego, estas muestras y las provenientes de hojas y tallos jóvenes de plantas adultas colectadas a campo (*in natura*), fueron molidas individualmente con un mortero y un molinillo de laboratorio, hasta obtener un polvo homogéneo. Los compuestos fenólicos fueron extraídos según Aliaga Huashuayo (2021), con algunas modificaciones. Como se indica en la Tabla 2, para las extracciones se utilizaron diferentes solventes diluidos al 70% (v/v) y agua destilada para los extractos acuosos, en una relación muestra:solvente de 1:10. Las mismas se realizaron en agitación, a temperatura ambiente y en

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

condiciones de oscuridad, durante 24 hs. Luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se reservó la fracción soluble para las determinaciones posteriores.

Tabla 2. Tipos de extracción de metabolitos secundarios para cada tipo de muestra.

Procedencia	Material vegetal	Extracción
Planta <i>in natura</i>	Hoja	Acuosa (HA)
		Metanólica (HM)
		Etanólica (HE)
	Tallo	Acuosa (TA)
		Metanólica (TM)
		Etanólica (TE)
Vitroplanta	Plántula completa	Etanólica (IVE)

3.1.2 Cuantificación de polifenoles totales.

El contenido total de polifenoles (CTP) de los extractos obtenidos se determinó mediante espectrofotometría a través del método colorimétrico de Folin-Ciocalteu y la cuantificación se realizó a partir de una curva de calibración con una solución estándar de ácido gálico (GAE) 1 mg/ml (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Tanto las curvas de referencia como las muestras se realizaron por triplicado y los resultados de CTP se expresaron en mg equivalentes (GAE)/100 g de peso seco (PS).

3.2 Determinación de actividad antioxidante *in vitro*.

La actividad antioxidante (AO) de los extractos fenólicos obtenidos se determinó a partir de su capacidad de estabilizar radicales libres a través de los métodos colorimétricos DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995) y ABTS (Re *et al.*, 1999; Kuskosky *et al.*, 2005). En ambos casos, el antioxidante de referencia utilizado fue Trolox (1 mM) y los resultados se expresaron en capacidad antioxidante equivalente Trolox (CAET) medida en μ moles equivalentes de Trolox/g de muestra en PS. Por otro lado, se determinó la concentración en la que los extractos inhibieron el 50% de los radicales libres DPPH y ABTS a través de una curva dosis/respuesta (IC_{50}). Tanto las curvas de referencia como las muestras se realizaron por triplicado y los porcentajes de inhibición se calcularon mediante los valores de las absorbancias obtenidas a través de la siguiente fórmula:

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

$$\% \text{ inhibición} = ((Abs_0 - Abs_m) \div Abs_0) \times 100\%$$

Dónde: Abs₀= absorbancia del reactivo, Abs_m: absorbancia de la muestra. La concentración en mg/ml en la que los extractos inhibieron el 50% de los radicales libres se determinó mediante el método estadístico de Probit.

3.3 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) mediante el test de Tukey para determinar las diferencias estadísticas entre los resultados obtenidos de los ensayos de desinfección, germinación y bioprospección de *L. ameghinoi*. Las diferencias con *p*-valor <0,05 se consideraron estadísticamente significativas. En los casos que cumplieron con los supuestos estadísticos para el análisis de ANOVA, se procedió a realizar el test no paramétrico de Kruskal-Wallis (1952). Los resultados se expresaron como la media ± desvío estándar (SD) de tres mediciones. Se utilizó el Coeficiente de Correlación de Pearson para evaluar el comportamiento entre el CTP y la AO obtenidos de los extractos y entre los métodos ABTS y DPPH (CAET e IC₅₀, individualmente). Para el análisis de correlación, se utilizó como referencia los rangos establecidos por Schober *et al.* (2018):

- menor–0,00: Correlación muy baja
- 0,10–0,39: Correlación baja
- 0,40–0,69: Correlación moderada
- 0,70–0,89: Correlación fuerte
- 0,90–1: Correlación muy fuerte.

Las actividades metodológicas fueron expresadas en un esquema en la sección de Anexos (Figura 1 y 2).

4. Resultados y Discusión

4.1 Acondicionamiento y desinfección de las semillas para el cultivo de tejidos vegetales.

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos de los protocolos de desinfección aplicados. De la misma se desprende que, independientemente de la concentración del hipoclorito de sodio (NaClO), una inmersión por 20 minutos (D1 y D2) no fue suficiente para lograr la desinfección total de las semillas, debido a que se observó la presencia de microorganismos. En estos casos, la contaminación fue observada en vitroplantas de *L. ameghinoi* de 2 o 3 días post germinación. Por otro lado, el aumento en el tiempo del agente desinfectante al 30% (D3) resultó eficiente dado que, en este tratamiento, se obtuvieron plántulas completas, libres de contaminación microbiana (Figura 3).

Tabla 3. Resultados de los parámetros de germinación evaluados para *L. ameghinoi*: Capacidad Germinativa (CG); Tiempo medio de germinación (TMG); Índice de Velocidad Germinativa (IVG); Energía Germinativa (EG), Contaminación (Cont.). Los valores representan un promedio de tres repeticiones con su Desvío Estándar.

Tratamiento	CG (%)	TMG (días)	IVG (nº de semillas/días)	EG (%)	Cont. (%)
D1	66,66±15,14	0,88±0,41	14±1,32	52,00±8,00	12,38±11,93
D2	76,00±17,43	0,97±0,20	16,33±4,04	54,66±15,4	12,13±5,70
D3	80,00±12,00	0,86±0,08	19,16±3,51	73,33±16,16	0,00±0,00
p valor	0,25	0,87	0,15	0,19	0,16

*p valor >0,05 (Sin diferencias significativas).

El NaClO es una solución ampliamente utilizada para la introducción de diversos materiales vegetales en el cultivo *in vitro*, dado a que posee acción germicida de alta eficacia, por sus efectos de cloración (Castro, 1992) y la inactivación de microorganismos producto de la oxidación celular (EPA, 1999). Además, es un agente químico seguro, económico y de fácil eliminación (Beena *et al.*, 2003; Pedroza-Manrique y Bejarano-Tibocha, 2008). Por otro lado, el etanol desestabiliza las membranas lipídicas al desnaturalizar las proteínas y es un agente deshidratante, lo hace muy efectivo como bactericida, sin embargo, no actúa

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

eficientemente sobre las esporas fúngicas. Así, su combinación con otras soluciones antisépticas, como el NaClO, permite ampliar la acción germicida deseada (Universidad de Chile, 2004).

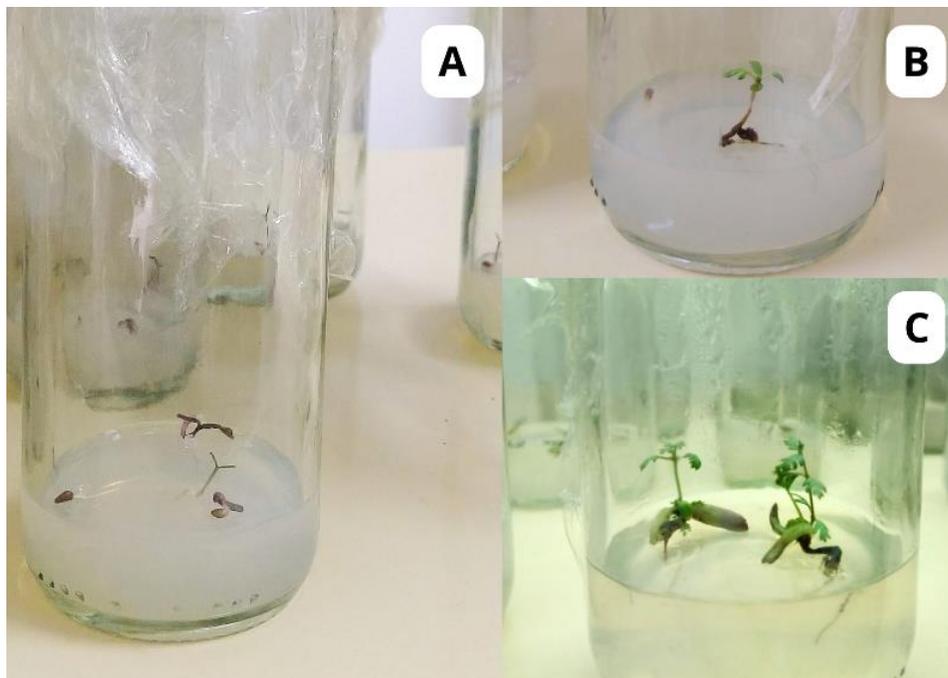


Figura 3: Proceso de germinación *in vitro* de *Larrea ameghinoi*. A) Emergencia de radículas y cotiledones. B) Plántula con primeras hojas. C) Vitroplanta establecida. Elaboración propia.

Los agentes desinfectantes empleados para la esterilización de las semillas en este trabajo, han sido utilizados exitosamente para el cultivo de tejidos *in vitro* de *Larrea divaricata* por Palacio *et al.* (2012) y Huenelaf *et al.* (2019). Sin embargo, estos autores aplicaron concentraciones inferiores a los de este estudio para lograr la asepsia de las semillas. Posiblemente estas discrepancias se deban a las características morfológicas y anatómicas propias de las semillas de las diferentes especies del género. No obstante, un aumento del tiempo de exposición y de la concentración de NaClO, puede comprometer la viabilidad y supervivencia del material vegetal, debido a que altera las condiciones fisiológicas de las semillas (Flores-Escobar *et al.*, 2008). Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 3, el incremento del tiempo de exposición o de la concentración de los agentes desinfectantes (D3), no afectaron negativamente la germinación (CG) dado que no se hallaron diferencias significativas entre tratamientos. Resultados similares se

obtuvieron a partir del análisis de la GDA, como se demuestra en la curva de la Figura 4. En este sentido, Inostrosa (2023) informó un comportamiento similar para semillas escarificadas de *L. divaricata*, con valores de GDA significativamente inferiores en la primera semana de ensayo. Además, las germinaciones de *L. ameghinoi* se produjeron de modo más uniforme y dentro de los primeros dos días, a diferencia de lo observado por Inostrosa (2023).

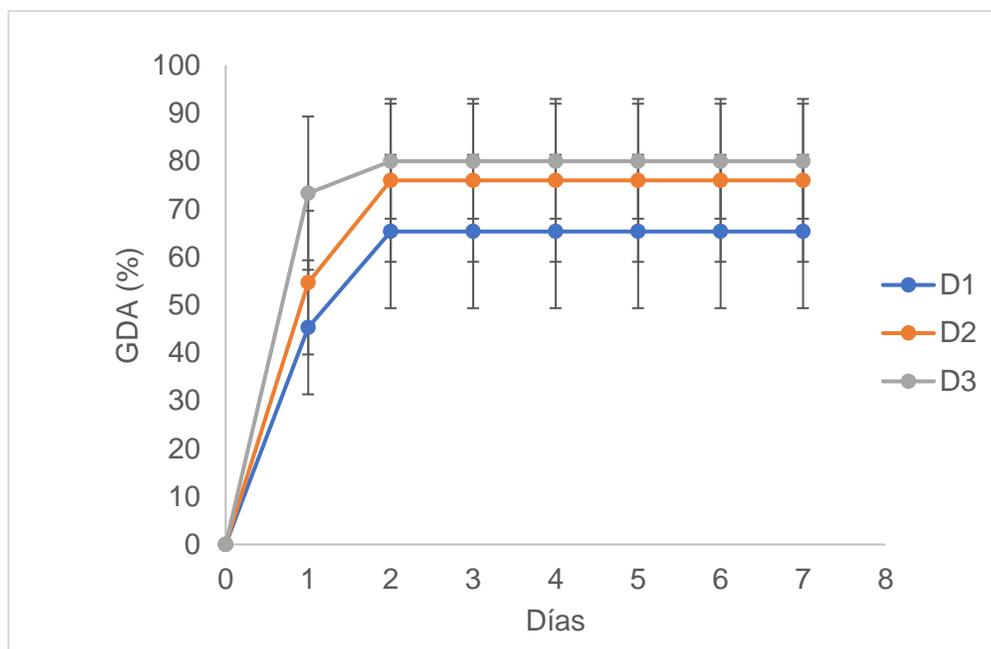


Figura 4. Porcentaje de Germinación Diaria Acumulada (GDA) para los tratamientos D1, D2 y D3, durante la primera semana de ensayo y sus respectivos valores de Desvío Estándar.

Cabe destacar que ante la falta de referencias bibliográficas de la especie que permitan discutir los resultados obtenidos, las comparaciones fueron realizadas con otros representantes del género. En este sentido, Huenelaf *et al.* (2021) informaron un 63,3% de germinaciones bajo condiciones *in vitro* de *L. divaricata*, mientras que Hernández *et al.* (2020), obtuvieron un valor similar (60,67%) luego de escarificar las semillas mecánicamente e incubarlas en placas de petri, bajo técnicas convencionales. Así, las discrepancias observadas entre estos autores y nuestros resultados podrían deberse a que se trata de especies diferentes y a que el cultivo *in vitro* ofrece condiciones óptimas de crecimiento que pueden favorecer los procesos germinativos.

Respecto a los parámetros evaluados, tanto el TMG como el IVG adquieren importancia debido a que han sido relacionados con el vigor de las semillas. Al respecto, se obtuvo un TMG significativamente superior al informado para *L. divaricata* y *L. tridentata* que varió de 6 a 10 días (Williams *et al.*, 1974; Hernández *et al.*, 2020). Estos resultados son relevantes dado que la velocidad de germinación permite conocer la distribución de la misma en el tiempo y está relacionada con otros parámetros, como el IVG. Este índice relaciona la CG con el tiempo de germinación y ello explica, en parte, que los valores de IVG obtenidos en este estudio mejoren respecto a los reportados para las semillas de *L. divaricata* en condiciones convencionales de cultivo. En este sentido, Inostrosa (2023) indicó un IVG inferior al observado para *L. ameghinoi* (7,05) (Tabla 3), lo cual ha sido relacionado con una mayor energía para que las semillas germinen. De esta manera, los bajos valores de TMG obtenidos en condiciones óptimas de germinación, así como los altos porcentajes de semillas germinadas y de IVG sugieren que *L. ameghinoi* presenta semillas vigorosas y de buena calidad fisiológica (Nassif y Perez, 2000).

Otro parámetro de interés es la energía germinativa (EG) dado que ésta se basa en la teoría de que sólo las semillas que germinan rápida y vigorosamente en condiciones de laboratorio son capaces de producir plántulas vigorosas en condiciones de campo, mientras que una germinación débil y tardía es limitante (Aldhous, 1972). Si bien, los resultados no presentaron diferencias estadísticamente significativas, la EG de las semillas cultivadas *in vitro* de *L. ameghinoi* duplicó los valores obtenidos para este parámetro por Inostrosa ($24,3 \pm 6,41\%$) en semillas escarificadas de *L. divaricata* incubadas en condiciones de laboratorio (Datos no publicados). En conjunto, los resultados observados a partir de los parámetros germinativos, representan una ventaja para estas semillas debido a que éstas son capaces de dar origen a un mayor número de plántulas, más vigorosas y en menor tiempo, por su mayor energía y vigor germinativo. Estos aspectos podrían incrementar las posibilidades de una mayor supervivencia de *L. ameghinoi in natura* (Espitia *et al.*, 2016).

Cabe destacar que, a pesar de que los tratamientos fueron estadísticamente similares en relación a los parámetros germinativos, las pequeñas diferencias obtenidas en D3 representan una ventaja en términos prácticos del cultivo *in vitro* dado que incrementa la cantidad de material vegetal introducido bajo estas condiciones. Por otra parte, los parámetros germinativos demuestran que los tratamientos de desinfección evaluados no perjudicaron las semillas de *L. ameghinoi*, aspecto que resulta fundamental para su introducción al CTV. Esto, sumado al conocimiento sobre las metodologías para interrumpir la dormancia y el vigor de las semillas, es determinante para el uso de esta especie en prácticas de restauración ecológica y en programas de multiplicación masiva y conservación *ex situ*. Además, permite ampliar las posibilidades de bioprospección de la “jarilla rastrera”, bajo condiciones controladas para obtener células, tejidos y órganos capaces de acumular compuestos valiosos como es el caso de los polifenoles (Palacio *et al.*, 2012).

4.2 Bioprospección

4.2.1 Cuantificación de polifenoles totales

La concentración de compuestos totales de polifenoles (CTP) obtenida de las diferentes metodologías de extracción realizadas (Tabla 2), se presentan en la Figura 5. En general, se puede observar que, en los extractos provenientes de plantas de campo, las extracciones con solventes (etanol y metanol) fueron más eficientes que las acuosas, coincidentemente con lo informado por Martins *et al.* (2012) y Boiteux *et al.* (2019), en *L. tridentata* y *L. cuneifolia*, respectivamente. El bajo contenido de CTP de los extractos acuosos podría deberse a la naturaleza apolar de las paredes celulares vegetales. Así, disolventes de menor polaridad que el agua, como es el caso del metanol y el etanol, extraen con mayor facilidad los compuestos fenólicos de las células (Dorta *et al.*, 2011). Por otro lado, en los extractos acuosos, los polifenoles pueden ser degradados por la acción de la enzima polifenol oxidasa, otorgando una coloración amarronada a los extractos, tal como fue observado en este trabajo, mientras que la misma se inactiva en presencia de solventes (Figura 6) (González-Montelongo *et al.*, 2010; Dorta *et al.*, 2011).

Si bien no se detectaron diferencias significativas para ambos tipos de muestras entre solventes, el CTP obtenido en los extractos foliares fue de 2 a 3 veces superior al de los de tallo (Figura 6) (HE: $83 \pm 12,6$ y HM: $78,4 \pm 1,3$ > TM: $59,1 \pm 1,15$ y TE: $48,3 \pm 4,25$ mg eq. GAE/g PS). Coincidentemente, Lorenzo *et al.* (2019) informaron, para *L. divaricata* y *L. cuneifolia*, un mayor contenido de polifenoles en extractos de hojas respecto a los de madera seca, sin especificar el tipo de muestra utilizado en este último caso. Por otro lado, Carbajal *et al.* (2017) utilizaron hojas de estas dos especies para extraer compuestos fenólicos mediante la infusión de las mismas e informaron un CTP de 1,042 y de 0,7 mg GAE/l, respectivamente, valores inferiores al obtenido en nuestro extracto, bajo condiciones similares (HA). Por otra parte, Boiteux *et al.* (2019) realizaron una extracción metanólica y acuosa de hojas de *L. cuneifolia* y obtuvieron un CTP entre 15 y 10 veces inferior a los del presente estudio. Sin embargo, Lorenzo *et al.* (2019; 2020) duplicaron nuestros resultados en extractos etanólicos de *L. cuneifolia* y *L. divaricata*. De manera similar, Martins *et al.* (2017) obtuvieron valores hasta 4 veces superiores en extractos acuosos, metanólico y etanólico, a partir de hojas de *L. tridentata*. Las discrepancias observadas entre los distintos autores, podrían deberse, por un lado, al hecho de que varió la especie bajo estudio y las procedencias de las mismas. Por otro lado, la cuantificación de polifenoles para *L. ameghinoi* se realizó sobre muestras obtenidas en ambientes más australes en relación a los reportes anteriormente citados.

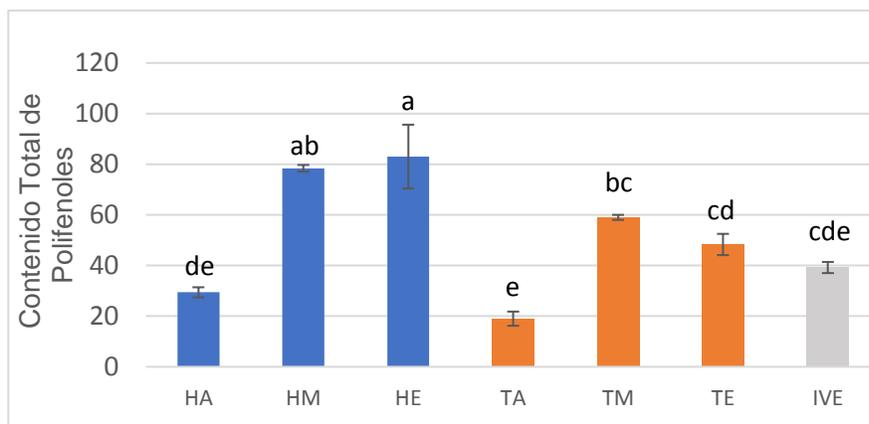


Figura 5: Valores de CTP expresados en mg eq. de GAE/g PS para los extractos de hoja acuoso (HA), metanólico (HM), etanólico (HE), de tallo acuoso (HA), metanólico (TM), etanólico (TE) y de vitroplantas (IVE). Letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias (p -valor < 0,05).

En este sentido, ha sido ampliamente comprobado que factores relacionados con los estímulos ambientales, tales como la luz, temperatura, disponibilidad de agua, altitud y salinidad, pueden afectar significativamente algunos procesos metabólicos asociados con la síntesis de compuestos bioactivos en plantas (Chaves y Escudero, 1999; Jones y Hartley, 1999; Yang *et al.*, 2018). Por otro lado, las metodologías de extracción aplicadas en cada caso también condicionan el CTP final. No obstante, es sabido que la capacidad de extracción depende del disolvente, el tipo de compuesto fenólico, el método de extracción empleado y la posible presencia de sustancias de interferencia (Bucić-Kojić *et al.*, 2011). Así, muchos de los autores citados asistieron sus extracciones con temperaturas altas, ultrasonidos, maceraciones o extracciones consecutivas para aumentar su rendimiento. Es preciso señalar que la obtención de compuestos fenólicos en *L. ameghinoi* se logró a partir de metodologías simples y replicables, lo cual aporta un gran potencial para complementarse con otras técnicas de extracción, de manera de aumentar la eficiencia de la misma.



Figura 6: extractos foliares metanólicos (HM), etanólicos (HE) y acuoso (HA), de izquierda a derecha, de *L. ameghinoi*. Elaboración propia.

Entre los resultados de CTP obtenidos para las plantas de campo se observó que los valores de los extractos metanólicos y etanólicos no presentaron diferencias significativas entre sí y fueron superiores a los acuosos. Por otro lado, actualmente hay una tendencia a reducir el uso de solventes orgánicos, regulados por la Ley

Nacional de Alcoholes 24.566, que limita el uso de metanol para aquellos productos que puedan ser manipulados por humanos. De esta manera, para la extracción de polifenoles a partir de las vitroplantas sólo se utilizó etanol como solvente y se obtuvo un CTP estadísticamente similar al de los extractos acuosos de tallo, e inferior a los de hoja *in natura* (Figura 3) (IVE: $39,2 \pm 2,2 > HA: 29,4 \pm 2 > TA: 19 \pm 2,8$ mg eq. GAE/ g planta PS). Como se mencionó anteriormente, estas diferencias en el contenido de polifenoles, pueden deberse a que la síntesis de MS se encuentra influenciada por estímulos ambientales, que no están presentes en el cultivo *in vitro*. En este sentido, algunos autores han indicado que la producción de los mismos en plantas *in vitro* varía en cantidad y composición de aquellas procedentes de campo, siendo usualmente menor en las primeras (Nikolova *et al.*, 2013, Barros *et al.*, 2012). Esto puede deberse a que las vitroplantas no elicidadas, las cuales generalmente derivan de material juvenil, crecen en condiciones ideales de luz, humedad, temperatura y nutrientes.

El cultivo *in vitro* del género ya ha sido utilizado para la obtención de metabolitos secundarios, particularmente el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) y sus derivados, compuestos reconocidos por su fuerte actividad antioxidante y antiinflamatoria (Palacio *et al.*, 2008, Palacio, 2011; Palacio *et al.*, 2012). De esta manera, nuestros resultados generan las bases necesarias para optimizar el protocolo de extracción de polifenoles y promover las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* que beneficien la producción de los mismos en *L. ameghinoi*.

4.2.2 Determinación de la actividad antioxidante *in vitro*

Como se desprende de la Tabla 4, a excepción de las extracciones acuosas de hoja (HA) y etanólicas de tallo (TE), cuyas actividades antioxidantes variaron según la metodología utilizada, el resto de los extractos presentaron una fuerte correlación entre los métodos DPPH y ABTS ($r=0,83$). Así, los extractos que exhibieron menor actividad, en ambos casos, fueron los acuosos de tallo (TA) y los de vitroplantas (IVE). Dicha respuesta podría deberse al menor contenido de polifenoles, tal como se detalló en el punto 4.2.1. Por otra parte, la actividad obtenida en todos los extractos por el método ABTS fue superior a las de DPPH. En este sentido, se ha observado que el DPPH presenta limitaciones asociadas a su mayor estabilidad (y,

por lo tanto, menor reactividad) y a su afinidad en medios orgánicos, por lo cual resulta más adecuado para caracterizar compuestos hidrofóbicos. En cambio, el radical ABTS tiene una reactividad más alta, es compatible con la mayoría de los antioxidantes debido a su solubilidad en medios acuosos y orgánicos, características que lo presentan como una herramienta útil para determinar la AO en compuestos lipofílicos e hidrofílicos en diversas matrices (Floegel *et al.*, 2011, Martysiak-Żurowska y Wenta, 2012; Mareček *et al.*, 2017).

Tabla 4. Valores medios y desvíos estándar de actividad antioxidante expresado en CAET (μ moles de Trolox/g muestra en peso seco) e IC₅₀ (mg/ml) de los extractos de vitroplantas y de campo de *L. ameghinoi* medidas por DPPH y ABTS.

Muestra	DPPH	ABTS	DPPH	ABTS
	CAET		IC ₅₀	
HA	174,3 ± 40 ^{abc}	106,8 ± 18,4 ^{abc}	0,3 ± 0,00 ^{bc}	0,11 ± 0,01 ^{abc}
HM	289, 4 ± 37,2 ^a	465,27 ± 74,71 ^a	0,15 ± 0,00 ^a	0,08 ± 0,00 ^a
HE	230,7 ± 15,6 ^{ab}	310,18 ± 14,46 ^{ab}	0,21 ± 0,00 ^{ab}	0,11 ± 0,00 ^{abc}
TA	88,84 ± 7,7 ^{bc}	88,9 ± 0,40 ^{bc}	0,2 ± 0,06 ^{ab}	0,13 ± 0,01 ^c
TM	193,7 ± 31,3 ^{ab}	256,21 ± 8 ^{abc}	0,21 ± 0,01 ^{ab}	0,09 ± 0,00 ^{ab}
TE	138,31 ± 30 ^{abc}	198,26 ± 12 ^{abc}	0,19 ± 0,01 ^{ab}	0,12 ± 0,00 ^{bc}
IVE	34,9 ± 0,2 ^c	63,53 ± 10,3 ^c	0,38 ± 0,03 ^c	0,31 ± 0,00 ^d

* Superíndices con letras diferentes en una misma columna, indican que hay diferencias significativas entre las medias (p -valor < 0,05).

Al igual que el CTP, la actividad antioxidante de *Larrea* spp. ha sido evaluada en varias ocasiones, especialmente con el método de captura del radical DPPH. Lorenzo *et al.* (2019) compararon la AO de extractos etanólicos de *L. divaricata* y *L. cuneifolia*, y, en concordancia con nuestros resultados, obtuvieron para ambas especies aproximadamente el doble de actividad antioxidante en CAET, en extractos de hoja respecto de los de madera. Sin embargo, la actividad hallada por estos autores fue entre 3 y 4 veces superior a la obtenida en el presente estudio. Este resultado fue también observado para el mismo extracto en *L. cuneifolia*

(Lorenzo *et al.*, 2020). Por otro lado, Aliaga Huashuayo (2021) obtuvo entre 425,9 y 480,4 mg de Trolox/ml en muestras etanólicas y metanólicas de hojas de *L. divaricata*, valores que duplican los obtenidos en el presente estudio, con el mismo tipo de extracto. Por otro lado, Gómez *et al.* (2021), obtuvieron compuestos fenólicos de muestras foliares a partir de cloruro de metileno de *L. divaricata* y *L. nitida* e informaron una AO 3,5 veces inferiores a los expuestos en nuestro trabajo, para *L. ameghinoi*.

La concentración en que los extractos evaluados son capaces de inhibir el 50% (IC₅₀) de los radicales libres DPPH y ABTS variaron en un rango entre 0,08 y 0,38 mg/ml (Tabla 4). Al igual que la AO expresada en CAET, ambos métodos mostraron una correlación fuerte entre ellos para las muestras evaluadas ($r=0,79$). El extracto HM fue significativamente más eficiente para inhibir los radicales libres, mientras que el IVE fue el que requirió de una mayor concentración de muestra para lograr dicha actividad. Tal como se observó en la AO evaluada en CAET, en términos generales, los resultados determinados por el método ABTS presentaron mayor actividad que los de DPPH. No obstante, los extractos de tallo evaluados por el método DPPH no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí. Sin embargo, cuando fueron determinados por ABTS se obtuvieron leves diferencias entre ellos, siendo TM el que requirió menor cantidad de muestra para inhibir el 50% de los radicales libres. La mejor actividad IC₅₀ observada en este trabajo (HM) coincide con los presentados por Ortega *et al.* (2017) para *L. divaricata* y por Carbajal *et al.* (2017) para *L. cuneifolia*, quienes obtuvieron valores de IC₅₀ de 0,096 y 0,07 mg/ml a través de los métodos DPPH y ABTS, respectivamente. Sin embargo, Gómez *et al.* (2021) reportaron valores de IC₅₀ por el método DPPH para *L. divaricata* y *L. nitida* 10 veces inferior que el obtenido para el extracto HM en el presente estudio.

La actividad antioxidante *in vitro* de los extractos, expresada como CAET tuvo una fuerte correlación con el CTP ($r=0,72$ a $0,86$), lo cual indica que aquellos que presentaron mayor concentración de compuestos fenólicos también mostraron la mayor AO. Por otro lado, el análisis de correlación de CTP con IC₅₀ mostró correlaciones bajas entre ambas variables ($r= -0,44$ a $-0,36$), es decir que, un

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

incremento del CTP fue correspondido con una reducción del IC₅₀. En este sentido, una disminución en el valor de IC₅₀ (y un coeficiente de correlación bajo) implica una AO mayor. Estos resultados han sido informados en otras oportunidades en las que se ha indicado una relación directa entre un alto contenido de polifenoles y una mayor capacidad antioxidante de los extractos (Oomah *et al.*, 2011; Žugić *et al.*, 2014; Niroula *et al.*, 2019). Cabe destacar que la AO de los extractos de *L. ameghinoi* fue significativa y comparable a la de otros autores y, además, podría ser incrementada a partir de la optimización del proceso de extracción de CTP.

5. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se logró determinar que:

- Se logró obtener una metodología eficiente para la desinfección y germinación bajo condiciones *in vitro* de las semillas de *L. ameghinoi* Speg.
- Los parámetros germinativos evaluados bajo estas condiciones (CG, TMG, IVG y EG), indican que *L. ameghinoi* presenta semillas vigorosas y de buena calidad fisiológica.
- Se logró la introducción exitosa de esta especie al Cultivo de Tejidos Vegetales.
- Fue posible obtener compuestos polifenólicos en *L. ameghinoi* y el CTP de las plantas *in natura* fue superior al obtenido a partir de las vitroplantas.
- Bajo las condiciones experimentales aquí propuestas, los polifenoles extraídos de plantas *in natura* tuvieron mayor afinidad con disolventes orgánicos que con agua.
- Los extractos evaluados de *L. ameghinoi* fueron capaces de inhibir los radicales libres ABTS y DPPH, por lo que podrían ser considerada como fuente de compuestos bioactivos con potencial antioxidante.
- En general, se observó una tendencia lineal entre el mayor CTP de los extractos y su actividad antioxidante, independientemente del método de determinación utilizado.
- Nuestros resultados indican que *L. ameghinoi* tiene un valor potencial y real para ser utilizada en la extracción de compuestos fenólicos.
- Este trabajo constituye el primer reporte de propagación sexual (a través de semillas) mediante el cultivo de tejidos *in vitro* y de bioprospección química para esta especie. Esta información ofrece la posibilidad de incrementar la producción de metabolitos bajo inducción *in vitro*, así como de generar protocolos de multiplicación masiva y de conservación *ex situ*.

6. Bibliografía

Aguirre-Joya, J. A., Pastrana-Castro, L., Nieto-Oropeza, D., Ventura-Sobrevilla, J., Rojas-Molina, R., & Aguilar, C. N. (2018). The physicochemical, antifungal and antioxidant properties of a mixed polyphenol based bioactive film. *Heliyon*, 4(12), 0094.

Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731.

Alarcón, A.M., Astudillo, P., Barrios, S., & Rivas, E. (2004). Política de Salud Intercultural: Perspectiva de usuarios mapuches y equipos de salud en la IX región, Chile. *Revista Médica de Chile*, 132(9), 1109-1114

Aldhous, J. R., & Mason, W. L. (1972). *Forest nursery practice* (No. 111).

Aliaga Huashuayo, R. M., & Huashuayo Chacondori, E. Y. (2021). Comparación del contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de tres tipos de extractos de hojas de *Larrea divaricata* Cav (jarilla hembra). Tesis de Grado, Universidad Privada Autónoma del Sur, Arequipa, Perú.

Alonso, M. R., Peralta, I., Monti, D., Martino, R., & Anesini, C. (2017). Stability of an Aqueous Extract of *Larrea divaricata* Cav. during a Simulated Digestion Process. *Phytotherapy Research*, 31(11), 1708–1714.

Arias Zabala, M., Angarita Velásquez, M. J., Aguirre Cardona, A. M., Restrepo Flórez, J. M., & Montoya Vallejo, C. (2009). Strategies for the improvement of secondary metabolites production in plant cell cultures. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4881-4895

Assessment, M. E. (2005). *Ecosystems and human well-being: wetlands and water*. World Resources Institute.

Barboza, G.E., J.J. Cantero, C. Núñez, A. Pacciaroni y L. Ariza Espinar. 2009. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana* 34 (1-2): 7-365.

Barbulova, A., Apone, F., & Colucci, G. (2014). Plant cell cultures as a source of cosmetic active ingredients. *Cosmetics*, 1(2), 94-104.

Valorización de la "Jarilla rastrera" (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

Barros, L., Duenas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2012). Phenolic profiles of in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry*, 132(2), 841-848.

Beena, M. R.; Martin, K. P.; Kirti, P. B.; Hariharan, M. 2003. Rapid in vitro propagation of medicinally important *Ceropegia candelabrum*. *Plant Cell Tiss, Org. Cult.* 72: 285-289

Bewley, J. D. (1997). Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, (9): 1055-1066.

Boiteux, J., Espino, M., de los Ángeles Fernández, M., Pizzuolo, P., & Silva, M. F. (2019). ECo-friendly postharvest protection: *Larrea cuneifolia*-nades extract against *Botrytis cinerea*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*, 51(2), 427-437.

Bongiovanni, G., Cantero, J., Eynard, A., & Goleniowski, M. (2008). Organic extracts of *Larrea divaricata* Cav. induced apoptosis on tumoral MCF7 cells with an higher cytotoxicity than nordihydroguaiaretic acid or paclitaxel. *J Exp Ther Oncol*, 7(1), 1-7

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Bucić-Kojić, A.; Planinić, M.; Srećko, T.; Jokić, S.; Mujić, I.; Bilić, M.; Velić, D. (2011). Effect of Extraction Conditions on the Extractability of Phenolic Compounds from Lyophilised Fig Fruits (*Ficus Carica* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61, 195-199.

Castro de Esparza, M. L. (1992). Uso de cloro para la desinfección de agua para consumo: efectos en la salud humana. *Hojas de Divulgación Técnica*, 49-50.

Carabajal, M. P. A., Isla, M. I., & Zampini, I. C. (2017). Evaluation of antioxidant and antimutagenic activity of herbal teas from native plants used in traditional medicine in Argentina. *South African Journal of Botany*, 110, 258-265.

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

Carabajal, M. P. A., Perea, M. C., Isla, M. I., & Zampini, I. C. (2020). The use of jarilla native plants in a Diaguita-Calchaquí indigenous community from northwestern Argentina: An ethnobotanical, phytochemical and biological approach. *Journal of ethnopharmacology*, 247, 112258.

Chaves, N. (1999). Variation of flavonoid synthesis induced by ecological factors. *Principles and practices in plant ecology: allochemical interactions*, 267-285.

Dalzotto, D. (2019). Biodiversidad regional: estrategias de propagación, propiedades nutricionales y funcionales de los frutos del Calafate (*Berberis microphylla* G. Forst). Tesis de grado, Universidad Nacional de Río Negro.

Davicino, R., Martino, R., & Anesini, C. (2011). *Larrea divaricata* Cav.: Scientific evidence showing its beneficial effects and its wide potential application. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(2), 92-103.

Davicino, R. C., Peralta, I. N., Martino, R. F., Alonso, R., & Anesini, C. A. (2015). Preventive anti-inflammatory activity of an aqueous extract of *Larrea divaricata* cav. and digestive and hematological toxicity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/> consultado marzo de 2023.

Del Valle, H. F., Elissalde, N. O., Gagliardini, D. A., & Milovich, J. (1998). Status of desertification in the Patagonian region: Assessment and mapping from satellite imagery. *Arid Land Research and Management*, 12(2), 95-121.

Dorta, E., Lobo, M. G., & Gonzalez, M. (2011). Reutilization of Mango Byproducts: Study of the Effect of Extraction Solvent and Temperature on Their Antioxidant Properties. *Journal of Food Science*, 77(1), C80–C88.

Enriquez, A. S., Fernandez, M. T., Aramayo, M. V. D. L., & De Pascuale Bovi, J. A. (2021). Percepción del cambio climático en Patagonia Norte. EEA Bariloche, INTA.

EPA (Environmental Protection Agency, EE.UU.). 1999. Desinfección con cloro. Washington, D.C. U.S. 9 pp. Disponible en: <https://espanol.epa.gov/> consultado en marzo de 2023.

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

Espitia, M., Cardona, C., & Araméndiz, H. (2016). Pruebas de germinación de semillas de forestales nativos de Córdoba, Colombia, en laboratorio y casa-malla. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 19(2), 307-315.

Estomba, D., Fernandez, H. M., & Stella, A. M. (2010). Antioxidantes y porfirinas de *Adesmia boronioides*, *Larrea divaricata* y *Atriplex lampa* cultivadas *in vitro*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 42(2), 135-142.

Fernández, M. E., Cony, M. A., & Passera, C. B. (2019). Temperaturas de germinación y dormición de semillas de dos especies de *Larrea* (Zygophyllaceae) del desierto del Monte, Argentina. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 51(2), 235-247.

Ferreira, M. L. F., Serra, P., & Casati, P. (2021). Recent advances on the roles of flavonoids as plant protective molecules after UV and high light exposure. *Physiologia Plantarum*, 173(3), 736-749.

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*, 24(7), 1043-1048.

Flores-Escobar, G., Legaria-Solano, J. P., Gil-Vásquez, I., & Colinas-León, M. T. (2008). Propagación *in vitro* de *Oncidium stramineum* Lindl., una orquídea amenazada y endémica de México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(3), 347-353.

Gómez, J., Simirgiotis, M. J., Manrique, S., Piñeiro, M., Lima, B., Bórquez, J., ... & Tapia, A. (2021). UHPLC-ESI-OT-MS phenolics profiling, free radical scavenging, antibacterial and nematocidal activities of “yellow-brown resins” from *Larrea* spp. *Antioxidants*, 10(2), 185.

Gonzalez, Y., Reino, J., & Machado, R. (2009). Dormancia y tratamientos pregerminativos en las semillas de *Leucaena* spp. cosechadas en suelo ácido. *Pastos y Forrajes*, 32 (4): 1-1.

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

González-Montelongo, R., Lobo, M. G., & González, M. (2010). Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. *Food Chemistry*, 119(3), 1030-1039.

Halder, M., Sarkar, S., & Jha, S. (2019). Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Engineering in life sciences*, 19(12), 880-895.

Haminiuk, C. W., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S., & Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits: an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2023-2044.

Hernandez, J. A., Pérez, D. R., & Busso, C. A. (2020). Germination of *Larrea divaricata* Cav, an important shrub species to restore desertified arid ecosystems. *Journal of Arid Environments*, 179, 104175.

Huenelaf, V. B., Dalzotto, D. C., Piñuel, M. L., Sharry, S. E., & Boeri, P. A. (2021). Trabajo extendido: Unidades encapsulables: una estrategia de propagación y conservación ex situ de plantas nativas. Universidad Nacional de Río Negro.

Hunziker, A. T. (2005). Solanaceae. Subtribu VIIa. Nicotianinae, parte A. 1. *Nicotiana. L. Flora Fanerogámica Argentina*, 256, 1-15.

Inostrosa, T. (2023) “Germinación post incendios: El efecto de las altas temperaturas en dos especies representativas del noreste patagónico.”. Tesis de grado, Universidad Nacional de Río Negro.

Jones, C. G., & Hartley, S. E. (1999). A protein competition model of phenolic allocation. *Oikos*, 27-44.

Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222-1239.

Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, 47(260), 583-621

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25, 726-732.

Lopez, A., Azpilicueta, M. M., Caballe, G., Lopez, D. R., & Marchelli, P. (2021). Somuncura: La meseta que suena y sus fito-curiosidades. EEA Bariloche, INTA. Disponible en: <https://repositorio.inta.gob.ar> consultado en marzo 2023.

López Dumrauf, I., Dalzotto, D., Sabanes, I., Failla, M., Sharry, S., & Boeri, P. A. (2018). Efectos de la escarificación física y química en semillas de *Larrea divaricata* (ZYGOPHYLLACEAE) en patagonia Argentina. Disponible en: <https://rid.unrn.edu.ar/> consultado en marzo 2023.

Lorenzo, M. E., Gómez, P. E., Sabatino, E., Segovia, A. F., Figueroa, L. C., & Baroni, M. V. (2020, November). Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Ethanolic Extract of *Larrea cuneifolia* Cav. Leaves. In *Proceedings* (Vol. 70, No. 1, p. 37). MDPI.

Lorenzo, M. E., Gómez, P. E., Segovia, A. F., Quiroga, A., Figueroa, L. C., & Baroni, M. V. (2019). Contenido fenólico y actividad antioxidante de extractos etanólicos de *Larrea divaricata* Cav., *Larrea cuneifolia* Cav. y *Sarcomphalus mistol* (Griseb.) Hauenschild, procedentes de diferentes áreas del valle central de Catamarca. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar> consultado en marzo 2023.

Maguire, J. D. (1962). Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor 1. *Crop science*, 2(2), 176-177.

Martins, S., Aguilar, C. N., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2012). Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. *Separation and Purification Technology*, 88, 163-167.

Mareček, V., Mikyška, A., Hampel, D., Čejka, P., Neuwirthová, J., Malachová, A., & Cerkal, R. (2017). ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of cereal science*, 73, 40-45.

- Martysiak-Żurowska, D., & Wenta, W.** (2012). A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta scientiarum polonorum technologia alimentaria*, 11(1), 83-89.
- Murashige, T., & Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Moreno, M. A., Bojorges, H., Falcó, I., Sánchez, G., López-Carballo, G., López-Rubio, A. & Fabra, M.J.** (2020). Active properties of edible marine polysaccharide-based coatings containing *Larrea nitida* polyphenols enriched extract. *Food Hydrocoll*, 102, 105595.
- Namdeo, A. G.** (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev*, 1(1), 69-79.
- Nassif, S. M. L., & Perez, S. D. A.** (2000). Temperature effects on germination of amendoim-do-campo (*Pterogyne nitens* Tul.) seeds. *Revista Brasileira de Sementes*, 22(1), 1-6.
- Nikolova, M., Petrova, M., Zayova, E., Vitkova, A., & Evstatieva, L.** (2013). Comparative study of in vitro, ex vitro and in vivo grown plants of *Arnica montana*—polyphenols and free radical scavenging activity. *Acta Botanica Croatica*, 72(1), 13-22.
- Niroula, A., Khatri, S., Khadka, D., & Timilsina, R.** (2019). Total phenolic contents and antioxidant activity profile of selected cereal sprouts and grasses. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 427–437.
- Oomah, B. D., Caspar, F., Malcolmson, L. J., & Bellido, A. S.** (2011). Phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls. *Food Research International*, 44(1), 436-441.
- Ortega, C., Favier, L. S., & Cifuentes, D. A.** (2017). Chemical derivatization of natural extracts obtained from *Larrea divaricata* Cav. increase in the antioxidant activity and protein precipitating capacity. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar> consultado en marzo de 2023.

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

Patagonia Extraandina, J. B. (2002). Usos tradicionales de las plantas en la meseta patagónica. Disponible en: <https://www.intranet.cenpat-conicet.gob.ar> consultado en marzo de 2023.

Palacio, L., Baeza, M. C., Cantero, J. J., Cusidó, R., & Goleniowski, M. E. (2008). In vitro propagation of “Jarilla” (*Larrea divaricata* CAV.) and secondary metabolite production. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(12), 2321-2325.

Palacio, L., Cantero, J. J., Cusidó, R., & Goleniowski, M. (2011). Phenolic compound production by *Larrea divaricata* Cav. plant cell cultures and effect of precursor feeding. *Process biochemistry*, 46(1), 418-422.

Palacio, L., Cantero, J. J., Cusidó, R. M., & Goleniowski, M. E. (2012). Phenolic compound production in relation to differentiation in cell and tissue cultures of *Larrea divaricata* (Cav.). *Plant Science*, 193, 1-7.

Pece, M., C. Gaillard, M. Acosta, C. Bruno y S. Saavedra. 2010. Tratamientos Pregerminativos para Tipa Colorada (*Pterogyne nitens* Tul.). Recursos Genéticos Forestales. México. *Foresta Veracruzana* 12 (1): 17-25.

Pedroza-Manrique, J. A., & Bejarano-Tibocha, A. (2008). Propagación vegetativa in vitro de *Puya santossi*. *Revista Colombiana de biotecnología*, 10(1), 36-48.

Pérez-Urria Carril, E., & Ávalos García, A. (2011). Metabolismo secundario de plantas. Disponible en: <https://eprints.ucm.es> consultado en marzo 2023.

Plan de Manejo Área Natural Protegida Meseta de Somuncura Provincia de Río Negro (2007). Supl Decr 1689 y Decr N° 356/86 - Secretaría de Programas Especiales. 124pp.

Quezada, F., Roca, W., Szauer, M. T., Gómez, J. J., & López, R. (2005). *Biotecnología para el uso sostenible de la biodiversidad: Capacidades locales y mercados potenciales*. Caracas: Corporación Andina de Fomento. Disponible en: <https://repositorio.cepal.org> consultado en marzo 2023.

Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89..

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

Ramirez-Estrada K, Vidal-Limon H, Hidalgo D, Moyano E, Golenioswki M, Cusidó RM, Palazon J (2016) Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules* 21(2):1–24.

Ranal, M. A., & Santana, D. G. D. (2006). How and why to measure the germination process?. *Brazilian Journal of Botany*, 29, 1-11.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (Eds.). (2006). *Handbook of Enology, Volume 2: The Chemistry of Wine-Stabilization and Treatments* (Vol. 2). John Wiley & Sons.

Schober, P., Boer, C., & Schwarte, L. A. (2018). Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. *Anesthesia & Analgesia*, 126(5): 1763-1768.

Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (Vol. 10). Universitat Jaume I.

Trejo-Tapia, G., & Rodríguez-Monroy, M. (2007). La agregación celular en la producción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales *in vitro*. *Interciencia*, 32(10), 669-674.

Trujillo, E. (1996). Análisis y pruebas rápidas de la calidad de las semillas. *Mejoramiento genético, selección y manejo de fuentes semilleras y de semillas forestales, Unidad, 3.*

Tohidi B, Rahimmalek M, Arzani A. (2017) Essential oil composition, total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of *Thymus* species collected from different regions of Iran. *Food Chemistry*, 220:153–161

Tousarkissian, M. (1980). Plantas medicinales de la Argentina: sus nombres botánicos, vulgares, usos y distribución geográfica. *Hemisferio Sur*, Bs. As, 1-139.

UCh (Universidad de Chile, Chile). 2004. Desinfectantes y antisépticos. *Central de Apuntes 5*. Universidad de Chile.

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

Williams, W., Cook, O., & Kay, B. (1974). Germination of native desert shrubs. *California Agriculture*, 28(8), 13-13.

Willian, R. L. (1991). Guía para la manipulación de semillas forestales (No. Fe 20/2). FAO.

Yang, C. M., Lee, C. N., and Chou, C. H. 2002. “Effects of Three Allelopathic Phenolics on Chlorophyll Accumulation of Rice (*Oryza sativa*) Seedlings: I. Inhibition of Supply-Orientation.” *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 43: 299-304.

Yeshi, K., Crayn, D., Ritmejerté, E., & Wangchuk, P. (2022). Plant secondary metabolites produced in response to abiotic stresses has potential application in pharmaceutical product development. *Molecules*, 27(1), 313

Žugić, A., S. Đordđević, I. Arsić, G. Marković, J. Živković, S. Jovanović and V. Tadić. 2014. Antioxidant activity and phenolic compounds in 10 selected herbs from Vrujci Spa, Serbia. *Industrial Crops and Products*. 52 (1):519-527.

Zuloaga, F. O., Morrone, O., & Belgrano, M. J. (2008). Catalogue of the vascular plants of the southern cone (Argentina, southern Brazil, Chile, Paraguay and Uruguay). *Catalogue of the vascular plants of the southern cone (Argentina, southern Brazil, Chile, Paraguay and Uruguay)*.

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

7. Anexo

Tabla 1: Antecedentes de *Larrea* spp. en Cuantificación de Polifenoles Totales (CTP).

Autor	Especie	Origen	Órgano	Extracción	CTP
Martins <i>et al.</i> (2017)	<i>L. tridentata</i>	Planta adulta de campo	Hojas	Acuoso	300 mg GAE/g planta peso seco
				Metanol	336,70 mg GAE/g planta peso seco
				Etanol	237,60 mg GAE/g planta peso seco
				Acetona	409,20 mg GAE/g planta peso seco
Ortega <i>et al.</i> (2017)	<i>L. divaricata</i>	Plantas adultas de campo	Partes aéreas	N-hexano	2,637 mg GAE/g
				Cloroformo	9,688 mg GAE/g
				Metanol	69,705 mg GAE/g
Carbajal <i>et al.</i> (2017)	<i>L. cuneifolia</i>	Plantas adultas de campo	Hojas	Acuoso (infusión)	1042 mg GAE/L
Aguirre Joya <i>et al.</i> (2018)	<i>L. tridentata</i>		Hojas	Acuoso (con calor)	300 mg GAE/gr
Boiteux <i>et al.</i> (2019)	<i>L. cuneifolia</i>		Hojas	Metanol	500 µg GAE/ml
				Acuoso	300 µg GAE/ml
Lorenzo <i>et al.</i> (2019).	<i>L. cuneifolia</i>	Planta adulta de campo	Hojas	Etanol	232 µg GAE/mg PS
	<i>L. cuneifolia</i>		Madera		82,91 µg GAE/mg PS
	<i>L. divaricata</i>		Hojas		136 µg GAE/mg PS
			Madera		76,35 µg GAE/mg PS
Lorenzo <i>et al.</i> (2020)	<i>L. cuneifolia</i>	Planta adulta de campo	Hojas	Etanol	228,1 ug GAE/ mg
Aliaga Huashayo (2021)	<i>L. divaricata</i>	Planta adulta de campo	Hojas	Metanol-maceración	886 mg EAG/100 ml
				Etanol maceración	882 mg EAG/100 ml
				Etanol -maceración	846 mg EAG/100 ml

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

Tabla 2: Antecedentes de Actividad Antioxidante en *Larrea* spp.

Autor	Especie	DPPH (CAET)	DPPH (IC ₅₀)	ABTS (IC ₅₀)
Ortega <i>et al.</i> (2017)	<i>L. divaricata</i>	-	0,163 mg/ml	-
		-	0,101 mg/ml	-
		-	0,096 mg/ml	-
Carbajal <i>et al.</i> (2017)	<i>L. cuneifolia</i>	-	-	19,7 µg/ml
	<i>L. divaricata</i>	-	-	71,2 µg/ml
Lorenzo <i>et al.</i> (2020)	<i>L. cuneifolia</i>	97,80 nmoles de Trolox 100/g hoja seca	-	-
		43,62 nmoles de Trolox 100/g madera seca	-	-
	<i>L. divaricata</i>	67,40 nmoles de Trolox 100/g hoja seca	-	-
		39,07 nmoles de Trolox 100/g madera seca	-	-
Gómez <i>et al.</i> (2021)	<i>L. divaricata</i>	8,42 ug de Trolox/ml	-	-
	<i>L. nitida</i>	8,41 ug de Trolox/ml	-	-
Aliaga Huashayo (2021)	<i>L. divaricata</i>	425,91 mg de Trolox/ml	-	-
		480,45 mg de Trolox/ml	-	-
		448,64 mg de Trolox/ml	-	-

Valorización de la “Jarilla rastrera” (*Larrea ameghinoi* Speg.): introducción al cultivo de tejidos *in vitro* y bioprospección química.

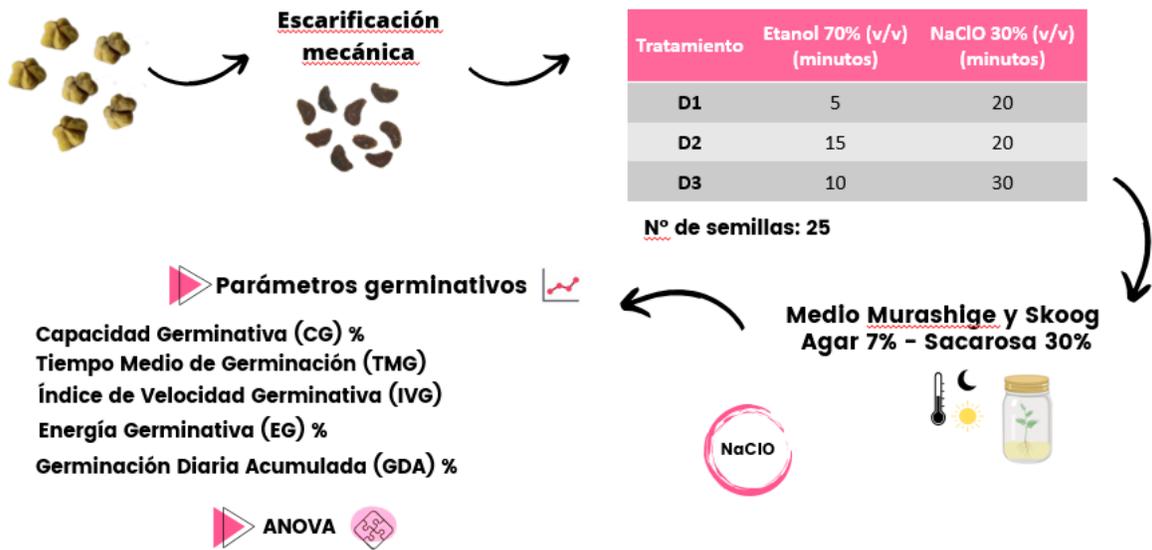


Figura 1. Esquema resumido de las actividades metodológicas de germinación y desinfección empleadas para la introducción de *L. ameghinoi* al cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Elaboración propia

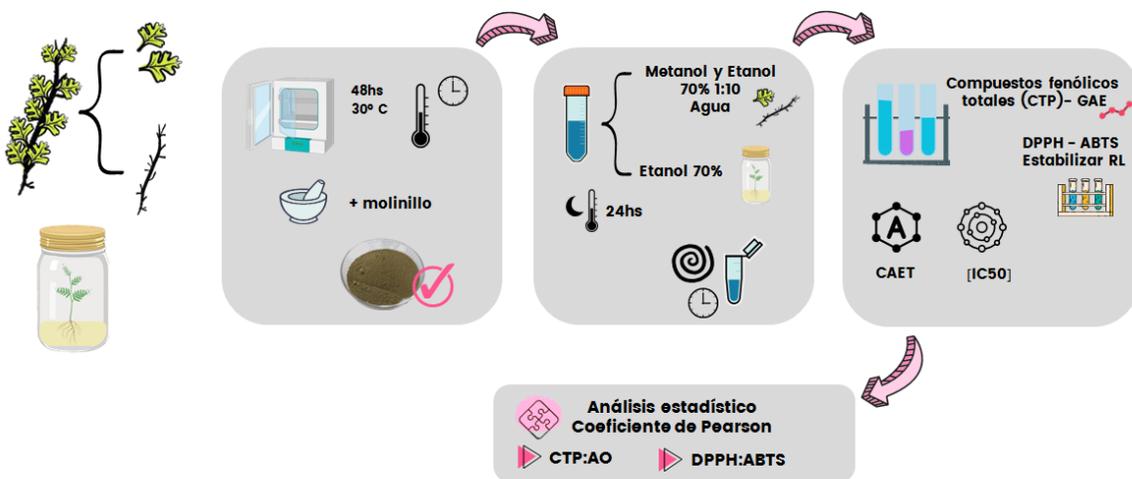


Figura 2. Esquema resumido de las actividades metodológicas utilizadas para bioprospección química de *L. ameghinoi*. Elaboración propia.