



**BIODIVERSIDAD REGIONAL: ESTRATEGIAS DE
PROPAGACIÓN, PROPIEDADES
NUTRICIONALES Y FUNCIONALES DE LOS
FRUTOS DEL CALAFATE (*Berberis microphylla*
G. FORST)**

Autora: Daniela Dalzotto

Directora: Dra. Patricia Boeri

Co-directora: Dra. Lucrecia Piñuel



Universidad Nacional de Río Negro
Sede Atlántica
Licenciatura en Ciencias del Ambiente

2019

Título: Biodiversidad regional: estrategias de propagación, propiedades nutricionales y funcionales de los frutos del calafate (*Berberis microphylla* G. Forst)

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

Datos del Director: Dra. Boeri Patricia, Centro de Investigación y Transferencia, Río Negro – CONICET.

Datos del Co-director: Dra. Lucrecia Piñuel, Centro de Investigación y Transferencia, Río Negro – CONICET.

Año: 2019

ÍNDICE

Resumen	1
Agradecimientos	2
Introducción	3
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
Hipótesis	4
Marco teórico	5
Materiales y métodos	8
1. Sitios y metodología de muestreo	8
2. Bioprospección	8
2.1. Procesamiento y extracciones de las muestras	8
a. Extracción de polifenoles	8
b. Extracción de proteínas	9
c. Obtención de péptidos	9
I. Digestión gástrica	9
II. Digestión duodenal	9
d. Caracterización fisicoquímica de proteínas y péptidos	9
2.2. Caracterización nutricional de pulpa y semilla	9
a. Peso fresco y peso seco	9
b. Cenizas	9
c. Proteínas	10
I. Contenido de proteína	10
II. Proteínas solubles	10
d. Lípidos	10
e. Determinación de azúcares	10
I. Azúcares reductores solubles totales	10
II. Azúcares totales	10
f. Estimación del aporte calórico	10

2.3.	Caracterización de compuestos bioactivos	10
a.	Polifenoles	10
b.	Análisis de la actividad antioxidante <i>in vitro</i>	11
3.	Propagación, optimización de los protocolos de germinación	11
3.1.	Tratamientos pregerminativos sin estratificación fría,	11
a.	Tratamiento de escarificación física (T1)	11
b.	Tratamiento de escarificación química (T2)	11
c.	Tratamiento de escarificación física y química (T3)	11
3.2.	Tratamientos pre-germinativos con estratificación fría	12
a.	Tratamiento de escarificación física (2T1)	12
3.3.	Parámetros germinativos	12
4.	Análisis estadístico	12
	Resultados y discusión	13
1.	Bioprospección	13
1.1.	Caracterización nutricional	13
1.2.	Proteínas e hidrolizados obtenidos de la harina de semilla.....	14
1.3.	Caracterización de compuestos bioactivos	15
a.	Cuantificación de Polifenoles Totales (CTP)	15
b.	Identificación y cuantificación de polifenoles	15
c.	Actividad antioxidante in vitro de polifenoles, proteínas y péptidos	17
2.	Propagación	18
2.1.	Tratamientos pregerminativos post-cosecha	18
2.2.	Tratamientos pre-germinativos con estratificación fría (2T1)	20
	Conclusiones	22
	Bibliografía	23

RESUMEN

La biodiversidad es un elemento clave para la mitigación y adaptación de las especies a los efectos del cambio climático. En los últimos tiempos a nivel global, se han producido cambios en el uso del suelo, que provocaron un conjunto de problemas ambientales, entre los que se encuentra la pérdida de biodiversidad. Por otra parte, en la Patagonia, la falta de conocimiento sobre la flora nativa representa una amenaza para la biodiversidad regional. En este sentido, conocer nuestros recursos y orientar las actividades científicas hacia la bioprospección, permitirá incorporar valor agregado, generar productos con identidad local y diversificar las actividades asociadas a la industria regional. Sin embargo, no es posible concebir ningún aprovechamiento de la biodiversidad si éste no es sustentable. Para ello, es indispensable complementar las técnicas de bioprospección con estudios de domesticación de las especies, lo cual involucra el conocimiento sobre las estrategias de propagación de las mismas.

Berberis microphylla G. Forst, conocida como “calafate”, es una especie multipropósito nativa de la Patagonia argentina que produce frutos comestibles de gran importancia para la economía regional. Tradicionalmente, han sido y son utilizados en preparaciones alimenticias. Además, se ha documentado su capacidad antioxidante asociada a la presencia de polifenoles. Esta especie resulta una fuente promisoría para la búsqueda e identificación de compuestos bioactivos con potenciales beneficios para la salud humana. El objetivo general de este trabajo plantea integrar metodologías de bioprospección y propagación de *B. microphylla* como estrategia para su domesticación, valorización y uso sustentable.

Se realizó la caracterización nutricional de la pulpa y la semilla de la especie. Los resultados mostraron que ambos tienen un valor nutricional del mismo orden que el documentado para otras especies del género. Los carbohidratos son el componente mayoritario en el fruto. Las semillas presentaron un contenido de proteínas del 13,65%, de las cuales se obtuvo una fracción soluble de $50 \pm 0,7$ mg proteína/g harina de semilla. Se realizó un aislado proteico, el cual fue sometido a un proceso de hidrólisis gastrointestinal para la obtención de péptidos. Por otro lado, se identificaron y cuantificaron los polifenoles de la pulpa y los mayoritarios fueron la delfinidina 3-O-glucosido (23,6 μ moles/g), el ácido caféico (6,27 μ moles/g) y la quercetina (3,6 μ moles/g). Los compuestos fenólicos presentaron una actividad antioxidante de $137,8 \pm 1,9$ μ moles equivalentes de Trolox/g peso fresco y un IC_{50} de 0,26 mg/ml. Las proteínas mostraron una capacidad antioxidante de $527,54 \pm 9$ μ moles equivalentes de Trolox/g peso seco de aislado proteico, inferior a la del hidrolizado gastrointestinal ($641,07 \pm 12$ μ moles equivalentes de Trolox/g peso seco). Para la propagación se evaluaron diferentes técnicas pre-germinativas, con metodología de escarificación física, química y físico-química, y de estratificación fría. Se determinó que el mejor tratamiento para establecer la germinación incluyó una estratificación fría de 90 días, una escarificación mecánica y una inmersión de las semillas en agua durante 12 horas. Así, se obtuvo una capacidad germinativa del $91,6 \pm 7\%$, un Índice de Velocidad Germinativa de $16,75 \pm 0,94$ y un porcentaje de supervivencia del $73,3 \pm 6,6\%$.

Esta investigación cobra importancia dado que abordó por primera vez el estudio de *B. microphylla* en la región norpatagónica. Se logró identificar algunos usos potenciales y revalorizar así, esta especie.

Palabras clave: bioprospección, compuestos bioactivos, estratificación, norpatagonia, calafate, berries.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la Universidad Nacional de Río Negro, por darme la oportunidad de estudiar y formarme como profesional.

A mis directoras de tesis. Patricia Boeri, por haberme invitado a participar del mundo de la investigación, por estar continuamente abriéndome puertas y, sobre todo, por hacer que nunca me falte motivación. A Lucrecia Piñuel, por todas las horas que, con mucha paciencia, dedicó para enseñarme bioprospección. Gracias a ambas por confiar siempre en mí y por no dejarme aburrir nunca.

A Sandra Sharry, por todos los consejos y oportunidades brindadas, y, de antemano, por todos los que están por venir. También a Patricio Solimano, por recibir siempre mis dudas y problemas, y ayudarme a resolverlos durante este trayecto.

A Daniel Barrio, por el apoyo brindado y por permitirme desarrollar este trabajo en el laboratorio que dirige en la universidad.

A Sergio Quichan, por su buena predisposición y ayuda.

Gracias al Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Provincia de Río Negro, por haberme proporcionado las muestras para trabajar en esta tesina de grado.

A Romina Monasterio, del Instituto de Biología Agrícola de Mendoza, por haber hecho la identificación y cuantificación de polifenoles.

Agradezco a todos mis profesores, por haber colaborado en mi formación profesional.

A todos mis amigos y compañeros que me han brindado ayuda en todos estos años de universidad, con los que compartí muchos mates y horas de estudio.

A mí siempre confiable mejor amiga, Eleri, porque desde chiquitas siempre estuvo ahí, escuchando y aconsejando, incluso a la distancia.

A Victor, por toda su paciencia y apoyo incondicional durante este largo proceso.

A todos mis tíos y primos, que aunque estén lejos, siempre se las arreglaron para trasmitirme su alegría por mis logros.

Un especial agradecimiento a mi mamá, hermana y abuela, porque son las mujeres de mi vida. Porque no me dejaron rendirme nunca, porque me enseñaron a ir siempre por más y por su apoyo incondicional. Sin ustedes no sería la persona que soy hoy.

A mi abuelo, porque sé que estaría muy orgulloso de mí.

A todos, gracias, sin ustedes no habría sido posible.

INTRODUCCIÓN

En los últimos tiempos se han producido cambios globales en el uso del suelo, que provocaron un conjunto de problemas ambientales con la consecuente pérdida de la biodiversidad. La destrucción de hábitats naturales para producir alimentos u otros productos agrícolas destinados al consumo, representa hoy la más severa y permanente amenaza a la biodiversidad global (Millennium Ecosystem Assessment, 2003). En este contexto, el mundo se enfrenta inexorablemente a una revisión profunda de sus sistemas productivos y a la necesidad de construir esquemas de vida más sustentables. Una nueva economía, basada en la biodiversidad (bioeconomía), está siendo considerada cada vez con mayor frecuencia. Ésta es específica de su lugar de origen y por ello es necesario contar con mayor conocimiento sobre la naturaleza, características y usos de los recursos biológicos.

En la Patagonia argentina, alrededor del 84% de la superficie ha sido afectada por procesos de desertificación, lo cual trae aparejado otro tipo de impactos, 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). Probablemente, la principal amenaza actual para los ecosistemas patagónicos sea la falta de conocimiento sobre su flora nativa y los impactos que genera la degradación ambiental. Sólo será posible promover la conservación de los recursos nativos, fomentar su uso sustentable y obtener beneficios para la sociedad, en la medida que aumente el conocimiento sobre la biodiversidad y su capacidad de generar valor agregado. En este sentido, conocer los recursos naturales regionales y orientar las actividades científicas hacia la bioprospección (búsqueda e identificación de compuestos bioactivos y otros productos de valor estratégico), permitirá incorporar valor agregado, generar productos con identidad local y diversificar las actividades asociadas a la industria regional.

En las últimas décadas, la pérdida de biodiversidad se ha producido con mayor intensidad en aquellas especies vegetales consideradas multipropósitos, las cuales constituyen un valioso recurso alimenticio y medicinal. En ambientes severos como los de la Patagonia, la biodiversidad es un importante medio de supervivencia para las comunidades locales. En la mayoría de los casos, se desconoce si poseen o no factores antinutricionales o tóxicos y cuáles son los principios activos y efectos farmacológicos que presentan las especies de la región. En Argentina, más del 45% de las especies vegetales aún no han sido químicamente analizadas y sólo el 42% fueron probadas farmacológicamente. En este sentido, resulta necesario generar mayor conocimiento, tanto de la composición química como de la actividad biológica de nuestra flora nativa (Barboza *et al*, 2009).

Por otro lado, una vez que las propiedades funcionales y/o medicinales son científicamente validadas, se debe asegurar y fomentar el manejo sustentable de las especies. No es posible concebir ningún aprovechamiento de la biodiversidad si éste no es sustentable desde el punto de vista biológico/ambiental, económico y social (Quezada *et al*, 2005). Para ello, resulta indispensable complementar las técnicas de bioprospección con estudios de domesticación y cultivo.

Berberis microphylla G. Forst, conocida como “calafate”, es una especie nativa de la Patagonia argentina que produce pequeños frutos comestibles de gran importancia para la economía regional. Tradicionalmente, han sido y son utilizados en preparaciones como mermeladas, helados, bebidas y frutas deshidratadas. Si bien se desconoce aún la composición química sus frutos en la región norpatagónica, la presencia de compuestos

de interés como polifenoles y sus propiedades antioxidantes, ha sido reportada en otras especies del género (Ruiz *et al*, 2010; Ruiz *et al*, 2013). En este sentido, *Berberis microphylla*, resulta una fuente promisoría para la búsqueda e identificación de compuestos bioactivos con potenciales beneficios para la salud humana.

Objetivo General

Integrar metodologías de bioprospección y propagación de *B. microphylla* como estrategia para su domesticación, valorización y uso sustentable.

Objetivos específicos

- 1) Evaluar las propiedades nutritivas de los frutos (pulpa y semillas) de *B. microphylla*.
- 2) Obtener aislados proteicos, péptidos y polifenoles de frutos.
- 3) Determinar la actividad antioxidante *in vitro* de proteínas, péptidos y polifenoles obtenidos.
- 4) Optimizar la propagación de *B. microphylla*, a través de la germinación.

Hipótesis

- 1) La bioprospección química de *B. microphylla* permitiría conocer sus principales propiedades y compuestos bioactivos y, así, determinar su potencial utilidad.
- 2) La determinación de sistemas eficientes de propagación de *B. microphylla* facilitaría la disponibilidad de plantas para su cultivo y aprovechamiento, disminuyendo la presión sobre las poblaciones nativas.

MARCO TEÓRICO

El 75% de la superficie Argentina está constituida por ecosistemas áridos y semiáridos, entre los que se destaca la región Patagónica. La misma representa un cuarto del territorio nacional, con una superficie de 790.000 km². La Cordillera de los Andes, que se extiende por la Patagonia, determina en gran medida las condiciones ambientales de la región y ocasiona un contraste climático entre el este y el oeste de la misma. Así, queda delimitada una zona occidental con climas hiperhúmedos a húmedos y una zona oriental donde predominan los climas subhúmedos, semiáridos y áridos (Breppe y Laura, 2014). Las características climáticas influyen en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas. Las escasas precipitaciones constituyen uno de los factores determinantes en el establecimiento de las comunidades vegetales, que generan adaptaciones frente a condiciones de aridez (Villagra *et al*, 2011; León *et al*, 1998). Así, las plantas desarrollan un conjunto de estrategias relacionadas con la supervivencia que involucran desde la síntesis de metabolitos, hasta una serie de eventos asociados a sus sistemas reproductivos, como la dormancia de sus semillas (Vilela *et al*, 2011; Sánchez *et al*, 2015).

Los metabolitos pueden ser clasificados en primarios y secundarios. Los compuestos primarios comprenden los hidratos de carbono, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Son esenciales para el desarrollo fisiológico de las plantas y son precursores de la síntesis de metabolitos secundarios (Petiard *et al*, 1987).

Los metabolitos secundarios son sintetizados por las plantas de acuerdo a las condiciones ambientales entre las que se encuentren y son de importancia ecológica, ya que participan en los procesos adaptativos. Pueden actuar como atrayentes o repelentes de animales, o tener una función protectora. Se clasifican en cuatro grupos: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides (García y Carril, 2011). Los compuestos fenólicos, también llamados polifenoles, son un grupo diverso que comprende desde moléculas sencillas, como los ácidos fenólicos, hasta polímeros complejos, como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides (García y Carril, 2011). Las características fisicoquímicas de los polifenoles les permiten participar en distintas reacciones celulares de óxido-reducción. En este sentido, son efectivos por su capacidad antioxidante. Una dieta rica en polifenoles posee efectos benéficos para la salud dada su acción como vasodilatadores, antitrombóticos, antiinflamatorios, antiapoptóticos, cardioprotector, antilipémicos y antiaterogénicos (Quiñones *et al*, 2012). Debido a estas propiedades, los polifenoles son utilizados como fármacos, pesticidas, colorantes, saborizantes y fragancias (Trejo-Tapia y Rodríguez-Monroy, 2007).

La búsqueda de compuestos bioactivos procedente de la flora nativa es posible a través de la bioprospección. A partir de ésta, se ha logrado avanzar hacia caracterizaciones químicas de extractos o fracciones con actividad biológica de interés para la industria medicinal, farmacológica y biotecnológica (Rocha, 2009). Esta búsqueda del conocimiento sobre la biodiversidad tiene impactos económicos, sociales, éticos y políticos (Madrigal *et al*, 2014). Desde la perspectiva económica, se apunta a desarrollar y posicionar bienes y servicios de manera sustentable, para favorecer el crecimiento de todos los sectores productivos de la sociedad. En este aspecto, se pretende mejorar el nivel de vida de las comunidades humanas y pueblos, bajo un criterio de equidad. En lo ético, se debe reorientar la mirada de la sociedad hacia su entorno natural, reconociendo el valor intrínseco de la naturaleza. En lo político, se debe dinamizar la participación comunitaria y democrática de los distintos sectores que participan del proceso bioprospectivo. En este

sentido, es necesario considerar tanto las comunidades que subsisten y conocen la biodiversidad, como aquellos que la comercializan bajo el enfoque de la bioprospección.

La bioprospección en la flora nativa debe llevarse a cabo de manera eficiente y sustentable. Si los recursos no se utilizan correctamente, pueden agotarse. En este sentido, se debe considerar la tasa de renovación de las especies para no afectar su supervivencia (Carretero, 1992). A fin de evitar la presión sobre las poblaciones naturales, es necesario contar con un sistema eficiente de propagación. Para ello, se debe considerar la presencia de dormancia, debido a que ésta es una de las estrategias con mayor frecuencia en plantas sometidas a ambientes hostiles (Baskin y Baskin, 1998). La dormancia consiste en disminuir la actividad metabólica de la semilla, para reactivarla una vez que las condiciones ambientales sean favorables y se produzca la germinación (Varela y Arana, 2011; Harper *et al*, 1970). Es muy frecuente que las semillas, tras su maduración y dispersión, no sean capaces de germinar por presentar algún tipo de dormancia (Khurana y Singh, 2002). Además, debido a que este tipo de respuesta es de carácter especie-específicas (determinadas condiciones pueden inducir la dormancia en algunas, y eliminarla en otras), resulta inevitable determinar los requerimientos germinativos para cada especie. Conocer profundamente las estrategias de propagación no solo facilitaría el uso sustentable de estos recursos nativos, sino también su implementación en planes de reforestación de áreas degradadas. Este aspecto resulta de gran importancia, especialmente en zonas donde las actividades antrópicas producen grandes impactos negativos sobre los ecosistemas, como es el caso de la región norpatagónica. Varela y Arana (2011) enumeran diferentes tratamientos pregerminativos para interrumpir la dormancia de las semillas. Entre ellos se encuentran la estratificación fría y la escarificación. La primera consiste en conservar las semillas a bajas temperaturas (entre 4 y 10 °C), por un periodo determinado. La escarificación es la eliminación total o parcial de las cubiertas seminales por métodos físicos (abrasión o corte) y/o químicos (ácidos fuertes) (Pérez García y Pita Villamil, 1999).

El calafate (*Berberis microphylla* G. Forst), una especie multipropósito de la región patagónica que pertenece a la familia Berberidaceae (Orden Ranunculales). Es un arbusto espinoso perenne, que se distribuye desde la provincia de Neuquén hasta Tierra del Fuego (Arena, 2017). La familia Berberidaceae posee alrededor de 15 géneros y 650 especies (Landrum, 1999), con dos grandes centros de diversidad en ambos hemisferios: los Septentrionales de Eurasia con alrededor de 300 especies, y las Australes de Sudamérica con 200 especies (Ahrendt, 1961), la mayoría de las cuales son andinas. Cabe destacar, que de los géneros de la familia Berberidaceae, *Berberis* es el único que se extiende en el hemisferio Sur (Urquieta, 2010). El género posee más de 170 especies distribuidas en las regiones templadas, extendiéndose a ambos lados de la Cordillera de los Andes, sobre los bosques húmedos. Sin embargo, su distribución en Argentina es más acotada debido a la disminución de las precipitaciones que genera la cordillera (Landrum, 1999). En Argentina habitan 26 especies que se distribuyen en 4 Dominios Fitogeográficos: Subantártico, Andino-Patagónico, Chaqueño y Amazónico (Bottini, 2000; Cabrera, 1976). La mayoría de las especies se presentan como arbustos espinosos y no son elementos predominantes en una flora, sin embargo poseen una gran plasticidad ecológica que les permite adaptarse a una gran variedad de condiciones climáticas y edáficas (Orsi, 1976). Las especies de este género más comunes en Argentina son: *B. darwinii*, *B. empetrifolia*, *B. ilicifolia*, *B. microphylla*, *B. montana*, *B. serratodentata*, y *B. trigon*.

B. microphylla es un arbusto de hasta 3 m de altura. Posee espinas en tres partes de 50-45 mm de largo. Sus hojas son obovadas a oblanceoladas, con 6-40 mm de largo y 2-14 mm de ancho, coriácea a subcoriácea color verde, con 1-2 dientes espinescentes en los márgenes. Sus flores son pentámeras, simples, con pecíolos largos, amarillas y hermafroditas. Su fruto es una baya de alto valor comestible, de color azul negruzco de 7-11 mm de diámetro, que posee de 6 a 10 semillas marrones o negras, de 4-6 mm de largo (Figura 1). Florece en primavera y sus frutos maduran hacia mediados del verano.



Figura 1 *B. microphylla*. Fuente: Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Provincia de Río Negro.

Debido a su popular uso en productos de calidad regional, los frutos de *Berberis* han sido estudiados alrededor del mundo con el objetivo de determinar sus compuestos bioactivos con potencial nutraceutico (Arena *et al*, 2017; Khan *et al*, 2016; Mariangel *et al*, 2013). En este sentido, se ha documentado que la actividad antioxidante del fruto de esta especie en Chile, supera las de otros berries de consumo frecuente, como los arándanos (Ruiz *et al*, 2013; Ruiz *et al*, 2010). Con el tiempo, los productores han mostrado un creciente interés en el uso de estos frutos, siendo muy atractivo para el establecimiento de plantaciones comerciales, dada la gran variedad de productos obtenidos de esta especie. En la norpatagonia el consumo de frutas frescas, como las del calafate, es una práctica habitual. Sin embargo, aún se desconoce cuál es el aporte nutricional de estos frutos y si poseen propiedades funcionales. La validación científica de los saberes tradicionales permitirá promover el uso sustentable de estos recursos y generar valor agregado en las cadenas productivas regionales preexistentes. En este sentido, la búsqueda de productos naturales en la biodiversidad nativa es un elemento clave en el desarrollo económico del interior del país, como la región patagónica, que por su diversidad específica brinda la posibilidad de obtener nuevos productos, derivados de la Bioprospección.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Sitios y metodología de muestreo

Los frutos se colectaron de 5 plantas madres con buen estado sanitario, en la localidad de Clemente Onelli (Figura 2), provincia de Río Negro (41° 19' 16.33" S, 70° 07' 52.87" W), ecorregión de la Estepa patagónica (Oyarzabal et al, 2018). Esta zona fue seleccionada por representar el límite noreste de un ambiente típico estepario, en el cual aún no existen datos sobre esta especie. Las muestras fueron recolectadas de dos sitios de muestreo. El primero (M1) ubicado al Oeste de la localidad de Clemente Onelli (41°19'16.33"S - 70° 7'52.87"O), y el segundo (M2) al Este de la localidad (41°11'5.11"S - 69°59'22.00"O). Los frutos fueron recolectados a mano e inmediatamente transportados en conservadoras hasta su acondicionamiento.

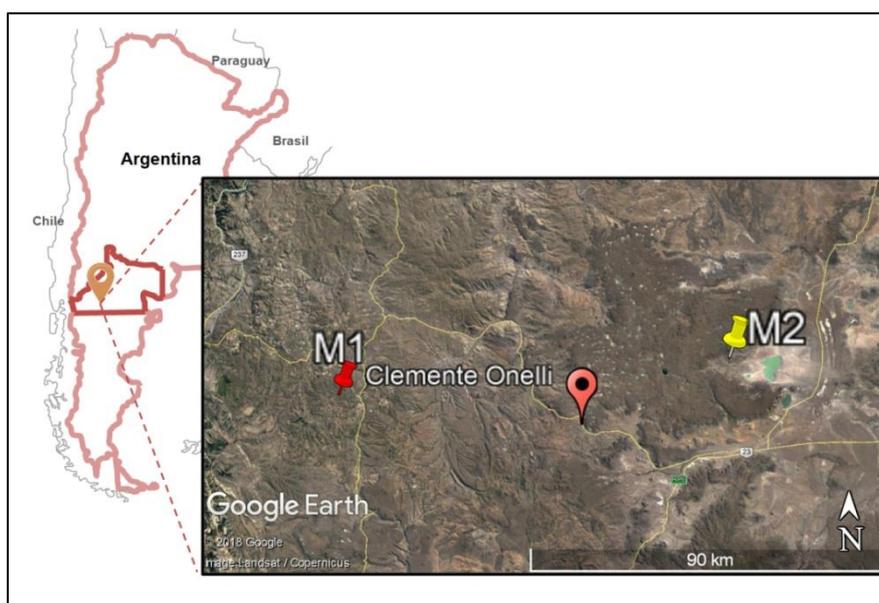


Figura 2 Ubicación geográfica de Clemente Onelli y los sitios de muestreo M1 y M2.

2. Bioprospección

2.1. Procesamiento y extracciones de las muestras

Inicialmente se separaron y pre-seleccionaron aquellos frutos maduros, enteros y libres de hongos. Los mismos fueron lavados 3 veces con agua destilada, luego se retiró el exceso de humedad y se trituraron con una procesadora con cuchilla de plástico. Por último, se separó en forma manual la pulpa de las semillas y se conservaron a 4°C, en oscuridad.

a. Extracción de polifenoles

La pulpa separada fue homogeneizada con un molinillo (Numak – F100). La extracción de polifenoles se realizó con 50 % v/v de etanol, según Pérez y col. (2014). Brevemente, se pesaron 10 g de pulpa y se añadió 250 ml de etanol al 50% (v/v). La muestra se dejó en agitación por dos horas a 60°C y se filtró. El solvente fue extraído con un Rotavapor (DLAB-RE100-Pro), a 75°C, 30 rpm durante 30 minutos, obteniendo un volumen final de 68 ml. El extracto fue liofilizado para el análisis de actividad antioxidante *in vitro* y determinaciones por HPLC-DAD.

b. Extracción de proteínas

Las semillas fueron secadas a 27°C durante 24 horas y luego procesadas para la obtención de una harina. A partir de ésta, se llevó a cabo una extracción alcalina según Martínez y Añón (1996) con algunas modificaciones. Brevemente, se utilizaron 3 g y se le añadió 30 ml de agua destilada pH 9 con NaOH 0,1 M. La muestra se dejó en agitación por dos horas a temperatura ambiente, a pH constante. Luego se centrifugó a 5000 rpm, y el sobrenadante fue ajustado a pH 5 con HCl 0,1 M. Por último, se centrifugó a 5000 rpm y el precipitado se resuspendió en 15 ml de buffer fosfato 10mM pH 7,2. El extracto acuoso obtenido, fue liofilizado para la obtención de péptidos y el análisis de actividad antioxidante *in vitro*.

c. Obtención de péptidos

Los péptidos se obtuvieron a partir del aislado proteico mediante la simulación del proceso digestivo con proteasas, para el cual las proteínas fueron hidrolizadas imitando el proceso digestivo gástrico y duodenal de acuerdo a lo descrito por Carrillo y col. (2017).

I. Digestión gástrica

Se utilizaron 10 mg del aislado proteico liofilizado y se le añadió 1 ml de SGF (pepsina 2000 unidades/ml, NaCl 0,35 M, pH 3). La misma se incubó en agitación por 2 horas a 37°C. La actividad hidrolítica fue detenida subiendo el pH con 100 µl de NaOH 1M y se incubó a 80°C durante 10 min.

II. Digestión duodenal

Luego de la digestión gástrica, a las muestras se les agrega 1 ml de SIF (CaCl₂ 20 mM, 7,6 mM BisTris pH 7 y pancreatina 100 unidades/ml). Se incubaron en agitación por 2 horas a 37°C. Luego, la reacción se finalizó con un baño a 80°C por 10 minutos.

d. Caracterización fisicoquímica de proteínas y péptidos

Para la caracterización del aislado proteico se utilizó un gel SDS-PAGE de 12% según Laemmli (1970). El perfil polipeptídico del hidrolizado de proteínas fue caracterizado mediante un gel Tricina–SDS–PAGE de 16% (Schägger, 2006).

2.2. Caracterización nutricional de pulpa y semilla

Para el análisis proximal se realizó la determinación del contenido de humedad, proteínas totales, lípidos y cenizas tanto de pulpa como de semilla con la metodología especificada por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, 1990).

a. Peso fresco y peso seco

Para la determinación del contenido de humedad, se dispusieron por separado 20 g de harina de semilla y 40 g de pulpa. La humedad se determinó mediante diferencia de peso antes y después del secado de la muestra a 75°C, hasta alcanzar peso constante.

b. Cenizas

Las cenizas se obtuvieron por mineralización de las muestras deshidratadas, a una temperatura de 550 °C durante 12 horas en mufla (TecnoEdu S.A).

c. Proteínas

III. Contenido de proteínas

El contenido proteico de la pulpa y semillas se determinó mediante el método Kjeldahl (AOAC, 1990) por duplicado. El cálculo de proteína se realizó a partir de los datos de nitrógeno obtenidos de la muestra, utilizando el factor de conversión 6,25.

IV. Proteínas solubles

El contenido de proteínas solubles se determinó a partir del aislado proteico mediante el método descrito por Bradford (1976). Para la curva de calibrado se utilizó Albúmina de Suero Bovino (BSA) 1 mg/ml como proteína patrón en un rango de 0-25 µg. Se midió la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro SP Spectrum 2100 UV / SP. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

d. Lípidos

La extracción de lípidos se realizó a partir de 5 g de harina de semilla y 5 g de pulpa, con dos repeticiones de cada una. Se realizó el método de Soxhlet con éter sulfúrico como solvente. La extracción se llevó a cabo durante 2 horas. El porcentaje de lípidos se obtuvo mediante la diferencia entre el peso final y el inicial del balón.

e. Determinación de azúcares

Se realizó una previa hidrólisis ácida con 1 g de pulpa, 100 ml de agua destilada y 20 ml de HCl concentrado. Se mantuvo en ebullición durante 2 horas y luego la muestra se neutralizó, con NaOH 40% (p/v).

V. Azúcares reductores solubles totales

Se determinaron según el método descrito por Somogyi-Nelson (Somogyi, 1952), utilizando glucosa (1 mg/ml) como patrón, cuyas concentraciones fueron de 0-0,3 mg/ml. Tanto la curva patrón como las muestras se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron en gramos equivalentes de glucosa /100g de peso seco.

VI. Azúcares totales

Se utilizó el método colorimétrico de fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). La curva de calibración fue realizada con glucosa (1 mg/ml), cuyas concentraciones fueron de 0-0,3 mg/ml. Tanto la curva patrón como las muestras se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron en gramos equivalentes de glucosa /100g de peso seco.

f. Estimación del aporte calórico

El aporte calórico se determinó de acuerdo a la ecuación descrita por Indrayan y col. (2005):

$$= (4 \times \%proteínas) + (9 \times \%lípidos) + (4 \times \%carbohidratos)$$

El resultado se expresó en Kcal/100g.

3. Caracterización de compuestos bioactivos

3.1. Polifenoles

El contenido de polifenoles totales (TPC) se cuantificó mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu y el de lectura directa de absorbancia a 280 nm (Ribéreau-Gayon *et al.*,

2006). El TPC se calculó a partir de una curva de calibración con una solución estándar de ácido gálico (GAE). Tanto las curvas patrón como las muestras se realizaron por triplicado. Los resultados de CPT se expresaron en mg equivalentes (GAE)/100 g de peso húmedo. A partir del extracto acuoso liofilizado, fueron identificados y cuantificados los polifenoles extraídos por HPLC-DAD en el Instituto de Biología Agrícola de Mendoza (IBAM) UNCuyo-CONICET, Mendoza, Argentina.

3.2. Análisis de la actividad antioxidante *in vitro*

Se determinó la capacidad de captar radicales libres del extracto fenólico, aislado proteico e hidrolizado de proteínas. Para la medición de esta actividad se utilizó el método ABTS (Re *et al*, 1999; Kuskosky *et al*, 2004). El patrón de referencia usado fue Trolox 1 mM (curva de calibrado 0-0,95 mM). Por otro lado, se calculó el valor de IC₅₀ para el extracto fenólico, es decir, la concentración de la muestra que se requiere para inhibir el 50% de los radicales libres.

4. Propagación, optimización de los protocolos de germinación

En este trabajo se evaluó la eficacia de diferentes metodologías de escarificación de *B. microphylla* y el efecto de la estratificación fría. Los resultados fueron comparados con semillas sin tratar (control). Las plántulas obtenidas fueron transplantadas a sustrato a base vermiculita en primer instancia y, luego, a tierra fértil.

4.1. Tratamientos pregerminativos sin estratificación fría

Las semillas fueron limpiadas y conservadas secas en un sobre de papel a temperatura ambiente y en oscuridad, hasta el momento de su uso. Tanto las semillas sometidas al tratamiento como las de control se dispusieron en placas de Petri preparadas con algodón y papel de filtro humedecido con agua destilada. La incubación se realizó en una cámara de germinación a 24°C ± 2, en oscuridad. Los ensayos constaron de tres repeticiones de 30 semillas. Las germinaciones fueron sostenidas durante 30 días y los resultados fueron comparados con semillas sin tratar (control).

4.1.1. Tratamiento de escarificación física (T1)

Se realizó una inmersión en agua destilada por 30 minutos para ablandar la cubierta seminal. Posteriormente, la misma fue recortada con una tijera sobre el extremo radicular, evitando generar daño en el embrión. Luego, para la desinfección, se sumergieron 1 minuto en etanol 70% (v/v) y 20 minutos en NaClO 30% (v/v).

4.1.2. Tratamiento de escarificación química (T2)

En este tratamiento, para ablandar la cubierta seminal y favorecer la permeabilidad del agua, las semillas fueron sumergidas en H₂SO₄ concentrado por 30 minutos. Fue necesario mantener las semillas en agitación para que desprendan el tegumento y luego retirar el ácido sulfúrico con tres enjuagues de agua destilada, asegurándose que no queden restos del mismo. Para la desinfección, las semillas fueron puestas 1 minuto en etanol 70% (v/v) y luego 20 minutos en NaClO 30% (v/v).

4.1.3. Tratamiento de escarificación física y química (T3)

En este caso se combinaron los tratamientos de escarificación física y química, de manera que en primera instancia se sumergieron las semillas por 30 minutos en H₂SO₄ concentrado. Luego de tres enjuagues con agua destilada, se hizo un corte en el

tegumento seminal en el área donde emerge la radícula. La desinfección las semillas fue con 1 minuto en etanol 70% (v/v) y 20 minutos en NaClO 30% (v/v).

4.2. Tratamientos pre-germinativos con estratificación fría (2T1)

En este segundo ensayo de germinación, las semillas fueron sometidas a una estratificación fría, para lo cual se incubaron en heladera a 4°C durante 90 días. Además, se modificaron las técnicas de escarificación y desinfección utilizadas en el punto 4.1.1 de la metodología. En este sentido, como metodología de escarificación se retiró la cubierta seminal realizando un corte por los bordes con una tijera y retirándola con una pinza. Luego las semillas se desinfectaron con 1 minuto de etanol 70% (v/v), 10 minutos en NaClO 15% (v/v), fueron enjuagadas tres veces con agua destilada y se mantuvieron en agua destilada durante 12 horas en la estufa de germinación, donde luego fueron incubadas. Tanto las semillas sometidas al tratamiento como las de control se dispusieron en placas de Petri preparadas con algodón y papel de filtro humedecido con agua destilada. La incubación se realizó en una cámara de germinación a 24°C ± 2, en oscuridad. Los ensayos fueron sostenidos durante una semana y constaron de tres repeticiones de 30 semillas. Los resultados fueron comparados con semillas sin tratar (control).

4.3. Parámetros germinativos

Se evaluaron los siguientes parámetros:

- Capacidad Germinativa (CG): Porcentaje de germinación total al finalizar el ensayo (Pece, 2010).
- Índice de Velocidad de Germinación (IVG) o Índice de Maguire's: el índice de Velocidad de Germinación (IVG) propuesto por Maguire (1962) es uno de los más utilizados (Nakagawa, 1999; Villagra, 1997) y se expresa como número de semillas germinadas por día. Su fórmula de cálculo es:

$$IVG = \frac{G1}{N1} + \frac{G2}{N2} + \dots + \frac{Gn}{Nn} = \sum_{i=1} \frac{Gi}{Ni}$$

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

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

Donde, "n" es el número de semillas germinado por día y "Nf" es número total de semillas (Trujillo, 1996).

Además de los parámetros antes mencionados, se evaluó el porcentaje de semillas contaminadas y la supervivencia de las plántulas al finalizar el ensayo.

5. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media ± desviación estándar (DE) de tres mediciones. La diferencia estadística entre tratamientos se probó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, 1952). Las diferencias en p <0,05 se consideraron estadísticamente significativas. Se utilizó el programa estadístico Infostat versión libre.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. Bioprospección

3.1. Caracterización nutricional

La determinación del valor nutricional de los frutos de *Berberis microphylla* cobra especial importancia ya que la información sobre esta especie en la Norpatagonia Argentina, uno de los límites de distribución de la especie, es escasa. Aun no ha sido descrita la caracterización nutricional sus semillas en el país. La información preexistente hace una descripción del “fruto”, sin discriminar si incluye las semillas (Arena, 2017). Se evaluó el contenido de humedad y se observó que el mismo varió significativamente entre pulpa y semilla, siendo 13 veces mayor en la pulpa (70,2%). Esto es usual en frutos carnosos, sobre todo en los berries (González, 2009). La humedad que posee un alimento impacta sobre su calidad, ya que influye en la conservación y posible contaminación del mismo (Ureña y Encina, 2007). Por lo tanto, el gran porcentaje de humedad que posee la pulpa de esta especie lo convierte en un fruto muy susceptible a la podredumbre y a la pérdida de agua, con el consecuente deterioro organoléptico, relevante para mantener la calidad de los frutos post-cosecha.

La Tabla 1 muestra los resultados de la caracterización nutricional de pulpa de frutos y semillas. Se observa que todos los parámetros determinados mostraron diferencias significativas entre ambos tipos de muestras. El contenido de proteínas en las semillas fue 10 veces mayor que en la pulpa. Asimismo, los lípidos cuantificados en las semillas presentaron una diferencia similar (10 veces superior) a la obtenida en proteínas. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Andola y col. (2011) para el género. En este sentido, la presencia mayoritaria de dichos metabolitos puede atribuirse a que los mismos están involucrados en el proceso de germinación y el desarrollo embrional (Doria, 2010).

Los carbohidratos fueron los componentes mayoritarios tanto en semilla como en pulpa. No obstante, el contenido fue significativamente superior en esta última (Tabla 1). Dentro de los carbohidratos de la pulpa, se determinó que el 71% son azúcares solubles y sólo el 3% corresponde a azúcares reductores; el 23% restante son azúcares insolubles. Los carbohidratos son sustancias involucradas en los mecanismos de defensa de las plantas. Estudios ecológicos y agronómicos han revelado una fuerte correlación entre la concentración de azúcares solubles y la tolerancia al estrés. Por ejemplo, la acumulación de carbohidratos limita la colonización fúngica y desempeña un papel clave en el control del potencial osmótico en las células vegetales (Siringam *et al*, 2012; Chaum y Kirdmanee, 2009; Pattanagul y Thitisaksakul, 2008). Nuestros resultados indican que, al igual que lo informado para *B. microphylla* en el sur de Chile (Ruiz *et al*, 2010), los azúcares son los principales nutrientes hallados en la pulpa. Ha sido descrito que éstos contribuyen con la calidad del fruto, en relación al peso, la firmeza, color y sabor en *Berberis buxifolia* (Arena *et al*, 2013).

El valor nutricional de la semilla y la pulpa de *B. microphylla* fue de 144,3 y 119,4 Kcal/100 g de peso seco, respectivamente. Estos valores se encuentran en el orden de los documentados en otras especies de *Berberis* (Andola *et al*, 2011).

Tabla 1 Caracterización nutricional de la semilla y la pulpa de *B. microphylla*, valores expresados para 100 g de peso seco. Los valores representan un promedio de tres repeticiones con su Desvío Estándar.

	Ceniza (%) [*]	Proteína (%) [*]	Carbohidratos (%) [*]	Lípidos (%) [*]
Semilla	2,21 ± 0,01 ^a	13,65 ^a	65,24 ± 1,14 ^a	18,9 ± 0,65 ^a
Pulpa	3,65 ± 0,08 ^b	1,33 ^b	93,32 ± 0,12 ^b	1,7 ± 0,04 ^b
p-valor	0,0485	0,0109	0,0163	0,0148

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

3.2. Proteínas e hidrolizados obtenidos de la harina de semilla

Debido a que la mayor contribución proteica del fruto la aportan las semillas (13,65%) y que además, representan aproximadamente el 70% del fruto completo (Figura 3), éstas podrían ser consideradas como una fuente promisoría de proteínas. En este sentido, los frutos de *B. microphylla* constituirían una potencial alternativa en la formulación de alimentos o suplementos dietarios.

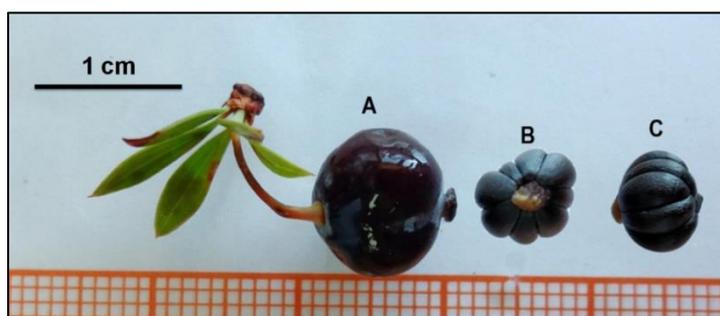


Figura 3 Relación de tamaño del fruto completo (A) de *B. microphylla* respecto a las semillas, vistas desde arriba (B) y desde el costado (C).

A partir de una extracción alcalina de harina de semilla, se obtuvieron $50 \pm 0,7$ mg proteína/g harina de semilla, las cuales fueron caracterizadas mediante SDS-PAGE (Figura 4 A, calle 2). El número de bandas observadas en el gel fueron 9, en un rango de pesos moleculares de 6 a 70 kDa. El análisis de la electroforesis además, reveló la presencia de 4 proteínas principales de 6; 9,5; 35 y 53 kDa. Dado que con frecuencia el fruto suele consumirse entero, sin discriminar la semilla, se decidió obtener hidrolizados de las mismas. El patrón electroforético de los hidrolizados obtenidos mostró bandas peptídicas con pesos moleculares de 11, 14 y 23 kDa para ambos hidrolizados (Figura 4B, calle 2 y 3). Sin embargo, en la digestión duodenal se observó que las bandas de 11 y 14 kDa fueron más intensas, lo cual podría indicar que hay una mayor cantidad de éstos péptidos.

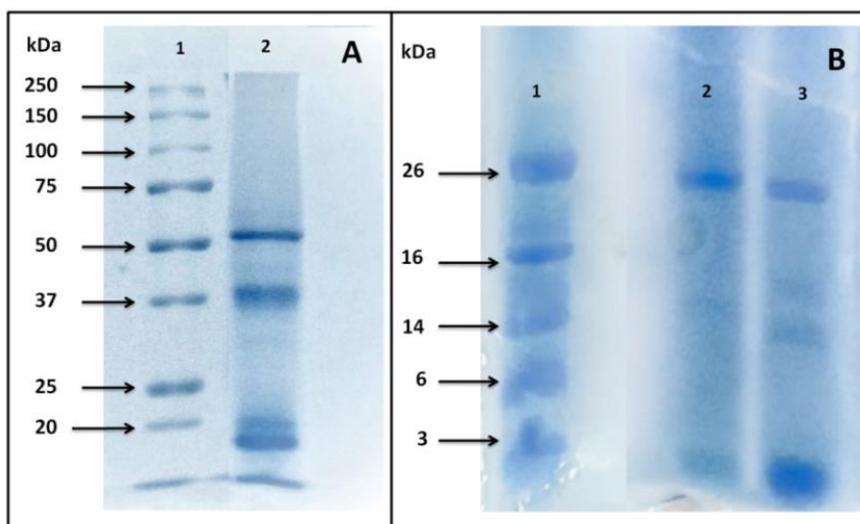


Figura 4 A) perfil proteico obtenido mediante un gel SDS-PAGE 12%. Calle 1: marcador molecular. Calle 2: aislado proteico. B) perfil peptídico obtenido mediante un gel Tricina-SDS-PAGE 16%. Calle 1: marcador molecular. Calle 2: digestión gástrica. Calle 3: digestión duodenal.

3.3. Caracterización de compuestos bioactivos

a. Cuantificación de Polifenoles Totales (CTP)

Los polifenoles son componentes bioactivos presentes en los alimentos que le confieren diferentes propiedades funcionales y contribuyen con la actividad antioxidante de los mismos. El CTP se cuantificó por dos métodos diferentes, como se describió en la metodología (Ver en apartado 3.1). La cantidad de polifenoles determinados mediante el método Folin-Ciocalteu fue $17,6 \pm 1,7$ mg GAE/g de peso seco, mientras que con el método de absorbancia a 280 nm fue 2,3 veces mayor ($41,8 \pm 1,55$ mg GAE/g de peso seco). Esta diferencia de resultados puede deberse a que la determinación proporcionada por el último método mencionado es imprecisa, ya que puede cuantificar otro tipo de compuestos además de los polifenoles (Csepregi *et al*, 2013). La misma desigualdad de resultados entre ambos métodos fue evidenciada por Ruiz y col. (2010) para esta especie en Chile. En ambos casos, los valores obtenidos por estos autores fueron superiores. Sin embargo, el método de extracción utilizado en este trabajo fue diferente y el rendimiento alcanzado fue del 38,6%.

b. Identificación y cuantificación de polifenoles

Mediante la técnica de HPLC se identificaron 14 compuestos fenólicos. De éstos, 9 fueron clasificados como “no antocianos” (Figura 5), entre los cuales los mayoritarios fueron el ácido caféico ($6,27 \mu\text{moles/g}$) y la quercetina ($3,6 \mu\text{moles/g}$). Los 5 compuestos restantes fueron antocianos (Figura 6) y la concentración total fue de $40 \mu\text{moles/g}$. Las antocianinas mayoritarias fueron la delphinidina 3-O-glucosido ($23,6 \mu\text{moles/g}$), la detunidina 3-O-glucosido ($7,7 \mu\text{moles/g}$) y la malvidina 3-O-glucosido ($3,24 \mu\text{moles/g}$).

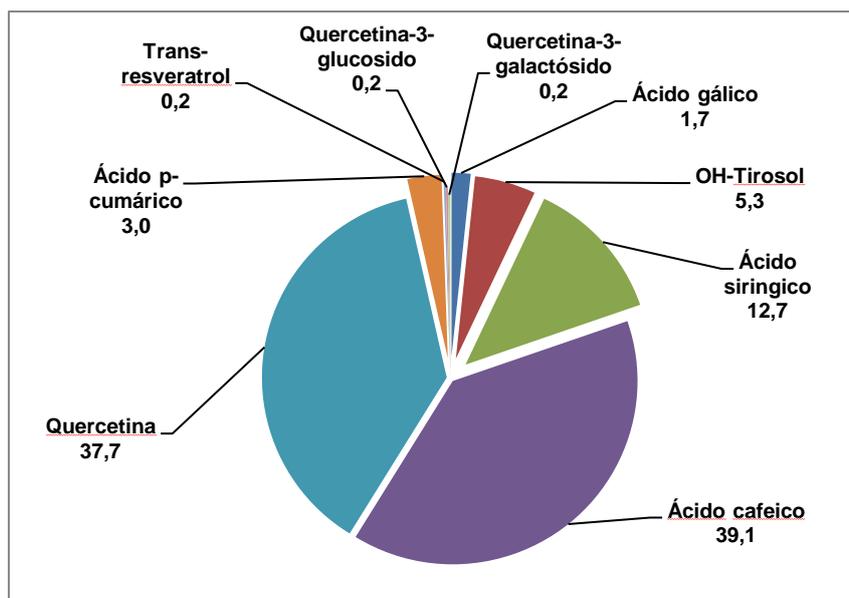


Figura 5 Compuestos no antocianos expresados en porcentaje (%).

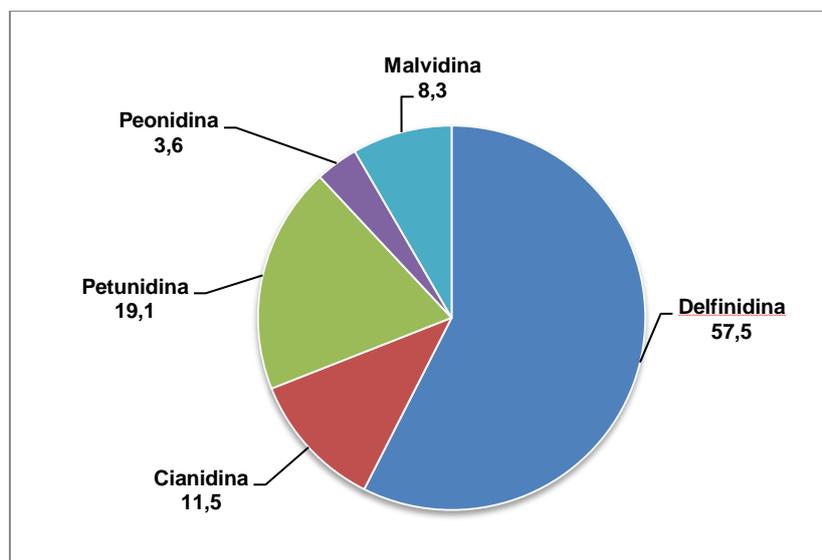


Figura 6 Compuestos antocianos expresados en porcentaje (%).

La quercetina y el ácido caféico son dos compuestos fenólicos ampliamente distribuidos en las especies vegetales y han demostrado tener actividades biológicas tales como efectos antiinflamatorios, antibacteriales, antivirales, antitumorales y antioxidativos (Morones Alba *et al*, 2016). La quercetina y sus derivados han sido documentados como uno de los flavonoides más abundantes de los frutos del calafate. Sin embargo, los valores obtenidos de éste compuesto en las muestras estudiadas (3,6 $\mu\text{mol/g}$) superan 10 veces los cuantificados por Ruiz y col. (2014) (0,32 $\mu\text{mol/g}$), quienes no identificaron la presencia de ácido caféico. No obstante, el mismo ha sido identificado en otros berries en un orden inferior a los cuantificados en nuestro estudio (Häkkinen *et al*, 1999).

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles que en general cumplen funciones en los frutos relacionadas a la polinización y dispersión (García y Carril, 2011). El color azul-púrpura del fruto de *B. microphylla* puede atribuirse a la presencia mayoritaria de delfinidina 3-O-glucosido. Cabe destacar que los tres compuestos mayoritarios

cuantificados en este trabajo fueron los mismos que los detectados por Ruiz y col. (2010). Además, el orden de abundancia aquí obtenido se corresponde con el de dichos autores, delfnidina 3-O-glucosido > petunidina 3-O-glucosido > malvidina 3-O-glucosido.

En zonas áridas y semi-áridas, la selección natural favorece la presencia de especies con baja tasa de crecimiento relativo y alto nivel de defensa para proteger los tejidos. Esto se traduce en un aumento de la síntesis de metabolitos secundarios (Vilela, 2011; Akula y Ravishankar, 2011). La cuantificación de los polifenoles identificados en este trabajo, supera a los detectados por Ruiz para la misma especie. Esto podría deberse a que las muestras del presente estudio provienen de regiones con un marcado estrés abiótico (baja disponibilidad de agua y nitrógeno, alta radiación UV-B, etc.), lo cual ya ha sido documentado por Mariangel y col. (2013).

c. Actividad antioxidante *in vitro* de polifenoles, proteínas y péptidos

Los polifenoles extraídos de la pulpa de *B. microphylla* presentaron una actividad antioxidante de $137,8 \pm 1,9$ μ moles equivalentes de Trolox/g peso fresco y un IC_{50} de 0,26 mg/ml. Ruiz y col. (2010) realizaron estudios de esta actividad en *B. microphylla* procedentes de diferentes lugares de Chile y obtuvieron una media de $74,5 \pm 15,9$ μ moles equivalentes de Trolox/g peso fresco. Cabe destacar que el Maqui, otro berry nativo de Chile reconocido por su actividad antioxidante (Fredes, 2009; Olate, 2008), también fue evaluado por Ruiz y col. (2010), presenta valores de actividad comparables con el calafate. Nuestros resultados superan alrededor de un 85% estos valores documentados. Estas diferencias podrían deberse a la presencia mayoritaria de ácido caféico y quercetina en nuestro extracto. Iacopini y col. (2008) describieron que la actividad antioxidante de los extractos no depende simplemente del TPC, sino de los compuestos fenólicos presentes y las formas en que pueden actuar entre ellos (sinergia o antagonismo). Este comportamiento también fue observado por Boeri y col. (2017) con muestras de otro fruto nativo procedente norpatagonia (*Condalia microphylla*).

Las proteínas y los péptidos (fragmentos de proteínas que se liberan durante la digestión gastrointestinal) procedentes de alimentos como la leche, soja y el huevo, han demostrado tener actividad antioxidante (Elias *et al*, 2008). En este trabajo se demostró que las proteínas conforman una porción representativa de la composición de las semillas y que las mismas pueden ser hidrolizadas en condiciones *in vitro* para la obtención de péptidos. La actividad antioxidante de los péptidos fue 1,2 veces mayor que la del aislado proteico (Tabla 2). Esta diferencia ha sido atribuida a que muchos mecanismos antioxidantes de las proteínas dependen de la composición de sus aminoácidos (por ejemplo, quelación de metales, eliminación de radicales libres, reducción de hidróperóxido, aducción de aldehído). Sin embargo, la actividad antioxidante de los péptidos está limitada por la estructura terciaria de los mismos (Arcan y Yemenicioğlu, 2007). La pérdida de esta estructura, por ejemplo, a través de una hidrólisis enzimática, puede aumentar potencialmente la accesibilidad de los restos de los aminoácidos a las especies oxidativas e incrementar la actividad de las proteínas (Elias *et al*, 2008).

Tabla 2 Actividad antioxidante de las proteínas e hidrolizado gastrointestinal determinada por ABTS. Los valores representan un promedio de tres repeticiones con su Desvío Estándar.

Actividad (µmoles equivalentes de Trolox/ g)*	
Aislado proteico	527,96 ± 0,38 ^a
Hidrolizado gastrointestinal	641,07 ± 12 ^b
p-valor	0,0480

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

4. Propagación

4.1. Tratamientos pregerminativos post-cosecha

Los resultados obtenidos para los parámetros germinativos evaluados se muestran en la Tabla 3. A través del análisis estadístico con ANOVA, se puede observar que, para Capacidad Germinativa (CG), existen diferencias significativas en los tratamientos implementados. La CG obtenida en control, y el incremento de la misma con los demás tratamientos (T3>T1>T2>control), confirma la presencia de dormancia ya documentada para el género por Thakur y col. (2015). Por otra parte, se puede observar que la combinación de diferentes metodologías de escarificación (T3) resultó más efectiva que la aplicación de éstas en forma individual (T2 y T1). Thakur y col. (2015) lograron un 90% de germinación utilizando un solo método de escarificación para *Berberis aristata*. Sin embargo, en este trabajo fue necesario aplicar dos métodos para lograr este porcentaje. Esto podría deberse a que las semillas evaluadas en este trabajo proceden de ambientes semi-áridos y podrían haber desarrollado una dormancia más profunda que si se encontraran en mejores condiciones ambientales (Baskin y Baskin, 1998).

Tabla 3 Resultados de los parámetros de germinación evaluados para *B. microphylla*. Los valores representan un promedio de tres repeticiones con su Desvío Estándar.

Tratamiento	CG (%)*	IVG*
Control	26,6 ± 2,3 ^a	0,7 ± 0 ^a
T1 (física)	56,6 ± 7,07 ^b	2,7 ± 0,3 ^b
T2 (química)	36,6 ± 2,3 ^c	0,8 ± 0,2 ^a
T3 (física + química)	90 ± 4,7 ^d	3,7 ± 0,2 ^b
p-valor	0,003	0,0033

* Superíndices con letras diferentes indican que hay diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (p -valor < 0,05).

Por otro lado, el tratamiento T3 también fue el más eficiente al considerar el Índice de Velocidad Germinativa (IVG). Los tratamientos Control y T2 no presentaron diferencias significativas y mostraron resultados inferiores al obtenido en T3. En este sentido, se evidencia que al combinar ambas estrategias también se optimiza la velocidad de germinación de las semillas.

En la Figura 7 se observa la curva de la Germinación Diaria Acumulada (GDA). Come (1982), documentó que el porcentaje máximo se alcanza en un tiempo determinado y

luego se estabiliza. Los tratamientos T3 y T1 aceleraron el proceso germinativo, ya que en ambos casos se inició a los 4 días de iniciado el ensayo. Sin embargo, las diferencias entre estos tratamientos se observaron a partir del día 12, alcanzando el valor máximo a los 16 días. Cabe destacar que todas las metodologías de escarificación realizadas mejoraron los valores de GDA respecto al control.

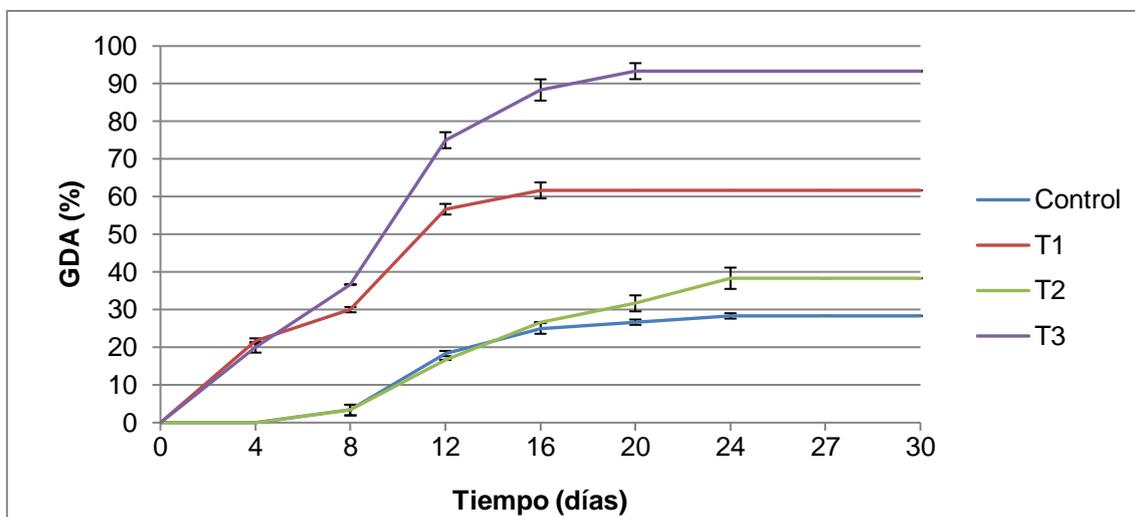


Figura 7 Porcentaje de Germinación Diaria Acumulada para todos los tratamientos durante los 30 días de ensayo. Las barras verticales que atraviesan las curvas representan los valores de Desvío Estándar para cada día de medición.

Respecto a la contaminación de las semillas, todos los tratamientos presentaron colonización fúngica (Figura 8A), siendo en el control y T1 donde se observó un mayor número de semillas contaminadas, 100 y 35%, respectivamente. Los tratamientos T2 y T3 mostraron menor contaminación (13% y 18,3%, respectivamente), lo cual indicaría que el ácido sulfúrico, además de romper la cubierta seminal y facilitar la permeabilidad de las semillas, pudo tener influencia en la desinfección de las mismas. Todos los tratamientos de escarificación mostraron diferencias significativas respecto al control, presentando menores porcentajes de contaminación. Anteriormente, se ha documentado que los tratamientos de escarificación disminuyen los eventos de contaminación de las semillas en relación a los controles (Castillo-Martínez, 2017).

De la evaluación de la supervivencia de las plántulas surge que el tratamiento T1 mostró diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos (66,6% \pm 4,71 de supervivencia). Las plántulas obtenidas fueron transplantadas en primera instancia en macetas con sustrato a base de vermiculita y finalmente, cuando aparecieron las hojas verdaderas, a tierra fértil (Figura 8B). Por otro lado, no se presentaron diferencias significativas entre el control, T2 y T3, cuya supervivencia no superó el 3%. Para los tratamientos que incluyeron ácido sulfúrico (T2 y T3) se observó que el crecimiento de la plántula se detuvo cuando la radícula alcanzó los 3-5 mm de longitud. Esto podría deberse a que la escarificación con un ácido fuerte puede ser un método demasiado abrasivo para el tegumento de la semilla de esta especie. En este sentido, estudios con otras especies mostraron que la escarificación química con ácidos concentrados puede causar daños al embrión y detener el crecimiento de la plántula (Coa Urbaz *et al*, 2004).

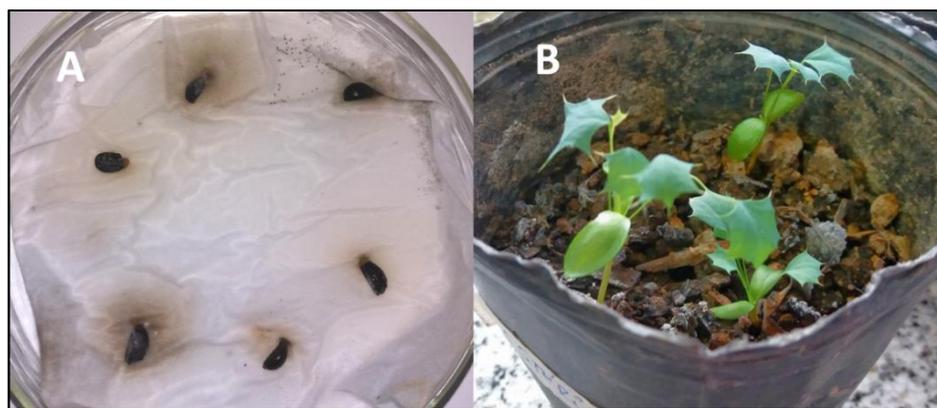


Figura 8 A: contaminación fúngica de las semillas control. B: plántulas del tratamiento T1 en tierra fértil.

Estos ensayos permitieron determinar que las semillas de *B. microphylla* germinan con mayor eficiencia si pasan previamente por un proceso de escarificación (T1, T2 y T3). En este sentido, los mejores resultados se obtuvieron cuando se aplicaron dos metodologías de escarificación (T3). Sin embargo la supervivencia de las plántulas se vio afectada, debido a que este tratamiento resultó muy abrasivo. Teniendo en cuenta esta condición, la escarificación física (T1) es la metodología sugerida para la propagación de la especie.

4.2. Tratamientos pre-germinativos con estratificación fría

En los ensayos anteriores se observó que persistió la contaminación fúngica y que el mejor tratamiento de escarificación fue el del corte del tegumento seminal (T1). Por lo tanto, se modificaron los tratamientos de desinfección y escarificación (ver 4.2 de la metodología). Por otra parte, debido a que la estratificación fría ha sido descrita con resultados satisfactorios para el género, se analizó el efecto de la misma en semillas de *B. microphylla* (Thakur *et al*, 2005; Figueroa, 2003).

Los resultados obtenidos para los parámetros germinativos evaluados en condiciones de estratificación fría, se encuentran en la Tabla 4. El tratamiento 2T1 (frío + físico + inmersión en agua) presentó diferencias significativas respecto al control.

Tabla 4 Resultados de los parámetros de germinación evaluados para *B. microphylla*.

Tratamiento	CG (%)	IVG
Control	8,3 ± 7 ^a	0,683 ± 0,49 ^a
2T1	91,6 ± 7 ^b	16,75 ± 0,94 ^b
p-valor	0,0067	0,0122

* Los valores con superíndices diferentes indican que hay diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (p -valor < 0,05).

La CG y el IVG se incrementaron con el tratamiento (2T1), la CG fue 3 veces superior al control mientras que el IVG fue 24 veces mayor. Resultados similares se han observado por Thakur y col. (2005) para *Berberis aristata*, quienes utilizaron estas metodologías de estratificación y de escarificación. Figueroa (2003), logró incrementar la tasa de germinación aplicando estratificación fría en *Berberis buxifolia*.

El porcentaje de contaminación también se vio mejorado respecto al control, ya que disminuyó la presencia fúngica luego de haber aplicado el tratamiento 2T1 (100 y 20% de

semillas contaminadas, respectivamente). Por otro lado, los resultados mostraron que la supervivencia se vio mejorada con en tratamiento 2T1, ya que con éste se logró el 73,3%, frente al 0% del control. En este último caso, se observó que las semillas germinadas no continuaron su crecimiento luego de que apareciera la contaminación.

En la figura 9 se evidencia que el tratamiento de escarificación aplicado mejoró la germinación respecto al control y a los tratamientos previamente descritos (Ver figura 9), observándose germinaciones a partir del día 1 (31,6%). No obstante, el proceso germinativo se inició durante la inmersión de las semillas en agua, previa a su incubación (Figura 10). El valor máximo de GDA para el tratamiento se obtuvo en el día 4 y fue del 91,6%, un 30% superior al valor obtenido con el tratamiento T1 (escarificación física). En ambos casos, la supervivencia de las plántulas fue del $73,3 \pm 6,6$ %. Cabe destacar que esta metodología evita los problemas de viabilidad asociados al uso del ácido sulfúrico, pese a que se observó una contaminación del 20%.

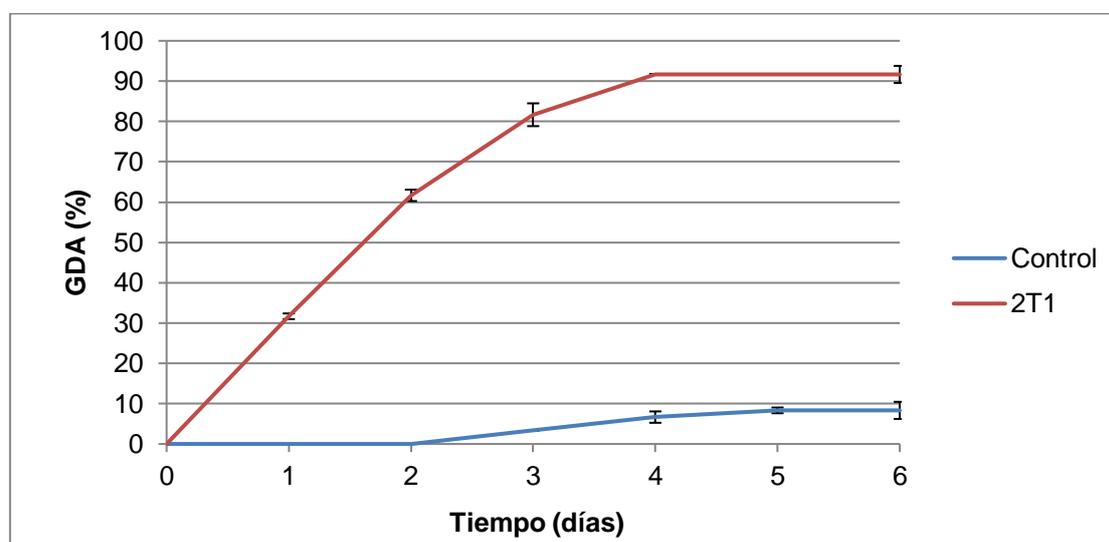


Figura 9 Porcentaje de Germinación Diaria Acumulada para ambos tratamientos durante los 6 días de ensayo. Las barras verticales que atraviesan las curvas representan los valores de Desvío Estándar para cada día de medición.

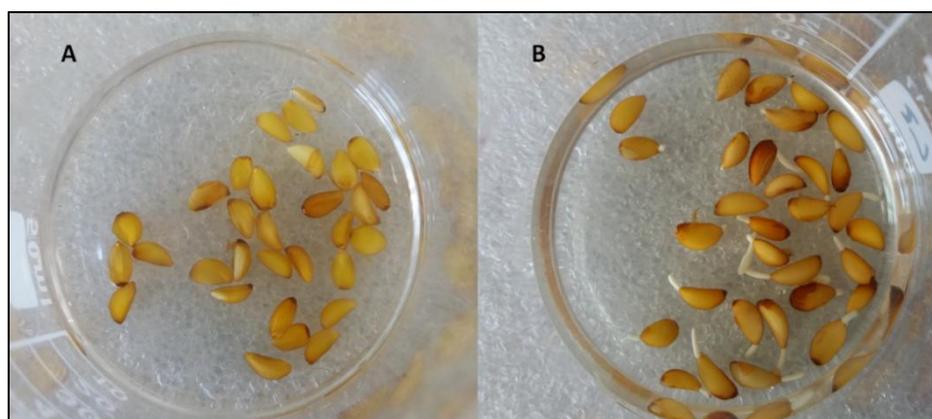


Figura 10 A: semillas sin cubierta seminal antes de ser sumergidas en agua. B: semillas germinadas después de ser sumergidas en agua por 12 horas.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos de la composición nutricional permiten sugerir a los frutos completos de *Berberis microphylla* como una fuente abundante de hidratos de carbono, por lo que podrían considerarse de potencial utilidad para la salud.
- Dado que las semillas aportan el mayor contenido proteico en el fruto, las mismas representan una fuente alternativa de proteínas vegetales. En este sentido, las semillas, en lugar de ser un descarte en la elaboración de productos alimenticios, podrían utilizarse para obtener nuevos productos.
- A partir de una extracción alcalina se obtuvieron proteínas de la semilla, hallándose la mayoría en un rango de pesos moleculares entre 6 y 70 Kda. La digestión dudodenal permitió obtener péptidos de menor peso molecular que la gástrica.
- Tanto el aislado como los hidrolizados proteicos presentan actividad antioxidante, siendo superior ésta última. Así, las proteínas de la semilla constituyen una fuente prometedora de péptidos con actividad antioxidante que podrían ejercer un efecto preventivo contra enfermedades asociadas al estrés oxidativo.
- El ácido caféico y la quercetina fueron los polifenoles predominantes, mientras que la delphinidina 3-O-glucosido fue la mayoritaria para los compuestos antocianos de los metabolitos secundarios estudiados.
- La presencia mayoritaria de delphinidina 3-O-glucosido en la pulpa, sugiere su posible uso como colorante natural.
- La actividad antioxidante de la pulpa de esta especie fue superior a la registrada para la misma en Chile.
- La capacidad antioxidante descrita para el fruto completo le atribuye un efecto preventivo frente a determinadas enfermedades degenerativas y lo presenta como una alternativa alimenticia saludable.
- Debido a que todas los tratamientos pre-germinativos mejoraron las condiciones de germinación, se podría considerar la existencia de dormancia en las semillas de *B. microphylla*. La combinación de estrategias de escarificación física y estratificación fría, resultó ser la metodología más eficiente para su cultivo y aprovechamiento sustentable.
- Los estudios realizados sugieren que el fruto de esta especie constituye una fuente de compuestos bioactivos, pudiendo ser utilizado tanto como suplementos dietarios y/o aditivos alimenticios.
- Esta investigación cobra importancia dado que abordó por primera vez el estudio de *B. microphylla* en la región norpatagónica. Se logró identificar algunos usos potenciales y revalorizar así, esta especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahrendt, L. W. A. (1961). *Berberis* and *Mahonia*: a taxonomic revision. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 57(369), 1-410.
- Akula, R., y Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling y behavior*, 6(11), 1720-1731.
- Andola, H. C., Rawal, R. S., y Bhatt, I. D. (2011). Comparative studies on the nutritive and anti-nutritive properties of fruits in selected *Berberis* species of West Himalaya, India. *Food Research International*, 44(7), 2352-2356.
- Arcan, I., y Yemenicioğlu, A. (2007). Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food Chemistry*, 103(2), 301–312.
- Arcan, I., y Yemenicioğlu, A. (2007). Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. *Food Chemistry*, 103(2), 301-312.
- Arena, M. E. (2017). Estudio de algunos fenómenos morfofisiológicos y cambios bioquímicos en *Berberis microphylla* G. Forst. (sinónimo *B. buxifolia* Lam.) asociados a la formación y maduración de frutos en Tierra de Fuego y su relación con la producción de metabolitos útiles. Tesis doctoral en Agronomía. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina.
- Arena, M. E., Postemsky, P. D., y Curvetto, N. R. (2017). Changes in the phenolic compounds and antioxidant capacity of *Berberis microphylla* G. Forst. berries in relation to light intensity and fertilization. *Scientia horticulturae*, 218, 63-71.
- Arena, M. E., Zuleta, A., Dyer, L., Constenla, D., Ceci, L., y Curvetto, N. (2013). *Berberis buxifolia* fruit growth and ripening: evolution in carbohydrate and organic acid contents. *Scientia Horticulturae*, 158, 52-58.
- Assessment, M. E. (2003). Conceptual framework (pp. 1-25). Washington, DC, *Island Press*.
- Association of Official Analytical Chemists. (1990). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists* (Vol. 1). The Association.
- 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.
- Baskin, C. C., y Baskin, J. M. (1998). Seeds: ecology, biogeography, and, evolution of dormancy and germination. *Elsevier*.
- Boeri, P., Piñuel, L., Sharry, S., Tombari, A., y Barrio, D. (2017). Chemical and Biological Characterization from *Condalia microphylla* Fruits, a Native Species of Patagonia Argentina.
- Bottini, María Cecilia J.. (2000). Estudios multidisciplinarios en las especies Patagónicas Argentinas del género *Berberis* L. (*Berberidaceae*). *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3284_Bottini.pdf

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Breppe, S., y Laura, A. (2014). Desertification in Patagonia. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Córdoba.
- Carretero, E. M. (1992). Recursos naturales, biodiversidad, conservación y uso sustentable. *Multequina*, 1, 11-18.
- Carrillo, León, Carpio, Albán, Vinuesa y Pilamunga. (2017). In vitro susceptibility digestion of Tocte (*Juglans neotropica* Diels) proteins concentrate, a walnut from Ecuador. *International Food Research Journal*. In Press.
- Castillo-Martínez, C. R. (2017). GERMINACIÓN *in vitro* DE SEMILLAS DE *Cedrela odorata* L. DE GENOTIPOS EXTINTOS. *AgroProductividad*, 10(8).
- Cattaneo, F., Sayago, J. E., Alberto, M. R., Zampini, I. C., Ordoñez, R. M., Chamorro, V., ... y Isla, M. I. (2014). Anti-inflammatory and antioxidant activities, functional properties and mutagenicity studies of protein and protein hydrolysate obtained from *Prosopis alba* seed flour. *Food Chemistry*, 161, 391-399.
- Chaum, S. y C. Kirdmanee. 2009. Effect of salt stress on proline accumulation, photosynthetic ability and growth characters in two maize cultivars. *Pak. J. Bot.* 41: 87-98.
- Chaum, S. y C. Kirdmanee. 2009. Effect of salt stress on proline accumulation, photosynthetic ability and growth characters in two maize cultivars. *Pak. J. Bot.* 41: 87-98.
- Coa Urbaez, M., Mendez Natera, J. R., Silva Acuña, R., y Mundarain Padilla, S. (2014). Evaluación de métodos químicos y mecánicos para promover la germinación de semillas y producción de fosforitos en café (*Coffea arábica*) var. Catuaí Rojo. *Idesia (Arica)*, 32(1), 43-53.
- Come, D. 1982. Germination In: Mazliak, P. (ed.). Croissance et developpement. Collection méthodes. Paris, France. pp. 129-225
- Csepregi, K., Kocsis, M., & Hideg, É. (2013). On the spectrophotometric determination of total phenolic and flavonoid contents. *Acta Biologica Hungarica*, 64(4), 500-509.
- Del Valle, H.F., N.O. Elissalde, D.A. Gagliardini y J. Milovich. 1998. Status of desertification in the Patagonian region: Assessment and mapping from satellite imagery, *Arid Soil Research and Rehabilitation* 12 (2): 95-121.
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos tropicales*, 31(1), 00-00.
- Dubois, M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P. y Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (3): 350-356.
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., y Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(5), 430-441.
- Figueroa, J. A. (2003). Seed germination in temperate rain forest species of southern Chile: chilling and gap-dependency germination. *Plant Ecology*, 166(2), 227-240.

- Fredes, C. (2009). Antioxidantes en berries nativos chilenos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 8(6).
- García, A. Á., y Carril, E. P. U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).
- García, F. P., y Villamil, J. M. P. (1999). Dormición de semillas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Glories, Y. (1978). Recherche sur la matière colorante des vins rouges. Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux II.
- González Enei, G. (2009). Libro de valorización: resultados y lecciones en productos agroindustriales ricos en antioxidantes, a base de berries nativos.
- Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkänen, H. M., y Törrönen, A. R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(6), 2274-2279.
- Harper, J. L., y White, J. (1970). The dynamics of plant populations. In Proc. Adv. Study Inst. *Dynamics Numbers Popul.*(Oosterbeek) (pp. 41-63).
- Hernández Domínguez, S. V. (2012). Relación entre la capacidad antioxidante y composición fenólica en vinos tintos del cv. carmenere.
- Iacopini, P., Baldi, M., Storch, P., and Sebastiani, L. (2008). "Catechin, Epicatechin, quercetin, Rutin and Resveratrol in Red Grape: Content, in Vitro Antioxidant Activity and Interactions." *Journal of Food Composition and Analysis* 21 (8): 589-98.
- Indrayan, A. K., Sharma, S., Durgapal, D., Kumar, N., y Kumar, M. (2005). Determination of nutritive value and analysis of mineral elements for some medicinally valued plants from Uttaranchal. *Current science*, 1252-1255.
- Khan, I., Najeebullah, S., Ali, M., y Shinwari, Z. K. (2016). Phytopharmacological and ethnomedicinal uses of the Genus *Berberis* (Berberidaceae): A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15(9), 2047-2057.
- Khurana, E., y Singh, J. S. (2004). Germination and seedling growth of five tree species from tropical dry forest in relation to water stress: impact of seed size. *Journal of Tropical Ecology*, 20(4), 385-396.
- 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.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685.
- Landrum, L. R. (1999). Revision of *Berberis* (Berberidaceae) in Chile and adjacent southern Argentina. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 793-834.
- León, R. J., Bran, D., Collantes, M., Paruelo, J. M., y Soriano, A. (1998). Grandes unidades de vegetación de la Patagonia extra andina. *Ecología Austral*, 8(2), 125-144.
- Madrigal, L. S. G., Torres, E. F. M., y Rivera, J. Á. M. (2014). Bioprospección y sustentabilidad participativa: una mirada desde el derecho de la biodiversidad. *Ciencia Jurídica*, 3(5), 7-24.

- Maguire, J. D. (1962). Speed of Germination—Aid In Selection And Evaluation for Seedling Emergence And Vigor 1. *Crop science*, 2(2), 176-177.
- Mariangel, E., Reyes-Díaz, M., Lobos, W., Bensch, E., Schalchli, H., y Ibarra, P. (2013). The antioxidant properties of calafate (*Berberis microphylla*) fruits from four different locations in southern Chile. *Cien. Inv. Agr.* 40 (1): 161-170. *Ciencia e Investigación Agraria*, 40(1), 161-170.
- Morones Alba, J. D., Macías Hernández, S. I., López, V., Cleva, G., y Aragón Flores, M. (2016). Efecto antiinflamatorio del ácido cafeico sobre la pulpitis en un modelo experimental en Cobayos. *Revista de la Asociación Dental Mexicana*, 73(5), 250-254.
- Martínez, E. N., & Añón, M. C. (1996). Composition and structural characterization of amaranth protein isolates. An electrophoretic and calorimetric study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(9), 2523-2530.
- Nakagawa, J. 1999. En: Teste de vigor baseados no desempenho das plântulas. Nakagawa, J., F.C. Krzyzanowski, R.D. Vieira y J.D.B. França Neto (Eds.). Londrina: *Abrates* (2): 1-21.
- Olate, V. (2008). Estudio químico y actividad antioxidante de los antocianos presentes en los frutos de maqui. *Universidad de Talca*, Chile.
- Orsi, M. C. (1976). Sinopsis de las especies Argentinas del genero *Berberis* (Berberidaceae). (Synopsis of the Argentine species of the genus *Berberis* (Berberidaceae)). *Bol. Soc. Argent. Bot*, 17(1-2), 127-149.
- Oyarzabal, M., Clavijo, J., Oakley, L., Biganzoli, F., Tognetti, P., Barberis, I., ... y Oesterheld, M. (2018). Unidades de vegetación de la Argentina. *Ecología Austral*, 28(1), 040-063.
- Pattanagul, W. y M. Thitisaksakul. 2008. Effect of salinity stress on growht and carbohydrate metabolismo in tree rice (*Oriza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. *Indian. J. Exp. Biol.* 46: 736-742.
- 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.
- Pérez, M.J., A.S. Cuello, I.C. Zampini, R.M. Ordoñez, M.R. Alberto, C. Quispe, G. Schmeda-Hirschmann y M.I. Isla. 2014. Polyphenolic compounds and anthocyanin content of *Prosopis nigra* and *Prosopis alba* pods flour and their antioxidant and anti-inflammatory capacity, *Food Res. Int.* Vol 64: 762-771.
- Petiard, V., y Steck, P. (1987). Industrial Applications of Plant Cell Cultures: Metabolite Production. In *Perspectives in Biotechnology* (pp. 139-153). *Springer*, Boston, MA.
- Quezada, F., W. Roca, M.T. Szauer, J.J. Gómez y R. López. 2005. Biotecnología para el uso sostenible de la biodiversidad. Capacidades locales y mercados potenciales. Editorial: *Unidad de Publicaciones de la CAF*. 126 pp.
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76-89.

- 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.
- Rocha, P. 2009. Propuesta para el Fortalecimiento de la Capacidad Nacional de Bioprospección con el uso de Herramientas Biotecnológicas, en áreas de interés para el desarrollo de Productos con Impacto Comercial. Departamento Nacional de Planeación, Colombia.
- Ruiz, A., Hermosin-Gutierrez, I., Mardones, C., Vergara, C., Herlitz, E., Vega, M., ... y von Baer, D. (2010). Polyphenols and antioxidant activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 6081-6089.
- Ruiz, A., Mardones, C., Vergara, C., Hermosín-Gutiérrez, I., von Baer, D., Hinrichsen, P., ... y Dominguez, E. (2014). Analysis of hydroxycinnamic acids derivatives in calafate (*Berberis microphylla* G. Forst) berries by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1281, 38-45.
- Sánchez Salas, J., Muro Pérez, G., Flores Rivas, J. D., Jurado Ybarra, E., y Sáenz Mata, J. (2015). Los bancos de semillas y su germinación en ambientes semiáridos. *Ciencia UANL*, 18(73), 70-76.
- Schägger, H. (2006). Tricine-sds-page. *Nature protocols*, 1(1), 16.
- Showalter, A.M., J.N. Bell, C.L. Cramer, J.A. Bailey, J.E. Varner y C.J. Lamb. 1985. Accumulation of hydroxyproline-rich glycoprotein mRNAs in response to fungal elicitor and infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (19): 6551-6555.
- Siringam, K., N. Juntawong, S. Cha-um, T. Boriboonkaset y C. Kirdmanee. 2012. Salt tolerance enhancement in indica rice (*Oryza sativa* L. spp. indica) seedlings using exogenous sucrose supplementation. *Plant Omics* 5 (1): 52.
- Siringam, K., N. Juntawong, S. Cha-um, T. Boriboonkaset y C. Kirdmanee. 2012. Salt tolerance enhancement in indica rice (*Oryza sativa* L. spp. indica) seedlings using exogenous sucrose supplementation. *Plant Omics* 5 (1): 52.
- Somers, T. C., & Ziemelis, G. (1985). Spectral evaluation of total phenolic components in *Vitis vinifera*: Grapes and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(12), 1275-1284.
- Somogyi, M. (1952). Determination of reducing sugars by Nelson-Somogyi method. *J. Biol. Chem*, 200, 245.
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S., y Gerós, H. (2013). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International journal of molecular sciences*, 14(9), 18711-18739.
- Thakur, A. S., Thakur, P. S., y Mehta, R. I. C. H. A. (2005). Effect of pre-sowing treatments on seed germination in *Berberis aristata*. *Indian Journal of Plant Physiology*, 10(4), 338.

Trejo-Tapia, G., y 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. En: Mejoramiento genético, selección y manejo de fuentes semilleras y de semillas forestales, Unidad 3: Recolección y manejo de semillas forestales. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 152 pp.

Ureña M., Encina, C. 2007. Determinación de la máxima retención de ácido ascórbico de la conserva de Aguaymanto en almíbar aplicando el método Taguchi. Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria. Lima, Perú.

Urquieta, C. A. P. (2010). Evaluación de la viabilidad polínica de cuatro especies pertenecientes al género *Berberis* L.(Berberidaceae) (Doctoral dissertation, Thesis, Chile University).

Varela, S. A., y Arana, V. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. *Sistema Forestal Integrado*, 1-10.

Varela, S. A., y Arana, V. (2011). Latencia y germinación de semillas. Tratamientos pregerminativos. *Sistema Forestal Integrado*, 1-10.

Vilela, A. E., González-Paleo, L., y Ravetta, D. A. (2011). Metabolismo secundario de plantas leñosas de zonas áridas: mecanismos de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento. *Ecología austral*, 21(3), 317-327.

Villagra, P. E., Giordano, C., Alvarez, J. A., Bruno Cavagnaro, J., Guevara, A., Sartor, C., ... y Greco, S. (2011). Ser planta en el desierto: estrategias de uso de agua y resistencia al estrés hídrico en el Monte Central de Argentina. *Ecología austral*, 21(1), 29-42.