



Universidad Nacional de la Patagonia
San Juan Bosco

Facultad de Ciencias Naturales

Maestría en Ciencias con mención en Química de Productos Naturales

**Tesis para la obtención del título de Maestría en Ciencias
con mención en Química de Productos Naturales**

**“Cultivo *in vitro* de *Baccharis darwinii*:
Una estrategia biotecnológica para la obtención de
metabolitos secundarios de interés farmacológico”**

Alumna

JUAREZ, M. Jimena

Directora de tesis

MSc. Susana G. Perales

Asesora

MSc. Ana María Berastegui

Me gustaría agradecer en estas líneas la ayuda que muchas personas y colegas me han ayudado durante el proceso de investigación y redacción de este trabajo.

En primer lugar:

Agradezco a Dios por bendecirnos, por la vida, por guiarnos a lo largo de nuestra existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

Mis sinceros agradecimientos a mi profesoras tutoras MSc. Susana G. Perales y MSc. Ana María Berastegui.

Susana, gracias por todo lo entregado durante estos años, por tu paciencia, dedicación y por tu constante apoyo. Gracias por obligarme a movilizarme, por tu rigurosidad, tu disposición y tu comprensión y tu perdón en mis caídas, nunca hubiera llegado a esto sin vos como directora, GRACIAS.

Gracias Ana María, por ayudarme en los momentos que no podía viajar, por tu apoyo en el cultivo para que pudiera continuar el trabajo, no lo hubiera logrado sin tu ayuda.

A mi esposo, Alejandro: En el camino hay personas que iluminan tu vida, que con su apoyo alcanzas de mejor manera tus objetivos. Porque nunca me faltó su apoyo, aunque a veces no entendiera hacia donde iba, sus consejos, su amor, paciencia y acompañamiento fue indispensable para llegar hasta acá.

A mis hijas, Cata e Isa, que a pesar de su corta edad entendieron las ausencias de mamá para estudiar, espero que algún día pueda compensar todos los momentos que les robé.

No podía faltar mi mayor agradecimiento a mis papás que me han ayudado y apoyado en todo. Desde el momento que, a los 9 años, decidí que quería seguir el camino de la "Ciencia". A mi mamá por estar siempre, por viajar y cubirme cada vez que me tenía que ausentar para poder ir a Comodoro y por su tan temida pregunta de siempre "Cuanto falta para terminar la Tesis?" A mi papa por su apoyo y por haberme orientado en todos los momentos que necesité sus consejos. A Mis hermanos Belu y Manu, por su cariño, consejos y por alentarme siempre.

A mis Suegros, Alejandra y Daniel, por su apoyo y acompañamiento, y sobre todo por sus oraciones.

Gracias a mi amiga Flor y a su esposo Gabriel, y a sus hijos José Ignacio, Juan Manuel y María Victoria, por darme cobijo cada vez que estuve en Comodoro, por su apoyo y ayuda para que yo pueda hacer y terminar la Tesis, por su amistad y cariño, por ser mi Familia en Comodoro. Por estar Siempre a pesar de los kilómetros.

A la Familia Müller, Gabi, Guille, Nica, Astrid y Agus la familia extendida que me regalo Dios, gracias por regalarme su amistad, cariño y también un lugar en su casa cuando lo necesité.

También quiero agradecer a la Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, directivos y profesores por la organización del programa de Maestría en Ciencias, por darnos la oportunidad de poder acceder a una formación superior a pesar de la distancia.

A la Dra. Susana Risso, por siempre estar atenta a mis inquietudes y solicitudes.

A la Dra. Mónica Freile, Directora de la carrera, por su apoyo y sugerencias.

Al departamento de Biología y Ambiente de la Universidad, donde pude llevar a cabo el trabajo de investigación.

Agradezco también a los integrantes de la comisión evaluadora de mi tesis, gracias por su apoyo, su excelente disposición.

A Mi jefe en la FAA, Com. Aldo A. Trebino, por darme el tiempo y el espacio para poder realizar este trabajo. Y a mis compañeros de trabajo y amigos, Cesar, Daniel, Gustavo, Mariana, Raúl y Rubén por su apoyo y por los momentos compartidos.

Gracias a mis compañeros de Maestría: Karina, Marisa y Agustín por su invaluable ayuda, por los momentos compartidos, por los audios y apuntes, por sus consejos y apoyo. Espero que pronto todos puedan llegar a esta etapa.

Gracias a mis amigas/os del alma, las/os que sacaron carcajadas y se alegraron con mis alegrías y también me prestaron su hombro cuando hubo dificultades.

RESUMEN

Las plantas medicinales y aromáticas han sido empleadas por diferentes grupos poblacionales humanos y utilizadas por centurias en la industria farmacéutica.

Numerosos estudios de especies del género *Baccharis* mostraron actividad antimicrobiana, antioxidante y anti-inflamatoria. *Baccharis darwinii* Hook & Arn., en particular, una especie nativa del cono sur y distribuida en casi todas las provincias del territorio Argentino, ha sido incluida en un proyecto global de búsqueda de nuevos compuestos con actividad antifúngica y antioxidante

El uso de procesos biotecnológicos, uno de ellos, la producción vegetal en masa a través de la micropropagación constituye una alternativa promisoría para el desarrollo de nuevos fármacos. Esta técnica *in vitro* se afianza como una interesante alternativa para la producción de metabolitos con actividad farmacológica, al garantizar una fuente estable y uniforme de principios activos en plantas obtenidas bajo condiciones controladas.

El objetivo de este trabajo fue establecer y cultivar *in vitro* plantas de *Baccharis darwinii*. Para establecer este cultivo *in vitro* se evaluaron dos fuentes: Segmentos nodales y semillas.

La viabilidad de las semillas es un aspecto crítico en el establecimiento del cultivo *in vitro*. Con el fin de evaluar la emergencia y el efecto de distintas técnicas de desinfección sobre su viabilidad, se determinó el porcentaje de germinación de dos poblaciones de semillas colectadas en diferentes tiempos (2007/2008 y 2015) de *B. darwinii*, y se ensayaron tres tratamientos pre-germinativos para iniciación del cultivo *in vitro*.

En cuanto a los segmentos nodales obtenidos de plantas nativas crecidas en campo. Se escindieron brotes jóvenes con yemas apicales y axilares y posterior a su desinfección fueron cultivados en tubos de ensayo con medio MS. Se evaluó el número de Yemas desarrolladas, largo de los brotes y desarrollo de raíces.

Una vez obtenido el establecimiento de los cultivos, en el proceso de multiplicación fueron ensayados cuatro combinaciones de reguladores de crecimiento

y analizado el número de yemas desarrolladas, largo de brotes y el desarrollo de raíces de las plantas como variables de respuestas a los tratamientos.

El éxito o el fracaso de todo el proceso de micropropagación dependen de la aclimatación. Para evaluarla fueron seleccionadas 20 de las plantas de *Baccharis darwinii* crecidas *in vitro* y transferidas a turba: perlita (1:3) durante 67 días. Se evaluó la supervivencia de las plántulas y la longitud del tallo durante este periodo.

En el proceso germinativo se registraron diferencias significativas entre los métodos de desinfección. En el mejor tratamiento pre-germinativo, en presencia de luz, se obtuvo un 31,7% de semillas germinadas.

Una vez establecido los cultivos, la tasa máxima de multiplicación obtenida fue $(3,23 \pm 1,18)$ con la combinación de BAP: IBA ($6,7 \mu\text{M}$: $0,73 \mu\text{M}$). Hubo una interacción significativa ($p < 0,05$) entre los reguladores y el MS basal, utilizado ($p < 0,05$; $G=3$). La mejor respuesta rizogénica se obtuvo con medio de cultivo Gamborg ($G:12,409$; $p < 0,05$; $G=2$) libre de fitohormonas (84% de los explantes formaron raíz).

Durante la rustificación, la supervivencia en invernadero fue del 94% de plantas viables.

La presión del ambiente, con sus factores bióticos y abióticos influye de manera diferente en cada planta generando un cambio en su metabolismo, lo que se manifiesta en una modificación de su perfil fitoquímico. En nuestro trabajo la evaluación mediante cromatografía en capa delgada (TLC) de los distintos extractos metanólico, etéreo, diclorometanólico y acuoso, presentaron un patrón de bandas de compuestos bioactivos similares para las distintas muestras. Sin embargo se observaron algunas variaciones en la cantidad de compuestos producidos entre las plantas generadas *in vitro* y nativas lo que hace suponer que el método de cultivo tuvo influencia en el metabolismo secundario de esta especie. Lo que nos permitiría, mediante la utilización de esta técnica, modificar la producción de metabolitos que resulten de interés para la industria farmacéutica.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. CONSIDERACIONES GENERALES.....	8
1.2. ANTECEDENTES.....	10
1.2.1 .LA FAMILIA ASTERACEAE.....	10
1.2.2. EL GÉNERO <i>BACCHARIS</i> .	11
1.2.3. <i>BACCHARIS DARWINII</i>	15
1.2.4. MICROPROPAGACIÓN.....	16
1.2.4.1. FASES DE LA MICROPROPAGACIÓN.....	17
1.2.4.2. MEDIOS DE CULTIVO.....	20
1.2.4.3. CONDICIONES DE INCUBACIÓN.....	23
1.2.4.4. APLICACIONES Y VENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN.....	23
1.2.4.5. MICROPROPAGACIÓN DE <i>BACCHARIS</i>	24
2. MOTIVACIONES Y OBJETIVOS.....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1. AISLAMIENTO Y ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS.....	28
3.1.1. PROTOCOLO DE CULTIVO Y ASEPSIA A PARTIR DE SEMILLAS.....	28.
3.1.2. PROTOCOLO DE CULTIVO A PARTIR DE TALLOS.....	29
3.2. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS Y MULTIPLICACIÓN Y ENRAIZAMIENTO.....	29
3.2.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS DEL ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN.....	32
3.3. ENRAIZAMIENTO.....	32
3.4. ACLIMATACION <i>IN VIVO</i>	33

3.5. COMPARACION MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN PLACA DELGADA DE EXTRACTOS DE <i>B. DARWINII</i>	34
4. RESULTADOS	37
4.1 ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> :	
4.1.1. SEMILLAS.....	37
4.1.2. ESQUEJES MULTINODALES.....	39
4.2. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS Y MULTIPLICACION.....	47
4.3. ENRAIZAMIENTO.....	50
4.4. ACLIMATACIÓN.....	52
4.5. COMPARACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN PLACA DELGADA DE EXTRACTO DE <i>B.DARWINII</i>	56
5. DISCUSIÓN.	63
6. CONCLUSIONES.....	71
7. BIBLIOGRAFÍA	72
8. ANEXOS	90

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONSIDERACIONES GENERALES

La Organización Mundial de la Salud (OMS) describe una planta medicinal a aquella planta que, en uno o más de sus órganos, contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o preventivos o que son precursoras para la semisíntesis químico-farmacéutica. A lo largo de la historia las plantas han sido tradicionalmente empleadas como una fuente natural en alimentación humana y animal, en la industria farmacéutica y como materia prima para la producción de sustancias de uso industrial (Cardoso J.C., Oliveira y Cardoso F., 2019). Se estima que cerca del 10% de las aproximadamente 50.000 especies de plantas conocidas son utilizadas en la fitoterapéutica (Jamshidi-Kia *et al.*, 2017). Además, de las drogas presentes en la farmacopea moderna, alrededor de un 25%, son derivados de plantas (fitomedicina) y otras son análogos sintéticos construidos a partir de compuestos naturales (Rao y Kaladhar, 2014; Edrah *et al.*, 2016). Las plantas, constituyen una importante fuente de recursos naturales en todo el planeta y su estudio, aislamiento, cultivo y extracción de metabolitos secundarios presenta ventajas notables

El género *Baccharis* ha sido vastamente estudiado desde el punto de vista fitoquímico (Bohlmann *et al.*, 1985) exhibiendo una gran variedad de constituyentes de interés para la industria farmacéutica (Gene *et al.*, 1996; Mongelli *et al.*, 1997; Budel *et al.*, 2018). La actividad biológica y farmacológica de varios compuestos pertenecientes a especies del género fueron analizados en los últimos años poniendo de manifiesto su potencial (Verdi *et al.*, 2005, Heiden y Pirani, 2016; Ramos Campos, 2016).

La mayor parte de los compuestos de plantas que han presentado una actividad biológica de interés, pertenecen al conjunto de entidades químicas denominadas metabolitos secundarios. Sin embargo, estos productos naturales no son sintetizados en todos los órganos de las plantas y su concentración, en general,

es baja, condicionada por las condiciones ambientales (Dewick, 2009), por lo que la utilización de plantas para la producción de fitoterapéuticos tiene sus limitaciones.

Las técnicas de cultivo *in vitro*, están siendo empleadas como una herramienta biotecnológica efectiva para modificar la producción de metabolitos secundarios en cultivos de células o tejidos de plantas. El desarrollo de un protocolo de propagación masiva de plantas medicinales, ha contribuido a su conservación y facilitó su cultivo en aquellas que mostraron interés comercial (Pant, 2014).

La micropropagación vegetativa *in vitro* consiste en el cultivo de un tejido vejetativo o reproductivo sobre un medio nutritivo, donde se optimizan las condiciones ambientales, en lo que se refiere a los factores físicos, nutricionales y hormonales, en condiciones estériles (Segovia *et al.*, 2002; Perales *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2018). Algunas de sus ventajas son: a) introducción rápida de nuevas variedades o clones que proporcionarían altos coeficientes de multiplicación de la especie de interés, b) obtención de plántulas genéticamente idénticas a la planta madre (clones) en condiciones estériles; c) permite manipular volúmenes elevados de plantas en cortos periodos de tiempo e independizarse de las condiciones ambientales para el cultivo. De esta forma es posible utilizar la micropropagación para especies en peligro de extinción, ornamentales, alimenticias, o medicinales, la conservación de germoplasma de especies deseables y facilitar la generación de plantas que sintetizen sustancias de interés para la industria (farmacéutica, alimenticia, agrícola, etc), cuya producción por métodos convencionales resulta difícil, escasa o económicamente poco viable (Segovia *et al.*, 2002; Perales *et al.*, 2008; Bremer, 1994; Srivastava *et al.*, 1996; García *et al.*, 2017). Los cultivos vegetales no siempre producen sustancias cualitativa y cuantitativamente iguales a las elaboradas por las plantas crecidas en su ambiente natural. La producción y el perfil de compuestos químicos de interés pueden variar, debido a que la planta madre tiene un entorno bioquímico, fisiológico y ambiental diferente al de las plantas que crecen en medios de cultivo con agar o líquidos

(DiCosmo, 1985). Por lo tanto, muchas moléculas complejas del metabolismo secundario producidas por las plantas en su *ambiente natural* pueden no estar presentes en las plantas desarrolladas *in vitro*. La calidad, concentración y combinación de reguladores de crecimiento, nutrientes y fuentes de carbono en el medio de cultivo tiene influencia directa sobre la velocidad de crecimiento y en la producción de un metabolito específico (Verpoorte y Memelink, 2002).

La distribución natural del género *Baccharis spp.* está asociada a ambientes áridos de Patagonia y registra antecedentes de uso medicinal por pobladores de la región. Con el objetivo de estudiar estrategias reproductivas se aplicaron técnicas de germinación y cultivo *in vitro* de plantas nativas de *Baccharis darwinii*.

El objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones óptimas de cultivo *in vitro* de *Baccharis darwinii* Hook & Arn para la producción de metabolitos con posible actividad farmacológica.

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1. LA FAMILIA ASTERACEAE

La familia *Asteraceae*, constituye el grupo vegetal más diverso de plantas vasculares sobre el planeta (Bremer, 1994; García, *et al.*, 2017). Se estima que dicho grupo taxonómico agrupa a más de 1.500 géneros y aproximadamente 25.000 especies. Su distribución es amplia, desde Provincia del Cabo (Sudáfrica), Sur de América, Australia, Región Mediterránea, Rusia y Estados Unidos (Laboratorio de Sistemática de plantas vasculares, 2013). Actualmente dentro de las *Asteraceae* se reconocen diez subfamilias (APG web, 2021). Las *Asteraceae* son especialmente abundantes en regiones semiáridas, tropicales y subtropicales (Cabrera *et al.*, 2000; Funk, Stuessy y Robinson, 2009). En su mayoría son herbáceas pero pueden encontrarse formas arbustivas, enredaderas y algunas especies arbóreas. En Argentina se reconocen aproximadamente 1.490 especies, de las cuales 387 son endémicas (Zuloaga y Belgrano, 2015). Entre los géneros más importantes de la familia *Asteraceae* se encuentran: *Senecio* (1.250 especies), *Vermonia* (1.000),

Cousinia (650), *Eupatorium* (600), *Centaurea* (600), *Artemisia* (550) y *Baccharis* (500) (Verdi *et al.*, 2005, Giuliano, 2014).

Las plantas pertenecientes a esta familia se caracterizan por presentar, frutos secos denominados cipselas (bicarpelares) en las cuales los sépalos se encuentran profundamente modificados, formando un papus o vilano de cerdas o pelos (Marzinek *et al.*, 2008). La raíz es axonomorfa, el tallo es generalmente cilíndrico, raramente alado. Las hojas son simples o compuestas, de formas muy variadas, enteras o hendidas, de disposición alterna, opuesta y alterno opuesta y menos frecuente verticilas (Barroso, 1991; Joly, 1998; Roque y Bautista, 2008; Souza y Lorenzi, 2008). Las flores se disponen estrechamente apretadas en una inflorescencia denominada “capítulo”, pudiendo ser capítulos solitarios en el ápice del pedúnculo floral, o bien estar dispuestos en una inflorescencia compuesta.

1.2.2. EL GÉNERO BACCHARIS

El origen del nombre *Baccharis* (Bakkharis) proviene del griego y es una antigua denominación en honor a Baco, dios del vino, para algunas plantas arbustivas. El término hace referencia al olor a especias de las raíces de una planta (que luego fue llamada “Valeriana celta”). En la antigüedad las especias eran consumidas de forma conjunta con el vino (Kissmann Groth, 1999). El género *Baccharis* (Familia *Asteraceae*, tribu: *Astereae*, subtribu: *Baccharinae*) se desarrolla en el continente americano, desde Canadá hasta la parte austral de Argentina y Chile, siendo constituido por entre 400 y 500 especies (Abad y Bermejo, 2007; Müller, 2013).

El 90% de las especies habitan en América del Sur, aunque se distribuyen prácticamente por todo el continente (Boldt, 1989; Müller, 2006). En Argentina se han registrado 96 especies del género (Giuliano, 2000; Giuliano y Freire, 2011; Giuliano, 2014).

Las especies del género *Baccharis* generalmente son arbustos que miden en promedio 0,5 a 4,0 m. de altura (Verdi *et al.*, 2005; Ramos Campos, 2016), aunque se extiende también a plantas perennes herbáceas y

subarbustos. La mayoría de las plantas de *Baccharis* se pueden distinguir por su hoja o tallo alado, las hojas son morfológicamente diferentes y ayudan a la identificación (Jasinski *et al.*, 2014). Además todas las hojas de las especies se caracterizan por ser pubescentes (Freire *et al.*, 2007).

Conocidas por los principios químicos que poseen, las especies del género *Baccharis* tienen un uso más o menos intensivo en medicina popular y han sido objeto de gran cantidad de estudios fitoquímicos y de actividad biológica (Verdi *et al.*, 2005).

Son diversos los trabajos publicados que confirman el potencial medicinal de las plantas pertenecientes al género *Baccharis*. Sustancias aisladas y extractos fueron evaluados y demostraron poseer actividad antiinflamatoria (Florão *et al.*, 2012; Paul *et al.*, 2009), antibacteriana (Betoni *et al.*, 2006; Vivot *et al.*, 2012), antifúngica (Lupi *et al.*, 2009; Fabri *et al.*, 2011; Vannini *et al.*, 2012), antiprotozoario (Luize *et al.*, 2005), antioxidante (Borgo *et al.*, 2010; De Toledo Dias *et al.*, 2009; Mendez *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2004; de Cruz Pádua *et al.*, 2010), antiproliferativa y mutagénica (De Pinho *et al.*, 2010; Fachinetto y Tedesco, 2009; Rodrigues *et al.*, 2009), antiobesidad (Souza *et al.*, 2012), anticancerígena (De Oliveira *et al.*, 2013), antiproteolítica y antihemorrágica (Januário *et al.*, 2004), antidiabético (Oliveira *et al.*, 2005), antisecretor (Biondo *et al.*, 2011), efectos toxicológicos (Grance *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2011; Padín *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2009), y alelopático (Xavier *et al.*, 2012). En la tabla 1, se enumeran las actividades biológicas y constituyentes químicos descritos en varias especies del género *Baccharis*.

TABLA 1: Actividades biológicas y constituyentes químicos descritos en varias especies de género *Baccharis*.

Especie	Extracto activo, fracción o compuesto aislado	Actividad	Referencia
<i>B. darwinii</i>	Cumarinas	Antifúngico	Kurdelas <i>et al.</i> , 2010
<i>B. subulata</i>	Ext. acuoso	Anti-inflamatorio	Dávalos, Jiménez y Almanza, 2007
	Ext. hexánico, diclorometano, etanólico y acuoso	Anti-inflamatorio	Abad <i>et al.</i> , 2006

<i>B. ulicina</i>	Ext. acuoso	Anti- inflamatorio	Dávalos <i>et al.</i> , 2007
<i>B. elaeoides</i>	Ext. Metanólico	Antibacteriano/ Citotóxico	Simonsen <i>et al.</i> , 2009
	Ext. diclorometano:metanol	Antimicrobiano	Mølgaard <i>et al.</i> , 2011
<i>B. incarum</i>	Ext. metanólico, acuoso, flavonoides y ácidos fenólicos	Antioxidante/ Antimicrobiano	Zampini <i>et al.</i> , 2009
	Ext. Hidroetanólico	Antioxidante/ Antimicrobiano	Nuño <i>et al.</i> , 2012
<i>B. magellanica</i>	Ext. Metanólico	Antibacteriano	Simonsen <i>et al.</i> , 2009
<i>B. santelicens</i>	Derivado de ác. <i>p</i> -cumárico	Antioxidante	Villagomés, <i>et al.</i> , 2006
	Ext. etanólico de éter dietílico	Antiproliferativo	Rodrigo <i>et al.</i> , 2010
<i>B. triangularis</i>	Flavonoides y dilactona	No ensayados	Petenatti <i>et al.</i> , 2007

El género *Baccharis* comprende numerosas y diversas especies, sin embargo, no existe evidencia suficiente sobre estudios morfoanatómicos, químicos y/o de actividad biológica (Verdi *et al.*, 2005; Abad y Bermejo, 2007, Budel, 2018).

Entre los compuestos que presentaron alguna actividad farmacológica de interés, se encuentran principalmente flavonoides, diterpenos y triterpenos (Verdi *et al.*, 2005, Budel, 2018). También se han obtenido cumarinas y aceites esenciales (Verdi *et al.*, 2005; Abad y Bermejo, 2007; Kurdelas *et al.*, 2010).

Los núcleos más representativos de metabolitos aislados del género *Baccharis spp.* son Flavonoides, Terpenoides y Cumarinas.

Los flavonoides son compuestos que se biosintetizan en las plantas vasculares. Algunos de ellos son responsables de la coloración de las flores, frutos y a veces hojas (Abad y Bermejo, 2007). Son pigmentos naturales que agrupan a metabolitos secundarios formados por un anillo aromático unido por lo menos a un grupo oxidrilo. Por lo general están presentes como agliconas libres y pocas veces glicosiladas (una característica de la familia *Asteraceae*).

Se identificaron alrededor de 298 flavonoides en *Baccharis spp.* (Verdi *et al.*, 2005).

Los flavonoides han sido estudiados durante décadas, por su amplia gama de actividades biológicas (Anzenbacher y Zanger, 2012). Numerosos estudios han asociado los flavonoides con beneficios en la salud e importantes propiedades antioxidantes ya que reducen la peroxidación lipídica y el efecto negativo de los radicales libres, contribuyendo a la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes y algunos tipos de cáncer (Tapia *et al.*, 2004; Andersen y Jordheim, 2006; Keller, 2009; Grecco *et al.*, 2012).

Los terpenoides: inicialmente se creía que eran producidos exclusivamente por hongos de los géneros *Fusarium spp.* y *Myrothecium spp.* y se los denominó tricotecenos. Sin embargo en 1976 este tipo de metabolito se aisló en *B. megapotamica*.

Jarvis *et al.*, (1991), con el fin de encontrar el origen de estos tricotecenos en *Baccharis*, demostraron, que dichos metabolitos, se biosintetizan en algunas especies después de la polinización de las plantas femeninas, como en el caso de *B. coridifolia*. Aunque existen pocos registros sobre la composición de triterpenos en el género *Baccharis spp.*, los compuestos más comunes son los triterpenoides de núcleo oleanólico. (Abad y Bermejo, 2007).

Los diterpenos característicos del género *Baccharis* son los de tipo neo-clerodane además se han aislado derivados de kaurano y labdano. De *B. gaudichaidiana* fueron identificados dos nuevos diterpenos clerodane, denominados gaudichanolides A y B y otro llamado bacchariol (Abad y Bermejo, 2007).

Baccharis es una fuente rica de aceites esenciales. Estudios realizados demostraron que este género poseen una alta proporción de estos compuestos, principalmente monoterpenos y sesquiterpenos (Boldt, 1989; Harbone, 1988).

Las cumarinas: en extractos de *Baccharis darwinii* se aislaron tres cumarinas llamadas 5'-hidroxiaurapteno (anisocoumarin H), aurapteno (7-geraniloxicumarina) y 5'-oxoaurapteno (diversinina). La anisocoumarina H y diversinina expresaron actividad antifúngica (Kurdelas *et al.*, 2010).

1.2.3. **BACCHARIS DARWINII**

También conocida como: *Baccharis ulicina* var. *subintegradoja* Kuntze; *Baccharis angulata* Griseb; *Neomolina darwinii* Hellwig. (NV: Chilca). Es una planta nativa, silvestre y ampliamente distribuida desde la provincia de Santa Cruz hasta Tucumán y Formosa y desde Mendoza hasta Buenos Aires. Crece en Argentina en terrenos secos y francoarenosos con tendencia calcárea de regiones semiáridas de la Argentina (donde el promedio pluvial anual varía de 200 a 350 mm). Aunque es una especie sumamente polimorfa (Troiani, 1985).

Es un subarbusto perenne (Figura N° 1), su altura varía entre 0.3-0.6 m, ramoso y hojoso hasta el ápice, glabro, laxamente punteado-granuloso o estrigoso. Tallos basales frecuentemente horizontales y radicantes. De hojas sésiles y lineares de 1 a 3 cm x 1-3 cm, agudas en el ápice, enteras en el margen (raramente con algunos dientes pequeños) en apariencia uninervadas. Las flores son tubulosas, pequeñas, de color blanco amarillento, con corola pentadentada en el limbo; papus blancuzco, crespo. Presenta individuos con flores masculinas y otras femeninas. Las flores femeninas son alargadas y masculinas casi esféricas.

Capítulos pedunculados, solitarios en el extremo de las ramas, formando un conjunto corimbo folioso simple o compuesto. Capítulos pistilados con involucro acampanado de 5-7 x 4-5 mm, filarios en 3-4 series, angostamente

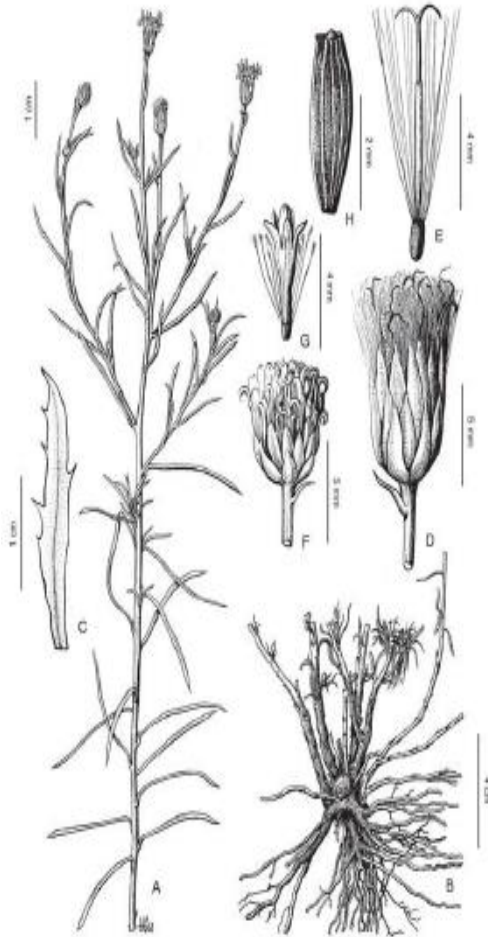


Figura N° 1: *Baccharis darwinii*: A: rama florífera, B: Porción basal de la planta; C: Hoja; D: Capitulo pistilado; E: Flor Pistilada; F: capitulo Estaminado; G: Flor estaminada; H: Aquenio. Fuente: Flora Argentina, *Baccharis*. Giuliano, 2014.

ovados, acuminados. Flores 18-27, corolas de 2-4.5 mm de largo, truncados en el ápice. Florece de Noviembre a Enero.

Los frutos son cipselas aquenios, fuertemente comprimidas, de 2,5-4 mm de largo, ligeramente pubérulas. Papus 2-3 seriados y de un marrón muy oscuro provisto de vilanos (Catálogo de las plantas vasculares del cono sur).

Existen diversos antecedentes químicos y biológicos de esta especie. Con respecto a la composición química hallada en el género *Baccharis*, flavonoides y terpenoides son los más investigados. En *B. darwinii*, la presencia de β -farnesano, aurapten, 5'-oxoaurapten, y 6',7'-epoxi- y 6',7'-dihidroxiaurapten fueron informados por Zdero (1986), en una muestra recolectada en la provincia Argentina de Neuquén. Posteriores trabajos fitoquímicos han reportado la actividad antimicrobiana de los mismos (Kurdelas *et al.*, 2010).

1.2.4. MICROPROPAGACION

La micropropagación es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*. A través de la micropropagación de un fragmento (explante) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones y libres de virus o bacterias (Castillo, 2010). El cultivo *in vitro* de plantas implica, cultivarlas dentro de un frasco de vidrio en un ambiente artificial (Castillo, 2010). Esta forma de cultivar el material vegetal tiene dos características fundamentales: la asepsia y el control de los factores que afectan el crecimiento (Cruz, 2012). El avance alcanzado por las ciencias biológicas ha permitido en los últimos años el estudio detallado de las plantas tanto a nivel celular como molecular. Actualmente es posible reproducir en condiciones de laboratorio la mayoría de los factores que pueden incidir en el crecimiento y desarrollo vegetal, aunque en muchas ocasiones resulta técnicamente compleja su determinación. Por esa razón se realiza una simplificación de la realidad escogiendo aquellos factores que puedan mantenerse controlados. En resumen, el cultivo *in vitro* de plantas es una técnica que exige un control específico del ambiente, tanto físico como químico, en el que se sitúa al explante. Por tanto, es necesario conocer cuáles son los principales factores que deberán ser controlados (Perales *et al.*, 2008; Berastegui *et al.*, 2009; Castillo, 2010).

El explante más empleado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas. Los envases que contienen las plantas se ubican en estanterías con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar el fotoperiodo. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación.

La micropropagación ofrece una alternativa para el cultivo de las plantas en general y las plantas medicinales en particular. Esta técnica ha sido exitosamente empleada para abordar diferentes problemáticas, desde la producción de plantas libres de patógenos hasta la conservación del germoplasma de las especies raras o en peligro de extinción.

Las plantas propagadas *in vitro* han resultado ser un material uniforme, mostrando menos variación en su contenido de metabolitos secundarios que sus contrapartes silvestres (Barreiro y Bolzani, 2009). Las plantas luego pueden ser replantadas en la naturaleza para acciones de restauración del medio ambiente o pueden ser utilizadas en la producción comercial (Goleniowski, 2007).

1.2.4.1. FASES DE LA MICROPROPAGACION:

En 1974 Murashige propuso tres fases en la micropropagación de plantas. Fase I; establecimiento de los cultivos asépticos, Fase II; multiplicación del material, Fase III; preparación para el trasplante a suelo. Debido a la información actual, el número de fases se amplió. Dentro del proceso de micropropagación actualmente se diferencian varias fases o etapas:

- 0: Selección y Preparación de la planta madre
- 1: Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas
- 2: Introducción del material seleccionado *in vitro*

3: Multiplicación de brotes

4: Enraizamiento

5: Aclimatación

Esta secuencia de etapas abarca el ciclo completo de la multiplicación de plantas *in vitro*; puede ser aplicada a diferentes especies vegetales, en cada caso se podrán incluir simplificaciones o cambios de acuerdo a las características de las plantas, pero en términos generales son comunes al proceso de propagación *in vitro*.

FASE 0:

PREPARACIÓN DE LA PLANTA MADRE

El inicio del cultivo *in vitro* es la primera etapa crítica en el éxito de la propagación de varias plantas (Marks y Simpsom, 1989), siendo importante el tipo de explante y el lugar de colecta (Hartmann, Kester y Davies, 2002), para contar con un material libre de microorganismos como hongos, bacterias y levaduras (Perales *et al.*, 2008; Berastegui *et al.*, 2009; Hartmann y Kester, 1998).

Se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener dicho material vegetal, es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses bajo condiciones controladas, lo que permite tener en la fase siguiente explantes sanos que den una respuesta uniforme. Generalmente se utilizan plantas en estado de crecimiento activo que muestren un desarrollo vigoroso y sano (Perales *et al.*, 2008; Berastegui *et al.*, 2009; Sharry *et al.* 2015). Se incluyen en esta etapa una serie de pre tratamientos como aplicaciones de fungicidas, bactericidas e insecticidas y cultivo en condiciones controladas de luz, temperatura y humedad relativa a fin de reducir los contaminantes y mejorar la respuesta (Hu y Wang 1983, Orozco, 2012).

FASE 1:

DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. El objetivo de la desinfección es eliminar los

microorganismos exógenos (Jiménez *et al.*, 2017). Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente.

Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia (Perales, 2004; Castillo, 2010, Sharry *et al.*, 2015).

FASE 2:

INTRODUCCIÓN DEL MATERIAL *IN VITRO*

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o propagación de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.

FASE 3:

MULTIPLICACIÓN DE LOS BROTES

Durante esta fase se espera que los explantes que sobrevivieron la FASE 1 y 2 se recuperen rápidamente después de su transferencia y originen nuevos brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas.

La proliferación puede lograrse con el uso de sustancias reguladoras de crecimiento, como componentes principales de un medio de cultivo previamente establecido y un adecuado manejo del proceso. De esta forma aumenta el número de plantas en cada repique o división de las plantas, y la operación se repite hasta lograr la cantidad de propágulos deseados (Debergh y Maene, 1981; Hu y Wang, 1983; Debergh y Zimmerman, 1991; Rout *et al.*, 2000). El número de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo.

FASE 4:

ELECCIÓN DE UN MEDIO DE ENRAIZAMIENTO DE LOS EXPLANTES

En esta etapa se favorecen la iniciación de raíces y el alargamiento del tallo. El inicio de raíces es un hecho complejo controlado por distintos componentes, cada uno de los cuales puede ser limitante. Es necesaria una combinación de factores para estimular la formación de raíces y han de estar presentes en las concentraciones adecuadas. (Debergh y Maene, 1981; Hu y Wang, 1983; Debergh y Zimmerman, 1991; Rout *et al.*, 2000). La proliferación de raíces *in vitro* representa un paso crítico para éxito del proceso. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea (Castillo, 2010; Indacochea, 2017)

FASE 5:

ACLIMATACIÓN DE LOS EXPLANTOS ENRAIZADOS

Los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación.

Durante este periodo la planta debe pasar por un periodo de adaptación que le permita desarrollar raíces y brotes funcionales, así como aumentar su resistencia a la desecación y al ataque de organismos patógenos.

Las condiciones del cultivo *in vitro*, generan cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de las plantas, por esta causa, durante la aclimatación, los cambios deben ser muy graduales, para minimizar el estrés y tener mayor tasa de sobrevivencia (Castillo, 2010; Varela, 2018).

1.2.4.2. MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivos para la producción de los cultivos *in vitro* de células y tejidos fueron desarrollados en la década de 1950. Entre los más usados se encuentran: Murashige y Skoog (MS), Gamborg (B5), Linsmaier y Skoog (LS), y

Schenk y Hilderbrand (SH). La diferencia principal entre los diferentes medios de cultivos se establece en la relación entre los constituyentes. El medio MS es el más usado, en particular para plantas herbáceas y para el cultivo de tejidos en general. Los componentes del medio de cultivo son: agua destilada (constituye el 95% del medio), fuentes de carbono, sustancias inorgánicas (macro y micronutrientes), vitaminas, hormonas y reguladores de crecimiento. Estos componentes varían en concentración según el tipo de planta y de la etapa en la que se esté trabajando. Con frecuencia se realizan modificaciones a las formulaciones estándares ajustándolas a las necesidades fisiológicas y a requerimientos nutricionales de cada cultivo, lo que resulta en una herramienta para comprender detalladamente el rol que los diferentes elementos químicos tienen en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Sharry *et al.*, 2015).

Los medios de cultivo contienen sales inorgánicas, macro (N, P, K, Ca, Mg, S) y micronutrientes (Fe, Co, Zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I) en cantidades suficientes o necesarias para mantener el crecimiento. El hierro se suministra acompañado en la forma de EDTA-ferroso, porque asegura la disponibilidad de hierro a valores de pH 8.0. La mayoría de los medios de cultivos contienen constituyentes orgánicos. Los aditivos mínimos usuales son la tiamina, el ácido nicotínico y la piridoxina. En muchos cultivos resulta beneficioso el inositol a razón de 100 mg/l. también se adiciona ácido pantoténico (0,1 mg/l) y la biotina (0,1 mg/l) (Debergh y Zimmerman, 1991; Hartmann y Kester, 1998).

Normalmente los medios de cultivo contienen una fuente carbonada glucosa o sacarosa (ocasionalmente se ha usado fructosa e incluso almidón). (Debergh y Zimmerman, 1991; Hartmann y Kester, 1998), como fuente de energía. Finalmente, son adicionados diferentes reguladores de crecimiento, siendo los más importantes las auxinas, como estimulantes para la formación de raíces y las citoquininas (para estimular la formación de brotes). La adición simultánea de auxinas y citoquininas incrementan una rápida proliferación celular y la formación de callos.

Las auxinas conocidas comprenden al ácido naftalenacético (NAA); al ácido indolbutírico (IBA); el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), y el ácido

indolacético (IAA). Las requeridas con más frecuencia son el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido indolbutírico (IBA). El 2,4-D se utiliza en numerosos medios de cultivo. Las auxinas promueven el crecimiento y la diferenciación celular, estimulan la dominancia apical, la rizogénesis, la floración, el crecimiento y maduración de los frutos, estimula la senescencia, controlan la abscisión y el geotropismo.

Las citoquininas incluyen a la N⁶-benciladenina (BA), la kinetina, la N⁶-isopentil-adenina (2iP) y la zeatina. Las citocininas son conocidas por promover los siguientes efectos fisiológicos: inhiben la formación de raíces laterales, rompen la latencia de las yemas axilares, promueven la organogénesis en los callos; retrasan la senescencia o envejecimiento de los órganos vegetales; estimulan la expansión celular en cotiledones y hojas; promueven la formación de los cloroplastos.

Entre los sostenes inertes, el agar es uno de los productos más utilizados. Su calidad varía según las distintas presentaciones comerciales. El pH y la concentración son los factores que más afectan la solidificación del medio. Con un pH muy bajo, el agar no solidifica bien y tiende a deteriorarse con el calor (Anderson, 1975)

El pH es un factor muy importante en la elaboración de un medio de cultivo, debido a que la mayoría de las células animales y vegetales crecen a un pH que varía entre 5,0 y 8,0; muchos elementos no están disponibles para las plantas en determinados pH o se hacen poco aprovechables (Hartmann y Kester, 1998). Se utiliza un pH en el rango de 5 a 6 para lograr un crecimiento adecuado de las plantas cultivadas *in vitro*. (Hartmann y Kester, 1998, Sharry *et al.*, 2015)

Finalmente, es necesario esterilizar el material de vidrio y los medios de cultivo. Dicho procedimiento, se realiza en autoclave a 121°C durante 10 a 20 minutos a 0,1 MPa. Cuanto mayor sea el volumen del medio a esterilizar se necesita mayor tiempo de esterilización. Las sustancias inestables deben esterilizarse por filtración, se añade una alícuota al medio después de haberlo esterilizado y cuando se haya enfriado a 35-40°C. El medio debe refrigerarse y usarse en el transcurso de unas dos a cuatro semanas. (Hartmann y Kester, 1998).

1.2.4.3. CONDICIONES DE INCUBACION

El material vegetal aislado se coloca en una cámara de cultivo con control de la intensidad lumínica, del fotoperiodo y de la temperatura. Los requerimientos lumínicos oscilan entre 30 - 40 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por lo general se usan lámparas fluorescentes blanco-frío o Gro-Lux. Los cultivos son incubados con ciclo de luz/oscuridad de 16/8 horas. Las temperaturas óptimas de incubación varían con las especies. La región climática originaria de las plantas micropropagadas ofrece una referencia acerca de la temperatura que debe seleccionarse. Un ambiente controlado entre 20 y 28° C, resulta adecuado, sin embargo algunas especies pueden requerir temperaturas más bajas. En dichas condiciones, es importante que la humedad relativa oscile entre el 30 y el 50%, para evitar la deshidratación del medio. Si la salinidad es elevada, el agua tiende a condensarse en las paredes de los envases limitando el crecimiento e incrementando el riesgo de contaminación (Zimmerman, 1979; Debergh y Maene, 1981; Hu y Wang, 1983; Pierick, 1991; Hartmann y Kester, 1998; Mroginski, Sansberro y Flaschland, 2004).

1.2.4.4. APLICACIONES Y VENTAJAS DE LA MICROPROPAGACION

La micropropagación posibilita la obtención de un gran número de plántulas en un corto periodo de tiempo y en un espacio reducido, permite la obtención de individuos libres de virus, así como la posibilidad de propagar vegetativamente especies recalcitrantes o para obtener una rápida multiplicación de semilleros, en los casos donde la semilla presente problemas. (Grattapaglia y Machado 1998; Fraça, 1999).

Otros usos importantes son la multiplicación rápida de cultivares nuevos o mejorados que se introducen a escala comercial provenientes de plantas que presentan resistencia ante organismos patógenos en programas de control de enfermedades. El cultivo *in vitro* proporciona plántulas en condiciones superiores a las obtenidas por vía convencional, lo que implica una ventaja potencial, tanto económica como ecológica.

Además, las técnicas de micropropagación se prefieren a menudo a las prácticas convencionales de propagación asexual en diversas especies debido a las siguientes ventajas potenciales: 1) solamente una cantidad pequeña de tejidos se necesita como explante inicial para la micropropagación de numerosas plantas clónicas en un año; 2) las técnicas de propagación *in vitro* posibilitan el intercambio rápido de material vegetal entre laboratorios. La sanidad de los cultivos reduce el peligro de la introducción de enfermedades incluso ubicados en diferentes países; 3) los *stocks* conservados *in vitro* pueden ser multiplicados en cualquier momento del año a diferencia de la propagación con prácticas convencionales.

Las técnicas de micropropagación ofrecen un gran potencial para estudiar el control del crecimiento, la dormancia y los ciclos reproductivos, entre otros procesos fisiológicos de las plantas. Conocer los factores que controlan el desarrollo resulta en una mayor producción de compuestos activos o la posibilidad de biosintetizar nuevos compuestos que no son producidos naturalmente por la planta (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011; Atanasov *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2018).

1.2.4.5. MICROPROPAGACION DE BACCHARIS:

Kajiki en 2004, demostró que la micropropagación resultó eficiente en el desarrollo de un protocolo para el cultivo de plantas homogéneas de *Baccharis tridentata*. Sin embargo, son escasos los estudios de micropropagación en otras especies del género.

La composición salina del medio MS en su formulación completa, es satisfactoria para el crecimiento adecuado de muchas especies de plantas cultivadas *in vitro*, mientras que para otras la proporción de sales puede ser tóxica o innecesariamente elevada (Bhojwani y Razan, 1983). *Baccharis tridentata* y *Baccharis dracunfolia* presentaron preferencia por medios de cultivo más ricos en nutrientes minerales, como el medio MS en su concentración original (Kajiki and Shepherd, 2006). Sin embargo, la reducción en la concentración de algunos de los macronutrientes resulta en igual o mayor crecimiento en otras especies, evidenciando la importancia de optimizar su concentración en el medio de cultivo para cada especie en particular.

La calidad de las plantas trasplantadas, el vigor de las mismas y la cantidad y calidad de raíces desarrolladas son factores muy importantes que contribuirán al éxito de la aclimatación.

Un protocolo de micropropagación completo debe incluir un proceso de aclimatación bien establecido. Por lo tanto, la transferencia a condiciones *extra vitro* sigue siendo el mayor problema para la micropropagación de muchas especies de plantas (Chandra *et al.*, 2010). El enraizamiento previo no fue necesario para *B. myriocephala*, haciendo que el protocolo sea más eficiente y de bajo costo. Sin embargo, es necesario asegurar la presencia de raíces *in vitro* para otras especies del mismo género (Singh y Dwivedi, 2014; Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2016), *E. alba* (Singh *et al.*, 2012) y *Gerbera jamesonii* (Cardoso y Teixeira da Silva, 2013).

2. MOTIVACION Y OBJETIVOS:

Las especies del género *Baccharis* son conocidas por los principios químicos activos que poseen y por el uso más o menos intensivo en medicina popular (Verdi et al., 2005). Han sido objeto de numerosos estudios fitoquímicos y de actividad biológica (Gonzaga, 2005). Sin embargo, los estudios biotecnológicos de micropropagación en especies diferentes de *Baccharis* son escasos.

El cultivo *in vitro*, es una estrategia que permite el cultivo de plantas de interés *sin suelo*. Mediante esta técnica se producen plantas principalmente de tipo herbáceo, sin perder de vista las necesidades básicas como luz, temperatura, agua y nutrientes. El rendimiento de los cultivos obtenidos mediante micropropagación, pueden duplicar el rendimiento de los cultivos tradicionales. *B. darwinii* es una planta herbácea originaria de la Patagonia argentina, ya caracterizada tanto en su composición química como en su actividad antimicrobiana e insecticida (Kurdelas et al., 2012). El cultivo *in vitro* constituye una herramienta que promueve la optimización de procesos metabólicos buscando mayor productividad y rendimiento. El presente estudio podrá servir como base para futuras investigaciones que permitan optimizar las condiciones de cultivos *in vitro* de *B. darwinii* y de otras especies presentes en la zona, con el fin de desarrollar alternativas innovadoras que permitan hacer uso de la micropropagación para la producción de compuestos de interés farmacológico.

2.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar las condiciones óptimas de micropropagación de plantas completas de *Baccharis darwinii*, a través de la micropropagación clonal y evaluar su influencia en la producción de metabolitos de interés.

2.2. Objetivos Específicos

- Obtener un tratamiento de asepsia efectivo para el establecimiento *in vitro* de semillas y esquejes de *B. darwinii*.
- Determinar las condiciones óptimas de cultivo *in vitro*, en lo referente a factores físicos, nutricionales y hormonales que permitan producir plantas que conserven los compuestos químicos de interés.
- Establecer la tasa de multiplicación de las plántulas cultivadas en distintas concentraciones de fitohormonas; inducir rizogénesis y describir las condiciones que la promueven.
- Establecer técnicas de cultivo efectivas de aclimatación *in vivo* y evaluar la tasa de supervivencia en invernadero y a campo.
- Determinar diferencias o similitudes en el perfil fitoquímico de plantas de *B. darwinii* obtenidas en cultivo *in vitro* y plantas nativas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1. AISLAMIENTO Y ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS

El material de partida utilizado para el establecimiento del cultivo fue obtenido de material vegetal adulto de campo y a través de material embrionario, semillas, recolectado en poblaciones cercanas a la ciudad de Comodoro Rivadavia, Patagonia Argentina (Lat. Sur 45°47'25", Long. Oeste 67°28'28") (Figura N° 2).

Para lograr el primer objetivo del trabajo, obtener un tratamiento de asepsia efectivo del material vegetal de partida que nos permita el establecimiento de los cultivos, se ensayaron los siguientes protocolos:

3.1.1. Protocolo de cultivo y asepsia a partir de semilla

Se trabajó con dos lotes de semillas procedentes de plantas silvestres ubicadas en los alrededores de la ciudad de Comodoro Rivadavia. Un primer grupo, recolectadas en diciembre de 2007/2008 y un segundo grupo obtenidas en noviembre del año 2015.

Se ensayaron tres protocolos, en todos ellos se realizaron cinco (5) lavados con agua destilada estéril, entre cada tratamiento: a) se mantuvo la hidratación con agua corriente estéril por 12 h, seguida por una inmersión en solución de hipoclorito de sodio 3% por siete (7) minutos; b) las semillas se hidrataron con agua corriente estéril por 24 h, luego se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio 5% por 10 minutos y, por último, se introdujeron en una solución de etanol al 98% durante un (1) minuto c) las semillas fueron hidratadas por 12 h con agua corriente estéril, luego se sometieron a una solución de hipoclorito de sodio 7,5% por siete (7) minutos, seguido por una inmersión en solución de etanol al 70% durante un (1) minuto; por último, se sometió a las semillas a una solución de etanol al 70% durante un (1) minuto.

Las semillas fueron colocadas en germinadores estériles (Placas de Petri con papel de filtro, esterilizadas en autoclave) y se hidrataron con agua destilada estéril en el momento de la incorporación de las semillas desinfectadas.

Las semillas germinadas fueron transferidas a condiciones de cultivo, en medio MS en su formulación completa de sales y sin la adición de hormonas.

Como variable de respuesta se evaluó el porcentaje de emergencia en cada uno de los tratamientos ensayados.

3.1.2. Protocolo de cultivo a partir de tallo

Los segmentos seleccionados de plantas crecidas a campo (Anexo 1) fueron lavados con agua corriente estéril. La asepsia se realizó por inmersión en solución de etanol al 70% durante cinco (5) minutos y posteriormente los mismos fueron sometidos a una solución de hipoclorito de sodio con una concentración de 20% durante diez (10) minutos. Entre cada tratamiento se realizaron cinco (5) lavados con agua destilada estéril. Se escindieron brotes jóvenes con yemas apicales y axilares. Dichos explantes fueron cultivados en tubos de ensayo con medio MS con la mitad de la concentración de sus sales. El pH se ajustó a 5,8. El medio fue suplementado con agar al 0,7% y 30 gramos de sacarosa. Se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 0,1 MPa y 120°C. El material aislado se incubó en cámara de cultivo a una temperatura de 21±1°C y un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad.

3.2. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS Y MULTIPLICACIÓN

De manera de poder determinar las condiciones óptimas de cultivo *in vitro*, en lo referente a factores físicos, nutricionales y hormonales, a partir de los explantes obtenidos de material adulto, se establecieron plantas madre. Para ello, fueron seccionados explantes de aproximadamente dos (2) cm de longitud conteniendo meristemas pre-existentes de material crecido *in vitro* que se transfirieron a tubos de ensayo.

El establecimiento de los explantes se llevó a cabo en medio MS con la mitad de la concentración de sus sales sin el agregado de reguladores de

crecimiento. En esta etapa, las variables de respuestas evaluadas fueron la cantidad de yemas desarrolladas y la longitud de los brotes para cada subcultivo.

El siguiente objetivo del trabajo fue establecer de la tasa de multiplicación, para ello fueron realizadas cuatro combinaciones de hormonas de crecimiento en medios de cultivo con las siguientes condiciones: tratamiento control sin reguladores y medio MS con combinaciones IBA (0,23 μM , 0,46 μM y 0,73 μM) y combinaciones de BAP (2,2 μM , 4,4 μM y 6,7 μM), como se detalla a continuación:

(T1) MS basal (BM). El basal responde a una formulación de macro y micronutrientes, suplementados con: 30 g/L de sacarosa, compuestos orgánicos (Ácido Nicotínico, Piridoxina HCl, Tiamina HCl, Myo-inositol y Glicina), Agar 7%.

(T2) BM con la adición de BAP: IBA (2,2 μM : 0,23 μM).

(T3) BM con la adición de BAP: IBA (4,4 μM : 0,46 μM).

(T4) BM con la adición de BAP: IBA (6,7 μM : 0,73 μM).

Las plántulas fueron crecidas en una cámara de cultivo con control de temperatura 21 (± 2) °C y fotoperiodo de 16 horas durante aproximadamente 30 días en un esquema de trabajo como en que se muestra en la Figura N° 3.

La variable de respuesta analizada fue cantidad de brotes desarrollados por tratamiento y la tasa de multiplicación entre los subcultivos y entre tratamientos.

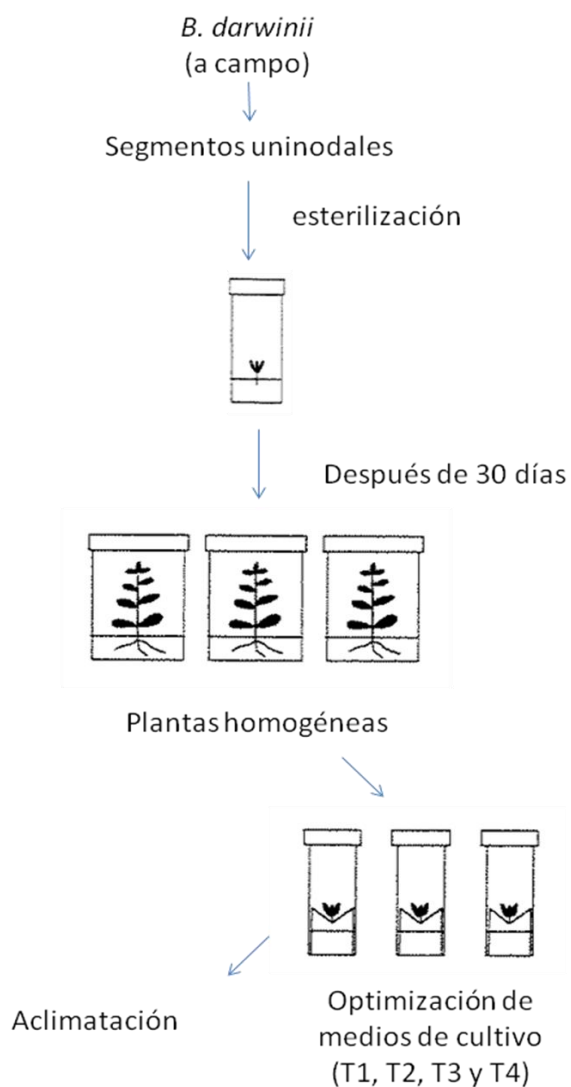


Figura N° 3: esquema del establecimiento de la micropropagación de *B. darwinii* a partir de segmentos nodales de plantas recolectadas de los alrededores de la ciudad de Comodoro Rivadavia. Fuente: Modificado de Kajiki F.O., 2004.

3.2.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS DEL ESTABLECIMIENTO Y MULTIPLICACIÓN

El diseño experimental fue completamente al azar. Se realizaron tres repeticiones, cada una de ellas conformada por 25 explantes.

Se chequearon los datos para normalidad y homocedasticidad de varianzas (Anexo 2). En los casos en que se cumplían los supuestos de normalidad y homocedasticidad, los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) para cuantificar las diferencias obtenidas entre los tratamientos aplicados.

En los casos en que no se pudieron aplicar pruebas paramétricas de análisis de varianza, se utilizaron pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis).

Las medias de los tratamientos fueron comparadas utilizando el test de Tukey, con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$. Se utilizó el software estadístico InfoStat® (Balzarini *et al.*, 2015) y planilla de cálculo *Microsoft Excel*.

3.3. ENRAIZAMIENTO

Con el objetivo de inducir rizogénesis y describir las condiciones que la promueven. Se trabajó con brotes de *B. darwinii* desarrollados en la etapa de multiplicación, generados en el tercer subcultivo. Los microtallos fueron transferidos en medio MS con y sin reguladores de crecimiento, MS con la mitad de la concentración de sus sales y medio Gamborg.

(T1) MS basal (BM). El basal responde a una formulación de macro y micronutrientes, suplementados con: 30 g/L de sacarosa, compuestos orgánicos (Ácido Nicotínico, Piridoxina HCl, Tiamina HCl, Myo-inositol y Glicina), Agar 7%.

(T2) MS con la mitad de concentración de sales.

(T3) MS con la mitad de concentración de sales, con la adición de BAP: IBA (4,0 μ M: 2,0 μ M).

(T4) Gamborg (BM). El basal responde a una formulación de macro y micronutrientes, suplementados con: 30 g/L de sacarosa, compuestos orgánicos (Ácido Nicotínico, Piridoxina HCl, Myo-inositol y Glicina), Agar 7%.

En las plántulas con respuesta rizogénica la variable de respuesta observada fue el número de raíces generadas.

3.4. ACLIMATACION.

La aclimatación *in vivo* fue llevada a cabo en una primera etapa en condiciones de laboratorio. Fueron seleccionaron 20 de las plantas crecidas *in vitro* (después de haber permanecido 25 días en medio de micropropagación) y transferidas a turba: perlita (1:3) durante 67 días. Se evaluó la supervivencia de las plántulas y la longitud del tallo durante este periodo, como variable de respuesta al proceso de aclimatación.

Posteriormente fueron transferidas a macetas y llevados a campo donde se siguió su desarrollo durante 90 días.

3.5. COMPARACIÓN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN PLACA DELGADA DE EXTRACTOS DE *B. DARWINII*

Para determinar una posible modificación en el perfil fitoquímico de cumarinas y de flavonoides debido al cultivo *in vitro*, se obtuvieron extractos preparados con muestras de *B. darwinii* obtenidos a campo, denominados: nativa 1 y 2, y una muestra proveniente de las plantas generadas *in vitro*, luego de su aclimatación. Los cuatro extractos fueron sometidos a la técnica de cromatografía en placa delgada (TLC).

3.5.1. PREPARACION DE EXTRACTOS

Los flavonoides son los metabolitos secundarios más comunes en la familia de las *asterácea*, han sido estudiados durante décadas, y son responsables de muchas de sus actividades biológicas (Anzenbacher y Zanger, 2012). En otras especies de *Baccharis* fueron identificados alrededor de 298 flavonoides (Verdi *et al.*, 2005).

Los flavonoides se encuentran en forma glicosilada y son solubles en solventes polares como el metanol.

Las cumarinas son solubles en alcohol y también se extraen con disolventes orgánicos como el éter. Las formas heterosídicas son más o menos solubles en agua (Miranda y Cuellar, 2012). Kurdelas *et al.*, (2010), informaron de la actividad antifúngica asociada a la presencia de compuestos de origen cumarínico de los extractos de Éter de Petróleo, Metanol y Diclorometano. Por lo tanto, se decidió realizar las extracciones con estos tres solventes. También se realizó una extracción con agua destilada de manera de tener un amplio espectro de solventes para la comparación.

Se compararon dos muestras de plantas nativas a campo (Nativa 1 y Nativa 2) colectadas en diferentes áreas de la ciudad de Comodoro Rivadavia y una de la planta generada *in vitro* (Anexo 1, Figura N° 2). Se pesaron 200 mg de cada muestras de planta disecada y molida y se les realizó una extracción por maceración durante 24 horas, con 5 ml de uno de los siguientes solventes: Éter de Petróleo,

Metanol, Agua destilada y Diclorometano (Anexo 1, Figura N° 3). Cada extracción fue realizada por duplicado. Se obtuvieron los extractos y se colocaron en frascos color caramelo, cerrados herméticamente y se conservaron refrigerados a una temperatura de 4 °C.

Cada extracto fue sometido a cromatografía en capa fina (TLC). Se utilizaron placas cromatográficas disponibles comercialmente (Merck) con fase estacionaria de sílica gel 60F254, con dimensiones de 4,5 cm de ancho X 9 cm de largo. Para la preparación de las fases móviles se utilizaron, Cloroformo, Metanol, Acetato de Etilo, Éter de Petróleo, Tolueno, Ácido Acético Glacial y Agua destilada, siguiendo las especificaciones de cada sistema de solventes (Waner y Bladt, 2001).

3.5.2. PREPARACION Y SIEMBRA DE LA MUESTRA

Se prepararon los patrones: *2-(3,4-Dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona* o Quercetina (para flavonoides) y la *1,2-Benzopirona* o Cumarina (para cumarinas), marca Sigma®, con una concentración de 1 g/mL en metanol, hasta redisolución total. En la placa de TLC, en la línea de siembra se colocaron con capilar aproximadamente 5µl de cada patrón y muestra a una distancia de 0,5 cm y dejando secar por un lapso de 10 minutos (Anexo 1, Figura N° 5).

3.5.3. PREPARACION DE LA FASE MOVIL

Se realizó la preparación de las diferentes fases móviles (Tabla N° 2), para conocer la composición de los extractos, las mismas fueron tomadas de la referencia bibliográfica que se detalla en la tabla (Waner y Bladt, 2001).

Tabla N° 2: Sistema de solventes utilizados en las Cromatografías en Placa Fina.

Metabolito a analizar	Fase móvil	Revelador	Identificación
<u>Flavonoides</u>	ACETATO DE ETILO- METANOL-AGUA (100:13.5:10)	Vapores de NH ₃ UV 253nm UV 366 nm	A 366 nm: Amarillo, amarillo verdoso, rojo.
<u>Cumarinas</u>	TOLUENO-ETER 10% ACIDO ACETICO (1:1)	-KOH 10% Etanol Absoluto	A 366nm: azul, azul verdoso.
<u>Flavonoides</u>	N-BUTANOL-ACETICO- AGUA (4:1:5)	Vapores de NH ₃ UV 253nm UV 366 nm	A 366 nm: Amarillo, amarillo verdoso, rojo.
<u>Cumarinas</u>	CLOROFORMO-METANOL (9:1)	KOH 10% Etanol Absoluto	A 366nm: azul, azul verdoso.

Para asegurar la saturación de las cubas, se colocaron las fases móviles en dichas cubas, 30 minutos antes de la introducción de las placas de TLC.

3.5.4. ELUCION Y REVELADO DE LA LAS PLACAS

Se colocaron las placas de TLC al interior de las cámaras de manera vertical (Anexo 1, Figura N° 4), quedando a 0,5 cm el borde inferior, en contacto con la fase móvil, y se cerró herméticamente para que ascienda por capilaridad a través de la placa hasta llegar 1cm antes del borde superior de la misma. Una vez alcanzado ese punto se retiró la placa y se dejó secar bajo campana de extracción hasta la evaporación total de la fase móvil. Posteriormente se prosiguió a visualizar, calcular los R_f y tomar fotos de las placas. Para el revelado de las placas se utilizó luz UV con dos longitudes de onda, 254nm y 366nm (Anexo 1, Figura N° 5). También se aplicaron vapores de amoníaco concentrado y solución de hidróxido de potasio al 10%.

4. RESULTADOS:

4.1. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO IN VITRO:

4.1.1. SEMILLAS

En los ensayos realizados con semillas obtenidas en el periodo 2007/2008, no se produjo la emergencia de plántulas bajo ninguno de los tratamientos de desinfección ensayados, mientras que las semillas recolectadas en el año 2015, se obtuvieron los porcentajes más altos de emergencia (31,7%) en semillas sometidas a hidratación con agua corriente por 24 h, seguido de una esterilización por inmersión en solución de hipoclorito de sodio 5% por diez (10) minutos y alcohol etílico 98% durante un (1) minuto. (Figura N°9 a y 9 b).

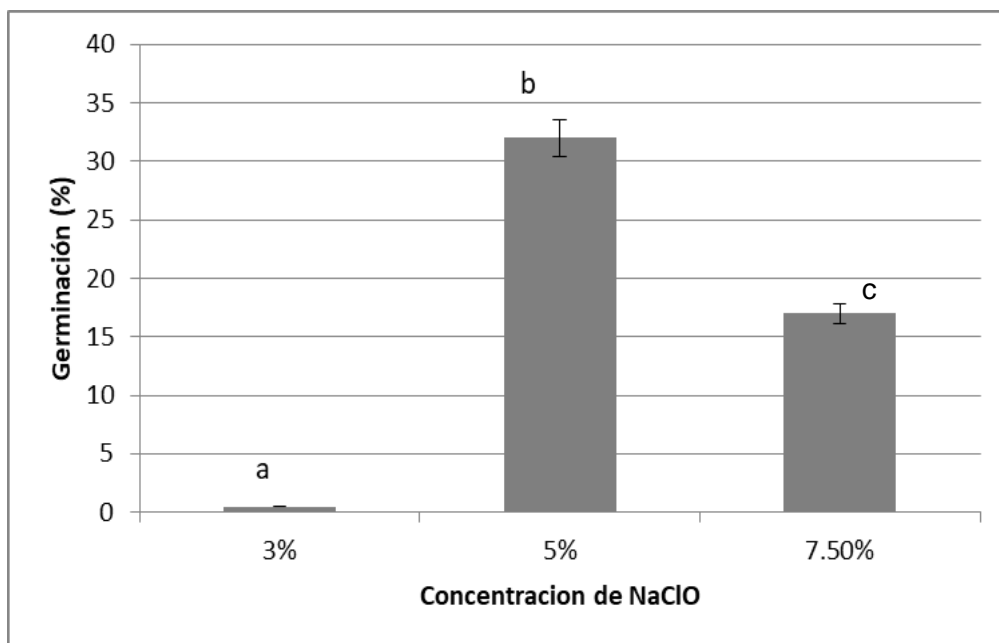


Figura N° 9a. *B. darwinii*: proporción de semillas germinadas en respuesta a distintos tratamientos de desinfección. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con letras diferentes ($p < 0.05$).

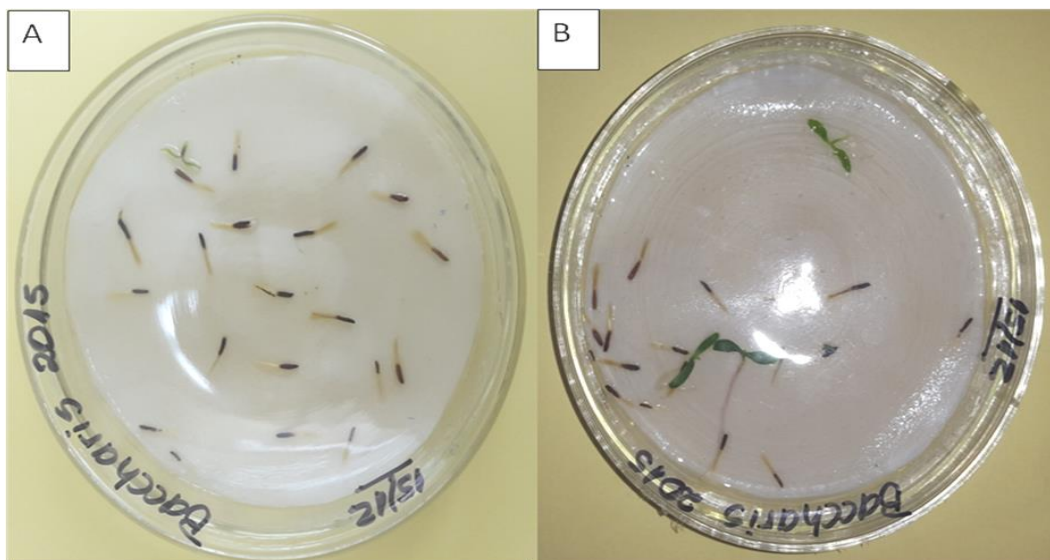


Figura N° 9b. *B. darwinii*. Semillas tratadas con hipoclorito de sodio al 5%. Germinación con dos (A) y quince días (B) respectivamente.

El Análisis de la varianza (ANOVA) (Anexo 2), reveló que las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio, el tiempo de exposición y la hidratación previa en los métodos de desinfección ensayados generaron una diferencia altamente significativa sobre el porcentaje de germinación de las semillas (Figura N° 9a).

Las plántulas obtenidas no presentaban contaminación visible en los germinadores. Sin embargo, cuando fueron transferidas a condiciones de cultivo, en medio MS, se observó la proliferación de hongos y bacterias, sobre las plántulas y en el medio.

4.1.2. ESQUEJES MULTINODALES

Se escindieron segmentos multinodales de *B. darwinii*, con yemas apicales y axilares provenientes de material adulto de campo. Después de esterilizarlos, los segmentos nodales, fueron inoculados en medio basal de Murashige y Skoog, con formulación completa, complementado con sacarosa 30 gr/L y sin reguladores de crecimiento. Fueron incubados en cámara de cultivo a 21 (\pm 2) °C y fotoperiodo: 16 h. (Figura N° 10. A). Se observó la presencia de compuestos oxidantes en los medios de cultivo (Figura N° 10. B y B₂), en pocos días se produjo la muerte del inóculo.

Para eludir la liberación de compuestos oxidantes por los explantes, se procedió sembrar los segmentos en el medio basal de Murashige y Skoog, con mitad de la concentración de sales y, al igual que en el ensayo anterior, complementado con sacarosa 30 gr/L y sin reguladores de crecimiento. Fueron incubados 30 días en cámara de cultivo a 21 (\pm 2) °C y fotoperiodo: 16 h. (Figura N° 11).

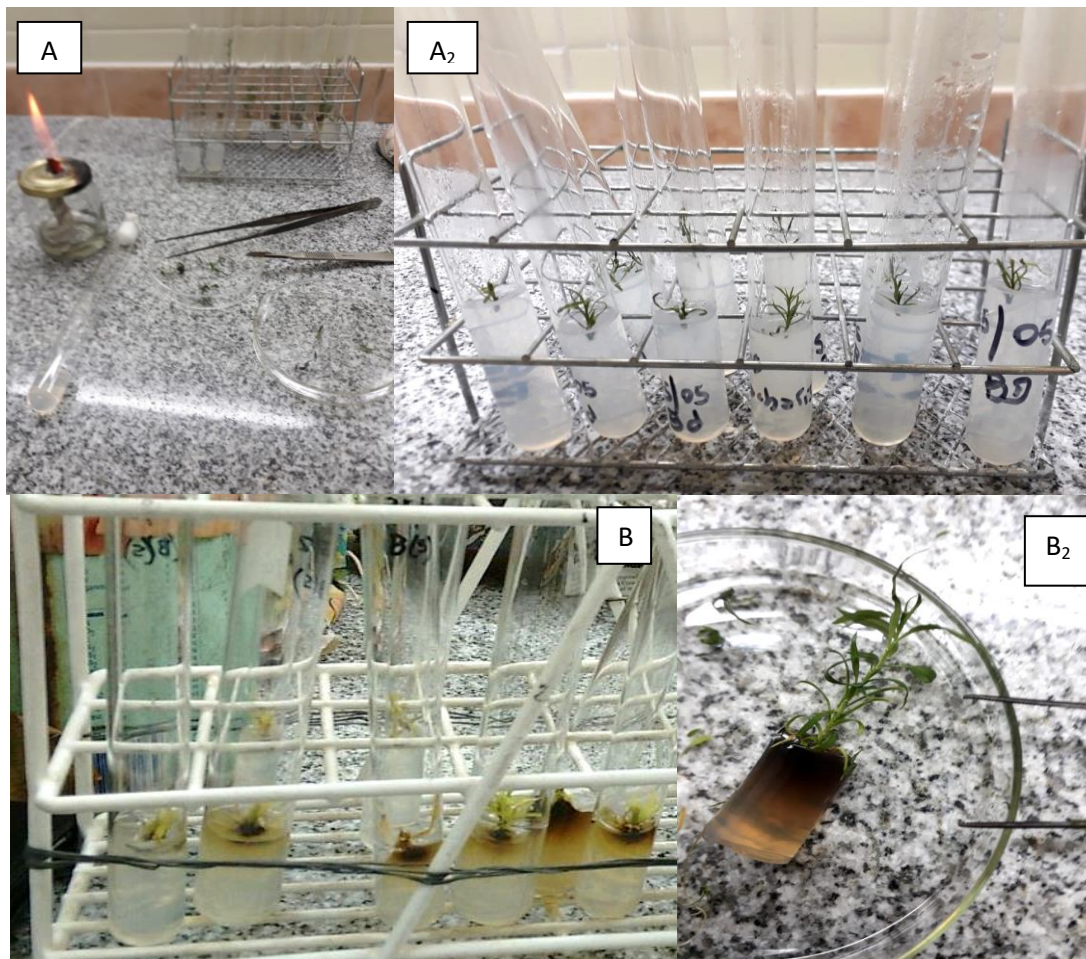


Figura N° 10. *B. darwinii*. Inicio del cultivo; subcultivos en medio MS de formulación completa de sales, sin reguladores de crecimiento. A₁) escisión segmentos nodales; A₂) siembra segmentos nodales; B₁) cultivos incubados 15 días en cámara de cultivo a 21 (\pm 2) °C y fotoperiodo de 16 h. B₂). Vista de la oxidación del medio de cultivo.

A partir de los resultados obtenidos, se calculó la proporción de explantes establecidos. Fueron evaluados tres subcultivos de 30 plántulas cada uno, haciendo un total de 90 observaciones. Se evaluaron el número de yemas axilares desarrolladas (Figura N° 12 y N° 13), la longitud de dichas yemas: Mayor (\pm 4cm/Ma),

Medio ($\pm 3\text{cm}/\text{Me}$), Pequeño ($\pm 2\text{cm}/\text{P}$) (Figura N° 14), presencia y cantidad de raíces desarrolladas (Figura N°15)

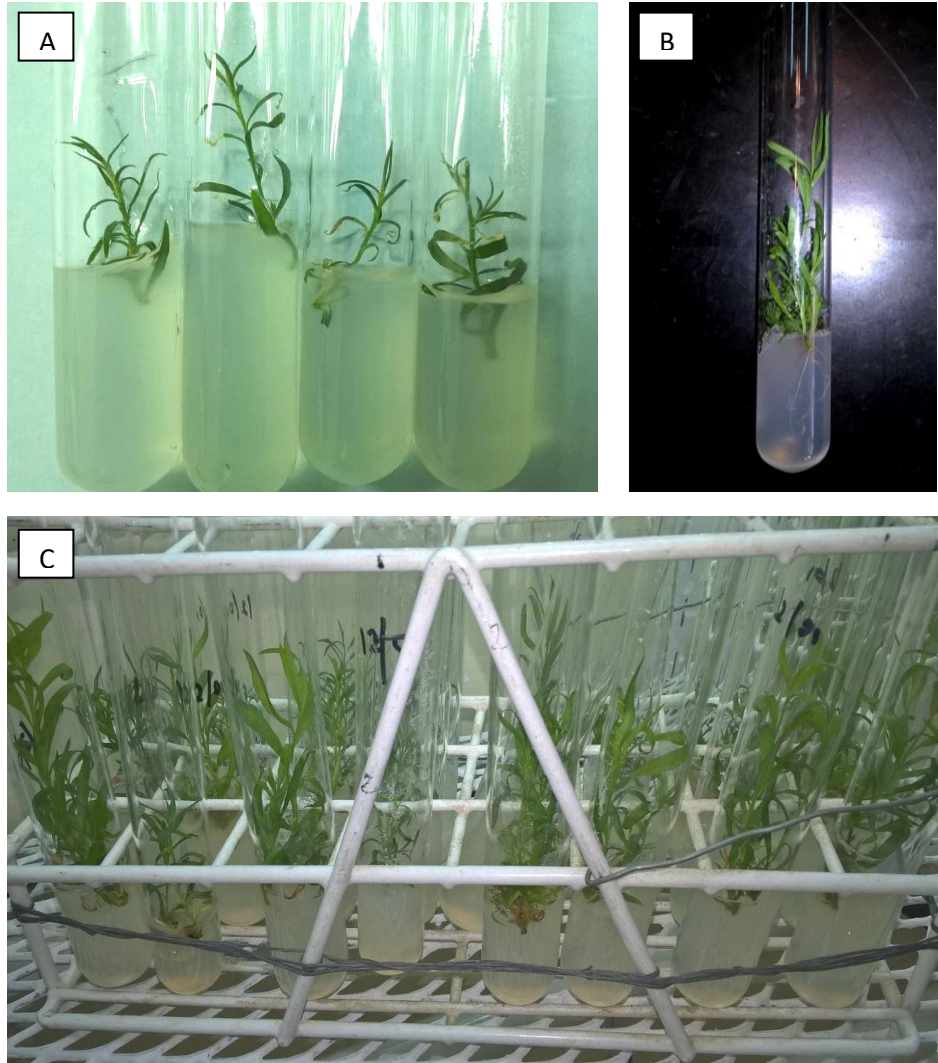


Figura N° 11. *B. darwinii*. Subcultivos en medio MS con la mitad de concentración de sales, sin reguladores de crecimiento. A) Inicio del cultivo. B) y C) A los 30 días a 21°C (± 2) y fotoperiodo de 16 hs.

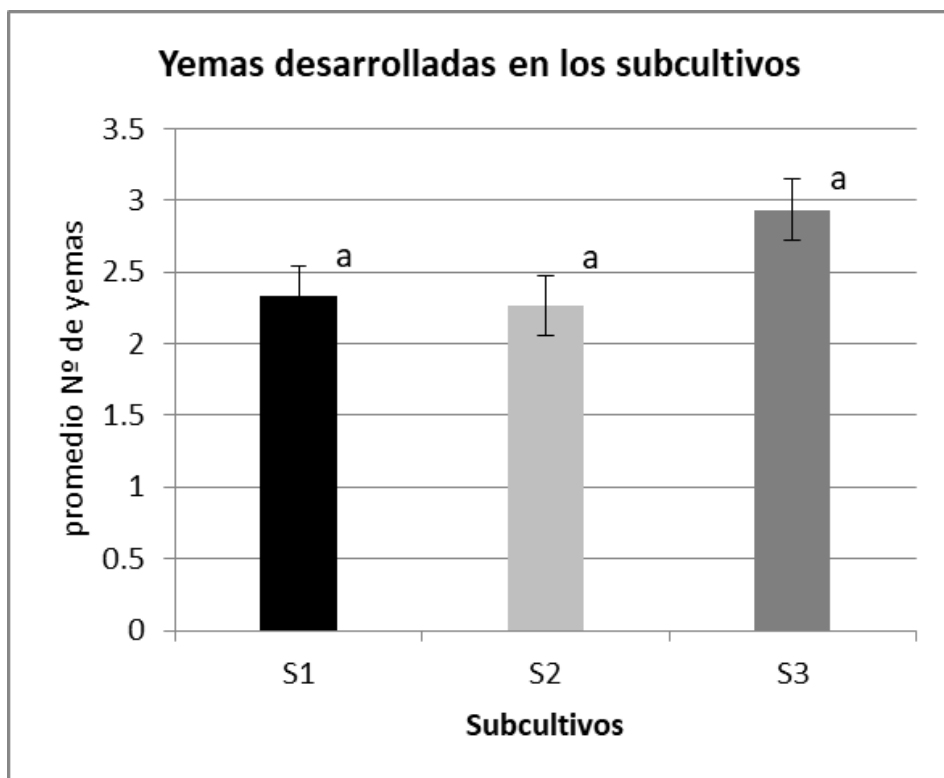


Figura N° 12. *B. darwinii*. Desarrollo de yemas axilares en tres subcultivos consecutivos de segmentos multinodales en medio MS con la mitad de la concentración de sales. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

*S1: Primer subcultivo; S2: Segundo subcultivo; S3: Tercer subcultivo.

El N° de yemas/explante no varió significativamente entre los diferentes subcultivos (Anexo 2.2) ($p > 0,05$) Fig. 12. Sin embargo hubo una leve tendencia a obtener un mayor N° yemas ($2,93 \pm 1,0$) en el tercer subcultivo (S3).

En el primer subcultivo (S1), la mayoría de las explantes desarrollaron entre dos (2) a cuatro (4) yemas. El mayor porcentaje de yemas brotadas se obtuvo en el segundo subcultivo (S2) (46%) En el tercer subcultivo (S3) la mayor proporción de las plántulas desarrollaron entre tres (3) y cuatro (4) yemas brotadas con 33 y 36% respectivamente (Figura N° 13).

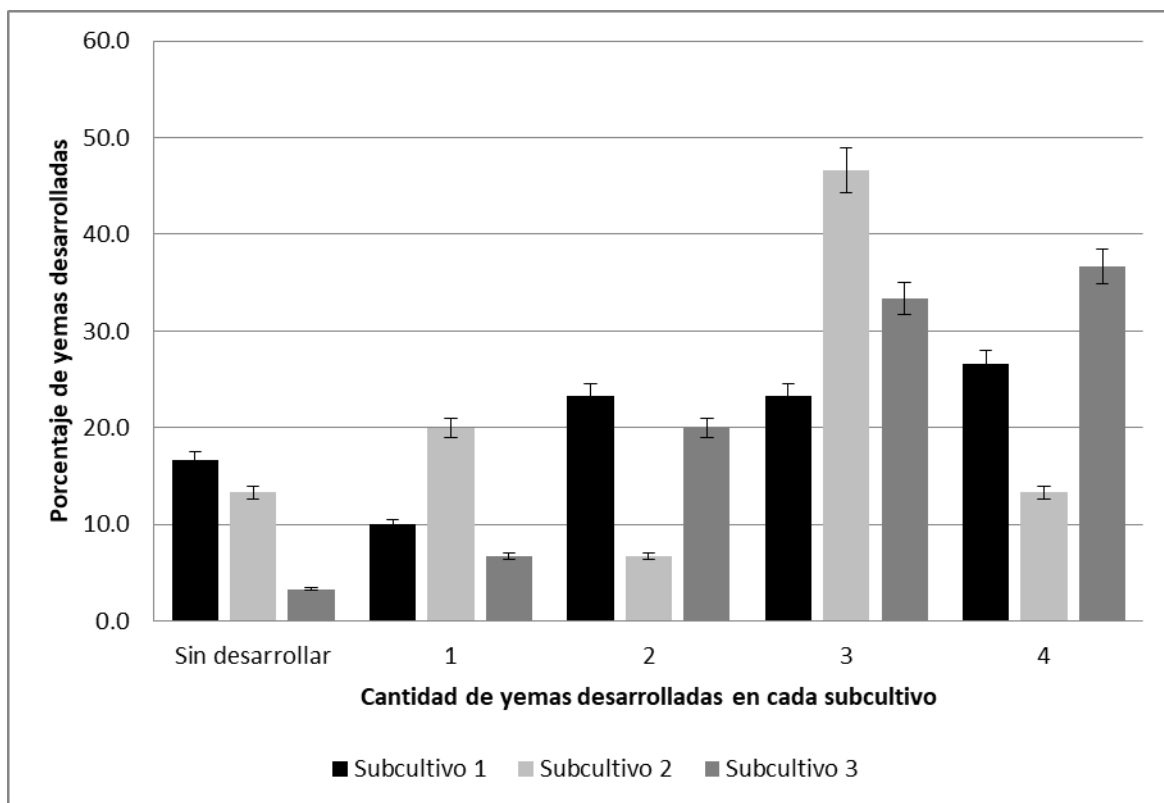


Figura N° 13. *B. darwinii*. Distribución de los porcentajes de yemas axilares desarrolladas en cada subcultivo de segmentos multinodales en medio MS con la mitad de la concentración de sus sales.

Se evaluó la longitud de los brotes desarrollados (Tabla N° 3 y Figura N° 14) y se determinó que en la mayor proporción de las plántulas, la altura registrada fue de ± 2 cm, para el primer y el tercer subcultivo, mientras que en el segundo se obtuvieron yemas de tamaño medio (± 3 cm).

Tabla N° 3. *B. darwinii*. Longitud de brotes de yemas desarrolladas: Mayor (Ma)(± 4 cm/Ma), Medio (Me)(± 3 cm/Me), Pequeño (Pe)(± 2 cm/P) en tres subcultivos consecutivos de segmentos uninodales en medio MS con la mitad de la concentración de sus sales.

	N° yemas totales desarrolladas en los subcultivos	Longitud *					
		Ma	%	Me	%	Pe	%
Primer subcultivo	70	10	14,3	30	42,8	30	42,9
Segundo subcultivo	68	13	19,1	30	44,1	25	36,8
Tercer subcultivo	88	15	17,0	24	27,3	49	55,7

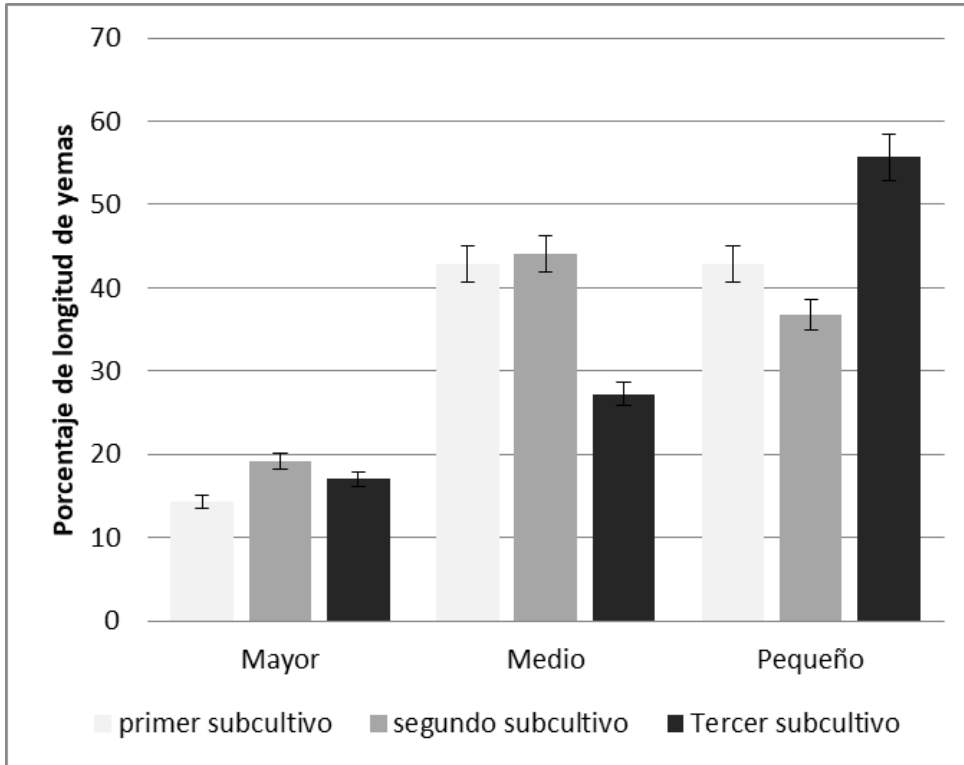


Figura N° 14: *B. darwinii*. Distribución de Longitud de yemas desarrolladas: Mayor (± 4 cm), Medio (± 3 cm), Pequeño (± 2 cm) en tres subcultivos consecutivos en medio MS con la mitad de la concentración de sales.

En la etapa de establecimiento del cultivo, se observó que algunos de los explantes presentaban desarrollo radicular. Se evaluó presencia y la cantidad de raíces. En la Figura N° 15, se muestra que, a medida que se avanza en los subcultivos, la proporción de plantas que presentan desarrollo de raíces va en aumento, así también como la cantidad de raíces por plántula. El desarrollo de raíces fue de 16% en el primer subcultivo, 36% en el segundo y 43% en el tercero.

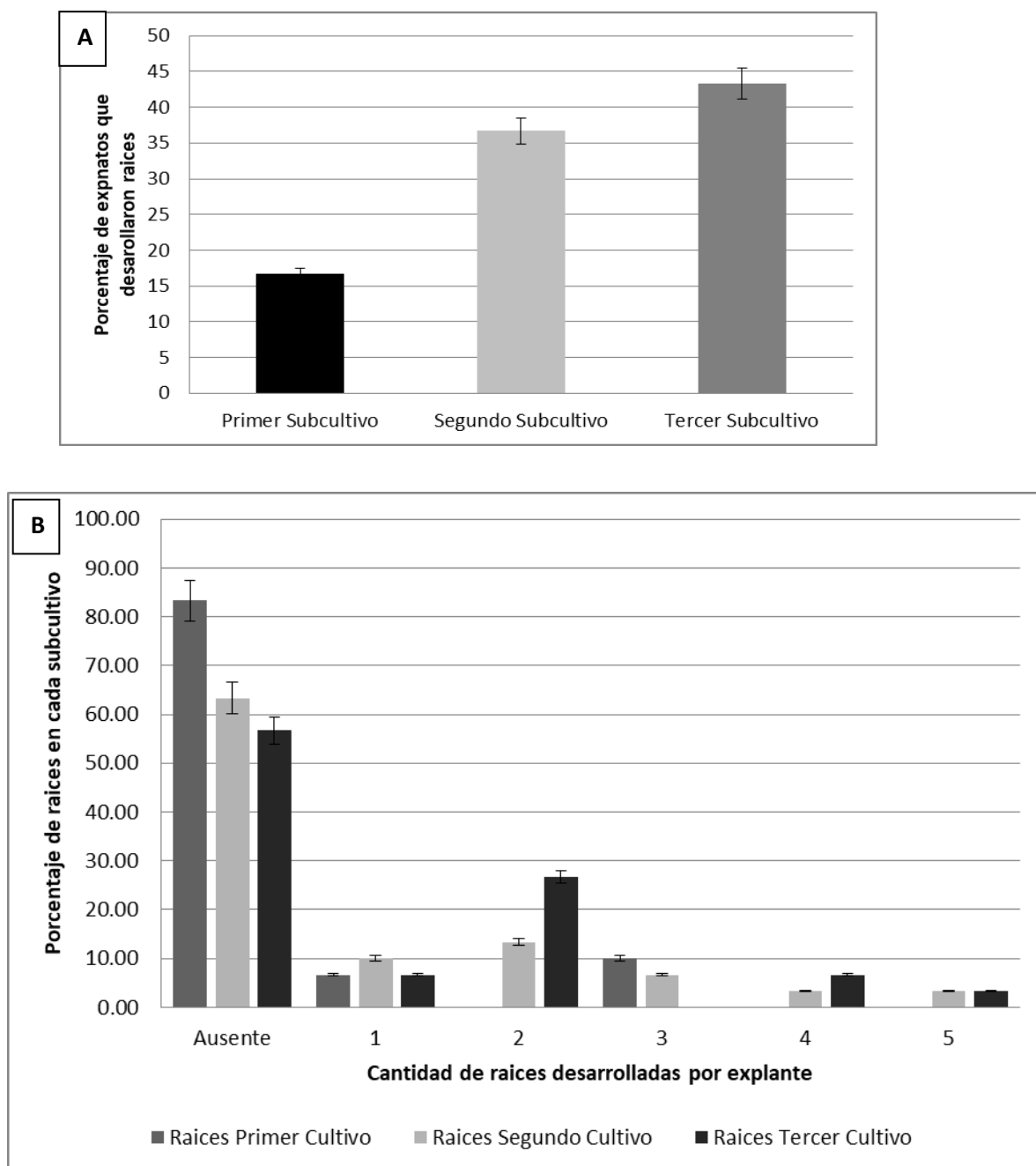


Figura N°15. *Baccharis darwinii*: A) Porcentaje de explantos que desarrollaron raíces en cada subcultivo. B) Distribución de cantidad de raíces desarrolladas en los tres subcultivos consecutivos en medio MS con la mitad de la concentración de sales.

* Ausente: No se observaron desarrollo de raíces en el subcultivo.

4.2. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS Y MULTIPLICACIÓN

Las vitroplantas establecidas (Figura N°17) fueron transferidas al medio para su multiplicación siguiendo la metodología citada. Se evaluó luego la tasa de multiplicación que se obtuvo del cociente entre el número de explantes obtenidos y el número de explantes cultivados en cada subcultivo.

En la Tabla N°4 se registra la tasa de multiplicación calculada en los sucesivos subcultivos. Los explantes se desarrollaron en medio MS con la mitad de la concentración de micro y macro nutrientes, suplementados con reguladores de crecimiento detallados en la metodología.

Tabla N°4. *Baccharis darwinii*. Efecto de los reguladores de crecimiento en la tasa de multiplicación en el curso de los sucesivos subcultivos.

Reguladores (μM)		Subcultivo		
BAP	IBA	1	2	3
-	-	$1,2 \pm 0,58$	$1,65 \pm 0,89$	$1,62 \pm 0,75$
2,20	0,23	$3,17 \pm 0,70$	$2,1 \pm 0,84$	$1,96 \pm 0,60$
4,40	0,46	$3,00 \pm 1,18$	$2,84 \pm 1,34$	$2,31 \pm 0,79$
6,70	0,73	$2,56 \pm 1,12$	$3,23 \pm 1,18$	$2,40 \pm 0,71$

Se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la tasa de multiplicación entre cultivos con y sin agregado de reguladores de crecimiento (Anexo 2.3). Sin embargo dichas diferencias no resultaron significativas cuando se analizaron los resultados obtenidos entre cultivos sometidos a diferentes tratamientos con fitohormonas (Figura N°16). La mayor tasa de multiplicación obtenida fue en el segundo subcultivo ($3,23 \pm 1,18$) cuando se incrementó la concentración BAP: IBA ($6,7 \mu\text{M}$: $0,73 \mu\text{M}$).

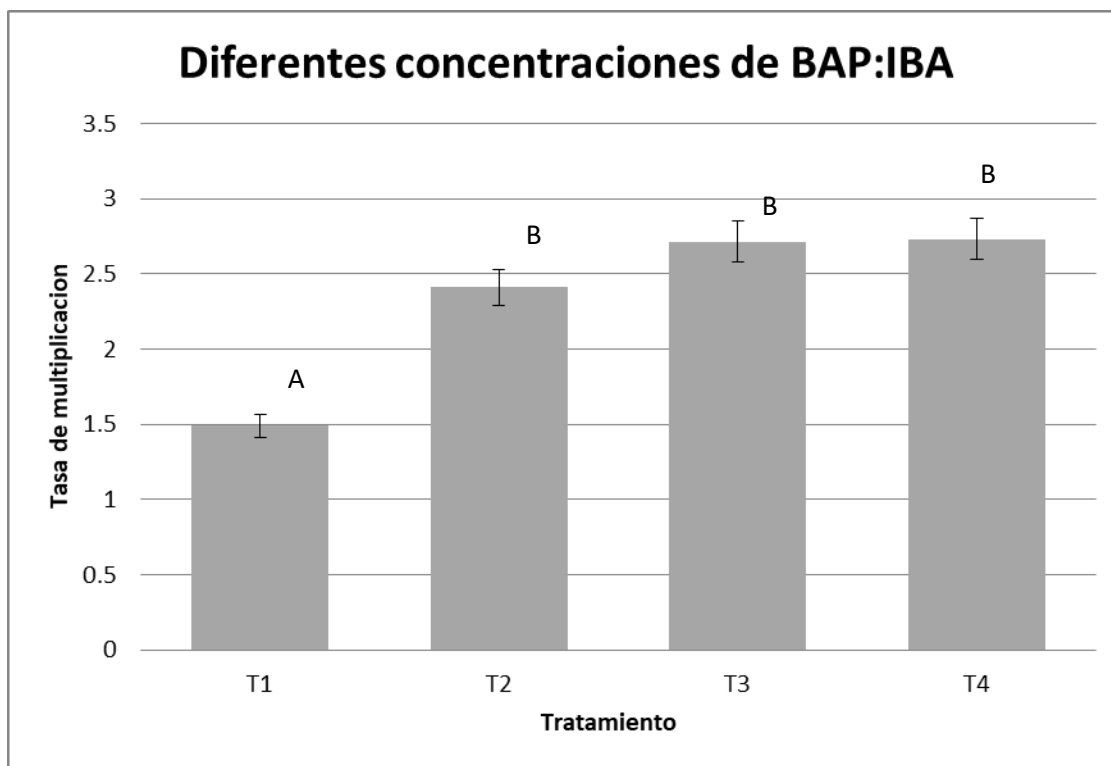


Figura N°16. *B. darwinii*. Tasa de multiplicación, desarrollo de brotes en distintas concentraciones de reguladores de crecimiento. (T1): MS basal (BM): (T2): BM con la adición de BAP: IBA (2,2 μ M: 0,23 μ M). (T3): BM con suplementado con BAP: IBA (4,4 μ M: 0,46 μ M) (T4): BM con BAP: IBA (6,7 μ M: 0,73 μ M). Medias con una letra diferente muestran diferencias estadísticamente significativas, ($p < 0,05$).

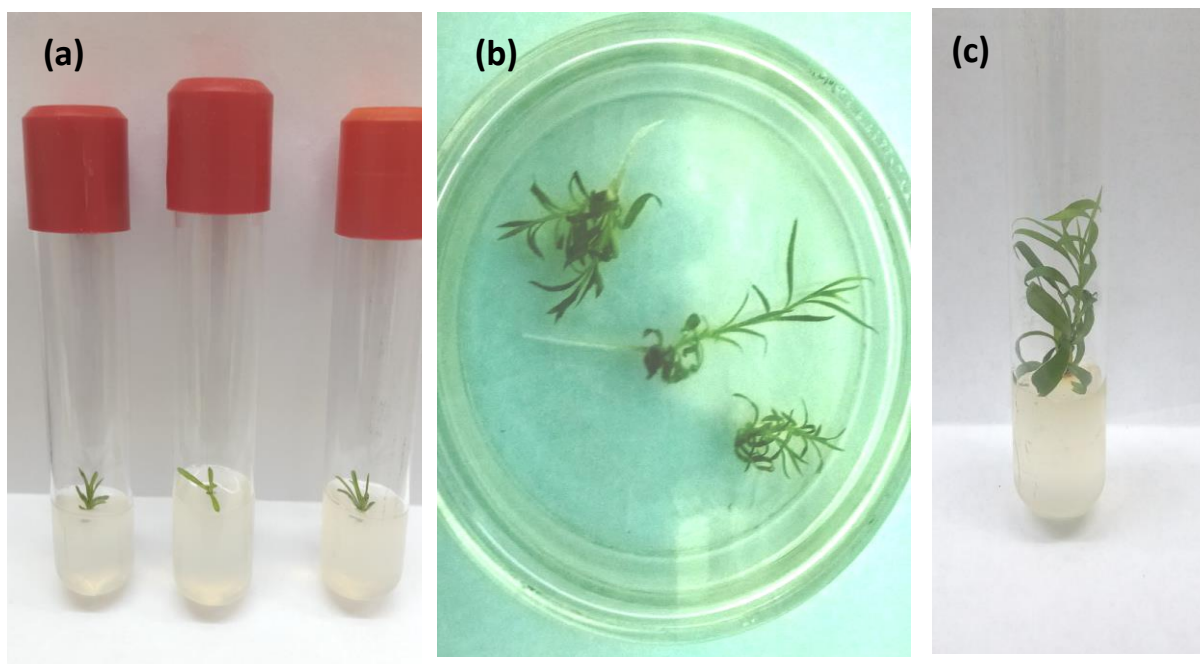


Figura N°17. *Baccharis darwinii*. Etapa de multiplicación en medio MS con la mitad de concentración de sales (a) Aspecto de brotes al inicio de los cultivos (b) Aspecto de planta de 30 días después de su siembra, en medio $\frac{1}{2}$ MS sin el agregado de reguladores de crecimiento. (c) Plántula cultivada en medio $\frac{1}{2}$ MS con la adición de BAP: IBA ($2,2 \mu\text{M}$: $0,23 \mu\text{M}$).

4.3. ENRAIZAMIENTO

La Figura N°18 muestra los resultados obtenidos donde la mejor respuesta rizogénica se observó en el tratamiento libre de fitohormonas y en medio Gamborg (84%) (Figura N°19) luego de 30 días en cámara de cultivo a 21°C (± 2) y fotoperiodo de 16 h.

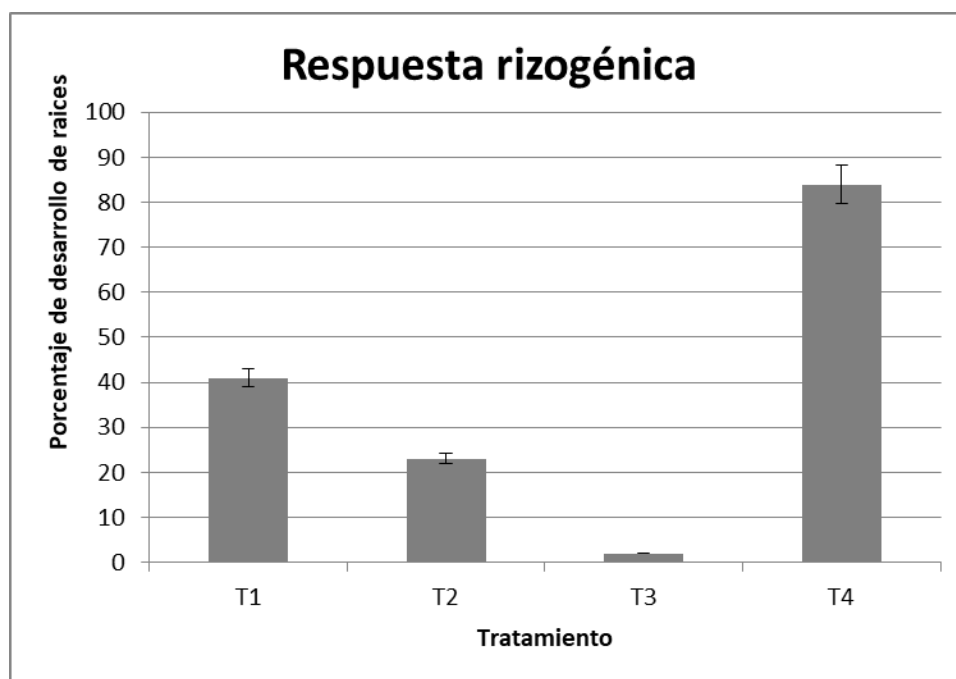


Figura N°18. *B. darwinii*. Desarrollo de raíces en respuesta a las distintas concentraciones de sales ensayadas en medio MS sin y con reguladores y en medio de Gamborg.

*T1: MS completo, T2: MS mitad de sales, T3: MS mitad de sales suplementado con BAP:IBA (4,0:2,0 μ M), T4: Medio Gamborg.



Figura N°19. *B. darwinii*. Raíces formadas después de 25 días de cultivo en medio Gamborg completo, sin reguladores del crecimiento y fotoperíodo 16 hs.

4.4. ACLIMATACION

La etapa de aclimatación (Figura N° 20) se llevó a cabo sin inconvenientes, lográndose una supervivencia de 94% de las plántulas seleccionadas. Después de los 67 días, se registró una altura promedio del tallo de 30 cm de y un desarrollo radicular, con una longitud promedio de 18,5 cm (Figura N° 21 y 22).

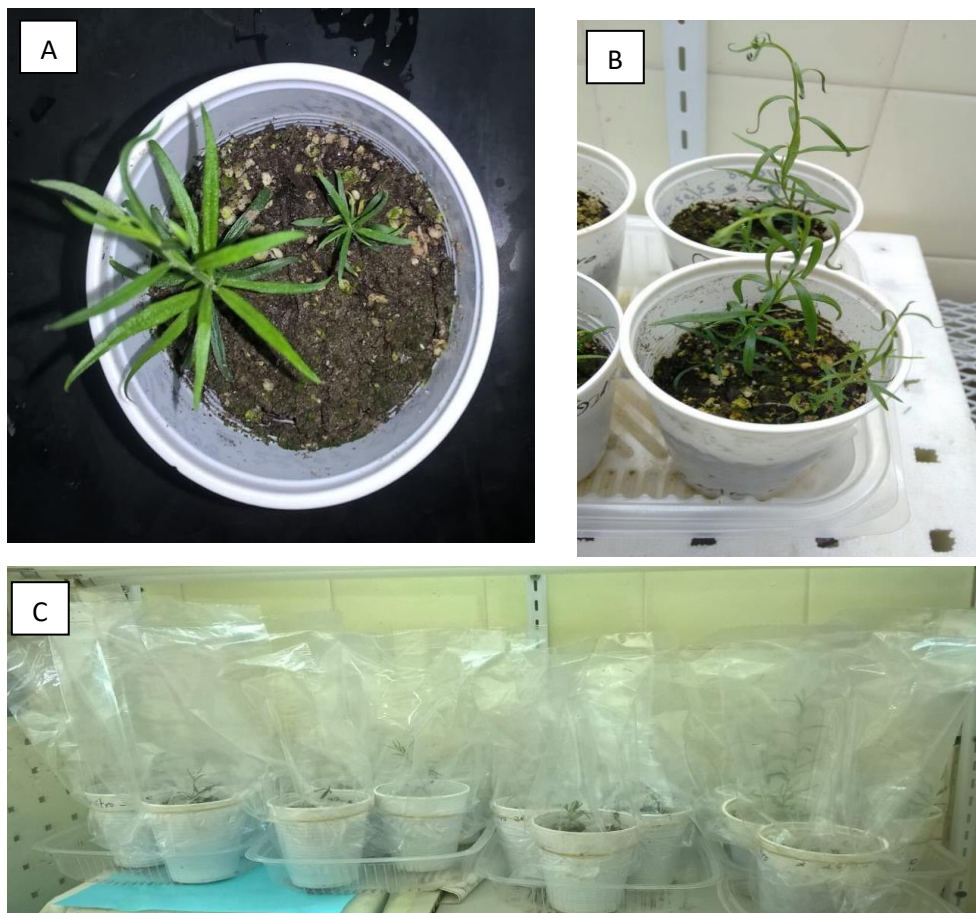


Figura N°20. *B. darwinii*. A) Plántulas en el inicio de la aclimatación. B) y C) Plantas a 10 días de cultivo en turba: perlita en cámara de cultivo.

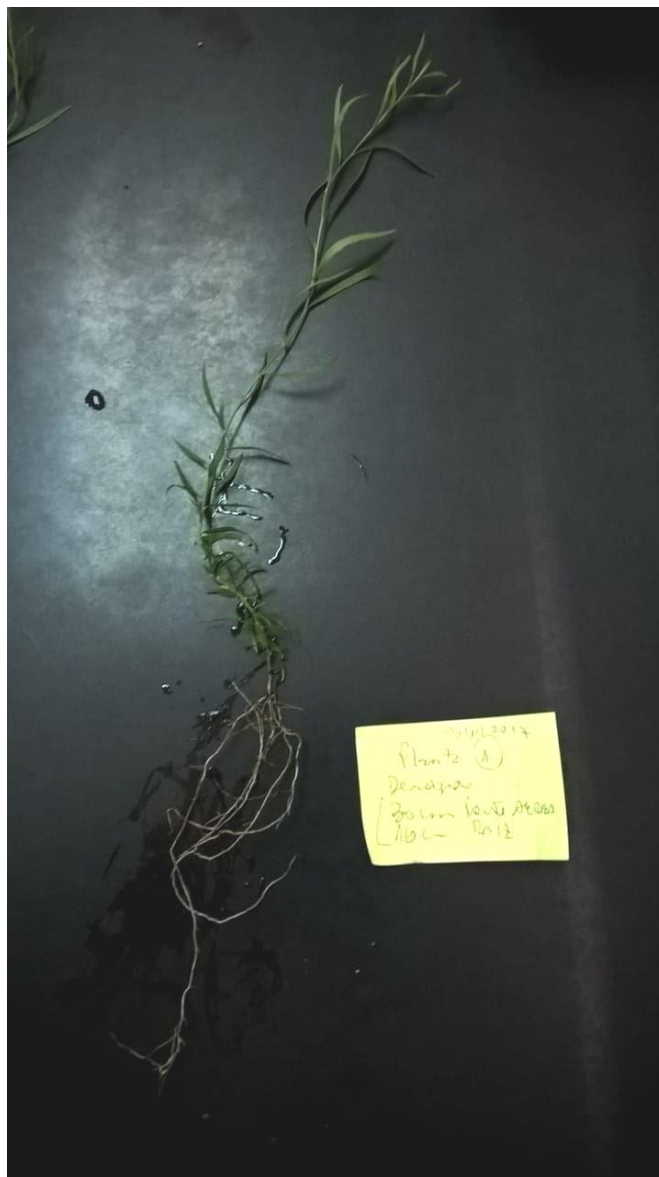


Figura N°21. *B. darwinii*. Planta descalzada luego de 67 días del periodo de aclimatación, previo a transferencia a maceta.

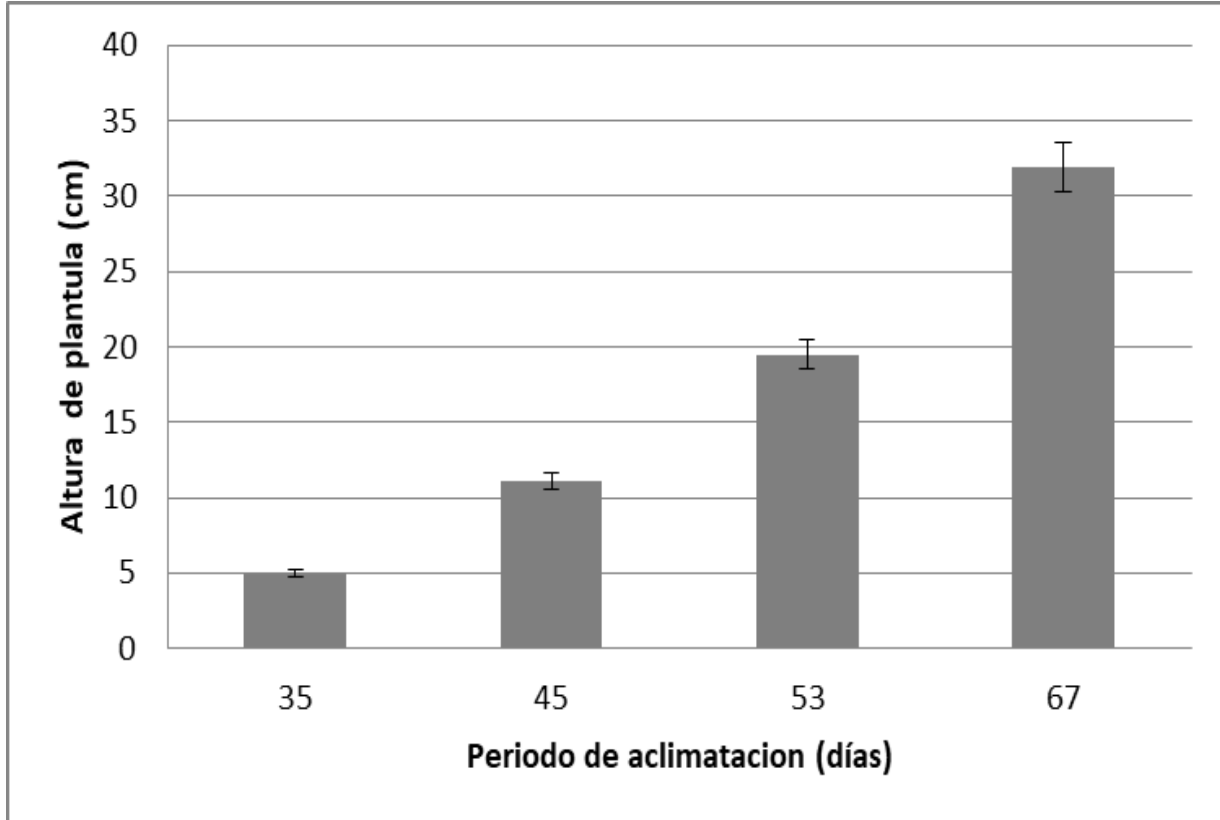


Figura N°22. *B. darwinii*. Gráfico de medias de intervalo para la altura de plantas de *B. darwinii* durante el periodo de aclimatación.

Al concluir los 67 días en laboratorio, las plantas fueron transferidas a macetas y llevadas a campo (Figura N° 23). Después de tres meses de trasplantadas, no se observaron diferencias significativas entre las plantas (Figura N° 24). Se desarrollaron en forma normal y similar sin aparentes cambios en la morfología de los individuos.



Figura N° 23. *B. darwinii*. Aspecto de las plantas transferidas a macetas a los 45 días de cultivo en laboratorio.



Figura N° 24. *B. darwinii*. Plantas en macetas en etapa de rustificación luego de tres meses a campo.

4.5. COMPARACIÓN MEDIANTE CROMATOGRFÍA EN PLACA DELGADA DE EXTRACTOS DE *B. DARWINII*

El análisis de las cromatoplas, mostró la presencia de diversas potenciales biomoléculas en el extracto de hojas y tallo de la planta (Anexo 3)

Los constituyentes fitoquímicos dieron diferentes valores de Rf en las distintas fases móviles. Estas variaciones de Rf proporcionan un dato importante en el entendimiento de la polaridad y también ayuda en la selección de sistemas de solventes apropiados para la obtención de compuestos puros mediante otros métodos de separación.

El análisis de las TLC confirmó la presencia de componentes bioactivos cuando las placas fueron sometidas a luz UV tanto de 253 nm y 366 nm y se determinaron los valores de Rf y color de los patrones y para cada banda de los distintos extractos, en los diferentes sistemas de solventes (Anexo 3 y Anexo 4).

Es probable que las bandas detectadas contengan la presencia de más de un metabolito pero, para efectos prácticos en el análisis de los resultados y teniendo en cuenta las limitaciones de esta técnica, se tomó cada banda como un compuesto.

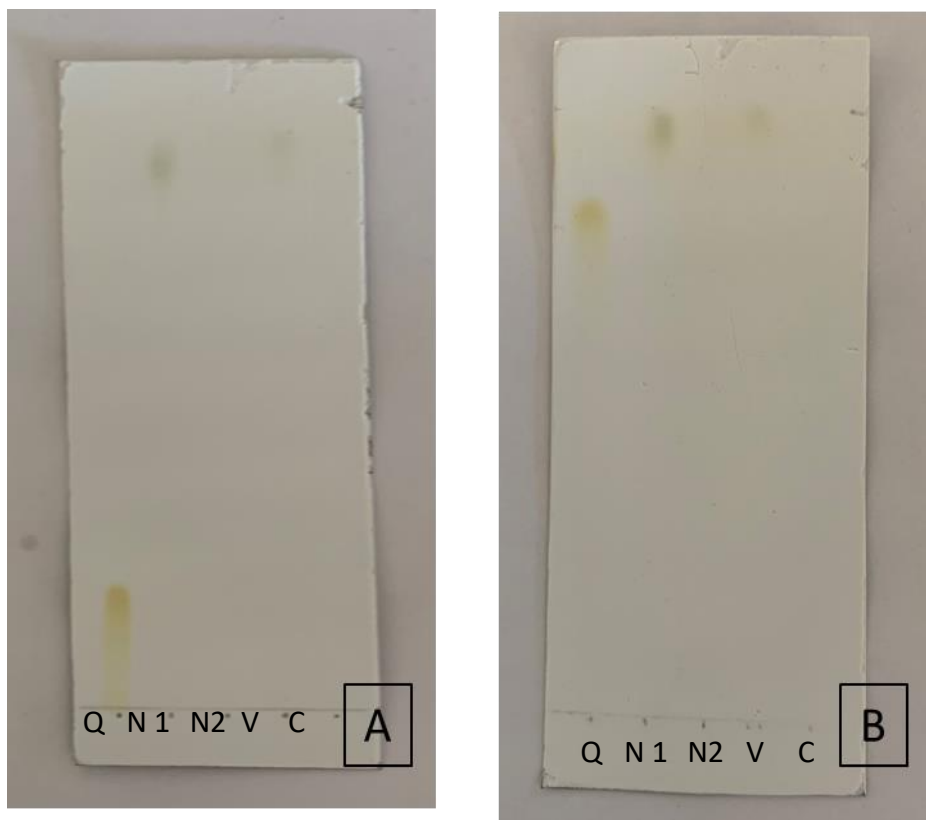


Figura N° 25. Placas Cromatográficas de Extractos de *B. darwinii*: **Q**: patrón de Quercetina; **N1**: Extracto de Planta Nativa, **N2**: Extracto de Planta Nativa; **V**: Extracto de Planta *In Vitro*, **C**: patrón de Cumarina. A) Extracto de Éter de petróleo. Fase móvil: Cloroformo: Metanol (9:1) Detección: vapores de Amoníaco. B) Extracto de Éter de petróleo. Fase móvil: Acetato de Etilo: Metanol: Agua (100:13.5:10) Detección: vapores de Amoníaco

El análisis cromatográfico en capa delgada de los extractos reveló la presencia de compuestos con características de migración similares al estándar de Cumarina cuando se lo observó a 253 nm. Al ser tratadas con la solución etanólica de Hidróxido de Potasio al 10% y sometidas a luz UV 366 nm, se pudo observar una fluorescencia azul intensa. El eluyente influye en la posición de las manchas (R_f) y varía para cada sistema. Sin embargo, la fluorescencia de las manchas es más específica del tipo de sustancia, aunque

no permita identificar sustancias concretas, sino grupos fitoquímicos. Por tanto, la presencia de fluorescencia azul en las placas, al ser tratadas con el revelador, reforzaría la conclusión que se trata de cumarinas, tanto en los extractos metanólicos, etéreos, diclorometanólicos y acuosos.

También se observó en las cromatoplasmas la presencia de manchas rojas, especialmente en los extractos etéreos y metanólicos, con un R_f igual al frente de corrida. Dichos compuestos podrían tratarse de clorofilas. Su presencia se evidencia en las placas reveladas con vapores de amoníaco, como manchas de color oscuras en el frente de corrida (Figura N° 25).

De las cuatro fases móviles ensayadas, el sistema de Cloroformo: Metanol (9:1) fue en el cual se obtuvo la mejor resolución y separación los compuestos presentes en los extractos. En el sistema BAW (n-Butanol: Acido Acético Glacial: Agua), se observó una mejor separación de los metabolitos extraídos con metanol e identificados como flavonoides, por presentar color amarillo-naranja al ser sometidos a vapores de amoníaco. Sin embargo, los compuestos que presentaron reactividad con la solución de KOH 10%, empleada para el revelado de cumarinas, no se separaron de forma eficiente, teniendo un R_f casi similar al frente de corrida. De la misma forma, con el sistema Acetato de Etilo: Metanol: Agua se observó una separación de los compuestos identificados como flavonoides, pero no los compuestos identificados como cumarinas.

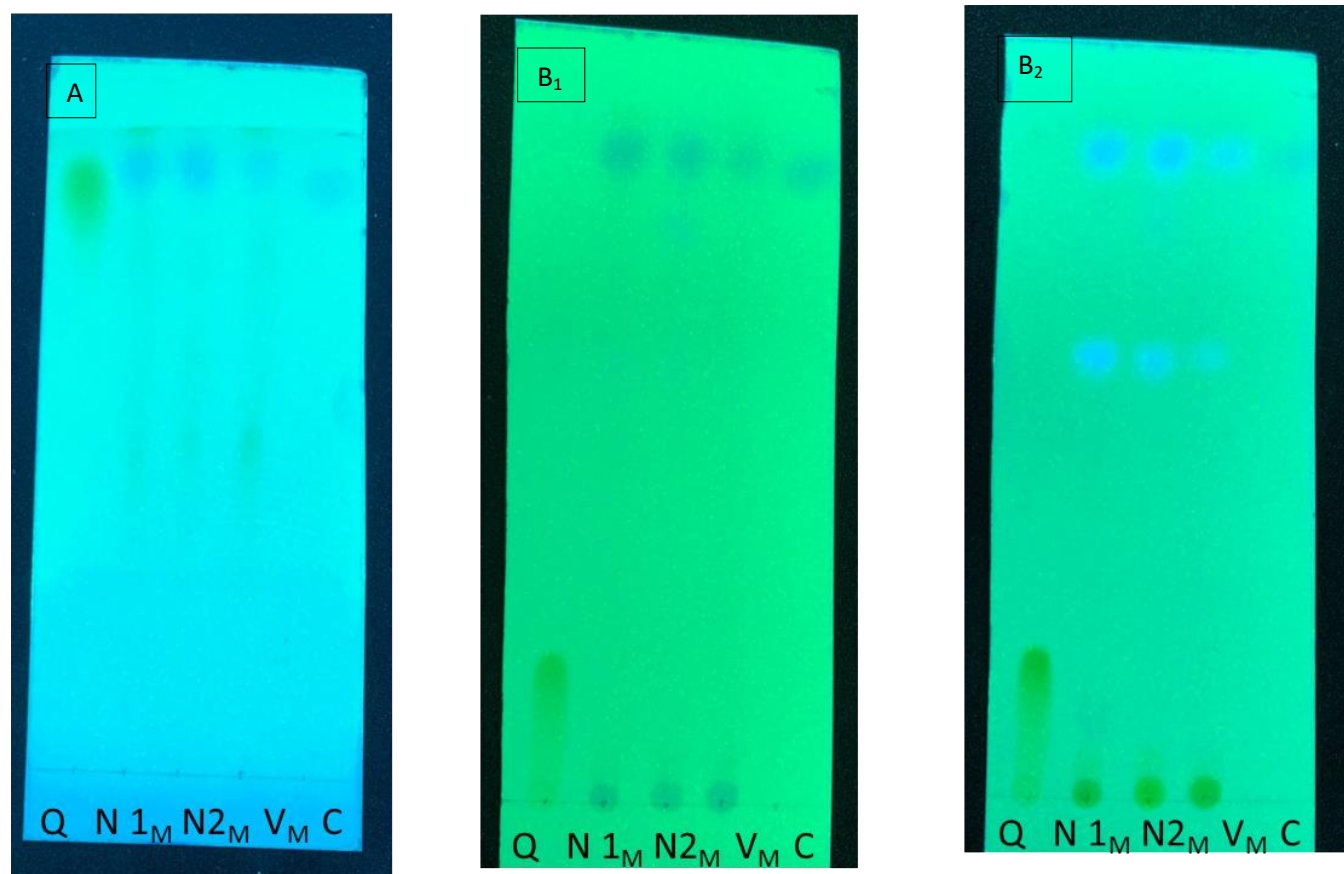


Figura N° 26. Placas Cromatográficas de Extractos metanólicos de *B. darwinii*: **Q**: patrón de Quercetina; **N1_M**: Extracto Metanolico de Planta Nativa, **N2_M**: Extracto Metanolico de Planta Nativa; **V_M**: Extracto Metanolico de Planta *In Vitro*, **C**: patrón de Cumarina A) Fase móvil: BAW (4:1:5), revelado: UV 253 nm. B₁) Fase móvil: Cloroformo: Metanol (9:1), revelado: UV 253 nm. B₂) Fase móvil: Cloroformo: Metanol (9:1), revelado: UV 253 nm y KOH 10%.

Debido a que la actividad antifúngica informada por Kurdelas (2010) fue adjudicada a la presencia de cumarinas. Se ensayó otra fase móvil para lograr una mejor resolución de las bandas posiblemente asociada a estos compuestos. Se empleó una fase móvil de Tetracloruro: Metanol (9:1), para los extractos obtenidos con Metanol, Éter de Petróleo y Diclorometano (Figura N° 27 y 28)

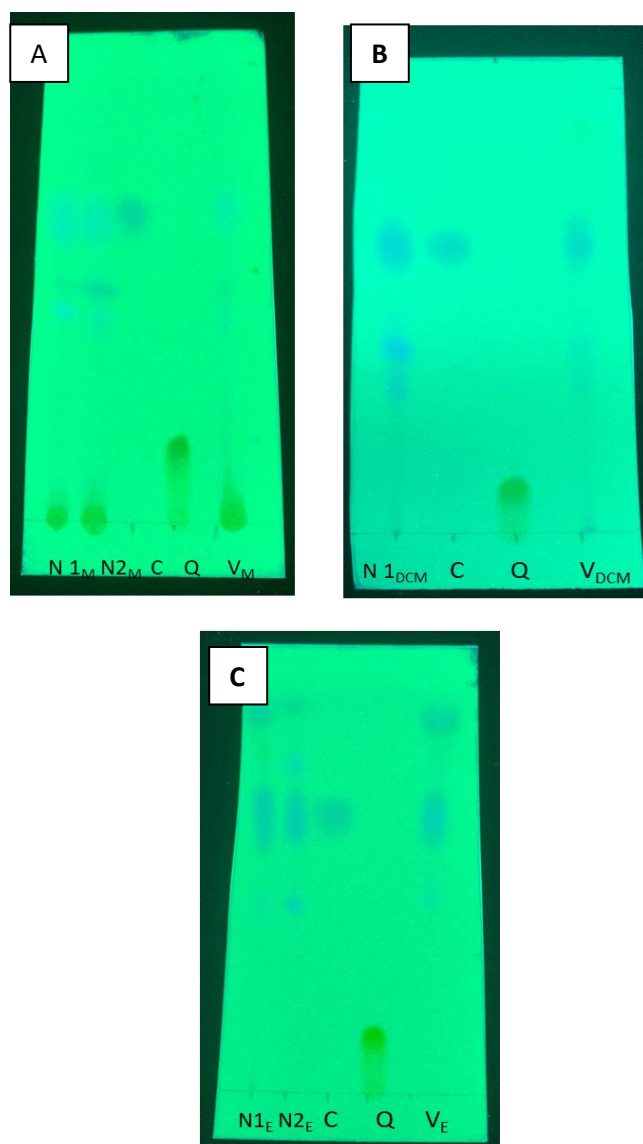


Figura N° 27. Placas Cromatográficas con Fase Móvil: Tetracloruro: Metanol (9:1), revelado bajo luz UV 253 nm: A) Extracto Metanólico B) Extracto de Diclorometano C) Extracto de Éter de petróleo.* **Q**: patrón de Quercetina; **N1**: Extracto de Planta Nativa, **N2**: Extracto de Planta Nativa; **V**: Extracto de Planta *In Vitro*, **C**: patrón de Cumarina.

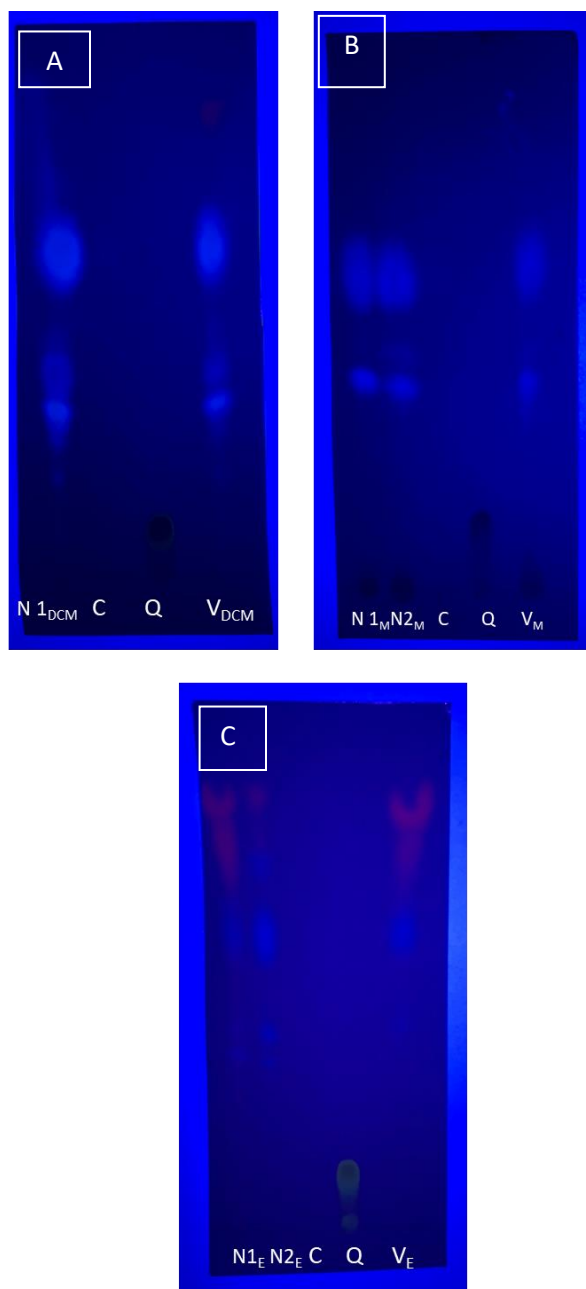


Figura N° 28. Placas Cromatográficas con Fase Móvil: Tetracloruro de Carbono: Metanol (9:1) bajo luz UV 366 nm: A) Extracto de Diclorometano B) Extracto Metanólico C) Extracto de Éter de petróleo.* **Q:** patrón de Quercetina; **N1:** Extracto de Planta Nativa, **N2:** Extracto de Planta Nativa; **V:** Extracto de Planta *In Vitro*, **C:** patrón de Cumarina.

El sistema Tetracloruro: Metanol (9:1) presentó una mejor resolución de la cromatografías, logrando la separación de compuestos que, en los sistemas anteriores, habían migrado conjuntamente y se observaron como una única banda (Figura N° 27 y 28). Obteniéndose para el extracto de metanol, tres (3) puntos con los siguientes Rf: 0,39; 0,57; 0,66 para la planta Nativa₁ y para la muestra de planta Nativa₂. Mientras que en el extracto de la planta generada *in vitro* se observaron dos compuestos con Rf: 0,5 y 0,66. En las placas donde se corrieron los extractos etéreos se observaron cuatro (4) manchas 0,40; 0,5; 0,67 y 0,90 para la planta Nativa₁, cinco (5) para la planta Nativa₂: 0,40; 0,5; 0,67; 0,74 y 0,90 y tres (3) para la planta *in vitro*: 0,43; 0,65 y 0,88. En el extracto diclorometanólico se observaron cuatro (4) 0,28; 0,37; 0,39 y 0,63 para la planta Nativa₁ y cinco (5) para la planta *in vitro*: 0,31; 0,39; 0,62; 0,70 y 0,92.

No todas las bandas presentaron reactividad cuando se los trató con la solución reveladora para cumarinas, indicando que en los extractos, también se encontraban presentes otros compuestos.

5. DISCUSIÓN

Conocidas por los principios químicos que poseen, las especies del género *Baccharis spp.* tienen un uso más o menos intensivo en medicina popular y han sido objeto de gran cantidad de estudios fitoquímicos y de actividad biológica (Verdi *et al.*, 2005). Son diversos los trabajos publicados que confirman el potencial medicinal de las plantas pertenecientes al género *Baccharis spp.* Sin embargo los estudios biotecnológicos de micropropagación en la especie *B. darwinii* son escasos. (Kajari, 2004). Como respuesta tecnológica se han evaluado diferentes alternativas para aumentar la disponibilidad de plantas a muy corto plazo, lo que es imposible de obtener en nuestro medio con métodos convencionales (propagación por estacas), pero sí es posible mediante el cultivo “*in vitro*”.

El presente estudio fue llevado a cabo para el desarrollo eficiente y reproducible de un protocolo de micropropagación clonal y posterior aclimatación de *B. darwinii*, una planta autóctona de la Patagonia, con potencial farmacológico.

En el inicio del cultivo de *Baccharis* resulta necesario definir la forma de producción de los explantes. La generación de plántulas a través de la germinación de semillas del género *Baccharis* ha sido informada en otras publicaciones (Gómez y Fernandes, 2002; Tucut, 2015; Leyva y Peralta, 2019). En nuestro estudio, se evaluaron diferentes agentes y tiempos de desinfección y promotores de la germinación para obtener plántulas *in vitro*. El mayor porcentaje de germinación obtenido fue de 31,7 %. Berastegui *et al.* (2010), habían informado en su trabajo un porcentaje de germinación similar al obtenido (35 ±11) % y coincidiendo en lo informado por Santos (2016) para *B. dracunculifolia* DC. También han sido reportados porcentajes menores (1%), como los obtenidos por Aráoz *et al.*, (2016) y Moreno-Pizani (2019). Dicha baja tasa de germinación, puede ser atribuida a la maduración heterogénea de

las semillas de las *Asteráceas*, resultante en una alta proporción de aquenios vanos (Tardáguila, 2004; Aráoz *et al.*, 2016).

Los protocolos de desinfección aplicados a las semillas de *Baccharis darwinii* recolectadas no dieron resultados positivos. Las plántulas obtenidas no presentaban contaminación visible en los germinadores. Desafortunadamente el 100% de los explantes provenientes de todos los protocolos de desinfección estuvieron infectados cuando fueron transferidos al medio de cultivo, indicando que los protocolos de asepsia ensayados, no fueron los suficientemente eficaces para la desinfección de las semillas. La asepsia y esterilización del material vegetal es clave en el inicio del cultivo *in vitro*.

Entre los factores que afectan la viabilidad del material vegetal en el establecimiento del cultivo, se menciona el tratamiento de asepsia, también se señala la importancia y el tipo de explante, el estado de desarrollo y el estado fisiológico del mismo, además del medio nutritivo y de las condiciones de cultivo (Sharry *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos en este trabajo no permitieron ajustar un protocolo de desinfección de semillas, y posterior introducción *in vitro* para obtener plantas axénicas, que luego constituyan una fuente de explantes para la multiplicación. En nuestro estudio utilizamos segmentos nodales jóvenes de plantas madres a campo para la iniciación del cultivo.

La asepsia y posterior establecimiento del material de campo se optimizaron con el uso de una solución de etanol al 70%, posteriormente de hipoclorito de sodio al 20%. Los segmentos seleccionados, y desinfectados fueron inoculados en medio MS, utilizado por Kajiki and Shepherd en 2006 en *B. tridentata*. Ellos demostraron que la composición salina del medio básico MS resultó adecuada para el cultivo de dicha especie, donde se observaron los mejores resultados de proliferación, el mismo comportamiento, se registró en el desarrollo de plántulas de *B. myriocephala*.

Por otra parte, Paiva *et al* (1997) realizaron ensayos de micropropagación MS con el 50% de la concentración de sus sales y obtuvieron un buen desarrollo *in vitro* de *B. gloxinia*. Las plantas de la *B. myriocephala* y *B. tridentata* (Kajiki and Shepherd, 2006), mostraron los mejores resultados de proliferación en el medio MS completo de sales.

En general los valores de pH 5,5-5,8 favorecieron el crecimiento de las especie *Baccharis tridentata*, y *Baccharis dracunfolia*. Varios estudios mostraron que las mencionadas concentraciones de iones resultaron ser las más convenientes, ciertamente por favorecer la solubilidad de la mayoría de los nutrientes minerales, siendo estos valores los más utilizados en el cultivo de tejidos (Caldas *et al.*, 1998).

Sin embargo, en nuestros ensayos, el material vegetal presentó una fuerte oxidación (caracterizada por el oscurecimiento de los explantes y del medio) que puede ser atribuido a la presencia de compuestos oxidantes liberados por los segmentos inoculados. En algunas especies, durante la etapa de aislamiento, ocurre la liberación de compuestos fenólicos por las células dañadas, causado por los agentes desinfectantes en la asepsia, los cortes, los cambios en el pH, la composición del medio de cultivo, como así también el volumen y la calidad del frasco de cultivo (Grattapaglia y Machado, 1998; Van Staden, 2006). Dichos metabolitos difunden rápidamente al medio de cultivo y resultan tóxicos para el explante. La oxidación está estrechamente relacionada con el estrés oxidativo que sufren las células cultivadas *in vitro* provocando la estimulación del metabolismo de los compuestos fenólicos (Azofeifa, 2009).

En la práctica existen varias estrategias para eludir los procesos de oxidación durante el cultivo: usar explantes en estado juvenil o en crecimiento activo, disminuir la intensidad de la luz de cultivo, disminuir la temperatura, realizar subcultivos con frecuencia, inocular el explante en medio líquido, agregar antioxidantes al medio, disminuir el pH, agregar adsorbentes como carbón activado, disminuir la duración de la esterilización del explante o cambiar el agente desinfectante, incrementar las sales de calcio y reducir los niveles de nitrato (D'Silva y D'Souza, 1993; George, 1996; Harikrishnan, *et al.*, 1997; Aliyu, 2005, Sharry, 2015; Naranjo y Gomez, 2017). Es conocido que la composición salina del medio MS es satisfactoria para el crecimiento adecuado de muchas especies de plantas, mientras que para otras especies resulta tóxico (Sharry *et al.*, 2015). Por lo tanto, para minimizar la presencia de compuestos oxidantes en el medio, los segmentos fueron sembrados en medio

basal de Murashige y Skoog, con mitad de la concentración de sales, complementado con sacarosa 30 gr/L y sin reguladores de crecimiento. Pudimos verificar que reduciendo la concentración salina, y realizando subcultivos con mayor frecuencia, la concentración de compuestos oxidantes liberados por los explantes se redujo notoriamente, permitiendo el establecimiento del cultivo y desarrollo de las vitroplantas.

En la primera etapa de establecimiento, la tasa de proliferación a través de los subcultivos fue en aumento. El mayor rendimiento promedio ($2,93 \pm 1,08$ yemas/explante) se obtuvo en el tercer subcultivo. En la etapa de micropropagación de brotes, los resultados mostraron que la combinación de BAP: IBA influyen la diferenciación celular y organogénesis en cultivo de tejidos y órganos (Masondo *et al*, 2014). En nuestros ensayos se observaron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos con y sin fitoreguladores. De acuerdo a la literatura, las auxinas (IBA), intervienen en el crecimiento y desarrollo de las plantas porque afecta la división celular, elongación y diferenciación (Leyva y Peralta, 2019). Las citocininas inducen la formación de brotes adventicios e inhiben la formación de raíces, promueven la multiplicación de tallos y proliferación de yemas laterales, a través de la disminución de la dominancia apical (Sharry *et al*, 2015). Una gran variedad de citoquininas han sido utilizadas debido a que promueven la división celular y estimulan la iniciación y crecimiento de brotes (Saini, 2013).

Cuando la concentración de citocininas es proporcionalmente superior a la concentración de auxinas, se promueve la multiplicación de brotes (KPI, 2015). La tasa de multiplicación más alta ($3,23 \pm 1,18$) se registró con la combinación de BAP: IBA ($6,7 \mu\text{M}$: $0,73 \mu\text{M}$). Los efectos de BAP, observados en el presente estudio, están en consonancia con los informados por otros autores (Kajiki y Shepherd, 2006). Berastegui *et al*, (2010) obtuvo una tasa de multiplicación más alta ($2,06 \pm 1,18$) para *B. darwinii* y con la combinación de BAP: IBA ($4,0 \mu\text{M}$: $2 \mu\text{M}$). Grattapaglia y Machado (1998), demostraron que la fitohormona BAP adicionada al medio de cultivo ha sido eficaz para promover la multiplicación en diversas especies.

El enraizamiento del cultivo *in vitro* es una etapa importante de la micropropagación. Las plantas no siempre enraízan con tanta facilidad, es bien

conocido un trabajo clásico de Skoog y Miller (1957), citado por Murashige en 1974 la necesidad de una alta concentración de auxinas y una baja de citocininas para que ocurra el enraizamiento.

Algunas especies de *Baccharis* presentan un desarrollo radicular espontáneo, como informan Singh y Dwivedi (2014) para *B. myriocephala*, sin embargo, para otras especies del mismo género, es necesario el desarrollo de un protocolo que induzca la formación de raíces (Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2016).

De Bona (2004) concluyó que la propagación vegetativa de *Baccharis trímera* por medio de estacas es viable y la especie presentó un mayor porcentaje de enraizamiento (100%) en invernadero, mientras que en *B. stenocephala* y *B. articulata* presentaron una proporción de raíces de 50 y 30% respectivamente.

La mejor respuesta rizogénica (84%) de las vitroplantas de *B. darwinii* cultivadas *in vitro* se obtuvo en medio Gamborg sin la adición de fitohormonas después de 25 días de cultivo. Algunos autores indican que las hojas jóvenes de los explantes constituyen una fuente rica de auxinas, no siendo necesaria su adición al cultivo de muchas especies (Grattapaglia y Machado, 1998), además de la citoquinina endógena puede ser lo suficientemente baja, asegurando la proporción adecuada entre estos reguladores para el enraizamiento de las plántulas. Dicho proceso también fue observado en la etapa de establecimiento del cultivo, cuando las plántulas fueron crecidas en medio MS con la mitad de sales y sin la adición de reguladores. En nuestros ensayos a medida que se avanzaba en los subcultivos, aumentaba la proporción de explantes que desarrollaban raíces, así también como la cantidad por plántula, 16% en el primer subcultivo, 36% en el segundo y 43% en el tercero.

Un protocolo de micropropagación completo debe incluir un proceso de aclimatación bien establecido. Por lo tanto, la transferencia a condiciones exteriores sigue siendo el mayor problema para la micropropagación de muchas especies de plantas (Chandra *et al.*, 2010).

La calidad de las plantas trasplantadas, el vigor de las mismas y la cantidad y calidad de raíces desarrolladas son factores muy importantes que contribuirán al éxito de la aclimatación.

El cultivo de tejidos puede generar cambios estructurales y fisiológicos que hace a las plantas más susceptibles al trasplante (Masondo *et al.*, 2014).

La pérdida de agua es uno de los principales factores de riesgo en la aclimatación, ocurriendo en las primeras horas después de la transferencia de las plántulas. Pre tratamientos utilizados para evitar la deshidratación son aplicados para aumentar la sobrevivencia de los cultivos (Kajiki y Shepherd, 2006). Este problema fue sorteado, empleando bolsas de polietileno sobre las plantas, de manera que la pérdida de agua por estas no se produjera en forma brusca.

La etapa de trasplante o de transferencia de la planta de la condición *in vitro* a *extra vitro*, es crítica en algunos casos y puede ser un limitante para la micropropagación. En nuestro estudio para *B. darwinii* la transferencia de las vitroplantas a condiciones *extra vitro*, en invernadero, resultó en una supervivencia del 94% de las plántulas. Otros trabajos, reportaron una supervivencia a invernadero de 78% de plantas viables de *B. darwinii* (Berastegui *et al.*, 2010).

Durante la etapa de transferencia a campo, se observó su crecimiento y luego de aproximadamente tres meses se comprobó que las plantas se desarrollaron en forma normal y similar a las naturales sin aparentes cambios en la morfología de los individuos.

De acuerdo a nuestros ensayos, las condiciones óptimas para la micropropagación y rusticación de plantas de *B. darwinii* se logró mediante la utilización del medio MS con la mitad de la concentración de sus sales y con la combinación de BAP: IBA (6,7 μM : 0,73 μM), a la cual se registró la tasa de multiplicación más alta ($3,23 \pm 1,18$).

Los usos medicinales de las especies del género *Baccharis* han sido vinculados a la composición química de este, basada principalmente en flavonoides, diterpenos y triterpenos, cumarinas y aceites esenciales. En *B. darwinii*, se determinó la presencia de β -farnesano, auraptén, 5'-oxoauraptén, y 6',7'-epoxi- y 6',7'-dihidroauraptén fueron informados por Zdero (1986), en una muestra recolectada en

la provincia Argentina de Neuquén y posteriores trabajos han reportado la actividad antimicrobiana de los mismos (Kurdelas *et al.*, 2010).

El método de análisis por TLC constituye una primera aproximación y una etapa preliminar imprescindible a la hora de optimizar la aplicación de métodos analíticos más precisos y sofisticados, como la técnica HPLC. En el trabajo realizado se observó que los métodos de extracción que se utilizaron fueron eficientes en la obtención de compuestos bioactivos. Los extractos crudos de *B. darwinii* de metanol, éter y diclorometano resultaron más eficientes en la obtención de metabolitos. Ya que, en los diferentes sistemas cromatográficos ensayados se observaron bandas que responden a los criterios de identificación de cumarinas. Kurdelas (2010), informo que extractos de Éter de petróleo, Metanol y DCM presentaron actividad antifúngica, la cual está asociada a las cumarinas, confirmando la presencia de estos compuestos en los extractos analizados.

Según Brunetti *et al.*, (2013) el entorno natural propicia desafíos que las plantas deben enfrentar para sobrevivir y desarrollarse. La presión del ambiente con sus factores bióticos y abióticos (Walters, 2005), la competencia generada por plantas vecinas, el cambio en la disponibilidad de nutrientes, temperatura e irradiación influyen de manera diferente en cada planta generando un cambio en su metabolismo (Kusano *et al.*, 2011 citado por Brunetti *et al.*, 2013). Debido a esto, es esperable encontrar diferencias en el perfil fitoquímico de las plantas obtenidas mediante cultivo *in vitro* cuando se las compara con las plantas nativas. En nuestro trabajo, el análisis por cromatografía de capa delgada (TLC) de los extractos crudos de *B. darwinii* presentaron un patrón de bandas de compuestos bioactivos similares para las distintas muestras, tanto para las dos muestras de plantas nativas como para la muestra de la planta cultivada *in vitro*. Sin embargo se observaron algunas variaciones en la cantidad de compuestos producidos, lo que hace suponer que el método de cultivo tuvo influencia en el metabolismo secundario de esta especie. También se evidenciaron diferencias en el perfil fitoquímico de las

muestras obtenidas en plantas nativas de distintas zonas de la ciudad de Comodoro Rivadavia.

Podríamos concluir que las condiciones de cultivo, en lo referente a factores físicos, nutricionales y hormonales tuvieron influencia sobre el metabolismo secundario y en la producción de compuestos de interés de la planta cultivada *in vitro* cuando fue comparada con la planta desarrollada en su ambiente natural.

Para una evaluación más precisa del perfil fitoquímico de la planta, sería recomendable la utilización de otro método de identificación (HPLC, GCMS o RMN), que permita corroborar la identidad de los compuestos observados en las TLC así como su cuantificación.

6. CONCLUSIONES

En la búsqueda de metabolitos bioactivos a partir de especies de la flora patagónica Argentina se evaluaron diversos métodos con el objetivo de estudiar las condiciones óptimas de micropropagación de plantas completas de *Baccharis darwinii*, a través de la micropropagación clonal.

Se aplicaron diferentes métodos de propagación in vitro y para ello, se probaron diferentes explantes, protocolos de desinfección y medios de cultivo. Se buscó superar el cuello de botella que implica la desinfección y establecimiento de los explantes en los medios de cultivo para lograr el establecimiento de las plantas. Desafortunadamente los protocolos de asepsia ensayados, no fueron los suficientemente eficaces para la desinfección de las semillas. El cultivo in vitro, en este caso, se mostró como un método poco eficaz para mejorar la respuesta a la germinación.

Se desarrolló un protocolo eficiente para la inducción y multiplicación de plantas de *Baccharis darwinii*. Protocolo que permitirá superar la diversidad genética por el uso de aquenios.

El estudio de los requerimientos para la micropropagación de *B. darwinii*, permitirá avanzar en las metodologías in vitro, en particular con las plantas nativas de interés farmacológico dado que la producción en masa alcanzada en los ensayos facilita la disponibilidad de material vegetal seleccionado que permitiría la evaluación biológica (actividades antifúngica y antioxidante), asegurando la conservación ex situ de la especie. Este estudio permitió desarrollo de un método de propagación eficaz de *B. darwinii*. Por otra parte, este estudio aporta estrategias biotecnológicas para la conservación y uso de un recurso fitogenético patagónico que puede aprovecharse en la recuperación de áreas degradadas

7. BIBLIOGRAFÍA

Boldt, P. E. (1989). *Baccharis* (Asteraceae), a review of its taxonomy, phytochemistry, ecology, economic status, natural enemies and the potential for its biological control in the United States. Miscellaneous publication MP-Texas Agricultural Experiment Station (USA).

Abad, M. J.; Bessa, A. L.; Ballarin, B.; Aragón, O.; Gonzales, E. y Bermejo, P. (2006). Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (Compositae). *Journal of ethnopharmacology*, 103(3), 338-344.

Abad, M. J. y Bermejo, P. (2007). *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7(1), 76-96.

Aliyu, O. M. (2005). Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: An appraisal. *African Journal of Biotechnology*, 4(13), 1485-1489.

Andersen, O.M. y Jordheim, M. (2006) *The Anthocyanins. Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, 471-551.

Anderson, W. C. (1975). Propagation of rhododendrons by tissue culture. 1. Development of a culture medium for multiplication of shoots. In *Comb Proc Int Plant Propag Soc.* 25, 129-135.

Anzenbacher, P. y Zanger, U. M. (2012). *Metabolism of drugs and other xenobiotics*. Wiley-VCH.

Aráoz, S.; Joseau, M.J.; Meehan, A. y Hernández, R. (2016) Calidad física y fisiológica de semillas de *Baccharis crispa* Sprengel y *Baccharis salicifolia* Ruiz & Pav. para su domesticación. *Quebracho* 24,59-69.

Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía mesoamericana*, 20(1), 153-175.

Barreiro, E. J. y Bolzani, V. D. S. (2009). Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química nova*, 32(3), 679-688.

Barroso, G. M.; Guimarães, E. F.; Ichaso, C. L. F.; Costa, C. G.; Peixoto, A. L. y Lima, H. C. (1978). *Sistemática de angiospermas do Brasil Vol 1(2)*. Universidade de São Paulo.

Berastegui, A.M.; Perales, S. G. ; Walicki, V.; Pentreath V & Peneff R. (2009). Estrategias Biotecnologicas Para La Conservacion Y Uso De Recursos Fitogeneticos Patagonicos; Micropropagacion De Schinus Marchandii F. A. Barkley. XXXII Jornadas Argentinas de Botánica; Huerta Grande, Córdoba, Octubre de. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica Volumen 44 Suplemento Córdoba, Argentina, pp 70

Berastegui, A.; Gratti, A; Peneff, R. y Freile, M. L. (2010). Congreso De Química De Productos Naturales Argentino-Chileno-Hispano La Diversidad Química Y Biológica De Organismos De La Región Patagónica, 26(2), 55.

Berastegui, A.M.; Perales, S. G. & Pentreath V. (2012). "Schinus marcandii: potencial fitogenético de la Patagonia Argentina".XXXII Editorial Académica Española 64

Betoni, J. E. C.; Mantovani, R. P.; Barbosa, L. N.; Di Stasi, L. C. y Fernandes Junior, A. (2006). Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(4), 387-390.

Bhojwani, S. S. y Razdan, M. K. (1986). *Plant tissue culture: theory and practice*. Elsevier.

Biondo, T. M. A.; Tanae, M. M.; Della Coletta, E.; Lima-Landman, M. T. R.; Lapa, A. J. y Souccar, C. (2011). Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: Analysis of underlying mechanisms. *Journal of ethnopharmacology*, 136(2), 368-373.

Bohlmann, F.; Banerjee, S.; Jakupovic, J.; Grenz, M.; Misra, L. N.; Schmeda-Hirschmann, G. y Robinson, H. (1985). Clerodane and labdane diterpenoids from *Baccharis* species. *Phytochemistry*, 24(3), 511-515.

Borgo, J.; Xavier, C. A. G.; Moura, D. J.; Richter, M. F. y Suyenaga, E. S. (2010). Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonóides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(1), 12-17.

Bremer, K. (1994) *Asteraceae: Cladistics and Classification*. Timber Press.

Brunetti, C.; George, R. M.; Tattini, M.; Field, K. y Davey, M. P. (2013). Metabolomics in plant environmental physiology. *Journal of experimental botany*, 64(13), 4011-4020.

Budel, J. M.; Wang, M.; Raman, V.; Zhao, J.; Khan, S. I.; Rehman, J. U. N.; Techen N.; Tekwani B.; Monteiro L.M.; Heiden G.; Takeda I.J.M.; Farago P.V. y Khan, I. A. (2018). Essential oils of five *Baccharis* species: investigations on the chemical composition and biological activities. *Molecules*, 23(10), 2620.

Cabrera, Á. L.; Crisci, J. V.; Delucchi, G.; Freire, S. E.; Giuliano, D. A.; Iharlegui, L.; Katinas, L.; Saenz, A.; Sancho, G. y Urtubey, E. (2000). Catálogo ilustrado de las Compuestas (Asteraceae) de la provincia de Buenos Aires, Argentina: sistemática, ecología y usos. ProBiota; Cobiobo.

Caldas, L.S.; Haridasan, P.; Ferreira, M.E. (1998). Meios Nutritivo. In: Torres, A.C.; Caldas, L.S.; Buso, J.A. (Eds.). *Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas*. Brasília: ABCTP/EMBRAPA, .87-132.

Cardoso, J. C. y da Silva, J. A. T. (2013). Gerbera micropropagation. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1344-1357.

Cardoso, J. C.; Oliveira, M. E. y Cardoso, F. D. C. (2019). Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. *Horticultura Brasileira*, 37(2), 124-132.

Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Las Brujas, Uruguay: AR-VITRO, INIA.

Chandra, S.; Bandopadhyay, R.; Kumar, V. y Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology letters*, 32(9), 1199-1205.

Cruz, F. (2012). Micropropagación (Manual de Prácticas). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de estudios superiores cuautitlán.(Tesis) 4-5

Da Cruz Pádua, B.; Silva, L. D.; Júnior, J. V. R.; Humberto, J. L.; Chaves, M. M.; Silva, M. E. y Costa, D. C. (2010). Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 129(3), 381-386.

De Oliveira, C. B.; Comunello, L. N.; Maciel, É. S.; Giubel, S. R.; Bruno, A. N., Chiela, E. C.; Lenz, G.; Gnoatto, S. C. B.; Buffon, A y Gosmann, G. (2013). The inhibitory effects of phenolic and terpenoid compounds from *Baccharis trimera* in Siha cells: differences in their activity and mechanism of action. *Molecules*, 18(9), 11022-11032.

Debergh, P. C. y Maene, L. J. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia horticultrae*, 14(4), 335-345.

Debergh, P. y Zimmerman, R. (1991). Micropropagation Technology and Application. Ed. Kluwer Academic Publishers., p. 484.

Dewick, P. M. (2002). Medicinal natural products: a biosynthetic approach.

Dias, L. F. D. T.; Melo, E. S. D.; Hernandez, L. S. y Bacchi, E. M. (2009). Atividades antiúlcera e antioxidante Baccharis trimera (Less) DC (Asteraceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, 19(1B), 309-314.

DiCosmo, F. y Misawa, M. (1985). Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. Trends in Biotechnology, 3(12), 318-322.

D'Silva, I. y D'Souza, L. (1993). Controlling contamination and browning of in vitro cultures of cashew. Journal of Plantation Crops, 21, 22-22.

Edrah, S. M.; Aljenkawi, A.; Omeman, A. y Alafid, F. (2016). Qualitative and quantities analysis of phytochemicals of various extract for Ephedra altissima from Libya. Journal of Medicinal Plants Studies, 4(3), 119-121.

Fabri, R. L.; Nogueira, M. S.; Dutra, L. B.; Bouzada, M. L. M. y Scio, E. (2011). Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. Revista brasileira de plantas medicinais, 13(2), 183-189.

Fachinetto, J. M. y Tedesco, S. B. (2009). Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de Baccharis trimera (Less.) AP de Candolle e Baccharis articulata (Lam.) Pers.(Asteraceae) sobre o sistema teste de Allium cepa. Revista brasileira de plantas medicinais, 11(4), 360-367.

Florão, A.; Budel, J. M.; Duarte, M. D. R.; Marcondes, A.; Rodrigues, R. A. F.; Rodrigues, M. V. N. y Weffort-Santos, A. M. (2012). Essential oils from Baccharis species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. Journal of Essential Oil Research, 24(6), 561-570.

França, S. D. (2004). Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 5, 128.

Freire, S. E. (2007). Systematic revision and phylogeny of *Ainsliaea* DC. (Asteraceae, Mutisieae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79-191.

Funk, V.A.; Susana, A.; Stuessy, T.F. y Bayer, R.J. (2009). Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae. International Association for Plant Taxonomy (IAPT).

Garcia, D.; Da Silva, P. S. S.; Furlan, M. R.; Isobe, M. T. C.; Marques, M. O. M. y Ming, L. C. (2017). Effect of organic fertilizer doses on the plant growth, essential oil production and chemical substances of “carqueja” over two harvest moments. *J Agri Sci Technol*, 7, 114-124.

Gene, R. M.; Cartañá, C.; Adzet, T.; Marin, E.; Parella, T. y Canigual, S. (1996). Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. *Planta médica*, 62, 232-235.

George, E. F. (1996). Plant propagation by tissue culture. Part 2: in practice. *Plant propagation by tissue culture. Part 2: in practice.*, (Ed. 2).

Giuliano D.A., A. Plos. (2014). *Baccharis* L. Flora vascular de la República Argentina 7(1): Dicotyledoneae-Asteraceae (Anthemideae a Gnaphalieae), 1era edición. Instituto de Botánica Darwinion, Buenos Aires; pp. 43-123.

Giuliano, D. A. (2001). Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana*, 131-154.

Giuliano, D. A. y Freire, S. E. (2011). Nuevas Secciones En *Baccharis* (Asteraceae, Astereae) de América Del Sur¹. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 98(3), 331-347.

Gomes, V. y Fernandes, G. W. (2002). Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Acta Botanica Brasilica*, 16(4), 421-427.

Gonzales Dávalos, E.; Villca Jiménez, T. y Loza Almanza, R. (2007). Evaluación de la actividad antiinflamatoria de ocho especies del género *Baccharis*: *B. articulata*, *B. dracunculifolia*, *B. salicifolia*, *B. ulcina*, *B. latifolia*, *B. pentlandii*, *B. obtusifolia*, *B. subalata*. *Revista Boliviana de Química*, 24(1), 41-44.

Grance, S. R. M.; Teixeira, M. A.; Leite, R. S.; Guimarães, E. B.; de Siqueira, J. M.; de Oliveira Filiu, W. F. y do Carmo Vieira, M. (2008). *Baccharis trimera*: effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 117(1), 28-33.

Grattapaglia, D.; Machado, M. A.; Torres A. C.; Caldas L. S. y Buso J. A. (1998). micropropagação. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*, 1, 183-260.

Grecco, S. D. S.; Reimão, J. Q.; Tempone, A. G.; Sartorelli, P.; Cunha, R. L., Romoff, P. y Lago, J. H. G. (2012). In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). *Experimental parasitology*, 130(2) 141-145.

Harbone, J. B. (1988) *Biochemistry of Plant Pollination. Introduction to Ecological Biochemistry*. 3a ed.

Harikrishnan, K. N.; Martin, K. P.; Anand, P. H. M. y Hariharan, M. (1997). Micropropagation of sweet flag (*Acorus calamus*) a medicinal plant. *Journal of medicinal and aromatic Plant sciences*, 19(2), 427-429.

Hartmann, H. T. y Kester, D. E. (1981). *Propagación de plantas. Principios y prácticas*. 6ª reimp. México, Continental. 785.

Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davies, F. T.; y Geneve, R. L. (2011). Propagation of Selected Annuals and Herbaceous Perennials Used as Ornamentals. *Hartmann & Kester's Plant Propagation: Principles and Practices (Subscription)*, 8, 840.

Hartmann, H.T.; Kester, D.E. y Davis, F.T. (2002). Plant Propagation: Principles and Practices. 6th ed.

Heiden, G. y Pirani, J. R. (2016). Novelty towards a phylogenetic infrageneric classification of *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Phytotaxa*, 289(3), 285-290.

Hu, C. Y. y Wang, P. J. (1983). Meristem, shoot tip and bud cultures. Handbook of plant cell culture.

Indacochea-Ganchozo, B.; Parrales-Villacreses, J.; Castro-Piguave, C.; Vera-Tumbaco, M. y Gabriel- Ortega J. (2017). Aclimatación in vitro de especies forestales nativas del Sur de Manabí en peligro de extinción.. *J. Selva Andina Res. Soc.* 8 (2):124-134,

Jamshidi Kia, F. y Saeidi, K. (2017). Quantification of caffeic acid content in 4 species of mullein (*Verbascum* sp.) ecotypes from southwest Iran. *Research Journal of Pharmacognosy*, 4(Supplement), 78-78.

Januário, A. H.; Santos, S. L.; Marcussi, S.; Mazzi, M. V.; Pietro, R. C.; Sato, D. N.; Ellena, J.; Sampaio, S. V.; França, S. C. y Soares, A. M. (2004). Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chemico-Biological Interactions*, 150(3), 243-251.

Jarvis, B. B.; Mokhtari-Rejali, N.; Schenkel, E. P.; Barros, C. S. y Matzenbacher, N. I. (1991). Trichothecene mycotoxins from Brazilian *Baccharis* species. *Phytochemistry*, 30(3), 789-797.

Jasinski, V. C.; Silva, R. Z. D.; Pontarolo, R.; Budel, J. M. y Campos, F. R. (2014). Morpho-anatomical characteristics of *Baccharis glaziovii* in support of its pharmacobotany. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(6), 609-616.

Jimenez González, A.; Ganchozo, B. A. Z.; Ganchozo, B. S. I. y Rodríguez, M. P. R. (2017). Protocolos de desinfección de explantes durante la micropropagación de *Cedrela odorata* L. UNESUM-Ciencias. Revista Científica Multidisciplinaria. ISSN 2602-8166, 1(2), 01-06.

Joly, A. B. (1979). Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 12. ed.

Kajiki, F. O. (2004). Estabelecimento do protocolo de micropropagação da especie nativa *Baccharis tridentata* (Asteraceae): estudos fisiologicos, anatomicos e histoquimicos in vitro (Tesis Doctoral).

Kajiki, F. O. y Shepherd, S. L. K. (2006). Micropropagation Of A Brazilian Species *Baccharis Tridentata* Vahl.(asteraceae). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.

Keller, R. B. (2009). Flavonoids: biosynthesis, biological effects and dietary sources.

Kissman, K. y Groth, D. (1999). Plantas infestantes e nocivas [Weeds and harmful plants]. Editora BASF, 2, 978.

Kurdelas, R. R.; Lima, B.; Tapia, A.; Egly Feresin, G.; Gonzalez Sierra, M.; Rodríguez, M. V. y Zacchino, S. (2010). Antifungal Activity of Extracts and Prenylated Coumarins Isolated from *Baccharis darwinii* Hook & Arn. (Asteraceae). *Molecules*, 15(7), 4898–4907.

Kurdelas, R. R.; López, S.; Lima, B.; Feresin, G. E.; Zygadlo, J.; Zacchino, S. y Freile, M. L. (2012). Chemical composition, anti-insect and antimicrobial activity of *Baccharis darwinii* essential oil from Argentina, Patagonia. *Industrial Crops and Products*, 40, 261-267.

Kusano, M.; Tohge, T.; Fukushima, A.; Kobayashi, M.; Hayashi, N.; Otsuki, H. y Fernie, A. R. (2011). Metabolomics reveals comprehensive reprogramming involving two independent metabolic responses of Arabidopsis to UVB light. *The Plant Journal*, 67(2), 354-369.

Leyva-Peralta, A. L.; Salcedo-Morales, G.; Medina-Pérez, V., López-Laredo, A. R., Trejo-Espino, J. L. y Trejo-Tapia, G. (2019). Morphogenesis and in vitro production of caffeoylquinic and caffeic acids in *Baccharis conferta* Kunth. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(5), 581-589.

Luize, P. S.; Tiunan, T. S.; Morello, L. G.; Maza, P. K.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P. y Nakamura, C. V. (2005). Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(1), 85-94.

Martín, S.; Torres, M. y Saco, D. (2018). Biotecnología vegetal. Cultivos vegetales in vitro. Obtención de productos de interés farmacéutico. *Fundamentos de biotecnología farmacéutica*, Dextra Editorial, Madrid.14, 53-376.

Marzinek, J.; De-Paula, O. C. y Oliveira, D. M. T. (2008). Cypselia or achene? Refining terminology by considering anatomical and historical factors. *Brazilian Journal of Botany*, 31(3), 549-553.

Masondo, N. A.; Finnie, J. F. y Van Staden, J. (2014). Pharmacological potential and conservation prospect of the genus *Eucomis* (Hyacinthaceae) endemic to southern Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 44-53.

Mendes, F. R.; Tabach, R. y Carlini, E. A. (2007). Evaluation of *Baccharis trimera* and *Davilla rugosa* in tests for adaptogen activity. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(6), 517-522.

Miranda, M. y Cuellar, A. (2000). Manual de prácticas de laboratorio: Farmacognosia y productos naturales.

Mølgaard, P.; Holler, J. G.; Asar, B.; Liberna, I.; Rosenbæk, L. B.; Jebjerg, C. P. y Simonsen, H. T. (2011). Antimicrobial evaluation of Huilliche plant medicine used to treat wounds. *Journal of ethnopharmacology*, 138(1), 219-227.

Mongelli, E. L. E. N. A.; Desmarchelier, C.; Coussio, J. y Ciccía, G. R. A. C. I. E. L. A. (1997). The potential effects of allelopathic mechanisms on plant species diversity and distribution determined by the wheat rootlet growth inhibition bioassay in South American plants. *Rev. Chil. Hist. Nat*, 70(1), 83-89.

Moreno-Pizani, M. A.; Farias-Ramirez, A. J.; HTd, S., Novembre, A. D. L. C.; Guevara-Orozco, L. I.; Paredes-Trejo, F. y Marques, P. A. A. (2019). Qualitative and quantitative evaluation protocol of *Baccharis* seed germination. *J Agric Sci*, 11, 421.

Mroginski, L. y Sansberro Flaschland, E. (2004). Estable cimiento de cultivos de tejidos vegetales (Capítulo 2). En: http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2_cap2.pdf

Müller, J. (2006). Systematics of *Baccharis* (Compositae-Astereae) in Bolivia, including an overview of the genus. *American Society of Plant Taxonomists*.

Müller, J. (2013) World checklist of *Baccharis* L. (Compositae–Astereae), version 2013-09-03. Herbarium Haussknecht, Friedrich-SchillerUniversität, Jena, 170

Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual review of plant physiology*, 25(1), 135-166.

Naranjo-Gómez, E. J.; Puertas-Mejía, M. A.; Mejía-Giraldo, J. C.; Amaya-Nieto, A. Z. y Atehortúa, L. (2018). Micropropagation of *Baccharis antioquiensis* (Asteraceae) and photoinduction of polyphenols by UV radiation. *Revista de Biología Tropical*, 66(2), 754-764.

Nogueira, N. P. A.; Reis, P. A.; Laranja, G. A. T.; Pinto, A. C.; Aiub, C. A. F.; Felzenszwalb, I.; Paes, M. C.; Bastos, F. F.; Bastos, V. L. F. C.; Sabino, K. C. C. y Coelho, M. G. P. (2011). In vitro and in vivo toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(2), 513-522.

Nuño, G.; Zampini, I. C.; Ordoñez, R. M.; Alberto, M. R.; Arias, M. E. e Isla, M.I. (2012). Antioxidant/antibacterial activities of a topical phytopharmaceutical formulation containing a standardized extract of *Baccharis incarum*, an extremophile plant species from Argentine Puna. *Phytotherapy Research*, 26(11), 1759-1767.

Oliveira, A. C. P.; Endringer, D. C.; Amorim, L. A. S.; Maria das Graças, L. B. y Coelho, M. M. (2005). Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. *Journal of ethnopharmacology*, 102(3), 465-469.

Oliveira, F. Q.; Andrade-Neto, V.; Krettli, A. U. y Brandão, M. G. L. (2004). New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. *Journal of ethnopharmacology*, 93(1), 39-42.

Orozco, F. (2012). Establecimiento del protocolo de micro propagación de hortensia (*Hydrangea macrophylla*) a partir de segmentos nodales, como una estrategia de producción a gran escala, para su utilización ornamental en los espacios públicos del distrito metropolitano de Quito.

Padin, S. B.; Fuse, C. B.; Urrutia, M. I. y Dal Bello, G. (2013). Toxicity and repellency of nine medicinal plants against *Tribolium castaneum* in stored wheat. *Bulletin of Insectology*, 66, 45-49

Paiva, P. D. D. O.; Mayer, M. D. B.; de Campos, R. J. C.; Rodrigues, V. A.; Pasqual, M. y Paiva, R. (1997). Propagação in vitro de gloxínia. *Ornamental Horticulture*, 3(2).

Palacio, L.; Lloret, C.; Baeza, C.; Goleniowski, M.; (2007). Cultivo celular de *Larrea divaricata* y producción de metabolitos secundarios. XVI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina. La Plata, Argentina.

Pant, B. (2014). Application of plant cell and tissue culture for the production of phytochemicals in medicinal plants. In *Infectious diseases and nanomedicine*.

Paul, A.; Mitter, K. y Raychaudhuri, S. S. (2009). Effect of polyamines on in vitro somatic embryogenesis in *Momordica charantia* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 97(3), 303-311.

Perales S. (2004). MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS Tema: Cultivo *in vitro* de *Rubus idaeus*: Una estrategia para su mejora por biotecnología. Director de tesis Dr. Fernando Pliego Alfaro. (Tesis de Maestría) Universidad Internacional de Andalucía, España. Calificación: 10 (diez) Sobresaliente.

Perales S. G.; Berastegui A. M. y Pliego Alfaro, F (2007) *Rubus idaeus*: regeneración de plantas in vitro. IV CONGRESO COLOMBIANO DE BOTÁNICA; ORGANIZA ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE BOTÁNICA – Instituto de Biología, Universidad de Antioquia ; *Revista Actualidades Biológicas* 29 (1): 85-342.

Perales S. G.; Berastegui A. M. y Pliego Alfaro, F. (2008) Regeneración In Vitro De Plantas De Frambuesa (*Rubus Idaeus* L.) Jornadas de Ciencias Naturales en Patagonia FCN UNPSJB; Libro de resúmenes. Esquel, Provincia de Chubut 1, 73

Pérez-Alonso, N. y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología vegetal*, 11(4).

Petenatti, E. M.; Petenatti, M. E.; Cifuentes, L. A.; Gianello, J. C.; Giordano, O. S.; Tonn, C. E. y Del Vitto, L. A. (2007). Medicamentos herbarios en el centro-oeste Argentino. VI. Caracterización y control de calidad de dos especies de "carquejas": *Baccharis sagittalis* y *B. triangularis* (Asteraceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(2), 201.

Pierik, R. L. M. (1991). Commercial micropropagation in western Europe and Israel. *Micropropagation*, 155-165.

Pinho, D. S. D.; Sturbelle, R. T.; Martino-Roth, M. D. G. y Garcias, G. L. (2010). Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(2), 165-170.

Ramírez-Mosqueda, M. A.; Iglesias-Andreu, L. G.; Ramírez-Madero, G. y Hernández-Rincón, E. U. (2016). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. in temporary immersion systems and evaluation of genetic fidelity. *South African Journal of Botany*, 106, 238-243.

Ramos Campos, F.; Bressan, J.; Godoy Jasinski, V. C.; Zuccolotto, T.; da Silva, L. E.; y Bonancio Cerqueira, L. (2016). *Baccharis* (Asteraceae): Chemical constituents and biological activities. *Chemistry & biodiversity*, 13(1), 1-17.

Rao, N. y Kaladhar, D. S. V. G. K. (2014). Antioxidant and Antimicrobial Activities of Rhizome Extracts of *Kaempferia galanga*. *World J Pharma Pharma Sci*, 3, 1180-1189.

Rodrigo, G. C.; Almanza, G. R.; Akesson, B. y Duan, R. D. (2010). Antiproliferative activity of extracts of some Bolivian medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(21), 2204-2210.

Rodrigues, C. R.; Dias, J. H.; de Mello, R. N.; Richter, M. F.; Picada, J. N. y Ferraz, A. B. (2009). Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(1), 97-101.

Roque, N. y Bautista, H. P. (2008). Asteraceae: caracterização e morfologia floral.

Rout, G. R.; Samantaray, S. y Das, P. (2000). In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnology advances*, 18(2), 91-120.

Saini, S.; Sharma, I.; Kaur, N. y Pati, P. K. (2013). Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant cell reports*, 32(6), 741-757.

Santos, C. D. L.; Figueira, G. M. y Belini, C. M. B. (2014). Seed conservation methods and evaluation of germination rate in *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae). In XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): V World 1125 (263-268).

Segovia, V.; Sánchez, I.; Mejía Jiménez, A.; Roca, W. M.; Lentini, Z. (2002) Micropropagación y regeneración de lulo (*Solanum quitoense*) por organogénesis. First Colombian Biotechnology Congress. National University of Colombia, Bogotá.

Sharry, S. (2015). Plantas de probeta. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).

Simonsen, H. T.; Riedel, C.; Gade, L. B.; Jebjerg, C. P.; Guzman, A. y Mølgaard, P. (2009). Chemical composition and antibacterial activity of the leaf essential oil of *Baccharis magellanica* (Lam.) Pers. and *Baccharis elaeoides* Remy from Chile. *Journal of Essential Oil Research*, 21(4), 377-380.

Singh, P. y Dwivedi, P. (2014). Two-stage culture procedure using thidiazuron for efficient micropropagation of *Stevia rebaudiana*, an anti-diabetic medicinal herb. *3 Biotech*, 4(4), 431-437.

Singh, S. K.; Rai, M. K. y Sahoo, L. (2012). An improved and efficient micropropagation of *Eclipta alba* through transverse thin cell layer culture and assessment of clonal fidelity using RAPD analysis. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 328-333.

Skoog, F. y Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured. *In Vitro Symp Soc Exp Biol*.

Souza, S. P.; Pereira, L. L. S.; Souza, A. A. y Santos, C. D. (2012). Seleção de extratos brutos de plantas com atividade antiobesidade. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(4), 643-648.

Souza, V. C. y Lorenzi, H. J. (2008). *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

Srivastava, J.; Lambert, J. y Vietmeyer, N. (1996). *Medicinal plants: An expanding role in development* (Vol. 320). World Bank Publications.

Tapia, A.; Rodriguez, J.; Theoduloz, C.; Lopez, S.; Feresin, G. E. y Schmeda-Hirschmann, G. (2004). Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of ethnopharmacology*, 95(2-3), 155-161.

Tardáguila, A. y Davies, P. (2004). *Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas*. 6. Fichas técnicas de cultivo. Serie, 11.

Troiani H. (1985) Las especies de *Baccharis* (compositae) de la provincia de La Pampa. Héctor O. Troiani. *Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa*. 1. 35-80

Tucat, G. (2015). *Estudios sobre la biología de Baccharis ulicina Hook & Arn y su susceptibilidad a estrategias de manejo en el sur bonaerense*. (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca.

Van Staden, J.; Fennell, C. W. y Taylor, N. J. (2004, September). Plant stress in vitro: the role of phytohormones. In V International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding 725 (55-62).

Vannini, A. B.; Santos, T. G.; Fleming, A. C.; Purnhagen, L. R. P.; Lourenço, L. A.; Butzke, E. T. B.; Kempt, M.; Begnini, I.M.; Rebelo, R.A.; Dalmarco, E.M.; Bella Cruz, A.; Schmit, V.; Cruz, R.C.B.; Yamanaka, C.N. y Steindel, M. (2012). Chemical characterization and antimicrobial evaluation of the essential oils from *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis semiserrata* DC (Asteraceae). *Journal of Essential Oil Research*, 24(6), 547-554.

Varela, F. (2018). Etapas de micropropagación. Recuperado el, 24.

Verdi, L. G.; Brighente, I. M. C. y Pizzolatti, M. G. (2005). Género *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química nova*, 28(1), 85-94.

Verpoorte, R.; Contin, A. y Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry reviews*, 1(1), 13-25.

Villagómez, J. R.; Mollinedo, P. y Almanza, G. R. (2006). (E)-3-Prenil-4-Hidroxicinamato De Metilo de *Baccharis santelici*s. *Revista Boliviana de Química*, 23(1), 13-18.

Vivot Lupi, E. P.; Sánchez Brizuela, C. I.; Cacik Jeifetz, F. y Sequin Acosta, C. J. (2009). Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos. *Revista Cubana de Farmacia*, 43(4), 74-84.

Vivot, E. P.; Sánchez, C.; Cacik, F. y Sequin, C. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia, docencia y tecnología*, 23(45), 165-185.

Wagner, H. y Bladt S. (2001). Flavonoid drugs including Ginkgo biloba and Echinaceae Species. In: Plant drug analysis: a thin layer chromatography Atlas. 2nd edition. Springer. München Germany. 195-245

Walters, R. G. (2005). Towards an understanding of photosynthetic acclimation. Journal of experimental botany, 56(411), 435-447.

Xavier, M. V. A.; Brito, S. S. S.; Oliveira, C. R. F.; Matos, C. H. C. y Pinto, M. A. D. S. C. (2012). Óleo essencial de Baccharis trimera (Less.) DC. sobre o potencial fisiológico de sementes de feijão caupi. Revista brasileira de plantas medicinais, 14(spe), 214-217.

Zampini, I. C.; Isla, M. I. y Schmeda-Hirschmann, G. (2009). Antimicrobial and antioxidant compounds from the infusion and methanolic extract of Baccharis incarum (Wedd.) Perkins. Journal of the Chilean Chemical Society, 54(4), 477-481.

Zdero, C.; Bohlmann, F.; King, R. M. y Robinson, H. (1986). Diterpene glycosides and other constituents from Argentinian Baccharis species. Phytochemistry, 25(12), 2841-2855.

Zuloaga, F. O. y Belgrano, M. J. (2015). The Catalogue of Vascular Plants of the Southern Cone and the Flora of Argentina: their contribution to the World Flora. Rodriguésia, 66(4), 989-1024.

Anexo 1



Figura N° 1: *B. darwinii*. Plantas madres a campo



Figura N° 2. Muestras de *B. darwinii* recolectadas para realizar las extracciones. A) Planta cultivada *in vitro* y rustificada. B) Planta Nativa. C) Mortero de preparación de muestras.

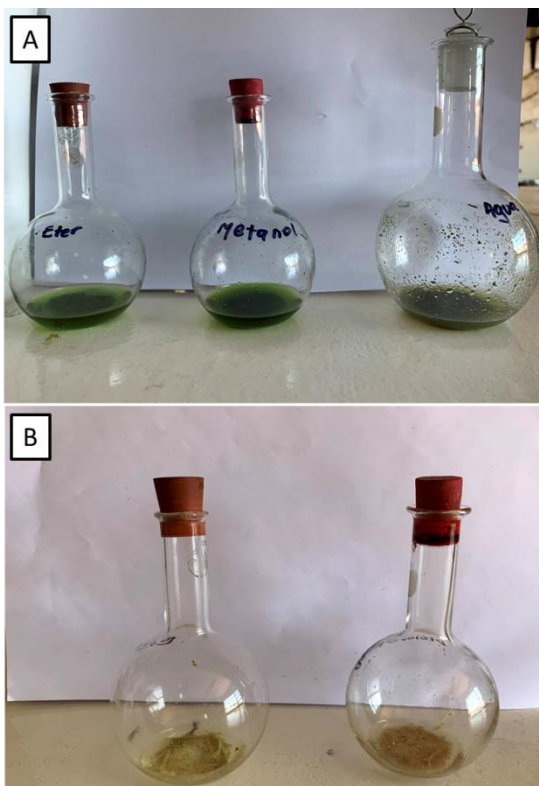


Figura N° 3. Maceración de la muestras de planta madre de *B. darwinii* con los diferentes solventes: A) Extracto Etéreo, Metanólico y Acuoso de las plantas obtenidas *in vitro*. B) Extracto con Diclorometano de las plantas obtenidas *in vitro* (derecha) y de la planta nativa (izquierda).

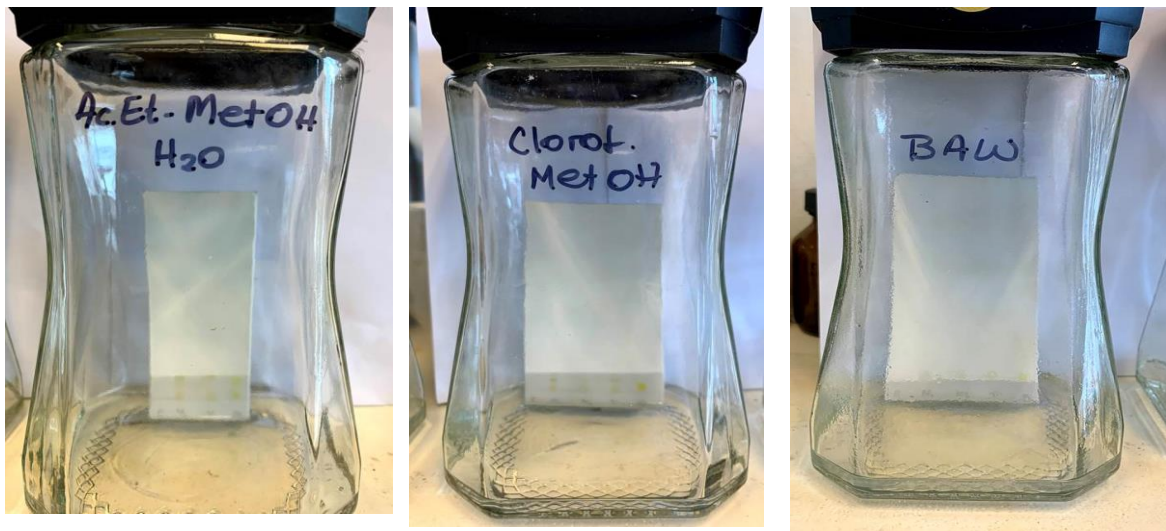


Figura N° 4. Corrida de la cromatografía en tres de los sistemas.

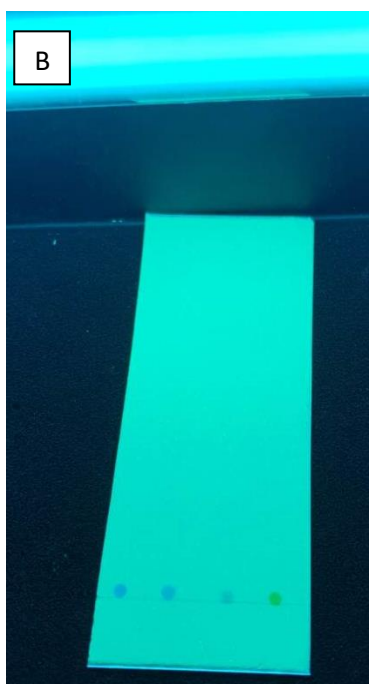
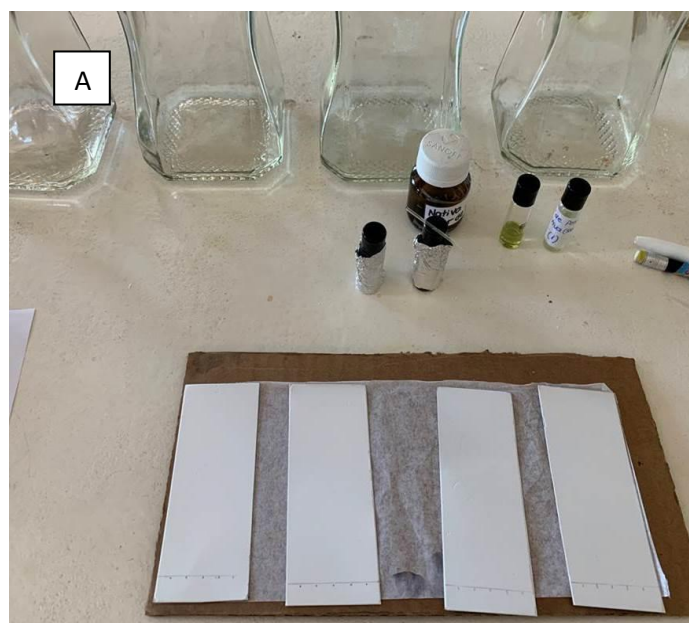


Figura N° 5. A) Proceso de sembrado de placas. B) Placa sembrada vista bajo luz UV 253 nm. C) Placa sembrada vista bajo luz UV 366 nm

Anexo 2

ANALISIS ESTADISTICO DE DATOS

2.1 GERMINACION

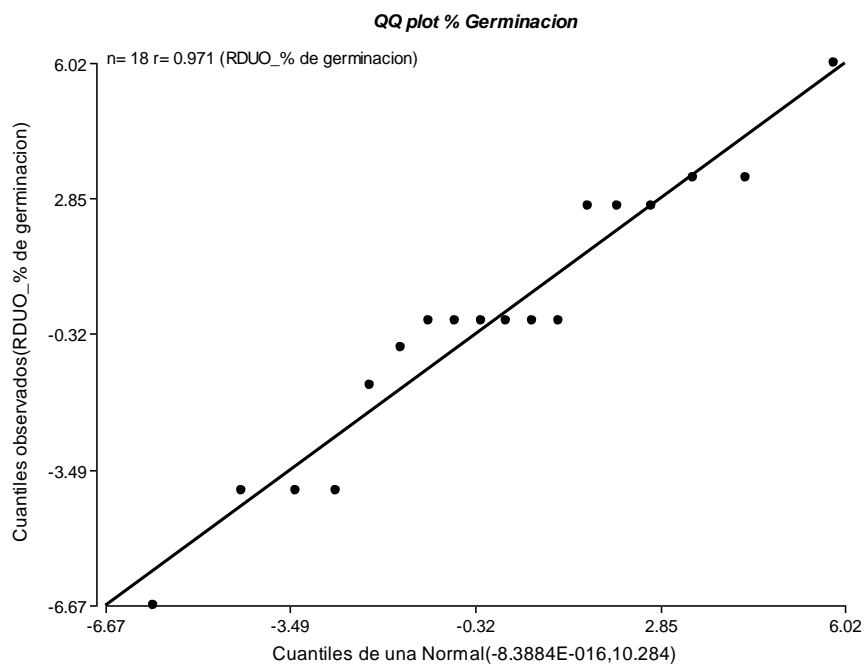
- **Medidas resumen**

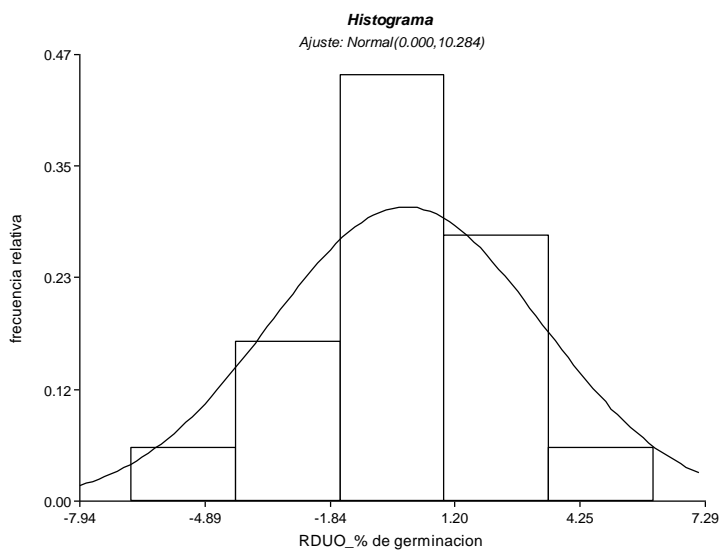
Variable	Media	Var(n-1)
RDUO_Germinación	0.00	0.01

- **Prueba formales de Normalidad: Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)**

Variable	Ajuste	media	varianzan	n	Estadistico D	p-valor
RDUO_Germinación	Normal(0,0.01)	0.00	0.01	17	0.32	0.0569

- **Prueba No formales de Normalidad: QQ plot e Histograma de residuos**





- **Prueba formales de Homocedasticidad – Test de Levene**

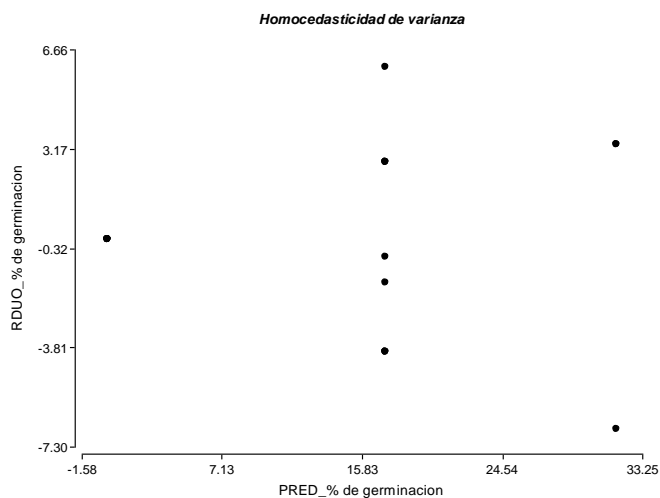
Análisis de la varianza de los residuos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS_Germinacion	17	0.19	0.07	160.36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.02	2	0.01	1.64	0.2291
% de NaClO	0.02	2	0.01	1.64	0.2291
Error	0.09	14	0.01		
Total	0.11	16			

- **Prueba no formales de Homocedasticidad: Dispersion de residuos de Varianza**



- Análisis de la varianza (ANOVA)**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
% de germinacion		18	0.93	0.92	24.50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2210.85	2	1105.43	94.85	<0.0001
Concentracion de NaClO	2210.85	2	1105.43	94.85	<0.0001
Error	174.82	15	11.65		
Total	2385.68		17		

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=5.66003

Error: 11.6549 gl: 15

Concentracion de NaClO	Medias	n	E.E.	
3%	0.00	6	1.39	A
7.50%	17.31	9	1.14	B
5%	31.67	3	1.97	C

Medias con una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

2.2 NUMERO DE YEMAS

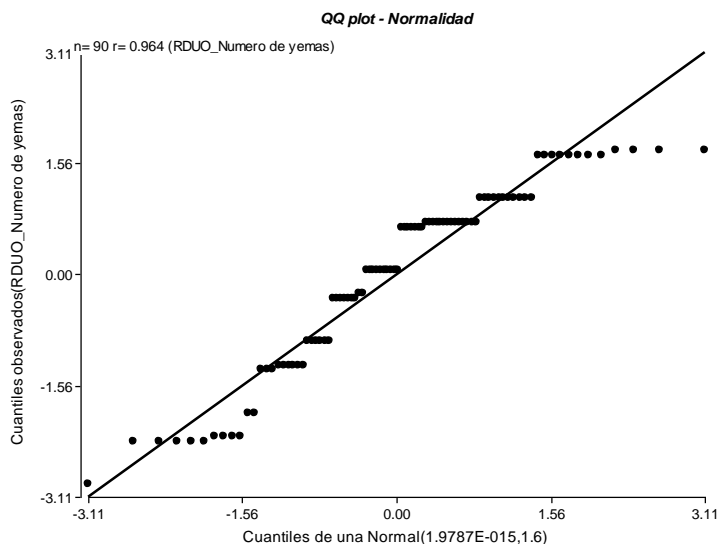
- Medidas resumen**

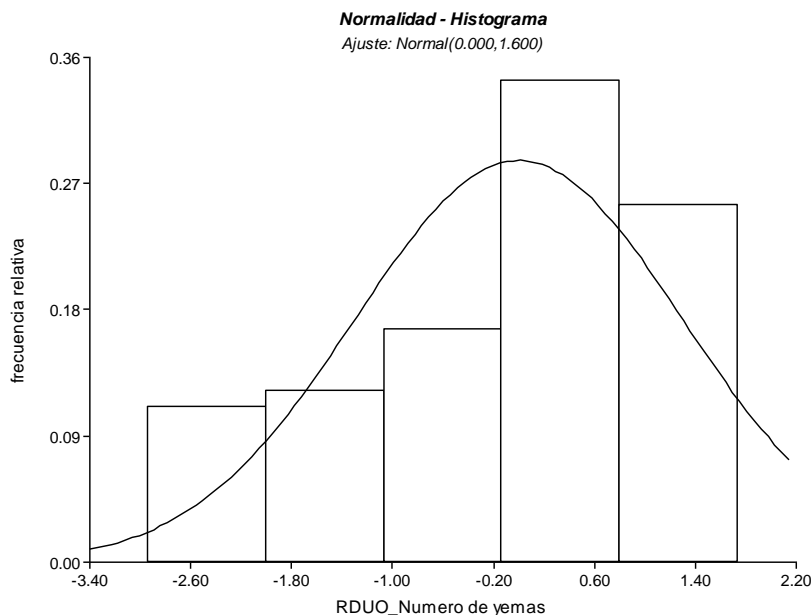
Variable	Media	Var(n-1)
RDUO_Yemas	0.00	1.60

- Prueba formales de Normalidad: Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)**

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadistico D	p-valor
RDUO_Yemas	Normal(0,1.6)	0.00	1.60	90	0.19	0.0031

- Prueba No formales de Normalidad: QQ plot e Histograma de residuos**





- **Prueba formales de Homocedasticidad – Test de Levene**

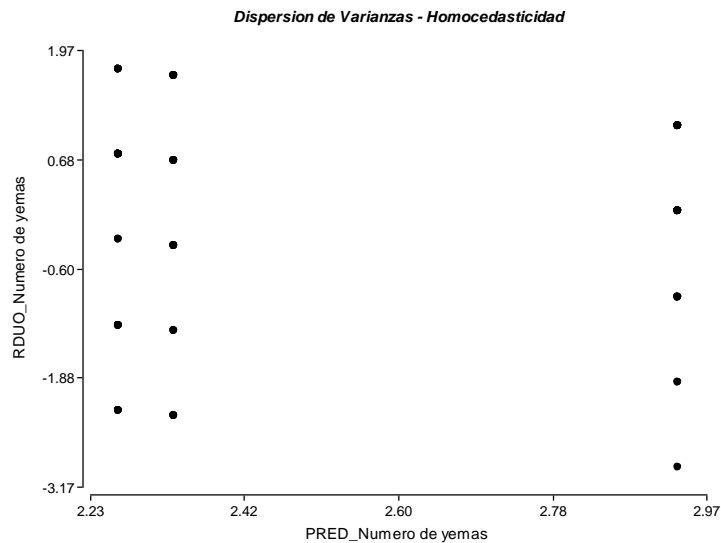
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Yemas	90	0.06	0.04	63.50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2.45	2	1.22	2.71	0.0721
SubCultivo	2.45	2	1.22	2.71	0.0721
Error	39.25	87	0.45		
Total	41.70	89			

- **Prueba no formales de Homocedasticidad: Dispersion de residuos de Varianza**



- Análisis de la Varianza no paramétrico Prueba de Kruskal Wallis**

Variable	SubCultivo	N	D.E.	Medianas	H	p-valor
Numero de Yemas	SC1	30	1.42	2.50	4.14	0.11
Numero de Yemas	SC2	30	1.31	3.00		
Numero de Yemas	SC3	30	1.08	3.00		

Medias no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

2.3 MULTIPLICACION.

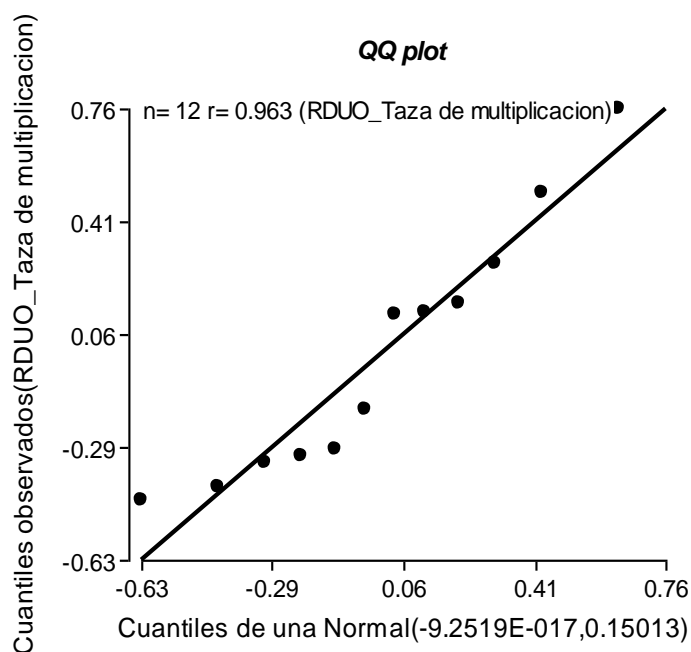
- Medidas resumen**

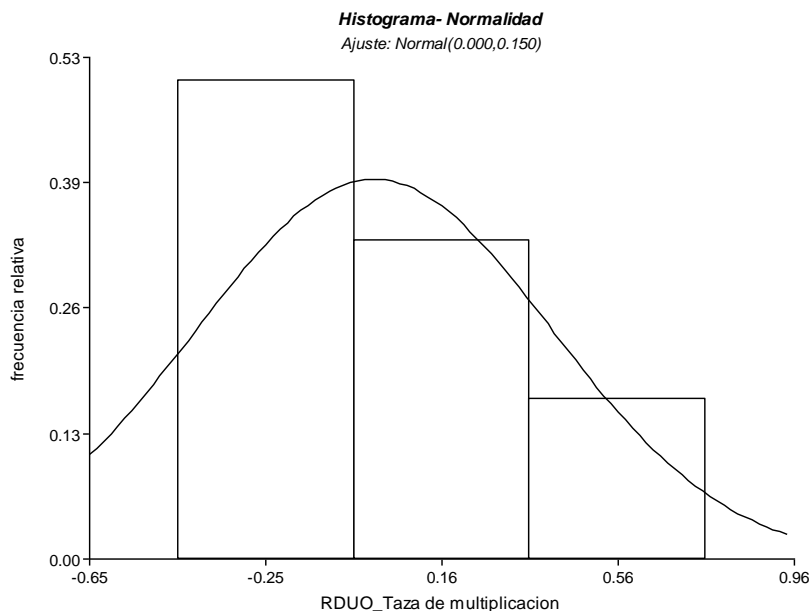
Variable	Media	Var(n-1)
RDUO_Taza de multiplicacio..	0.00	0.15

- Prueba formales de Normalidad : Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)**

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadistico D	p-valor
RDUO_T. multiplicacio..	Normal(0,0.15)	0.00	0.15	12	0.19	0.7810

- Prueba No formales de Normalidad: QQ plot e Histograma de residuos**





- **Prueba formales de Homocedasticidad – Test de Levene**

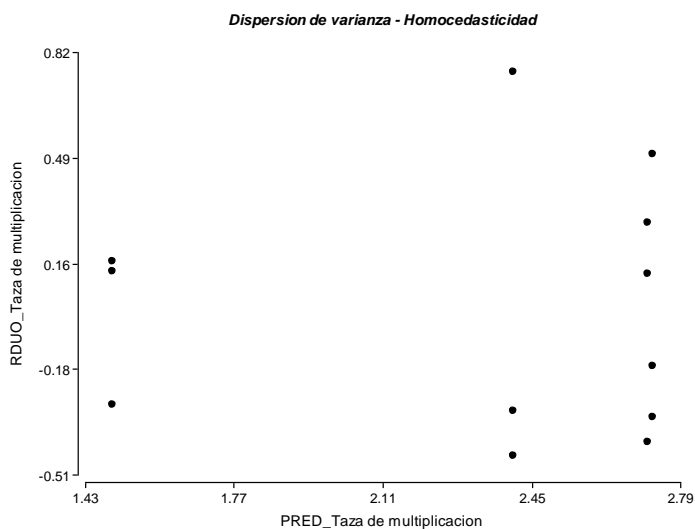
Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS_Taza de multiplicacio..	12	0.43	0.21	50.31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.16	3	0.05	1.98	0.1956
Tratamiento	0.16	3	0.05	1.98	0.1956
Error	0.22	8	0.03		
Total	0.38	11			

- **Prueba no formales de Homocedasticidad: Dispersion de residuos de Varianza**



• **Análisis de la Varianza (ANOVA)**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Taza de multiplicacion		12	0.65	0.52	19.44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3.06	3	1.02	4.95	0.0314
Tratamiento	3.06	3	1.02	4.95	0.0314
Error	1.65	8	0.21		
Total	4.72	11			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.18799

Error: 0.2064 gl: 8

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
T1	1.49	3	0.26	A
T2	2.41	3	0.26	B
T3	2.72	3	0.26	B
T4	2.73	3	0.26	B

Medias con una letra diferente son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Anexo 3

PLACAS CROMATOGRAFICAS

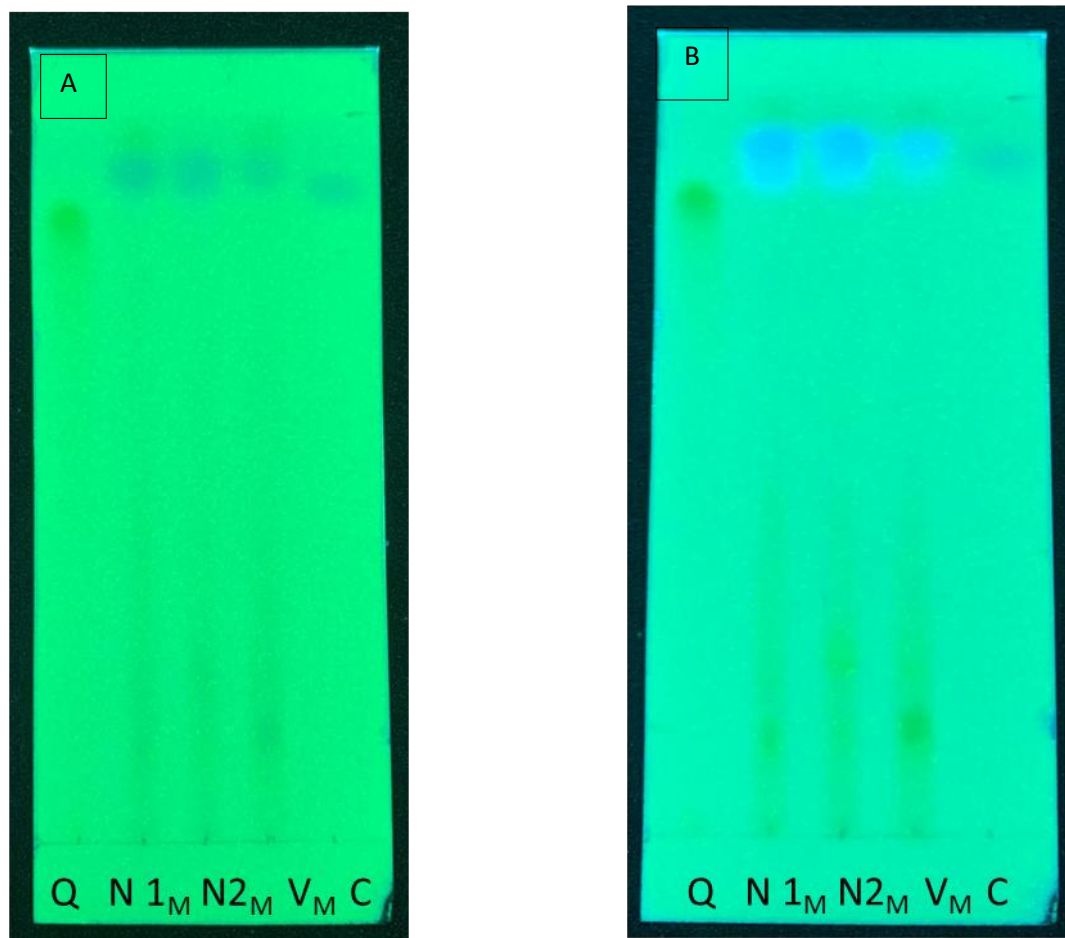


Figura N° 1. Placas Cromatográficas de Extractos metanólicos de *B. darwinii*: **Q**: patrón de Quercetina; **N1_M**: Extracto Metanólico de Planta Nativa, **N2_M**: Extracto Metanólico de Planta Nativa; **V_M**: Extracto Metanólico de Planta *In Vitro*, **C**: patrón de Cumarina A) Fase móvil: Acetato de Etilo: Metanol: Agua (100:13.5:10), revelado: UV 253 nm. B) Fase móvil: Acetato de Etilo: Metanol: Agua (100:13.5:10), revelado: UV 253 nm y KOH 10%.

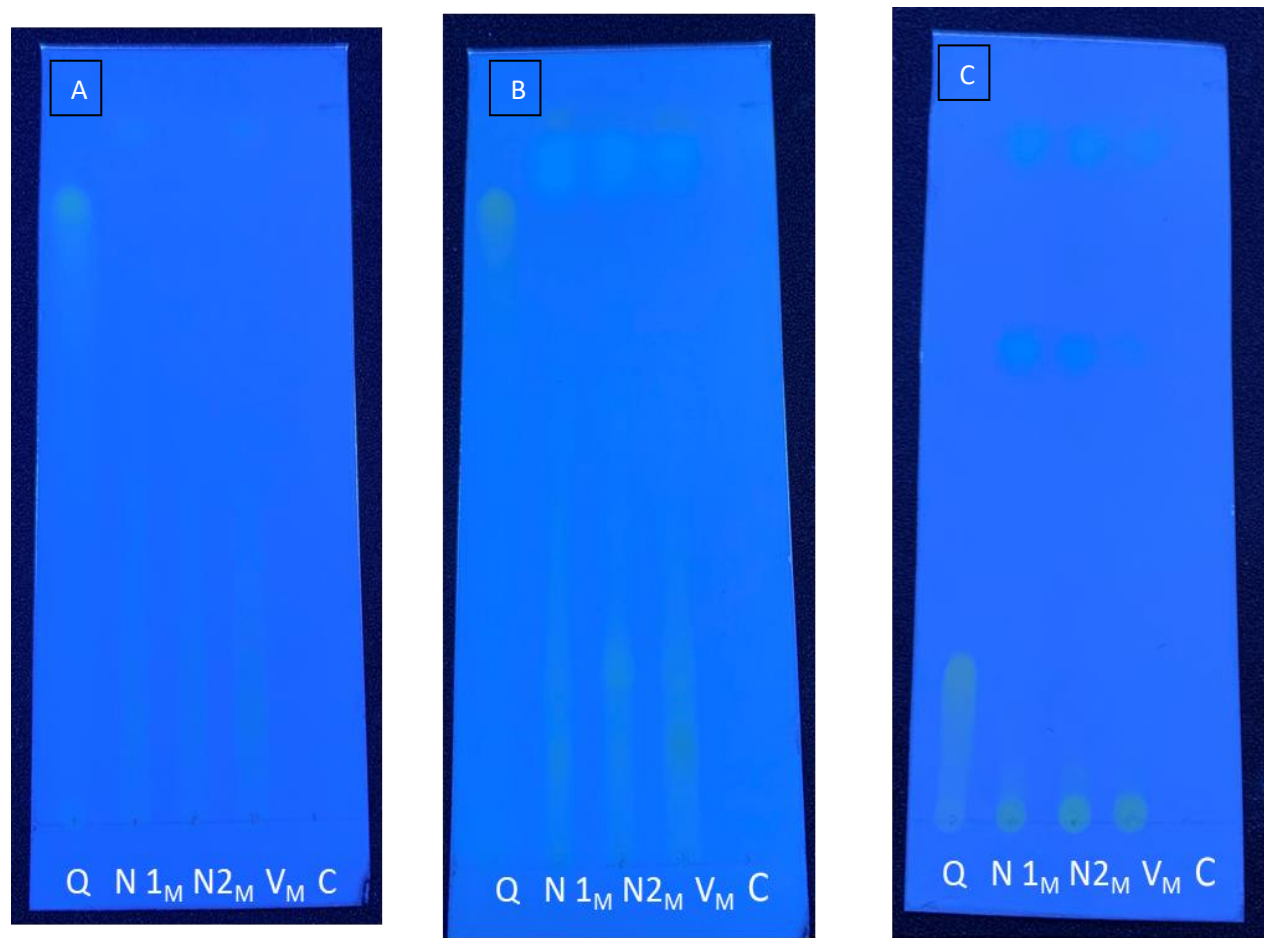


Figura N° 2. Placas Cromatográficas de Extractos metanólicos de *B. darwinii*: **Q**: patrón de Quercetina; **N1_M**: Extracto Metanólico de Planta Nativa, **N2_M**: Extracto Metanólico de Planta Nativa; **V_M**: Extracto Metanólico de Planta *in vitro*, **C**: patrón de Cumarina. A) Fase móvil: BAW (4:1:5), revelado: UV 366nm B) Fase móvil: BAW (4:1:5), revelado: 366 nm y KOH 10% C) Fase móvil: Cloroformo: Metanol (9:1) revelado:UV 366nm.

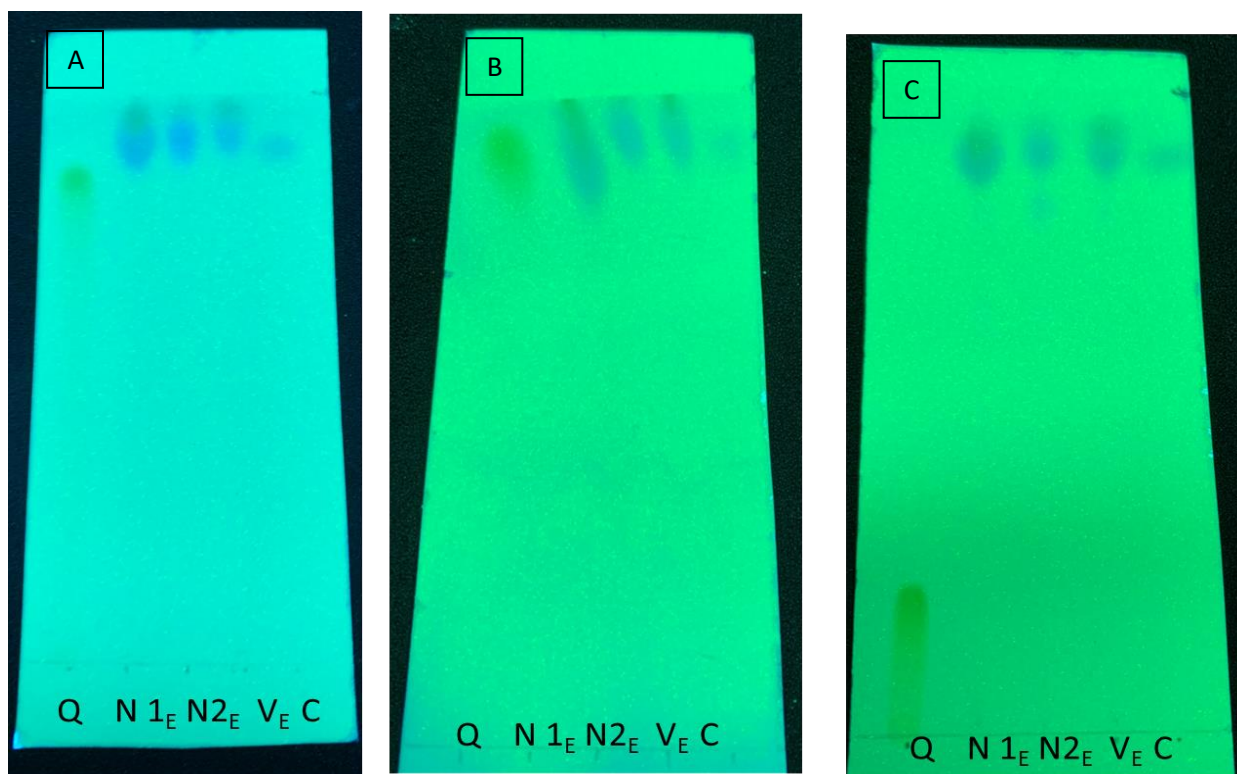


Figura N° 3. Placas Cromatográficas de Extractos de Éter de petróleo de *B. darwinii*: **Q**: patrón de Quercetina; **N1_E**: Extracto de Éter de petróleo de Planta Nativa, **N2_E**: Extracto de Éter de petróleo de Planta Nativa; **VE**: Extracto de Éter de petróleo de Planta *In Vitro*, **C**: patrón de Cumarina A) Fase móvil: Acetato de Etilo: Metanol: Agua (100:13.5:10), revelado: UV 253 nm B) Fase móvil: BAW (4:1:5), revelado: UV 253 nm C) Fase móvil: Cloroformo: Metanol (9:1), revelado: UV 253 nm.

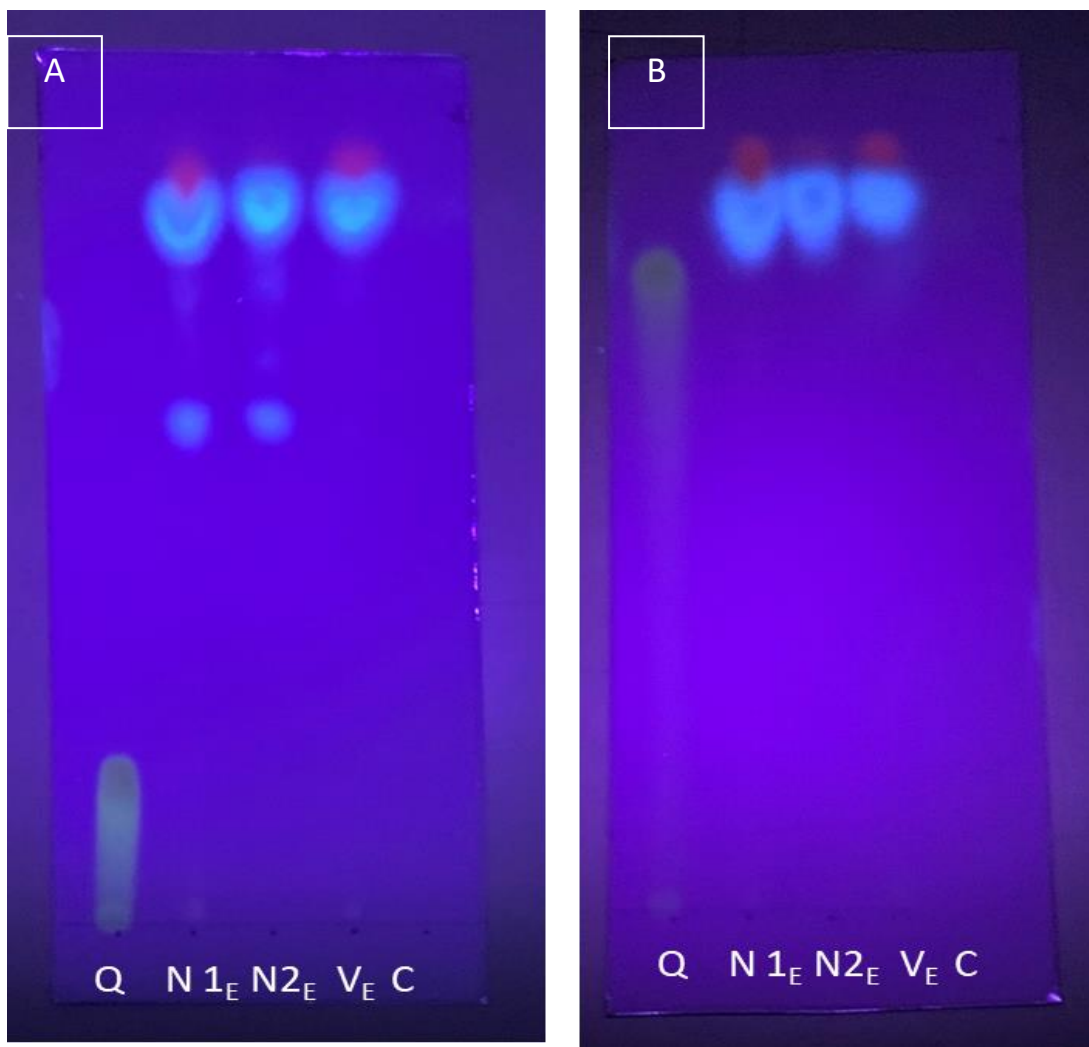


Figura N° 4. Placas Cromatográficas de Extractos de Éter de petróleo de *B. darwinii*: **Q**: patrón de Quercetina; **N1_E**: Extracto de Éter de petróleo de Planta Nativa, **N2_M**: Extracto de Éter de petróleo de Planta Nativa; **V_E**: Extracto de Éter de petróleo de Planta *in vitro*, **C**: patrón de Cumarina A) Fase móvil: Cloroformo: Metanol (9:1), revelado: UV 366nm y KOH 10% B) Fase móvil Acetato de Etilo: Metanol: Agua (100:13.5:10), revelado: UV 366 y KOH 10%.

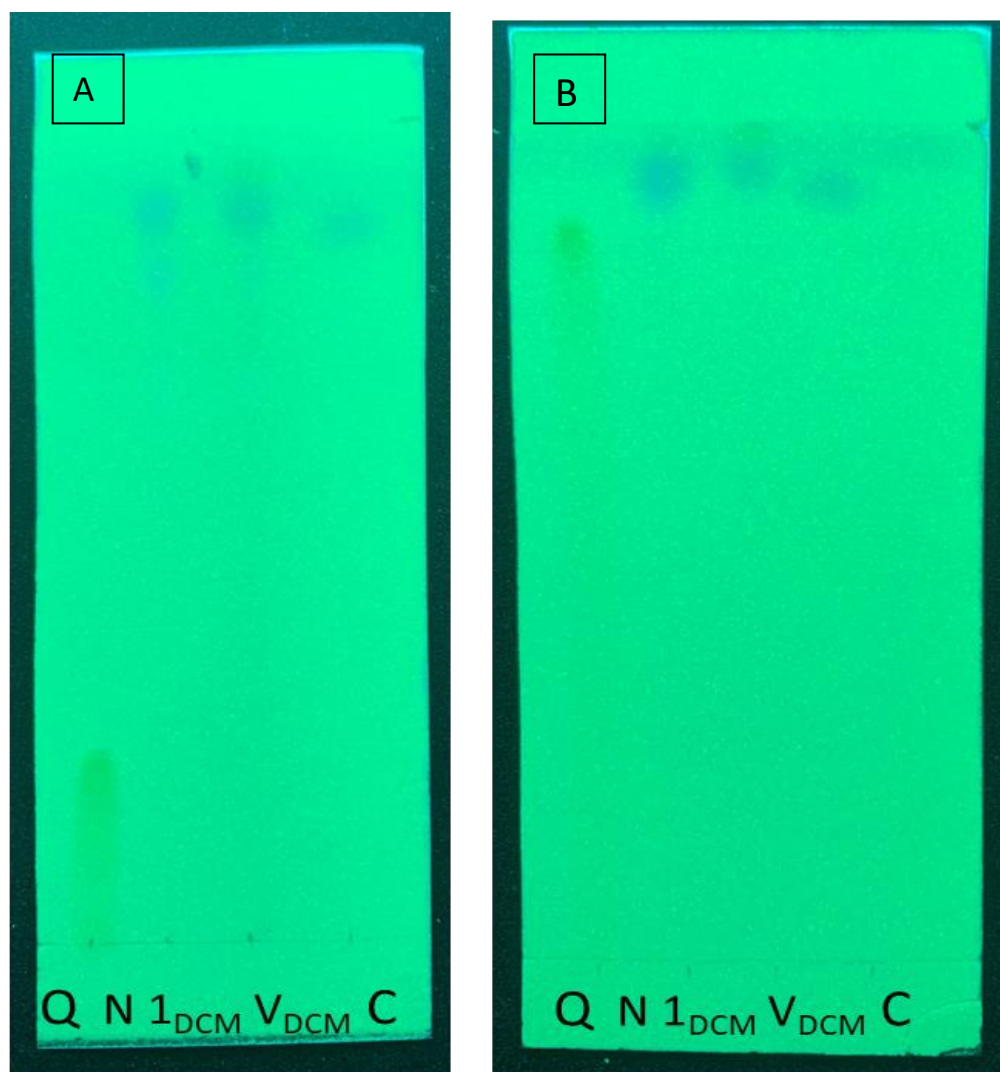


Figura N° 5. Placas Cromatográficas de Extractos de Diclorometano de *B. darwinii*: **Q**: patrón de Quercetina; **N1_{DCM}**: Extracto de Diclorometano de Planta Nativa, **V_{DCM}**: Extracto de Diclorometano de Planta *in vitro*, **C**: patrón de Cumarina A) Fase móvil: Cloroformo: Metanol (9:1), revelado: UV 253 nm B) Fase móvil: Acetato de Etilo: Metanol: Agua (100:13.5:10), revelado: UV 253 nm.

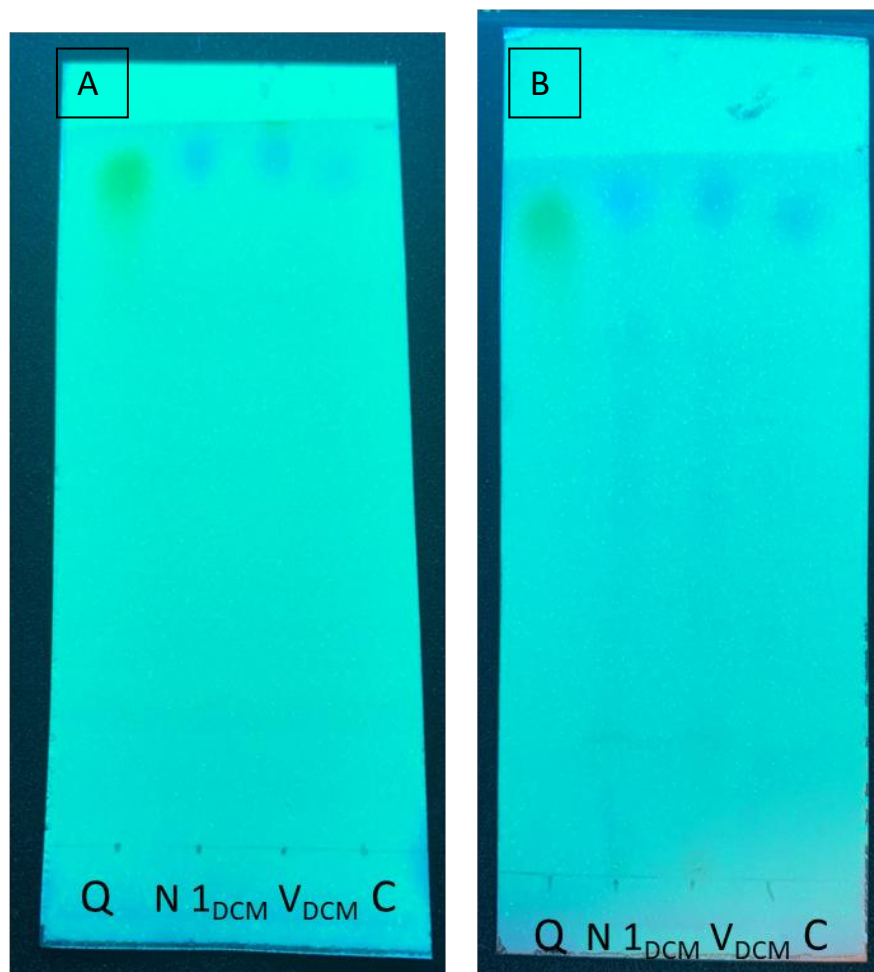


Figura N° 6. Placas Cromatográficas de Extractos de Diclorometano de *B. darwinii*: **Q**: patrón de Quercetina; **N1_{DCM}**: Extracto de Diclorometano de Planta Nativa, **V_{DCM}**: Extracto de Diclorometano de Planta *In Vitro*, **C**: patrón de Cumarina A) Fase móvil: BAW (4:1:5), revelado: UV 253 nm y KOH 10% D) Fase móvil: BAW (4:1:5), revelado UV 253 nm.

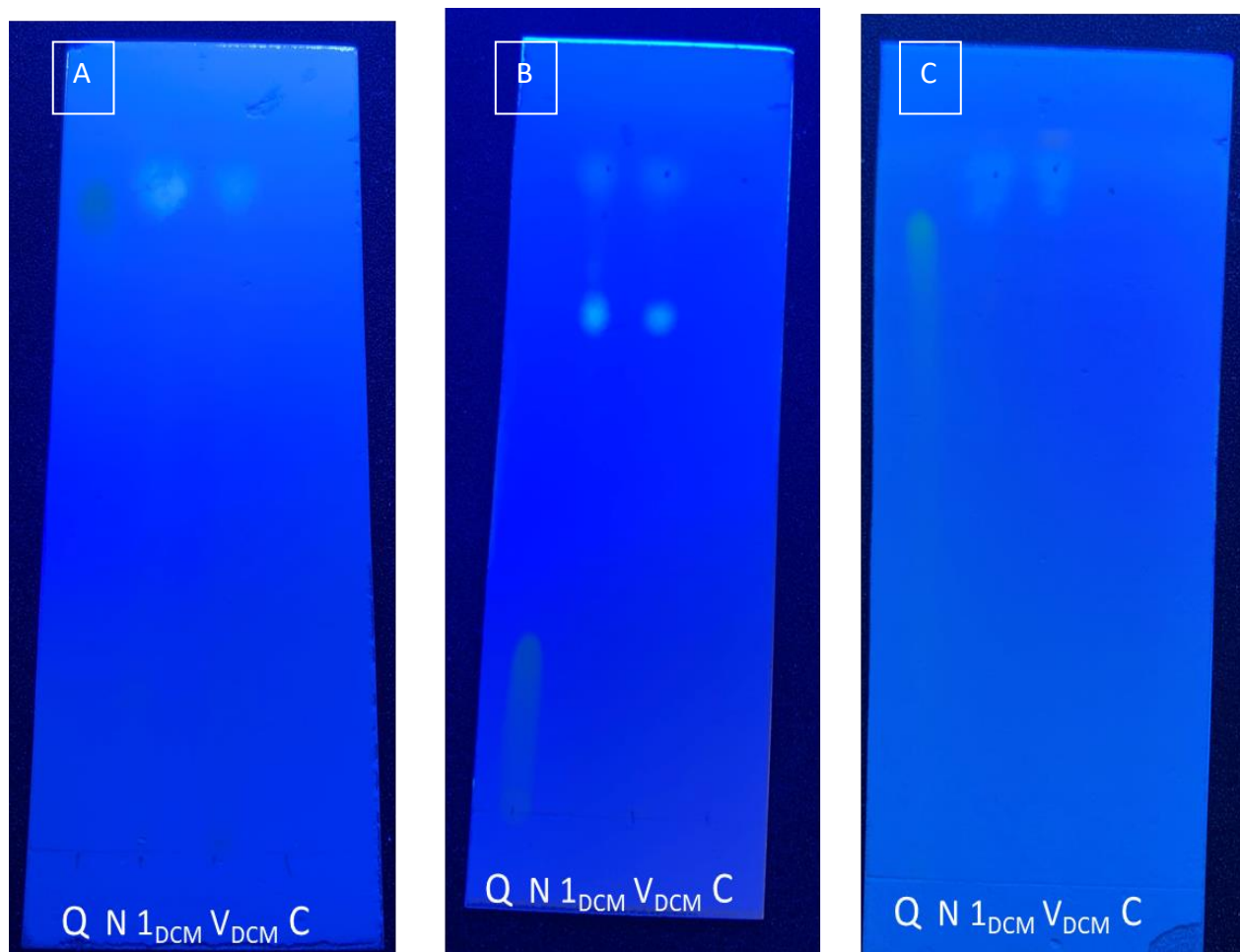


Figura N° 7. Placas Cromatográficas de Extractos de Diclorometano de *B. darwinii*: **Q**: patrón de Quercetina; **N**_{1_{DCM}}: Extracto de Diclorometano de Planta Nativa, **V**_{DCM}: Extracto de Diclorometano de Planta *in vitro*, **C**: patrón de Cumarina A) Fase móvil: BAW (4:1:5), revelado: UV 366 nm y KOH 10% B) Fase móvil: Cloroformo: Metanol (9:1), revelado: UV 366nm y KOH 10%. C) Fase móvil: Acetato de Etilo: Metanol: Agua (100:13.5:10), revelado: UV 366 y KOH 10%.

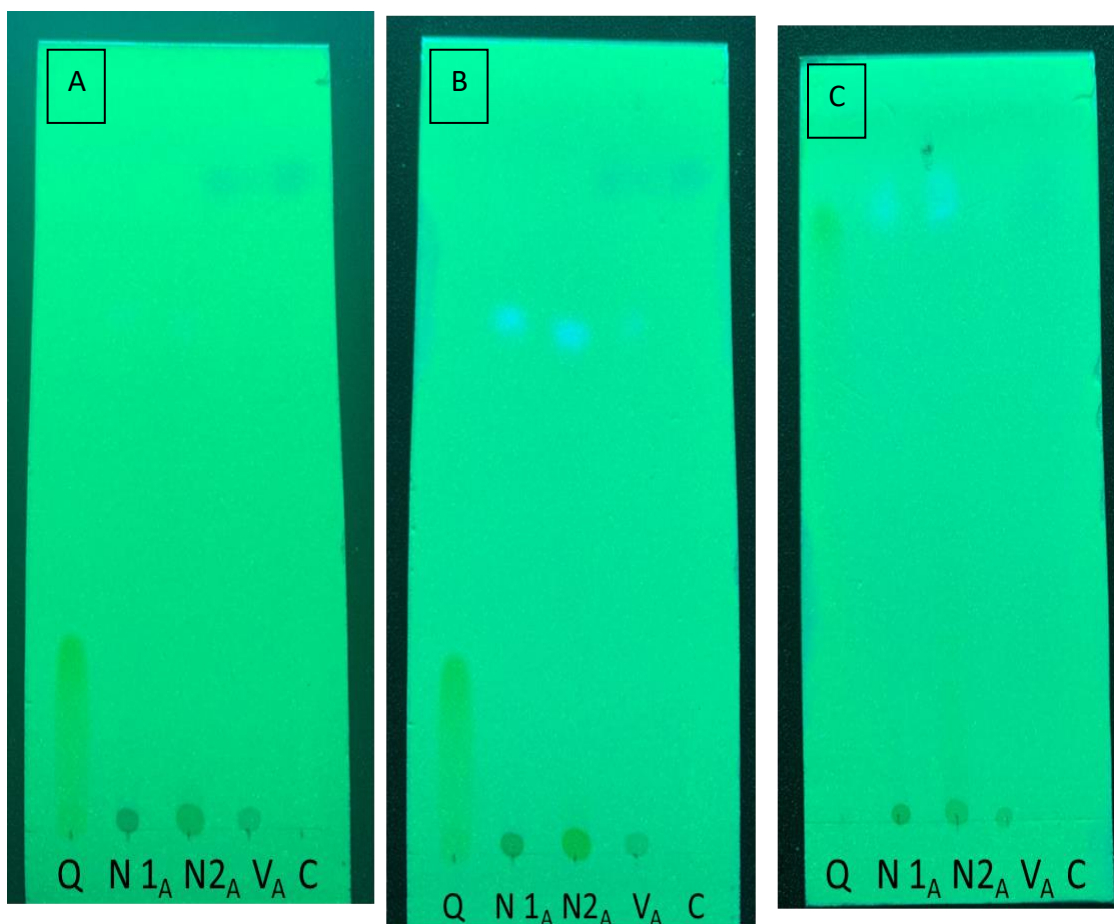


Figura N° 8. Placas Cromatográficas de Extractos Acuoso de *B. darwinii*: **Q**: patrón de Quercetina; **N1_A**: Extracto Acuoso de Planta Nativa, **N2_A**: Extracto Acuoso de Planta Nativa; **V_A**: Extracto Acuoso de Planta *in vitro*, **C**: patrón de Cumarina. A) Fase móvil: Cloroformo: Metanol (9:1), revelado: UV 253 nm. B) Fase móvil: Cloroformo: Metanol (9:1), revelado: UV 253 nm y KOH 10% C) Fase móvil: Acetato de Etilo: Metanol: Agua (100:13.5:10), revelado: UV 253 nm y KOH 10%.

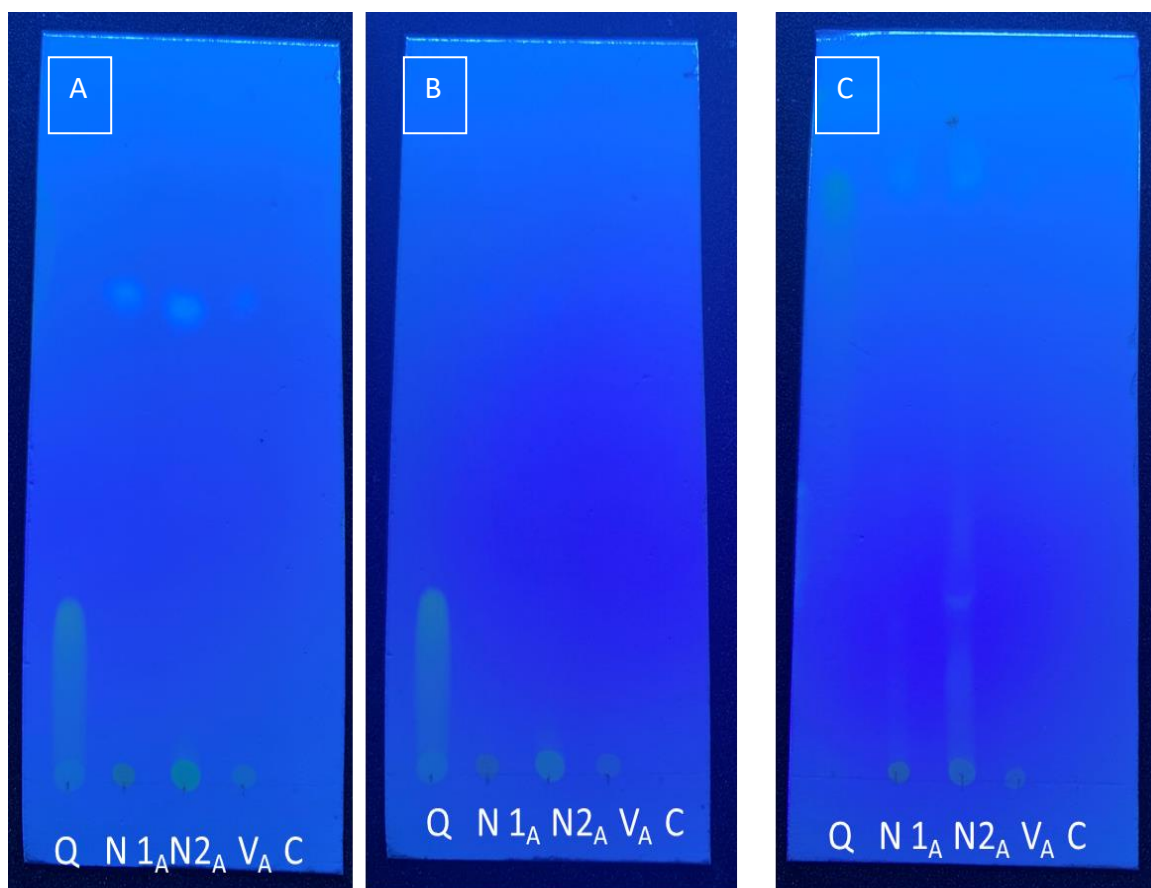


Figura N° 9. Placas Cromatográficas de Extractos Acuoso de *B. darwinii*: **Q**: patrón de Quercetina; **N1_A**: Extracto Acuoso de Planta Nativa, **N2_A**: Extracto Acuoso de Planta Nativa; **V_A**: Extracto Acuoso de Planta *in vitro*, **C**: patrón de Cumarina. A) Fase móvil: Cloroformo: Metanol (9:1), revelado: UV 366nm y KOH 10%, B) Fase móvil: Cloroformo: Metanol (9:1) revelado: UV 366 nm C) Fase móvil: Acetato de Etilo: Metanol: Agua (100:13.5:10), revelado: UV 366.

ANEXO 4

TABLAS DE Rf

FM: CLOROFORMO METANOL (9:1)

EXTRACTO	REVELADO y Rf				
Extracto de METANOL	Visible	Vapores de NH3	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) QUERCETINA	0,18	0,18	0,18 (amarillo)	0,18 (amarillo verdoso)	0,18 (amarillo verdoso)
2) NATIVA 1	0,96 (verde)	0,96 (verde)	0,90 (rosado)	0,6 (azul)	0,6 (azul)
3) NATIVA 2	-	-	0,81(rosado)/0,90 (rosado)	0,6 (azul)	0,6 (azul)
4) IN VITRO	0,96 (verde)	0,96 (verde)	0,90 (rosado)	0,6 (azul)	0,6 (azul)
5) CUMARINA	-	-	0,88 (violeta)		
Extracto de ETER	Visible	Vapores de NH3	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) QUERCETINA	0,19 (amarillo)	0,19	0,19 (amarillo)	0,19 (amarillo)	0,19 (amarillo/marrón)
2) NATIVA 1	0,90 (verde)	0,9	0,86 (rosado)/ 0,9 (rojo)	0,62(azul)/ 0,86 (azul)	0,62 (azul)/ 0,86 (azul)/ 0,90 (rojo)
3)NATIVA 2	0,90 (verde)	0,9	0,77 / 0,86(rosado)/ 0,90	0,62(azul)/ 0,86(azul)/ 0,90 (rojo)	0,62(azul)/ 0,86 (azul)/ 0,90 (rojo)
4) IN VITRO	0,90 (verde)	0,9	0,86 (rosado)/ 0,90	0,62 (azul)/ 0,86 (azul)/ 0,90 (rojo)	0,62 (azul)/ 0,86 (azul)/ 0,90 (rojo)
5) CUMARINA	-	-	0,86 (rosado)	-	-
Extracto de AGUA	Visible	Vapores de NH3	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) QUERCETINA	0,17 (amarillo)	0,17 (amarillo)	0,17 (amarillo)	0,17 (amarillo)	0,17 (amarillo)
2) NATIVA 1	-	-	-	0,51 (azul)	0,51(azul)
3) NATIVA 2	-	-	-	0,45 (azul)	0,45 (azul)
4) IN VITRO	-	-	-	0,42 (azul)	0,42 (azul)
5) CUMARINA	-	-	0,9 (rosado)	-	-
Extracto de DICLOROMETANO	Visible	Vapores de NH3	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) QUERCETINA	0,16 (amarillo)	0,16 (amarillo)	0,16 (amarillo)	0,16 (amarillo)	0,16 (amarillo/marron)
2) NATIVA 1	-	-	0,79 (azul)/ 0,88 (rosado)	0,56 (azul)/ (rosado)	0,95 0,6 (azul)/0,89 (azul)/0,94 (rosado)
4) IN VITRO	-	-	0,88 (rosado)	0,56 (azul)/ (rosado)	0,95 0,6 (azul)/ 0,89 (azul)/ 0,94 (rosado)
5) CUMARINA	-	-	0,85 (rosado)	-	-

FM: N-BUTANOL-ACIDO ACETICO – AGUA (4:1:5)

EXTRACTO	REVELADO Y Rf				
Extracto de METANOL	Visible	Vapores de NH ₃	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) QUERCETINA	0,93 (amarillo)	0,93	0,93 (amarillo)	0,93 (amarillo/ marrón)	0,93 (amarillo/marrón)
2) NATIVA 1	1 (verde)	0,52 (marrón)/ 0,83 (marrón)	0,56 (amarillo)/ 0,83 (marrón)/ 0,96 (violeta)	1 (verde)	0,56 (amarillo/marrón)
3) NATIVA 2	1 (verde)	0,52 (marrón) /0,83 (marrón)	0,56 (amarillo)/ 0,83 (marrón)/ 0,96 (violeta)	1 (verde)	0,56 (amarillo/marrón)
4) IN VITRO	1 (verde)	0,52 (marrón)/ 0,83 (marrón)	0,56 (amarillo)/ 0,83 (marrón)/ 0,96 (violeta)	1 (verde)	0,56 (amarillo/marrón)
5) CUMARINA	-	-	0,93 (rosado)	-	-
Extracto de ETER	Visible	Vapores de NH ₃	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) QUERCETINA	0,88 (amarillo)	0,88 (amarillo)	0,88 (amarillo)	0,88 (amarillo/marron)	0,88 (amarillo/marrón)
2) NATIVA 1	0,96 (verde)	0,96 (verde)	0,93 (violeta)	0,96 (verde)	-
3) NATIVA 2	0,96 (verde)	0,96 (verde)	0,93 (violeta)	0,96 (verde)	-
4) IN VITRO	0,96 (verde)	0,96 (verde)	0,93 (violeta)	0,96 (verde)	-
5) CUMARINA	-	-	0,93 (rosado)	-	-
Extracto de AGUA	Visible	Vapores de NH ₃	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) QUERCETINA	0,88 (amarillo)	0,88 (amarillo)	0,88 (amarillo)	0,88 (amarillo/marron)	0,88 (amarillo/marron)
2) NATIVA 1	-	-	-	-	Banda continua (azul)
3) NATIVA 2	-	-	-	-	-
4) IN VITRO	-	-	-	-	Banda continua (azul)
5) CUMARINA	-	-	0,93(rosado)	-	-
Extracto de DICLOROMETANO	Visible	Vapores de NH ₃	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) QUERCETINA	0,92 (amarillo)	0,92 (amarillo)	0,92 (amarillo)	0,92 (amarillo/marron)	0,92 (amarillo/marron)
2) NATIVA 1	-	-	0,95 (rosado)	0,92 (azul)/ 1 (rojo)	0,95 (azul)/ 1 (rojo)
4) IN VITRO	-	-	0,95 (rosado)	0,92 (azul)/ 1 (rojo)	0,95 (azul)/ 1 (rojo)
5) CUMARINA	-	-	0,92 (rosado)	-	-

FM: ACETATO DE ETILO: METANOL: AGUA (100:13.5:10)

EXTRACTO	REVELADO Y Rf				
Extracto de METANOL	Visible	Vapores de NH3	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) QUERCETINA	0,85 (amarillo)	0,85 (amarillo)	0,85 (amarillo)	0,85 (amarillo/marron)	0,85 (amarillo/marron)
2) NATIVA 1	0,18 (amarillo)/ 0,95 (verde)	0,12 (marron)/ 0,95 (verde)	0,12 (marron)/ 0,18 (rosado)/ 0,94 (violeta)	0,88 (azul)/ 0,93 (rojo)	0,88 (azul)/ 0,93 (rojo)
3) NATIVA 2	0,18 (amarillo)/ 0,95 (verde)	0,12 (marron)/ 0,95 (verde)	0,12 (marron)/ 0,18 (rosado)/ 0,94 (violeta)	0,88 (azul)/ 0,93 (rojo)	0,88 (azul)/ 0,93 (rojo)
4) IN VITRO	0,18(amarillo)/ 0,95 (verde)	0,12 (marron)/ 0,95 (verde)	0,12 (marron)/ 0,18 (rosado)/ 0,94 (violeta)	0,88 (azul)/ 0,93 (rojo)	0,88 (azul)/ 0,93 (rojo)
5) CUMARINA	-	-	0,88 (violeta)	-	-
Extracto de ETER	Visible	Vapores de NH3	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) QUERCETINA	0,79 (amarillo)	0,79 (amarillo)	0,79 (amarillo)	0,79 (amarillo/verde)	0,79 (amarillo/verde)
2) NATIVA 1	0,90 (verde)	0,06 /0,16	0,84 (rosado)/ 0,90 (violeta)	0,88 (azul)/ 0,92 (rojo)	0,88 (azul)/ 0,92(rojo)
3)NATIVA 2	0,90 (verde)	0,06/ 0,16	0,84 (rosado)/ 0,90 (violeta)	0,88 (azul)/ 0,92 (rojo)	0,88 (azul) /0,92(rojo)
4) IN VITRO	0,90 (verde)	0,06/ 0,16	0,84 (rosado)/ 0,90 (violeta)	0,88 (azul)/ 0,92 (rojo)	0,88 (azul)/ 0,92(rojo)
5) CUMARINA	-	-	0,84 (rosado)	-	-
Extracto de AGUA	Visible	Vapores de NH3	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) QUERCETINA	0,87 (amarillo)	0,87 (amarillo)	0,87 (amarillo)	0,87 (amarillo/verde)	0,87 (amarillo/verde)
2) NATIVA 1	--	-	0,87 (rosado)	0,87 (azul)	0,87 (azul)
3)NATIVA 2	-	-	0,87 (rosado)	0,87 (azul)	0,87 (azul)
4) <i>IN VITRO</i>	-	-	-	0,87 (azul)	0,87 (azul)
5) CUMARINA	-	-	0,88 (violeta)	-	-
Extracto de DICLOROMETANO	Visible	Vapores de NH3	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) QUERCETINA	0,86 (amarillo)	0,86 (amarillo)	0,86 (amarillo)	0,86 (amarillo/verde)	0,86 (amarillo/verde)
2) NATIVA 1	0,95 (verde)	0,95 (verde)	0,88 (rosado)/ 0,95(marron)	0,77 (rojo)/ 0,85 (azul)/ 0,94 (azul)/ 0,95 (rojo)	0,77 (rojo)/ 0,85 (azul)/ 0,94 (azul)/ 0,95 (rojo)
4) <i>IN VITRO</i>	0,95 (verde)	0,95 (verde)	0,88 (rosado)/ 0,95(marron)	0,77 (rojo)/ 0,85 (azul)/ 0,94 (azul)/ 0,95 (rojo)	0,77 (rojo)/ 0,85 (azul)/ 0,94 (azul)/ 0,95 (rojo)
5) CUMARINA	-	-	0,88 (violeta)	-	-

FM: TETRACLORURO DE CARBONO: METANOL (9:1)

EXTRACTO	REVELADO Y Rf				
Extracto de METANOL	Visible	Vapores de NH3	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) NATIVA 1	-	-	0,39 / 0,57/ 0,66	0,41/ 0,6	0,41/ 0,6
2) NATIVA 2	-	-	0,39 / 0,57/ 0,67	0,41/ 0,6	0,41/ 0,48/ 0,6
3) CUMARINA	--	-	0,65 (violeta)	-	0,62(rosado)
4) QUERCETINA	0,13 (amarillo)	0,13 (amarillo)	0,13 (amarillo)	0,13 (amarillo)	0,13(amarillo)
5) <i>IN VITRO</i>	-	-	0,57/ 0,66	0,41	0,43/ 0,66
Extracto de ETHER	Visible	Vapores de NH3	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) NATIVA 1	0,88 (amarillo)	0,90	0,40/ 0,57/ 0,67/ 0,90	0,40/ 0,57/ 0,67/ 0,90	0,40/ 0,57/ 0,67/ 0,90
2) NATIVA 2	-	0,90	0,4/ 0,57/ 0,67/ 0,74/ 0,90	0,4/ 0,57/ 0,67/ 0,74/ 0,90	0,40/ 0,57/ 0,67/ 0,74/ 0,90
3) CUMARINA	-	-	0,65	-	-
4) QUERCETINA	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
5) <i>IN VITRO</i>	-	0,88	0,43/ 0,65/ 0,88	0,43/ 0,65/ 0,88	0,43/ 0,65/ 0,88
Extracto DICLOROMETANO	Visible	Vapores de NH3	UV 253	UV366	UV 366 + KOH
1) NATIVA 1	-	-	0,28/ 0,37/ 0,39/ 0,63	0,31/ 0,41 /0,62	0,31/ 0,41/ 0,62
3) CUMARINA	-	-	0,62	-	-
4) QUERCETINA	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
5) <i>IN VITRO</i>	-	0,92	0,31/ 0,39/ 0,62/ 0,70/ 0,92	0,31/ 0,62/ 0,91	0,31/ 0,62/ 0,91

