

1918-2018. Cien años de la reforma universitaria

Beatriz S. Méndez

Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina

bea@qb.fcen.uba.ar

En la América hispana podríamos decir que proliferó la fundación de universidades. Fueron en total treinta, la primera de ellas en 1538 y la última en la época de la independencia. Algunas se crearon por órdenes reales o pontificias que posteriormente coincidían. Otras, entre ellas la de Córdoba, surgieron de iniciativas de congregaciones religiosas como franciscanos y jesuitas. Varias persisten hasta nuestros días con carácter estatal. La Real y Pontificia Universidad de San Marcos, Lima (1551) es actualmente la Universidad Mayor Nacional de San Marcos, la Universidad Mayor, Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca (1624), que hoy conserva el mismo nombre, formó a héroes americanos de la independencia como Juan José Castelli y Bernardo de Monteagudo, y la de Córdoba también tuvo una deriva que no previeron sus fundadores.

En Estados Unidos se fundaron durante el período inglés nueve universidades, de carácter religioso en su mayoría, y que perduran hasta la fecha como instituciones laicas. Es de hacer notar que si bien la fundación de Harvard tuvo lugar en 1636, siete de las otras universidades comenzaron su actividad a partir de mediados del siglo XVIII en relación con el desarrollo económico que estaban alcanzando las entonces colonias británicas.

En Brasil el dominio portugués no creó universidades, los americanos se formaban en la Universidad de Coimbra.

A principio del siglo XX existían en Argentina tres universidades nacionales que debido a la época y el lugar en que fueron creadas presentaban estructuras de gobierno similares y distintas vivencias. La Universidad de Córdoba es la más antigua del país. Fundada por los jesuitas en 1621, pasó por distintos avatares: la formación escolástica, la expulsión de la orden y el remplazo por los franciscanos, su dependencia del gobierno provincial y por fin a partir de 1854 su paso al gobierno nacional. La de Buenos Aires, creada en 1821, padeció las guerras civiles del siglo XIX. La Universidad de La Plata se inauguró en 1906 en el contexto de la ciudad recién creada. Las tres fueron organizadas por la ley Avellaneda (1885-1947) que sembró algunas semillas que persisten como ser la figura del rector como representante de la universidad, su elección por una asamblea universitaria y la existencia de un consejo superior que cogobernara la universidad. El gobierno nacional, de acuerdo a dicha ley, se reservaba la aprobación del nombramiento de profesores, que no habían sido seleccionados por concurso, a

partir de una terna presentada por el consejo superior. Las facultades, llamadas también academias, eran gobernadas por alrededor de quince personas que integraban el consejo directivo de las cuales unas pocas se desempeñaban como profesores.

Mientras tanto en el país la gran inmigración, a la cual no era ajena la provincia de Córdoba, había originado un aumento significativo de la población y con ello la cantidad de estudiantes que concurrían a la universidad. Por consiguiente surgieron una variedad de ideas sobre su gobierno y los contenidos de la enseñanza a impartir. La Universidad de Buenos Aires incorporó algunas modificaciones que respondieron a esas inquietudes como eliminar la categoría de vitalicios para los miembros de los consejos directivos y favorecer la formación de doctores. A la vez se dio la particularidad del interés de algunos universitarios por la investigación científica.

Córdoba presentaba una situación diferente, cualquier modificación a la organización establecida a partir de la ley Avellaneda era, en la mayoría de los casos, rechazada. Esto se debía al peso de la historia pero sobretodo a la importancia del título doctoral para acceder a posiciones en la administración pública y en el gobierno de la provincia, de manera que el ascenso social y el control de la vida política pasaban por la universidad.

En el caso que nos ocupa, ya que fue Córdoba la cuna de la reforma universitaria, la Academia o Facultad de Ciencias Médicas de su Universidad, se organizó bajo la ley Avellaneda y nombró a su consejo directivo dos años después (1887). Una vez constituido estableció que para ser elegido académico titular vitalicio se debía tener por lo menos tres años de antigüedad como catedrático titular o suplente y haber publicado un trabajo original sobre cualquier tema médico. Estas eran las condiciones requeridas para los encargados de gobernar dicha facultad y como consecuencia, ya que todos eran vitalicios, quedaba excluida la participación de la mayoría de los profesores. Una situación de estas características provocaría a lo largo de los años tensiones dadas por la falta de adecuación a los cambios que tenían lugar en la sociedad y a los requerimientos, tanto de los profesores como de los estudiantes, sobre los conocimientos que debían ser impartidos.

La chispa que encendió la Reforma Universitaria fue, a decir verdad, más adecuada a un vodevil que al movimiento que cambió las formas de gobernar las universidades en gran parte de América Latina. La Facultad de Medicina había organizado un internado para alumnos de los últimos años de la carrera en su Hospital de Clínicas, esto permitía la realización de prácticas médicas y a la vez daba soluciones de alojamiento a los estudiantes del interior de la provincia. En diciembre de 1917 la Academia suprimió el internado, dado que los alumnos sino cumplían con la condición de retirarse al horario nocturno establecido. La razón, su función de velar "por la moralidad" de los alumnos, ya que estos estaban alejados del hogar paterno. Dicho acto dio pie a los estudiantes para manifestar sus numerosos reclamos sobre el funcionamiento de la institución, como ser el carácter vitalicio de los académicos y su falta de conocimientos actualizados, el nepotismo en los nombramientos de los nuevos miembros de la

Academia, la falta de contenidos prácticos en los programas de las materias, y el manejo de los fondos recibidos, amén de otros problemas incluyendo el del internado. Ante la falta de soluciones por parte de las autoridades universitarias comenzaron a partir de 1918 manifestaciones estudiantiles para exigir que se tuvieran en cuenta sus demandas, presentadas esta vez ante el Ministerio de Justicia e Instrucción Pública de la Nación. Frente a esta situación el Poder Ejecutivo nacional decidió la intervención de la Universidad de Córdoba. Sin embargo el proceso no tuvo el desarrollo esperado ya que si bien se aceptaron parte de las exigencias estudiantiles, como la pérdida de autoridad de las academias y la renovación periódica de los consejos directivos, la elección de un rector contrario a las mismas no garantizaba su cumplimiento. Por consiguiente prosiguió la agitación estudiantil con el apoyo de representantes destacados del mundo académico. El 21 de junio la Gaceta Universitaria publicó el **Manifiesto Liminar de la Reforma** en el cual se expresaba que “...*la juventud universitaria de Córdoba afirma que jamás hizo cuestión ni de nombres ni de empleos. Se levantó contra un régimen administrativo, contra un método docente, contra un concepto de autoridad*”. Recalcaron, como lo venían haciendo desde comienzos de ese mismo año, que “*Los métodos docentes estaban viciados en un estrecho dogmatismo contribuyendo a mantener a la Universidad apartada de la ciencia y de las disciplinas modernas*” y por último “*La juventud ya no pide. Exige que se reconozcan el derecho de exteriorizar ese pensamiento propio en los cuerpos universitarios por medio de sus representantes*” [1]



Figura 1. Estudiantes de la Federación Universitaria de Córdoba izando su bandera en el frontispicio del edificio antiguo de la Universidad. (Reconstrucción. Autor Claudio Bustos)

Fue necesaria una nueva intervención nacional, y numerosas manifestaciones estudiantiles para que finalmente, el 5 de octubre de 1918, se modificaran los estatutos de la Universidad estableciendo, entre otros artículos, que los miembros de los consejos directivos surgirían de un asamblea formada por todos los profesores titulares, igual número de suplentes e igual número de estudiantes que elegirían a sus representantes consolidando de esa manera

la autonomía y el gobierno tripartito. La Reforma Universitaria había nacido y su ejemplo se siguió en Argentina y en varios países latinoamericanos.

¿Cuál es su legado? Con distintas interrupciones la autonomía y el gobierno tripartito rigen hoy en las universidades argentinas y también en la mayoría de las de América Latina. La libertad de cátedra nadie la discute. Su prédica a favor de la investigación científica tuvo un ejemplo paradigmático, Bernardo Houssay fue nombrado titular de la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires en 1919, también se dio la inclusión como profesores de destacados científicos extranjeros y con el correr de los años los antecedentes científicos tuvieron importancia en los concursos de distintas facultades. La extensión fue uno de sus logros inesperados y significativos. Las universidades la comprendieron muy rápidamente como una herramienta para aumentar su proyección social. Proliferaron en un principio las conferencias, la creación de radios universitarias y los cursos extracurriculares para la población que no accedía a sus aulas y hoy en día sus campos de aplicación van desde bibliotecas a preservación ambiental entre muchas otras actividades [2].

Esto que es hoy moneda corriente parece normal. ¿Es suficiente para la actividad universitaria ante la complejidad del mundo actual? No. Pero sin los principios de ese movimiento estudiantil de 1918 no tendríamos herramientas para encararla. Además, en general: *“Las universidades siguen siendo unos de los pocos lugares del país en los que se mantiene la cultura de la austeridad, del esfuerzo y del rigor”* [3]. Es bueno recordarlo.

Feliz cumpleaños Reforma Universitaria y que cumplas muchos más.

Referencias

1. www.unc.edu.ar/sobre-la-unc/manifiesto-liminar
2. **Suplemento especial de extensión universitaria** (2018) *Química Viva* 17(1).
3. **Buchbinder P** (2010) Historia de las universidades argentinas. *Buenos Aires: Sudamericana*

La autora es directora de Química Viva, profesora consulta e investigadora de CONICET.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 17, agosto 2018

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Norberto José Palleroni (1922-2018): semblanza de un pionero de la biología y taxonomía molecular del género *Pseudomonas*

Pablo I. Nickel

*The Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability,
Universidad Técnica de Dinamarca, 2800 Kgs. Lyngby, Dinamarca*

pabnik@biosustain.dtu.dk



**Norberto J. Palleroni
(1922-2018)**

Norberto J. Palleroni nació en Buenos Aires y se doctoró en la Universidad de Buenos Aires en 1947. Asistió a varios cursos en las áreas de Botánica, Taxonomía y Biología Fundamental (todas ellas relativamente nuevas para nuestro país en las décadas del 30 y del 40), lo cual le permitió recibirse como ingeniero agrónomo en la Facultad de Agronomía. En sus propias palabras: *«Fui un buen estudiante y, a pesar de las penurias económicas en mi hogar en aquel entonces, me recibí con honores y obtuve un hermoso diploma del cual cuelga una igualmente hermosa medalla dorada»*. Su mentor fue el profesor Santos Soriano, ingeniero agrónomo nacido en Italia y formado profesionalmente en nuestro país. Soriano fue profesor de Microbiología y Microbiología Agrícola en la Universidad de Buenos Aires, y fue, asimismo, quien estableció una línea de investigación pionera sobre bacterias aisladas del suelo en la Facultad de Agronomía en los años 30, después de una estancia de investigación en el laboratorio de Martinus W. Beijerinck en Holanda.

Inmediatamente después de recibirse, y con financiamiento del Club Rotary Internacional, el Dr. Palleroni se desempeñó como investigador postdoctoral en la Universidad de Southern Illinois (Carbondale) durante algo más de un año. Trabajó bajo la dirección del

profesor Carl C. Lindegren¹, y eligió la genética de levaduras (que por entonces era un área de investigación *en vogue* en Estados Unidos) como tema de investigación para la que fuera su primera experiencia postdoctoral en el exterior [1]. Luego de esta primera estadía en los Estados Unidos, regresó a Argentina y se incorporó como profesor en la Universidad de Cuyo en Mendoza, institución en la cual ejerció activamente no solo como profesor sino también como director de los institutos de Microbiología y de Fermentaciones Industriales. Una curiosidad científica inagotable lo llevó nuevamente a Estados Unidos, en esta oportunidad, a la Universidad de California (Berkeley), institución en la cual desarrollaría un tema de investigación que marcaría un antes y un después en el metabolismo de azúcares en bacterias.

En esta oportunidad, el financiamiento fue provisto por la prestigiosa John Simon Guggenheim Memorial Foundation. Fue en este contexto, desde 1954 y hasta los primeros años de la década del 70, que el Dr. Palleroni se estableció como investigador postdoctoral en el laboratorio del Prof. Roger Stanier, en donde colaboró estrechamente con el Prof. Michael Doudoroff iniciando una línea de investigación en biología fundamental del género *Pseudomonas* que persistiría y se expandiría durante más de 20 años. La cepa bacteriana con la que Palleroni desarrolló sus investigaciones en aquella época es *Pseudomonas saccharophila*, la cual se consideraba un modelo de estudio en bioquímica fundamental [2] (y que, incidentalmente, ha sido rebautizada como *Pelomonas saccharophila*²). Palleroni trabajó con una enzima que es capaz de isomerizar azúcares (manosa, fructosa, y ramnosa) [3]. Luego de purificar la isomerasa y analizar su actividad en ensayos *in vitro*, descubrió que la enzima era capaz de sintetizar un nuevo disacárido estructuralmente similar a la sacarosa, la glucosil-D-ramnulosa [4]. Doudoroff se interesó en este trabajo y ofreció extender la estadía de Palleroni en su laboratorio financiando su salario cuando el estipendio que recibía de la John Simon Guggenheim Memorial Foundation llegó a su fin. Las líneas de investigación acerca del metabolismo de azúcares en bacterias en el laboratorio de Doudoroff (junto con el trabajo de Nathan Entner en ese mismo laboratorio) dieron como resultado el descubrimiento y caracterización de la ruta de Entner-Doudoroff [5]. Esta ruta catabólica está presente en la mayoría de los rizo-simbiontes y, en particular, en las bacterias del género *Pseudomonas* [6].

Palleroni mencionaba en sus innumerables charlas que, a pesar de que las cepas bacterianas con las que trabajaba el grupo de Doudoroff y Stanier tenían características unificadoras que permitían clasificarlas (como, por ejemplo, algunas propiedades bioquímicas), existían diferencias fundamentales entre los distintos aislamientos que requerían una

¹ El Prof. Lindegren ha sido un pionero en establecer el por entonces inexistente campo de genética molecular, y fue uno de los fundadores de la genética de levaduras. En este sentido, vale la pena leer la carta que le escribiera a Francis Crick (1916-2004) en ocasión de la publicación de sus estudios sobre la estructura del DNA. La carta puede leerse en <https://profiles.nlm.nih.gov/ps/retrieve/ResourceMetadata/SCBBSF>.

² Palleroni sostenía que, si un investigador decidía bautizar una especie bacteriana con su propio nombre, debía incluir tal nombre en el epíteto específico y no en la especie, dada la inopinada frecuencia con la que las especies bacterianas son renombradas. El renombramiento de *Pseudomonas saccharophila* refleja el contenido de este comentario con toda claridad.

clasificación rigurosa (la cual, por entonces, no existía). Stanier y Palleroni se embarcaron en una caracterización minuciosa de las propiedades fisiológicas, morfológicas, y bioquímicas de todos los aislamientos bacterianos clasificados como *Pseudomonas* (267, para ser más exactos) en la colección de cultivos en el laboratorio. De este esfuerzo mancomunado y sin precedentes contemporáneos surgió una publicación en el *Journal of General Microbiology* que se ha convertido en un clásico en el campo [7]. En Julio de 2018, y de acuerdo con la información disponible en *Google Scholar*, dicho artículo ha sido citado 2900 veces desde su publicación en 1966. A pesar de que este estudio resultó esencial para entender las diferencias taxonómicas entre las distintas especies de *Pseudomonas* (algunas de ellas ya no son tales, y han sido rebautizadas más de una vez), se echaba en falta una característica *realmente* unificadora que permitiese clasificar las bacterias en forma simple e inequívoca. Stanier propuso analizar secuencias de DNA que pudiesen usarse como marcadores para este fin, y Palleroni se dedicó a secuenciar y analizar las propiedades genéticas de los aislamientos que habían sido previamente caracterizados desde un punto de vista metabólico y morfológico. Para sorpresa de todos, los aislamientos presentaban un patrón heterogéneo en la secuencia del DNA que codifica el RNA de 16S y en ensayos de hibridación DNA-DNA, todo lo cual derivó en la definición de nuevas especies del género *Pseudomonas* (y en la redistribución de algunos miembros en grupos taxonómicos distintos), incluyendo *P. pseudomallei*, *P. acidovorans*, *P. testosteroni*, *P. solanacearum*, *P. diminuta*, *P. facilis*, *P. delafieldii*, *P. saccharophila*, y *P. palleronii*³ [8-11]. Un aspecto metodológico interesante de esta serie de estudios taxonómicos es que Palleroni no contaba con entrenamiento en el análisis de DNA codificante de RNA (en ese momento, los ensayos de hibridación DNA-DNA eran más populares para analizar diferencias genéticas entre especies distintas). Es por ello que fue al Departamento de Bacteriología de la Universidad de Washington (Seattle) para aprender técnicas de hibridación de RNA ribosomal. La aplicación de esta metodología en la clasificación de los aislamientos reveló un hecho sin precedentes: el por entonces considerado único género *Pseudomonas* estaba compuesto, en realidad, por al menos cinco géneros distintos. La misma técnica estaba siendo aplicada para bacterias anaerobias por John L. Johnson en el Instituto Politécnico de Virginia [12]. Palleroni mantuvo una estrecha colaboración (y amistad) con este investigador por años, dado que fue él quien incorporó la metodología de hibridación de ácidos nucleicos para facilitar la taxonomía de otros grupos bacterianos. Al mismo tiempo, una estrecha colaboración con Erika Ralston dio inicio a una serie de estudios taxonómicos en bacterias del género por entonces denominado *Hydrogenomonas* [13] (los detalles de la clasificación de este género bacteriano, que ha sido rebautizado como *Alcaligenes*, *Ralstonia*, y *Cupriavidus*, se pueden consultar en el artículo de Méndez *et al.* [14]).

³ Fiel a sus convicciones, es el epíteto específico de la forma binomial el que se deriva del nombre de Palleroni (la clasificación moderna de esta especie es *Hydrogenophaga palleronii*, y se trata de una especie capaz de fijar CO₂ utilizando H₂ como fuente de energía; véase Nota 2). Otras especies que llevan su nombre son *Actinoplanes palleronii* (un actinomiceto esporulador) y *Pseudomonas palleroniana* (aislada de arroz). Existe, además, un género de bacterias halófilas moderadas aisladas del Mediterráneo murciano bautizado en su honor (desde luego, no por él mismo), *Palleronia*, dentro del cual se encuentra la especie tipo *Palleronia marisminoris*.

En los primeros años de la década del 70, la línea de investigación iniciada en el laboratorio de Doudoroff y Stanier estaba llegando a su fin, entre otros motivos y según advirtiera consternadamente el propio Palleroni, porque Doudoroff desarrolló un cáncer difícil de curar, lo cual lo obligó a apartarse definitivamente de la investigación⁴. «*Ignorando el consejo de Buster Keaton*»⁵, según recordaría tiempo más tarde, el Prof. Palleroni se mudó a la costa este de los Estados Unidos y estableció una línea de investigación en la división de investigación y desarrollo de los laboratorios farmacéuticos Hoffmann-LaRoche en Nutley, New Jersey. Su principal misión allí fue el ejercer como curador de la inmensa colección de microorganismos que se utilizaban para la producción industrial de antibióticos. Esta actividad como experto en taxonomía microbiana no se restringía únicamente a los Estados Unidos, y Palleroni debía viajar frecuentemente a Japón y Suiza, países en los cuales la farmacéutica mantenía operaciones y líneas de producción de antimicrobianos⁶. El desarrollo e inclusión de nuevas técnicas para el aislamiento de bacterias productoras de compuestos biológicamente activos entre los años 1973 y 1985 derivó en que Palleroni estableciera un vínculo estrecho con la Universidad de Rutgers en New Brunswick, New Jersey, y, en particular, con dos investigadores del Departamento de Bioquímica y Microbiología. El Prof. Max M. Häggblom (quien aun se desempeña como profesor en la Universidad de Rutgers) y el Prof. Bongkeun Song (quien en la actualidad se desempeña como profesor asociado en el Instituto de Ciencias Marinas de Virginia, y cuyo supervisor fuera Palleroni) han sido sus colaboradores desde el inicio de sus carreras como investigadores. Palleroni recordaba cómo, décadas después de establecer un método para el aislamiento de especies de *Actinoplanes* con Max Häggblom, la metodología era aún utilizada por varios laboratorios por su simpleza y eficacia. En aquella época, el conocimiento fundamental sobre las actinobacterias (y sobre *Actinoplanes* en particular) se restringía a la descripción de unas pocas características fenotípicas generales, y la dificultad que representaba el aislar estas bacterias constituía una barrera importante para el desarrollo de nuevas estrategias de cultivo. Palleroni resolvió el problema ideando un método de selección basado en la movilidad de las esporas producidas por *Actinoplanes brasiliensis* (una característica única del género, descubierta por el mismo Palleroni [15]), valiéndose de la quimiotaxis positiva que presenta *Actinoplanes* hacia soluciones de cloruros o bromuros inorgánicos siguiendo un gradiente de concentración.

Palleroni se retiró de los laboratorios Hoffman-La Roche definitivamente en 1985, y aceptó el ofrecimiento de incorporarse al Instituto de Microbiología Waksman de la Universidad de Rutgers como Busch Visiting Scholar (1985-1986) y, posteriormente, se desempeñó como profesor adjunto en el Departamento de Microbiología de la Escuela de Medicina en la Universidad de New York. En 1992, Palleroni regresó a la Universidad de Rutgers, en esta

⁴ Palleroni indicaría tiempo más tarde que este desafortunado hecho lo alejó definitivamente del cigarrillo, costumbre que Stanier, Doudoroff y él mismo compartían.

⁵ Una referencia a la película de cine mudo «*Go West*» de 1925.

⁶ Lamentablemente, esta noble práctica ha caído en desuso, y los laboratorios de las grandes empresas farmacéuticas han cancelado sus actividades en esta área. El caso más reciente es el de Novartis, que decidió cerrar las líneas de investigación y desarrollo de nuevos antibióticos en Julio de 2018.

oportunidad en calidad de profesor de investigación en el recientemente establecido Centro de Biotecnología para la Agricultura y el Medio Ambiente, perteneciente al Departamento de Bioquímica y Microbiología. Fue allí donde, en colaboración con los grupos de investigación de Lily Young, Gerben J. Zylstra, y Max M. Häggblom, Palleroni describió la taxonomía molecular de otros géneros bacterianos, incluyendo *Burkholderia*, *Thauera*, *Stenotrophomonas*, *Azoarcus*, y *Paenibacillus* [16-18].

Norberto Palleroni publicó más de 150 artículos en Microbiología, en áreas tan diversas como taxonomía clásica, taxonomía molecular, técnicas de cultivo y aislamiento, y producción de compuestos bioactivos. Su contribución al campo de la taxonomía molecular de *Pseudomonas* queda reflejada en los capítulos que, sobre este tema, escribió para el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática en sus varias ediciones. Fue miembro de la Academia Americana de Microbiología y de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales en nuestro país (8 de Noviembre de 1984, ocasión en la cual dictó una conferencia magistral con el título «*Contribución de la Bacteriología a la Biología Moderna*», posteriormente publicada en los anales de la academia [19]). Entre las numerosas distinciones que recibió a lo largo de su carrera, Palleroni fue Doctor Honoris causa de la Universidad de Cuyo y de la Universidad de Buenos Aires, y recibió el premio de la Fundación Konex en Bioquímica y Microbiología en 1993. En los Estados Unidos, recibió el premio honorario como orador Selman A. Waksman conferido por la Sociedad Theobald Smith en 1986, y la medalla Bergey en 1995, en reconocimiento a su trayectoria en el campo de la sistemática de bacterias y arqueones. Su contribución a la docencia en nuestro país ha sido igualmente enriquecedora: en la última oportunidad, en diciembre de 1999, Palleroni participó en un curso de post-grado (*Tópicos de Microbiología del suelo*) organizado por el Prof. Marcelo Dankert en la Fundación Campomar. En el contexto de esta visita a Buenos Aires, también impartió una charla sobre transposición en bacterias como mecanismo de generación de diversidad génica.

Tal vez el aspecto más importante de la extensa lista de contribuciones científica de Norberto Palleroni haya sido el desarrollo de una taxonomía sistemática de las bacterias del género *Pseudomonas* [20, 21], tal y como se indicó anteriormente. Su enfoque personal, divertido, y dinámico fue reconocido por quienes, el autor de este artículo incluido, hemos tenido el placer de escucharlo hablar sobre el tema. A modo de conclusión, reproduzco aquí un fragmento del citado artículo publicado por Palleroni en ocasión de su investidura como miembro de la Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Buenos Aires: «*En resumen, el ejemplo de Pseudomonas [...] muestra que desde el punto de vista filogenético, las bacterias son mosaicos, con caracteres que derivan por una parte de antecesores remotos, pasados de una generación a la siguiente en forma "vertical", mientras que otros caracteres pueden haber sido adquiridos a distintos tiempos por transferencia "horizontal"*». Esta aseveración resume, en forma sucinta, más de tres décadas de investigación en taxonomía de *Pseudomonas* y permanece tan vigente como cuando fue originalmente acuñada.

Referencias

1. **Palleroni NJ, Sheffner AL, Lindegren CC** (1952) The absence of pre-adaptive oxidation of galactose by strains of *Saccharomyces*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 40: 22-27. DOI: 10.1016/0003-9861(52)90069-6.
2. **Palleroni NJ, Doudoroff M** (1965) Identity of *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of Bacteriology* 89: 264.
3. **Palleroni NJ, Doudoroff M** (1956) Mannose isomerase of *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of Biological Chemistry* 218: 535-548.
4. **Palleroni NJ, Doudoroff M** (1956) Preparation and properties of D-rhamnulose (6-deoxy-D-fructose) and glucosyl rhamnuloside. *Journal of Biological Chemistry*, 219: 957-962.
5. **Entner N, Doudoroff M** (1952) Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of Biological Chemistry* 196: 853-862.
6. **Nikel PI, Chavarría M, Fuhrer T, Sauer U, de Lorenzo V** (2015) *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and pentose phosphate pathways. *Journal of Biological Chemistry* 290: 25920-25932. DOI: 10.1074/jbc.M115.687749.
7. **Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M** (1966) The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *Journal of General Microbiology* 43: 156-273. DOI: 10.1099/00221287-43-2-159.
8. **Palleroni NJ, Doudoroff M** (1971) Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 107: 690-696.
9. **Ballard RW, Palleroni NJ, Doudoroff M, Stanier RY, Mandel M** (1970) Taxonomy of the aerobic pseudomonads: *Pseudomonas cepacia*, *P. marginata*, *P. alliiicola* and *P. caryophylli*. *Journal of General Microbiology* 60: 199-214. DOI: 10.1099/00221287-60-2-199.
10. **Palleroni NJ, Ballard RW, Ralston E, Doudoroff M** (1972) Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. *Journal of Bacteriology* 110: 1-11.
11. **Martínez-Checa F, Quesada E, Martínez-Cánovas MJ, Llamas I, Béjar V** (2005) *Palleronia marisminoris* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium belonging to the 'Alphaproteobacteria', isolated from a saline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2525-2530. DOI: 10.1099/ijs.0.63906-0.
12. **Johnson JL** (1973) Use of nucleic-acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 23: 308-315. DOI: 10.1099/00207713-23-4-308.
13. **Ralston E, Palleroni NJ, Doudoroff M** (1972) Deoxyribonucleic acid homologies of some so-called "Hydrogenomonas" species. *Journal of Bacteriology* 109: 465-466.
14. **Méndez BS, Pettinari MJ, López NI** (2010) Cuando los nombres ocultan a los nombrados. *Química Viva* 9: 59-64.
15. **Palleroni NJ** (1976) Chemotaxis in *Actinoplanes*. *Archives in Microbiology* 110: 13-18. DOI: 10.1007/BF00416963.
16. **Song B, Young LY, Palleroni NJ** (1998) Identification of denitrifier strain T1 as *Thauera aromatica* and proposal for emendation of the genus *Thauera* definition. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 889-894. DOI: 10.1099/00207713-48-3-889.
17. **Song B, Palleroni NJ, Kerkhof LJ, Häggblom MM** (2001) Characterization of halobenzoate-degrading, denitrifying *Azoarcus* and *Thauera* isolates and description of *Thauera chlorobenzoica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 589-602. DOI: 10.1099/00207713-51-2-589.
18. **Palleroni NJ, Bradbury JF** (1993) *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 606-609. DOI: 10.1099/00207713-43-3-606.
19. **Palleroni NJ** (1985) Contribución de la Bacteriología a la Biología Moderna. *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 37: 31-38.
20. **Palleroni NJ** (2003) Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology* 141: 1-7. DOI: 10.1099/mic.0.25952-0.
21. **Palleroni NJ** (2010) The *Pseudomonas* story. *Environmental Microbiology* 12: 1377-1383. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x.

22. **Nikel PI, de Lorenzo V** (2018) *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to *trans*-metabolism. *Metabolic Engineering* DOI: 10.1016/j.ymben.2018.05.005.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 17, agosto 2018

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Hacia la reprogramación de crecimiento bacteriano mediante edición genómica: la bioinformática puesta a prueba

Alfonso Soler Bistue

Grupo Genómica de Vibrio, Laboratorio de Patogenia Microbiana, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas "Dr. Rodolfo A. Ugalde" Instituto Tecnológico de Chascomús, CONICET, Universidad Nacional de San Martín, San Martín, Buenos Aires, Argentina.

asoler@iib.unsam.edu.ar

Introducción

Gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación aumentó exponencialmente el número de genomas disponibles en bases de datos [1]. En paralelo, el costo de síntesis química de DNA se redujo de manera drástica [2]. Es decir, somos capaces de "leer" y "escribir" DNA de manera cada vez más eficiente. Esta revolución genómica se refleja en la síntesis de la primera célula artificial [3] y el diseño de la forma de vida cultivable de genoma más pequeño, *Mycoplasma mycoides* (JCV-Syn3.0) [4]. Más aún, ya existen cromosomas sintéticos de levaduras [5] y se ha planificado la construcción de una célula humana de genoma artificial [6]. A pesar de estos ejemplos de *big science*, aún es difícil predecir con exactitud el fenotipo de un organismo en base a la secuencia primaria de su genoma. Las bacterias poseen un genoma haploide de tamaño relativamente pequeño, 1×10^6 - 1×10^7 pares de bases (pb), por lo que han sido fundamentales para investigar esta temática [7]. Nuestro conocimiento de su genoma está evolucionando rápidamente. Hasta hace poco, se lo entendía como una molécula de DNA desnuda flotando estocásticamente en el citoplasma. Hoy sabemos que, por a su asociación a proteínas, se compacta unas 1000 veces para ocupar un 15-30% del volumen celular, con diferentes niveles de organización y plegamiento que permiten una disposición espacial específica que sigue una coreografía precisa a lo largo del ciclo celular [8-13]. Dicha estructura espacial se coordina en simultáneo con procesos fundamentales como son la replicación, la transcripción (a su vez acoplada a la traducción de proteínas) y la segregación del material genético. A pesar de estos avances, se desconoce aún cómo la organización del genoma influye en la fisiología celular y en la evolución de los microorganismos. Un parámetro que caracteriza muy bien ambas variables es la velocidad de crecimiento (interconvertible con el tiempo de generación que es el tiempo entre una división celular y la siguiente). Este es un parámetro clave que refleja la fisiología, la bioquímica y la competitividad celular [14]. La velocidad de crecimiento máxima varía drásticamente entre un microorganismo y otro con tiempos generacionales que pueden ir desde minutos a días o semanas. Por ejemplo, bacterias como *Vibrio natrigens*, *Pectinobacterium carotovorum* o *Clostridium perfringens* se dividen cada

10-15 minutos mientras que *Mycobacterium leprae* demora 10 días. A pesar de que la fisiología bacteriana es una disciplina con más de un siglo de estudio (por ejemplo las fases del crecimiento bacteriano se describieron ya en 1909 [15]) aún se desconoce qué factores genéticos moldean la velocidad máxima de crecimiento de una especie.

Organización del genoma bacteriano

Tras la secuenciación de más de 30.000 genomas emerge una nueva imagen del cromosoma bacteriano y su evolución [1]. En contraste con las células eucariotas, el genoma bacteriano posee un contenido genético muy variable. Su evolución ocurre principalmente por transferencia horizontal de genes. Así, dos aislamientos de la misma especie bacteriana pueden tener un 20% de divergencia en contenido génico. A pesar de tal flexibilidad, las bacterias muestran una organización muy estricta a nivel de secuencia del genoma conservada filogenéticamente [16, 17]. Universalmente, las bacterias presentan único origen de replicación (*oriC*) desde donde se inicia la duplicación del DNA bidireccionalmente hasta la región terminal (*ter*) en el extremo opuesto del cromosoma. Así, el genoma se organiza longitudinalmente a lo largo de un eje *ori-ter* que divide al DNA en dos *replichores* de un tamaño similar (Figura 1). Existen pocos estudios sobre cómo esta estructura influye en la fisiología celular y en la evolución del genoma [18, 26].

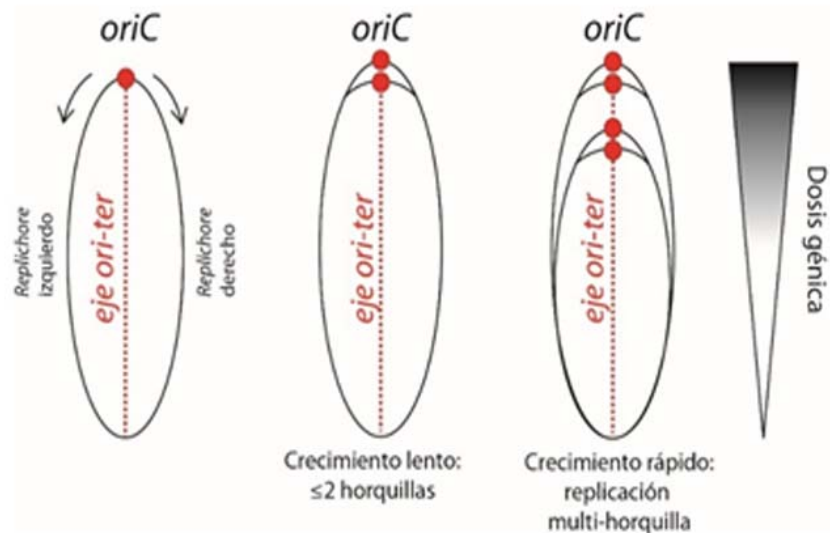


Figura 1. Estructura del genoma bacteriano. Izquierda y centro: la replicación comienza en el único *oriC* y procede (flechas) a lo largo de dos *replichores* simétricos. Cuando las bacterias crecen lentamente el genoma tiene tiempo para replicar el cromosoma antes de la división celular. **Derecha:** durante el crecimiento rápido, se superponen ciclos de replicación ya que el tiempo de división es más corto que el que requiere la duplicación del DNA. Esto genera un gradiente decreciente de dosis génica a lo largo de ambos replichores (triángulo) (Modificado [22]).

Varios trabajos muestran que esta organización influye fuertemente en la fisiología y en la evolución bacteriana. Por ejemplo, las inversiones de segmentos de DNA ocurren con una

frecuencia relativamente alta. Algunas abarcan cientos de kpb. En el caso de las grandes inversiones, generalmente solo son viables aquellas que ocurren simétricamente respecto del eje *ori-ter*. De esta manera ambos *replichores* mantienen un tamaño similar [16, 20, 27]. También se ha observado que los genes esenciales están co-orientados con la replicación. Motivos de secuencia implicados en la reparación y la segregación se encuentran más frecuentemente en la hebra líder de la replicación [16, 17]. Más específicamente, se han descrito también patrones en el genoma que podrían influir en la velocidad máxima de crecimiento bacteriana.

Localización genómica y expresión

La Genómica Comparada revela que la posición de ciertos genes en el cromosoma está ampliamente conservada. Los genes que codifican las proteínas asociadas al nucleoide, los factores sigma de la RNA polimerasa y las topoisomerasas tienen una localización conservada que se correlaciona además con su momento de expresión en las fases de crecimiento bacteriano: los genes que se expresan en la fase exponencial se localizan cerca del *oriC* mientras que aquellos que se expresan durante la fase estacionaria se ubican cerca de la región *ter* [28, 29]. Paralelamente, se descubrió que los genes que codifican para la maquinaria de expresión de la información genética como la RNAP, los RNAt, los RNAr y las proteínas ribosomales (PR) tienden a ubicarse cerca del *oriC*. Dicha correlación se observa solo en bacterias de crecimiento rápido lo que sugiere fuertemente que la localización de estos genes influiría en la fisiología celular [30, 31]. Se especuló entonces que esta localización traería el beneficio de aumentar mayor dosis génica durante la replicación (Figura 1). Esto es particularmente cierto en bacterias de crecimiento rápido como *Escherichia coli* o *Vibrio cholerae* que se dividen en un tiempo menor al requerido para la replicación del DNA. En consecuencia, inician la replicación más de una vez por división celular, fenómeno llamado replicación multi-horquilla (Figura 1). Así, las células hijas heredan un cromosoma parcialmente replicado evitándose la generación de células anucleadas. Esto conduce a que las regiones próximas al *oriC* posean 4, 8 o más copias que los genes en la región terminal lo que genera un gradiente de dosis y expresión a lo largo de ambos *replichores* (Figura 1). Así, la posición cromosómica puede condicionar el nivel de expresión que puede alcanzar un gen. Los genes para la maquinaria de traducción y transcripción están entonces en mayor dosis durante la fase exponencial de crecimiento, el momento en que más se los requiere.

Estudios recientes demuestran que la expresión de un fenotipo no depende solo de la presencia o ausencia de su(s) gen(es) codificantes sino también del contexto genómico en el que se encuentra(n). Por ejemplo, para que el programa de esporulación funcione correctamente en *Bacillus subtilis*, dos de los genes reguladores de la cadena de fosfotransferencia deben estar en extremos opuestos del cromosoma [23]. Análogamente, la localización genómica del operón *comCDE* en *Streptococcus pneumoniae* es crucial para que la bacteria pueda inducir su programa de competencia natural frente a lesiones en el DNA [24].

De la misma manera, recientemente describimos que la posición de los genes que codifican para las PR impactan fuertemente en la velocidad de crecimiento, la aptitud adaptativa (*fitness*) y la infectividad de *V. cholerae* (ver más adelante) [21, 22]. Otro caso paradigmático es el gen *fis* de *E. coli*, cuya relocalización reduce su *fitness* por la modificación simultánea de diversos fenotipos [19]. Los trabajos citados apuntan, en líneas generales, a dos mecanismos principales por los cuales la posición en el cromosoma afecta al fenotipo: por un cambio de dosis del gen en cuestión [18] o bien, debido a la alteración de su localización física [19, 32].

Sintonía fina de la velocidad de crecimiento: relocalización del principal locus de PR en *V. cholerae*

Recientemente, investigamos experimentalmente cómo la estructura del genoma influye en la fisiología celular. Como modelo usamos *V. cholerae*, un patógeno de relevancia local y global. Como agente etiológico del cólera, afecta anualmente a entre 1,4 y 4,3 millones de personas causando entre 21.000 y 143.000 muertes [33]. Desde 2016 se desarrolla en Yemen la epidemia más grande de la historia con más de un millón de infectados y 2.200 muertes. En nuestra región se desarrolló una gran epidemia a fines de los '90 y más recientemente, fue célebre la ocurrida en Haití en 2010 [33, 35]. *V. cholerae* es un habitante de aguas costeras con un ciclo de vida que alterna entre un período de amplificación, durante la infección, y una fase de persistencia en el ambiente [36]. El crecimiento rápido se asocia con el período de amplificación, mientras que el crecimiento lento se asemeja a las condiciones ambientales de la fase de persistencia.

Además de la importancia sanitaria, *V. cholerae* es particularmente interesante porque, con un tiempo generacional de 17 minutos, está entre las bacterias de crecimiento más rápido conocidas. Este rasgo correlaciona con una estructura genómica que sigue las tendencias observadas en organismos de crecimiento veloz: alto número de operones ribosomales y RNAs así como genes de PR y RNAP cercanos al *oriC* del cromosoma principal (*oriC1*). Otro rasgo interesante es que es un microorganismo que rompe con otro paradigma. Habitualmente se piensa que las bacterias poseen un solo cromosoma. Sin embargo, al menos un 10% de las bacterias poseen al menos 2 cromosomas. *V. cholerae* es uno de los modelos mejor estudiados de bacterias con múltiples cromosomas. Posee un cromosoma principal de ~3 Mpb que aloja a la mayoría de los genes esenciales y un cromosoma secundario de ~1 Mpb con mayoría de genes de función desconocida. La replicación de ambos cromosomas está perfectamente coordinada: el cromosoma principal comienza su replicación y cuando alcanza los 2/3 del *replichore* se gatilla el *oriC* del cromosoma secundario. De esta manera la replicación de ambos cromosomas concluye simultáneamente.

Para entender los vínculos entre la estructura del genoma y la fisiología celular, nos focalizamos en el locus *s10-spec-α* (S10), un sitio de 13,2 Kpb que alberga la mitad de los genes de PR. Para ello, desarrollamos herramientas de recombinación basadas en fagos

lamboides que permiten una manipulación sin precedentes del genoma bacteriano [21]. Gracias a este desarrollo, generamos un set de cepas isogénicas donde S10 fue relocalizado a distintos sitios del genoma de manera de colocar el *locus* a diferentes distancias del *oriC1* e incluso en el cromosoma secundario (Figura 2a).

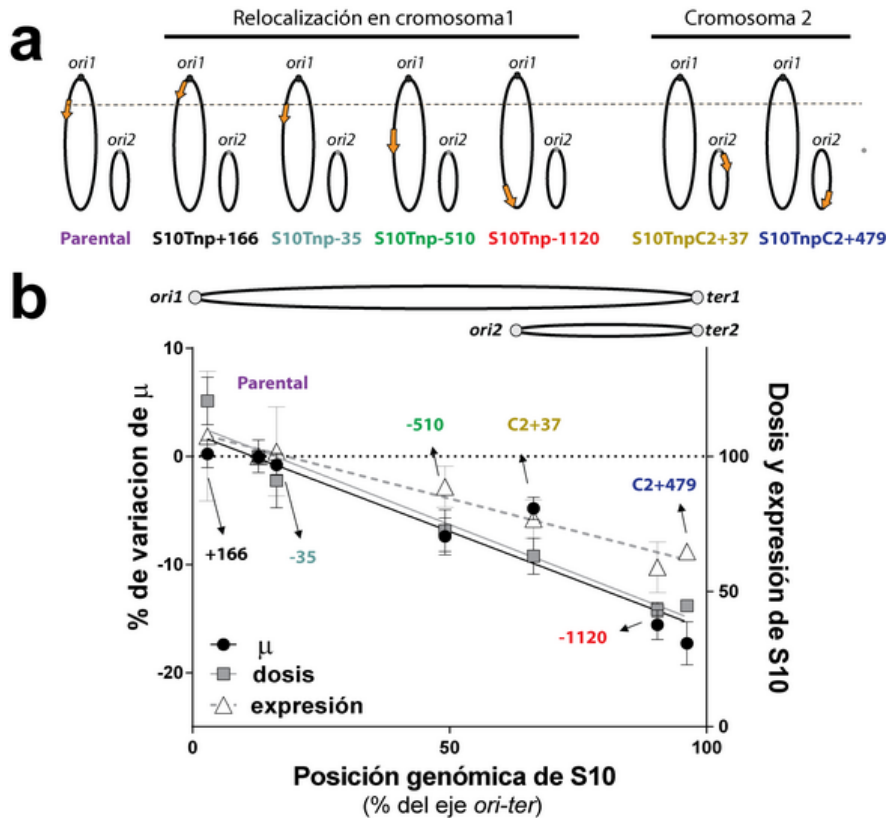


Figura 2. La posición genómica de S10 determina la dosis del locus su expresividad y determina la velocidad de crecimiento (μ) de *V. cholerae*. **a**) Mediante edición del genoma se reubicó S10 (flecha naranja) en diferentes sitios del genoma generándose una colección de cepas que permite estudiar la relación localización-fenotipo. **b**) Determinación de la velocidad de crecimiento (negro, eje izquierdo), la dosis (gris, ordenada derecha) y la expresión (blanco, eje derecho) de S10 en las diferentes cepas. Se observa una fuerte correlación de las 3 variables con la posición genómica de S10 (abscisa) (Modificado [22]).

Para nuestra sorpresa, ninguna de estas derivadas resultó afectada en su viabilidad ni en su morfología macroscópica o microscópica. Es decir que la localización genómica del locus es flexible. Luego, analizamos esta colección de cepas en condiciones óptimas de crecimiento. Descubrimos que la velocidad máxima de crecimiento de cada cepa, la dosis génica y la expresión de S10 variaban en proporción inversa a la distancia entre S10 y *oriC1* (Figura 2b) [21].

En medio mínimo, cuando no ocurre la replicación multi-horquilla (Figura 1), la velocidad de crecimiento resultó independiente de la posición genómica del locus. Todos estos experimentos sugerían fuertemente que la localización de S10 determina la velocidad máxima de crecimiento al proveer una dosis de S10 que maximiza la expresión de estas PR. Sin

embargo, al relocalizar S10 se altera simultáneamente la dosis y la sublocalización celular del locus. De esta manera, si la reubicación de estos genes es deletérea por motivos ajenos a la dosis génica (por ejemplo, si la inserción *per se* es perjudicial o si S10 es requerido en *cis*), los efectos observados serían similares. Para clarificar esta cuestión, se construyeron mutantes con dos copias de S10 lejos del *oriC1*. De esta manera se generaron cepas donde, si bien se alteró la localización espacial de S10, se mantiene su dosis génica. Estas cepas complementaron el defecto en la velocidad de crecimiento demostrando que la posición genómica del locus es importante para la fisiología celular dado que provee la dosis de S10 esencial para la fisiología bacteriana [21]. Por otro lado, experimentos de infección en *Drosophila melanogaster*, la mosca de la fruta, mostraron que la relocalización de S10 reduce de manera drástica la infectividad de *V. cholerae* lo que sugiere que la posición de estos genes es importante en las condiciones ambientales que afronta el patógeno [21].

Con el objeto de revelar efectos independientes de la dosis estudiamos en detalle estas cepas en medio mínimo empleando ensayos de competencia [22]. Estos son más sensibles que las curvas de crecimiento para determinar reducciones en el *fitness* [37]. Así detectamos que cuando desplazamos S10 a la región *ter* del cromosoma 1 o del cromosoma 2, el *fitness* de la bacteria se reduce de manera muy significativa. Esto sugería que se trataba de efectos independientes de la dosis. Sin embargo, para nuestra sorpresa, la adición de una segunda copia de S10 restituyó el *fitness* de la bacteria. Mediante la secuenciación masiva de estas cepas hallamos, que la relocalización de S10 produce una reducción del 30% de la dosis génica de S10 en ausencia de replicación multi-horquilla. Los cambios en la dosis correlacionan muy ajustadamente con los efectos observados en el *fitness* de las cepas. En contraste con lo que proponían los estudios bioinformáticos, la posición genómica de las PR es fundamental para proveer la dosis génica óptima independientemente de la presencia de la replicación multi-horquilla [22]. En el caso de *V. cholerae* implica que la posición de estos genes impacta en ambos estadios de su ciclo de vida, tanto en la fase infectiva de la bacteria (crecimiento rápido) como durante su persistencia en el ambiente (crecimiento lento). Pero además esto sugiere que el posicionamiento genómico de los genes que codifican para el flujo de la información genética podría influenciar la evolución de las bacterias de crecimiento lento. Así esta clase de aproximación puede emplearse para reprogramar la velocidad del crecimiento bacteriano. Por otro lado, la dosis de S10 podría ser limitante del crecimiento bacteriano. O dicho de otra manera, quizás aumentando su dosis podríamos acelerar su crecimiento. Para probar esta posibilidad creamos cepas con 2, 3 y hasta 4 copias del locus (Figuras 3a y 3b).

Es decir, creamos cepas merodiploides, merotriploides y merotetraploides para S10. Las cepas merodiploides mostraron un crecimiento similar al de la cepa parental indicando que un pequeño exceso de S10 no es perjudicial. Mientras tanto, la adición de una tercera y cuarta copia del locus impactó en el crecimiento celular, ya que las cepas merotriploides y la

merotetraploide mostraron reducciones significativas de su velocidad de crecimiento con respecto a la parental (Figura 3c).

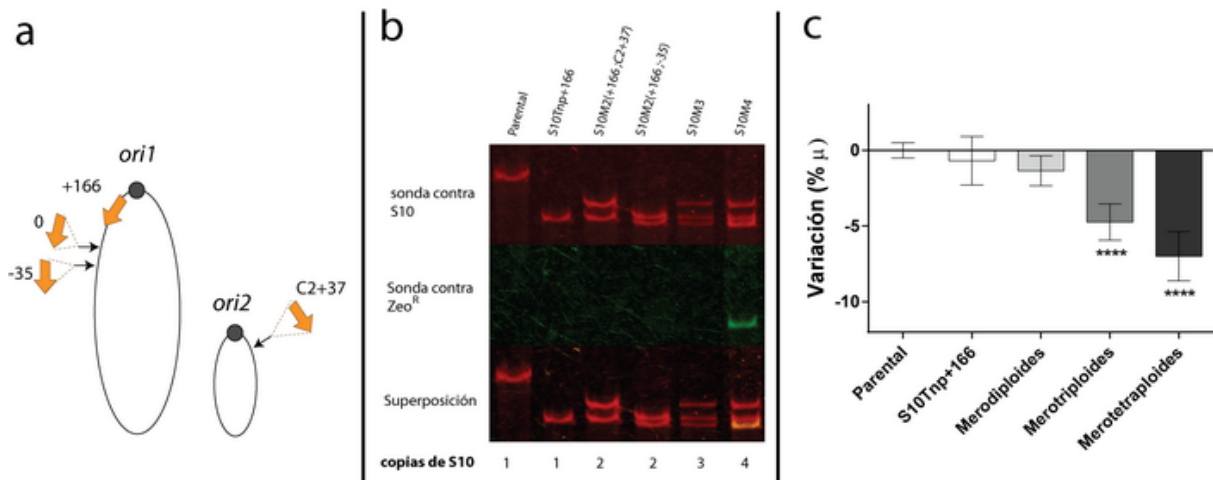


Figura 3: Impacto del aumento de la ploidía de S10 en *V. cholerae*. **a)** Se insertaron varias copias S10 (flechas naranjas) dentro del genoma de la cepa + 166. Los sitios de inserción, dibujados como flechas negras y las coordenadas (en pares de kilobases desde la ubicación original), se muestran sobre una representación de los cromosomas de *V. cholerae*. **b)** Southern Blot con DNA genómico digerido con una enzima de restricción de las cepas indicadas en el panel superior. Las sondas se dirigieron a S10 (rojo) o a un marcador asociado (ZeoR) cuando los tamaños obtenidos eran similares (verde). Los cambios en el genotipo se evidencian por el cambio de tamaño de S10 al moverse (parental vs. S10Tnp + 166). Luego se agrega la segunda y tercera copia de S10Tnp-35 y S10TnpC2+37 (flechas negras). La cuarta copia de S10 viene de una cepa que origina un fragmento de restricción con un tamaño similar al del alelo proveniente de +166. Sin embargo, puede distinguirse por una señal de sonda S10 incrementada y la sonda verde. La ploidía de S10 para cada cepa se muestra en el panel inferior. **c)** El efecto de ploidía S10 en la velocidad de crecimiento se cuantificó promediando la tasa de crecimiento (μ) obtenida en varios experimentos independientes para cada cepa mutante y normalizándolo a μ de la cepa parental. Los resultados se expresan como porcentaje de la variación (% μ) con respecto a la cepa parental (Modificado [22]).

Por lo tanto, la velocidad de crecimiento no puede mejorarse mediante el aumento de la dosis de S10, lo que demuestra que el número de copias del locus no es limitante para el crecimiento bacteriano. La célula puede tolerar los efectos perjudiciales putativos de una copia extra, pero aumentar la ploidía de S10 aún más, como en las cepas merotriploide y merotetraploide, perjudica la fisiología celular (Figura 3c). Estos resultados, sumados a la flexibilidad en la localización genómica de S10, sugieren que el locus, a lo largo de la evolución, derivó a la posición genómica óptima para el crecimiento de *V. cholerae*.

Remarcas finales

A lo largo de nuestro trabajo mostramos un efecto claro del reposicionamiento de S10 sobre la fisiología, la infectividad y la competitividad de *V. cholerae*. Creemos que este locus es la punta del iceberg de muchos más grupos de genes por descubrir. También las herramientas

experimentales que desarrollamos y el marco teórico que empleamos servirán para poner a prueba muchas hipótesis que provienen de la genómica comparada pero que no se han puesto a prueba experimentalmente. Ya hemos comenzado la búsqueda de nuevos casos, por ejemplo, ya estamos estudiando el rol de la localización de los genes de la RNA polimerasa bacteriana. Además, estamos iniciando el estudio de otros modelos bacterianos, en particular, nos interesa acelerar el tiempo generacional de bacterias de crecimiento lento. La aplicación de esta metodología a otras bacterias y a otros genes proporcionará información sobre las reglas de la organización del genoma. Además, comprender los factores genómicos que afectan la velocidad de crecimiento permitirá reprogramar el crecimiento bacteriano, ayudar a predecir el comportamiento de sistemas biológicos más complejos y desarrollar mejores modelos teóricos [38,39]. Nuestros estudios contribuirán al desarrollo del diseño de genomas, la bioingeniería y la biotecnología en el contexto del surgimiento de la Biología Sintética y de la invención de nuevas herramientas para la edición de genomas.

Agradecimientos

Agradezco a las estudiantes de mi grupo Belén Bordignon, Leila Bartrolí y Julieta Viglino por leer cuidadosamente este artículo.

Referencias

1. **Land M. et al.** (2015) Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional & integrative genomics* 15:141-161. doi:10.1007/s10142-015-0433-4
2. **Kosuri S, Church GM** (2014) Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications. *Nature methods* 11: 499-507. doi:10.1038/nmeth.2918
3. **Gibson DG et al.** (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 329: 52-56. doi:10.1126/science.1190719.
4. **Hutchison CA 3rd et al.** (2016) Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* 351, aad6253. doi:10.1126/science.aad6253.
5. **Annaluru N et al.** (2014) Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science* 344: 55-58. doi:10.1126/science.1249252.
6. **Boeke JD et al.** (2016) GENOME ENGINEERING. The Genome Project-Write. *Science* 353: 126-127. doi:10.1126/science.aaf6850
7. **Robinson NP, Bell SD** (2005) Origins of DNA replication in the three domains of life. *The FEBS Journal* 272: 3757-3766. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04768.x.
8. **LeTB, Laub MT** (2014) New approaches to understanding the spatial organization of bacterial genomes. *Current opinion in microbiology* 22: 15-21. doi:10.1016/j.mib.2014.09.014.
9. **Reyes-Lamothe R, Nicolas E, Sherratt DJ** (2012) Chromosome replication and segregation in bacteria. *Annual review of genetics* 46: 121-143. doi:10.1146/annurev-genet-110711-155421.
10. **Dorman CJ** (2013) Genome architecture and global gene regulation in bacteria: making progress towards a unified model? *Nature Reviews Microbiology* 11: 349-355. doi:10.1038/nrmicro3007.

11. **Toro E, Shapiro L** (2010) Bacterial chromosome organization and segregation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000349. doi:10.1101/cshperspect.a000349.
12. **Campos M, Jacobs-Wagner C** (2013) Cellular organization of the transfer of genetic information. *Current opinion in microbiology* 16: 171-176. doi:10.1016/j.mib.2013.01.007.
13. **Liyo V S et al.** (2018) Multiscale structuring of the *E. coli* chromosome by nucleoid-associated and condensin proteins. *Cell* 172: 771-783 e718. doi:10.1016/j.cell.2017.12.027.
14. **Monod J** (1949) The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Reviews in Microbiology* 3: 371-3949.
15. **Lane-Clayton JE** (1909) Multiplication of Bacteria and the Influence of Temperature and some other Conditions thereon. *The Journal of hygiene* 9: 239-248.
16. **Rocha EP** (2008) The organization of the bacterial genome. *Annual review of genetics* 42: 211-233. doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091653.
17. **Touchon M, Rocha EP** (2016) Coevolution of the Organization and Structure of Prokaryotic Genomes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8, a018168. doi:10.1101/cshperspect.a018168.
18. **Slager J, Veening JW** (2016) Hard-Wired Control of Bacterial Processes by Chromosomal Gene Location. *Trends in microbiology* 24: 788-800. doi:10.1016/j.tim.2016.06.003.
19. **Gerganova V et al** (2015) Chromosomal position shift of a regulatory gene alters the bacterial phenotype. *Nucleic acids research* 43: 8215-8226. doi:10.1093/nar/gkv709.
20. **Esnault E, Valens M, Espeli O, Boccard F** (2007) Chromosome structuring limits genome plasticity in *Escherichia coli*. *PLoS genetics* 3, e226. doi:10.1371/journal.pgen.0030226.
21. **Soler-Bistue A et al.** (2015) Genomic location of the major ribosomal protein gene locus determines *Vibrio cholerae* global growth and infectivity. *PLoS genetics* 11, e1005156. doi:10.1371/journal.pgen.1005156.
22. **Soler-Bistue A, Timmermans M, Mazel D** (2017) The proximity of ribosomal protein genes to *oriC* enhances *Vibrio cholerae* fitness in the absence of multifork replication. *mBio* 8. doi:10.1128/mBio.00097-17.
23. **Narula J et al**(2015) Chromosomal arrangement of phosphorelay genes couples sporulation and DNA replication. *Cell* 162: 328-337. doi:10.1016/j.cell.2015.06.012 (2015).
24. **Slager J, Kjos M, Attaiech L, Veening JW** (2014) Antibiotic-induced replication stress triggers bacterial competence by increasing gene dosage near the origin. *Cell* 157: 395-406. doi:10.1016/j.cell.2014.01.068.
25. **Fitzgerald S et al** (2015) Re-engineering cellular physiology by rewiring high-level global regulatory genes. *Scientific reports* 5, 17653. doi:10.1038/srep17653.
26. **Sobetzko P, Glinkowska M, Travers A, Muskhelishvili G** (2013) DNA thermodynamic stability and supercoil dynamics determine the gene expression program during the bacterial growth cycle. *Molecular bioSystems* 9: 1643-1651. doi:10.1039/c3mb25515h.
27. **Repar J, Warnecke T** (2017) Non-Random inversion landscapes in prokaryotic genomes are shaped by heterogeneous selection pressures. *Molecular biology and evolution* 34: 1902-1911. doi:10.1093/molbev/msx127.
28. **Muskhelishvili G, Travers A** (2014) Order from the order: how a spatiotemporal genetic program is encoded in a 2-D genetic map of the bacterial chromosome. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 24: 332-343. doi:10.1159/000368852.
29. **Sobetzko P, Travers A, Muskhelishvili G** (2012) Gene order and chromosome dynamics coordinate spatiotemporal gene expression during the bacterial growth cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: E42-50. doi:10.1073/pnas.1108229109.
30. **Couturier E, Rocha EP** (2006) Replication-associated gene dosage effects shape the genomes of fast-growing bacteria but only for transcription and translation genes. *Molecular microbiology* 59: 1506-1518. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05046.x.

31. **Vieira-Silva S, Rocha EP** (2010) The systemic imprint of growth and its uses in ecological (meta)genomics. *PLoS genetics* 6, e1000808. doi:10.1371/journal.pgen.1000808.
32. **Bryant JA, Sellars LE, Busby SJ, Lee DJ** (2014) Chromosome position effects on gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic acids research* 42: 11383-11392. doi:10.1093/nar/gku828.
33. **Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB** (2012) Cholera. *Lancet* 379: 2466-2476. doi:10.1016/S0140-6736(12)60436-X.
34. **Domman, D et al.** (2017) Integrated view of *Vibrio cholerae* in the Americas. *Science* 358: 789-793. doi:10.1126/science.aao2136.
35. **Hu D et al** (2016) Origins of the current seventh cholera pandemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: E7730-E7739. doi:10.1073/pnas.1608732113.
36. **Nelson EJ, Harris J B, Morris J G Jr., Calderwood, SB, Camilli A** (2009) Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic. *Nature reviews. Microbiology* 7: 693-702. doi:10.1038/nrmicro2204.
37. **Concepcion-Acevedo J, Weiss H N, Chaudhry WN, Levin BR** (2015) Malthusian Parameters as Estimators of the Fitness of Microbes: A Cautionary Tale about the Low Side of High Throughput. *PloS one* 10, e0126915. doi:10.1371/journal.pone.0126915.
38. **Karr JR et al.** (2012) A whole-cell computational model predicts phenotype from genotype. *Cell* 150: 389-401. doi:10.1016/j.cell.2012.05.044.
39. **Scott M, Hwa T** (2011) Bacterial growth laws and their applications. *Current opinion in biotechnology* 22: 559-565. doi:10.1016/j.copbio.2011.04.014.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 17, agosto 2018

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Identificación de alcaloides psicoactivos de plantas por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa. Aplicación en pipas cerámicas de dos sitios arqueológicos de Catamarca

Valeria P. Careaga¹, Gerardo Gottas¹, María Fabiana Bugliani², María Cristina Scattolin² y Marta S. Maier¹

¹UMYMFOR – Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Pabellón 2, Ciudad Universitaria, ²Instituto de las Culturas (IDECU), UBA, CONICET, Museo Etnográfico, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

maier@qo.fcen.uba.ar

Recibido 13/08/2018-Aceptado 15/08/2018

Resumen

Las culturas precolombinas de América utilizaron plantas que contienen alcaloides psicoactivos en ceremonias rituales y como medicinas. En este trabajo se optimizaron las condiciones de análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa para la identificación simultánea de los alcaloides presentes en hojas de tabaco y coca y en semillas de chamico y cebil con el objeto de contar con una metodología de análisis para su identificación en materiales arqueológicos. La metodología desarrollada se aplicó a la identificación de alcaloides en siete fragmentos de pipas cerámicas y sedimentos asociados provenientes de dos sitios arqueológicos del valle del Cajón en la provincia de Catamarca, Argentina. Se identificó 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina en dos hornillos y en los sedimentos contenidos en un hornillo y en dos tubos de tres pipas cerámicas. Sólo se identificó nicotina en el hornillo de una de las pipas. Los resultados demuestran el uso de cebil como alucinógeno por los antiguos pobladores de Catamarca.

Palabras clave: alcaloides psicoactivos, cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa, pipas, patrimonio cultural

Identification of plant psychoactive alkaloids by gas chromatography – mass spectrometry. Application in ceramic pipes from two archaeological sites in Catamarca

Abstract

The pre-Columbian cultures of America used plants containing psychoactive alkaloids in ritual ceremonies and as medicines. In this research we have optimized the analytical conditions of gas chromatography coupled to mass spectrometry for the simultaneous identification of alkaloids from tobacco and coca leaves as well as chamico and cebil seeds with the aim of developing an analytical methodology for their identification in archaeological remains. The optimized methodology was applied to the identification of alkaloids in seven fragments of ceramic pipes and sediments from two archaeological sites from the Cajón valley in Catamarca province, Argentina. We have identified 5-hydroxy-*N,N*-dimethyltryptamine in two pipe furnaces and in the sediments contained in the furnace and tubes from three ceramic pipes. We have identified nicotine only in one pipe furnace. These results indicate the use of cebil as hallucinogen by ancient inhabitants of Catamarca.

Keywords: psychoactive alkaloids, gas chromatography – mass spectrometry, pipes, cultural heritage

Introducción

Fuentes etnográficas y etnohistóricas indican que el consumo de sustancias alucinógenas derivadas de plantas jugó un papel importante en la vida de los pueblos originarios de América. Los modos de consumo variaban de acuerdo con el efecto buscado, ya sea como sustancias medicinales o en ceremonias rituales o religiosas. Las sustancias podían beberse, mascarse, inhalarse mediante el uso de tubos y tabletas, fumarse en cigarrillos o pipas, o aplicarse a través de enemas [1]. Entre las partes de las plantas más utilizadas podemos mencionar las semillas de cebil (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*), las hojas de tabaco (*Nicotiana* sp) y de coca (*Erythroxylum coca*) y las hojas o semillas de chamico (*Datura ferox*). Todas estas plantas se caracterizan por contener alcaloides. La hoja de coca contiene principalmente cocaína [2], mientras que la hoja de tabaco se caracteriza por su contenido en nicotina y cotinina, su producto de oxidación [3]. El cebil es un árbol que se encuentra desde Perú y el noroeste de Bolivia, Brasil y Paraguay hasta las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, Corrientes, Misiones y Córdoba. Sus semillas constituyen la parte de la planta con mayor concentración de alcaloides triptamínicos, tales como 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltryptamina (bufotenina), *N,N*-dimetiltryptamina y 5-metoxi-*N,N*-dimetiltryptamina [4,5]. En cuanto al chamico, sus semillas contienen alcaloides derivados del tropano, como atropina y escopolamina [6].

La utilización de plantas que contienen alcaloides psicoactivos por las culturas precolombinas de Sudamérica fue demostrado en numerosos estudios. Se han identificado restos de nicotina en pipas [7,8] y cabellos de momias precolombinas [9,10] de sitios arqueológicos de Chile, así como alcaloides del cebil en pipas arqueológicas del noroeste argentino [11,12] y en objetos hallados en contextos funerarios en el área de San Pedro de Atacama, en el norte de Chile [13].

En la literatura científica se encuentra descripto el análisis de alcaloides psicoactivos mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-EM) [14-16], cromatografía líquida de alta resolución [17] y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa [18]. Numerosos trabajos demuestran el interés en el desarrollo de metodologías basadas en técnicas de espectrometría de masa para la identificación de alcaloides pertenecientes a diferentes familias de compuestos, particularmente en matrices biológicas [19-21]. Sin embargo, no se ha reportado una metodología para la determinación simultánea de los alcaloides del tabaco, cebil, coca y chamico, la cual sería una herramienta analítica valiosa para la identificación de estas sustancias en materiales arqueológicos de Sudamérica. Por consiguiente, el objetivo del presente trabajo fue la optimización del análisis de una mezcla de extractos de hojas de coca y tabaco y semillas de cebil y chamico por CG-EM y su posterior aplicación a la identificación de alcaloides en pipas cerámicas recuperadas de dos sitios arqueológicos del valle del Cajón en la provincia de Catamarca, Argentina.

Materiales y métodos

Material biológico

Las hojas de coca fueron adquiridas en un mercado en Arica (Chile) mientras que los frutos de chamico fueron proporcionados por el Lic. Gustavo Álvarez. Las hojas de tabaco y las semillas de *Anadenanthera colubrina* var. cebil fueron provistas por la Dra. Ana María Llamazares.

Extracción de los alcaloides de las especies vegetales

Las semillas de cebil y chamico se molieron en un mortero y se extrajeron con metanol (calidad para cromatografía líquida, Merck) a temperatura ambiente durante 24 horas. Las hojas de coca y tabaco fueron extraídas con metanol en las mismas condiciones. Posteriormente, cada extracto metanólico se filtró y evaporó a sequedad a presión reducida. Los extractos fueron disueltos en metanol y analizados por cromatografía en capa delgada (CCD) de sílica gel utilizando como solventes de elución cloroformo:metanol (9:1) para los extractos de coca, tabaco y chamico y *n*-butanol:ácido acético:agua (12:3:5) para el extracto de cebil. En todos los casos se utilizó el reactivo de Dragendorff como revelador para la detección de alcaloides.

Los extractos metanólicos fueron purificados por extracción en fase sólida utilizando un cartucho de sílica gel (Strata, Phenomenex, 500 mg/3 ml). Se utilizaron cloroformo, mezclas de cloroformo:metanol de polaridad creciente y metanol como solventes de elución. Las fracciones eluidas se analizaron por CCD de sílica gel en las condiciones descritas anteriormente. Las fracciones de cada extracto que contenían mayoritariamente alcaloides se unificaron y se analizaron por CG-EM.

Análisis de los extractos con alcaloides por CG-EM

Las fracciones purificadas que contenían alcaloides se disolvieron en metanol y se analizaron en un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masa Shimadzu GCMSQP5050A con una columna capilar Zebron ZB-5 (Phenomenex, 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano, 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y un espesor de film de 0,25 μm). Se utilizó helio como gas portador (1,5 ml/min de flujo). La temperatura del inyector fue de 240 °C y la del detector de 280 °C. El programa de temperatura comprendió una temperatura inicial de 80 °C (2 min) con una rampa de temperatura de 15 °C/min hasta una temperatura final de 280 °C que se mantuvo constante durante 15 min. El espectrómetro de masa fue operado en modo de ionización electrónica a 70 eV en un rango de masa/carga (m/z) de 40 a 650.

A continuación se detallan los alcaloides identificados en los extractos metanólicos purificados de cada especie vegetal junto con sus tiempos de retención (t_r) y los valores de m/z y de intensidad relativa (%) de los iones del espectro de masa.

Alcaloides del extracto de hojas de coca: anhidroecgonina metil éster ($t_r = 8,99$ min; $m/z = 57$ (7); 68 (5); 82 (15); 94 (10); 120 (10); 122 (16); 152 (100); 153 (13); 166 (12); 181 (33)), ecgonina metil éster ($t_r = 9,83$ min; $m/z = 55$ (17); 56 (7); 68 (8); 82 (100); 83 (60); 84 (9); 94 (29); 96 (81); 97 (40); 112 (9); 140 (11); 168 (7); 182 (7); 199 (12)), cocaína ($t_r = 15,91$ min; $m/z = 51$ (15); 55 (8); 77 (42); 82 (100); 83 (37); 94 (34); 96 (26); 105 (44); 122 (10); 183 (8); 198 (10); 272 (6); 303(21)), norcocaína ($t_r = 15,66$ min; $m/z = 51$ (9); 67 (7); 68 (33); 69 (10); 77 (25); 81 (5); 82 (11); 83 (8); 105 (26); 108 (20); 168 (100); 169 (9); 289 (8)), cinamilcocaína ($t_r = 17,58$ min y 19,07 min; $m/z = 77$ (20); 81 (11); 82 (100); 83 (57); 94 (33); 96 (65); 97 (15); 103 (28); 131 (18); 168 (11); 182 (62); 183 (8); 238 (24); 329 (19)), y benzoilecgonina ($t_r = 20,02$ min; $m/z = 51$ (16); 57 (13); 67 (10); 77 (37); 82 (65); 83 (29); 93 (21); 94 (28); 95 (13); 96 (22); 105 (42); 122 (10); 124 (100); 168 (57); 289 (8)).

Alcaloides del extracto de hojas de tabaco: nicotina ($t_r = 8,44$ min; $m/z = 51$ (4); 55 (4); 65 (4); 78 (4); 82 (6); 84 (100); 85 (6); 92 (6); 119 (5); 130 (4); 133 (24); 161 (14); 162 (15); 163 (1)) y cotinina ($t_r = 11,88$ min; $m/z = 51$ (8); 65 (7); 69 (7); 70 (6); 78 (8); 91 (6); 98 (100); 99 (7); 117 (6); 118 (16); 119 (14,5); 121 (8); 147 (10); 176 (40); 175 (10); 177 (5)).

Alcaloides del extracto de semillas de cebil: *N,N*-dimetilriptamina ($t_r = 12,57$ min; $m/z = 58$ (100); 59 (2); 63 (2); 77 (2); 89 (1); 116 (1); 130 (6); 143 (4); 188 (3)) y 5-hidroxi-*N,N*-

dimetiltriptamina ($t_r = 14,85$ min; $m/z = 58$ (100); 59 (3); 91 (2); 117 (1); 146 (4); 159 (1); 160 (2); 204 (7)).

Alcaloides del extracto de semillas de chamico: escopolamina ($t_r = 17.13$ min; $m/z = 77$ (23); 81 (27); 91 (21); 94 (100); 97 (20); 103 (24), 108 (49); 110 (12); 120 (17); 136 (34); 137 (13); 138 (60); 154 (30); 303 (18)).

Pipas cerámicas y contexto arqueológico

Las pipas cerámicas estudiadas (Figura 1) provienen de dos sitios arqueológicos localizados en el sector meridional del valle del Cajón (provincia de Catamarca, Argentina) en una estrecha quebrada al borde de la puna. Cardonal y Bordo Marcial son asentamientos aldeanos de los primeros siglos de la era cristiana que se emplazan en dos terrazas de escasa pendiente que bordean un cerro de mayor altura [22,23].



Figura 1: Fragmentos de pipas arqueológicas del valle del Cajón, provincia de Catamarca.

Estas aldeas están formadas por más de 100 estructuras circulares y subcirculares que se agrupan configurando núcleos habitacionales de entre tres y seis recintos cada uno. En el caso de Cardonal, uno de ellos, el Núcleo 1, fue excavado en su totalidad y mostró evidencias de la vida cotidiana de quienes habitaron esta aldea. En las distintas habitaciones se hallaron una docena de recipientes cerámicos semicompletos, puntas de proyectil, decenas de instrumentos líticos tallados y pulidos, improntas de cestería, restos vegetales carbonizados, fragmentos óseos faunísticos, una pipa cerámica completa, además de 64 fragmentos cerámicos correspondientes a otras pipas de similares características. Por otra parte, en Bordo Marcial, se excavó de forma total un recinto circular en el cual se halló el tubo completo de una pipa cerámica y algunos fragmentos pequeños de otras pipas. Los fragmentos de las pipas arqueológicas se describen en la Tabla I. La pipa completa hallada en el sitio Cardonal está compuesta por el hornillo (C497-H1) (muestra 1, Tabla I) y dos fragmentos del tubo

posteriormente reconstituido (C497-H2+C425) (muestra 2, Tabla I). Las muestras 1, 2, 3 y 5 (Tabla I) proceden de la misma habitación, la Estructura 1, que fue utilizada como cocina. Asimismo se analizó un pequeño fragmento de otra pipa (C399-T8, muestra 7) hallada en la Estructura 5, un patio, y otro fragmento de hornillo y pie (C161, muestra 6) recolectado en la superficie del sitio. Del sitio Bordo Marcial se analizó un tubo de pipa (C874-T1) y los sedimentos extraídos del mismo (muestra 4), hallados en la Estructura 18.

Los sedimentos asociados a los fragmentos de las pipas correspondientes a las muestras 1, 2, y 4 se extrajeron en el laboratorio.

Tabla I. Muestras analizadas: descripción y datos de procedencia

Muestra	N° catálogo PASCAL	Descripción	Datos de procedencia
1	C497-H1	Hornillo de pipa con rostro modelado y sedimentos extraídos del hornillo.	Sitio arqueológico Cardonal. C497. Estructura 1. Sector NW-SW. Piso de ocupación.
2	C497-H2 + C425	Tubo de pipa y sedimentos extraídos del interior del tubo.	Sitio arqueológico Cardonal. C497. Estructura 1. Sector NW-SW. Piso de ocupación.
3	C241 Hallazgo #19	Hornillo de pipa	Sitio arqueológico Cardonal. Estructura 1. Unidad 2. Nivel 1.
4	C874-T1	Tubo de pipa y sedimentos extraídos del interior del tubo.	Sitio arqueológico Bordo Marcial. Núcleo 2. Estructura 18. Cuadrícula 29. Nivel 2.
5	C238 Hallazgo #17	Fragmento de tubo de pipa reconstruido.	Sitio arqueológico Cardonal. Sector 1. Estructura 1. Unidad 4. Nivel 4.
6	C161	Fragmento de hornillo y pie	Sitio arqueológico Cardonal. Recolección de superficie.
7	C399-T8	Hornillo de pipa con interior cilíndrico correspondiente al tubo.	Sitio arqueológico Cardonal. Núcleo 1. Estructura 5. Unidad NW. Cuadrícula D. Nivel 6.

Extracción de los alcaloides de las pipas arqueológicas

Con excepción del fragmento de la pipa C399-T8 (muestra 7), el cual se sumergió en metanol durante 24 horas para la extracción de los alcaloides, en el caso de los fragmentos de las otras pipas, se raspó material de su interior (100 mg) y el sólido se dejó en contacto con

metanol (5 ml) durante 2-3 horas a temperatura ambiente. De la misma manera se procedió con los sedimentos asociados a las muestras 1, 2 y 4. Cada extracto metanólico se separó del sólido por centrifugación y la solución se evaporó a sequedad a presión reducida para su posterior análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-EM).

Resultados

Los extractos purificados de las partes de cada una de las especies vegetales se analizaron por CG-EM con el objeto de identificar los alcaloides mayoritarios a partir del análisis de sus espectros de masa. El extracto de hojas de coca reveló la presencia de cocaína como compuesto mayoritario y cantidades minoritarias de anhidroecgonina metil éster, el éster metílico de ecgonina, norcocaína y benzoilecgonina, además de dos picos a tiempos de retención de 17,58 y 19,07 minutos correspondientes a los isómeros *cis* y *trans* de la cinamilcocaína. El extracto de tabaco indicó la presencia de nicotina y cotinina, su producto de oxidación, mientras que en el extracto de cebil se identificó 5-hidroxi-*N,N*-dimetilriptamina como componente mayoritario y *N,N*-dimetilriptamina. El análisis por CG-EM del extracto de las semillas de chamico indicó la presencia de escopolamina como único alcaloide, ya que su proporción es mucho mayor que la de atropina/hiosciamina [24]. Una vez identificados los alcaloides en los extractos purificados de las cuatro especies vegetales, se preparó una mezcla de los cuatro extractos y se analizó por CG-EM en las mismas condiciones de análisis con el objeto de su detección simultánea en un único análisis cromatográfico. El cromatograma de corriente iónica total (Figura 2) muestra la identificación de los alcaloides nicotina, anhidroecgonina metil éster, el éster metílico de ecgonina, cotinina, 5-hidroxi-*N,N*-dimetilriptamina, norcocaína, cocaína y cinamilcocaína, además de los ácidos grasos saturados mirístico (14:0), palmítico (16:0) y esteárico (18:0), comunes a distintas especies vegetales. No se detectaron escopolamina, *N,N*-dimetilriptamina y benzoilecgonina debido a su baja concentración en el extracto, sin embargo, los tiempos de retención de cada uno de estos alcaloides (ver Materiales y métodos) permitirían su separación e identificación por CG-EM en el caso de encontrarse en mayor proporción y en mezclas conteniendo algunos de los otros alcaloides psicoactivos.

La metodología optimizada se aplicó al análisis de los fragmentos de pipas y sedimentos asociados provenientes de los sitios arqueológicos Cardonal y Bordo Marcial ubicados en el valle del Cajón, Catamarca (Figura 1, Tabla I). Los fragmentos de las pipas y los sedimentos fueron extraídos con metanol y los extractos metanólicos analizados por CG-EM realizando un barrido completo de los iones en el rango de m/z de 40 a 650. En todos los extractos se detectaron únicamente ácidos grasos de 8 a 18 átomos de carbono y en algunos casos se identificaron también sus ésteres metílicos. En función de este resultado, se reanalizaron las muestras por CG-EM realizando un monitoreo selectivo de iones, lo cual favorece la identificación de componentes que se encuentran en muy bajas proporciones. Se

seleccionaron los iones principales para la identificación de nicotina ($m/z = 84, 133, 161, 162$), cotinina ($m/z = 98, 176$), *N,N*-dimetiltriptamina ($m/z = 58, 77, 130, 188$), 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina ($m/z = 58, 91, 146, 160, 204$), norcocaína/benzoilecgonina ($m/z = 82, 289$), cocaína ($m/z = 82, 94, 303$) y escopolamina ($m/z = 94, 138, 303$). La metodología se aplicó al análisis de los extractos metanólicos de las pipas cerámicas y sedimentos descriptos en la Tabla I. En el extracto metanólico del hornillo de la pipa C497-H1 (muestra 1) se identificó nicotina mientras que en el sedimento asociado al fragmento se detectó 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina. Este alcaloide fue identificado en los hornillos de las pipas C241 Hallazgo #19 (muestra 3) y C399-T8 (muestra 7) y en los sedimentos contenidos en los tubos C497-H2+C425 (muestra 2) y C874-T1 (muestra 4). Por otra parte, en las muestras 5 y 6 no se identificaron alcaloides.

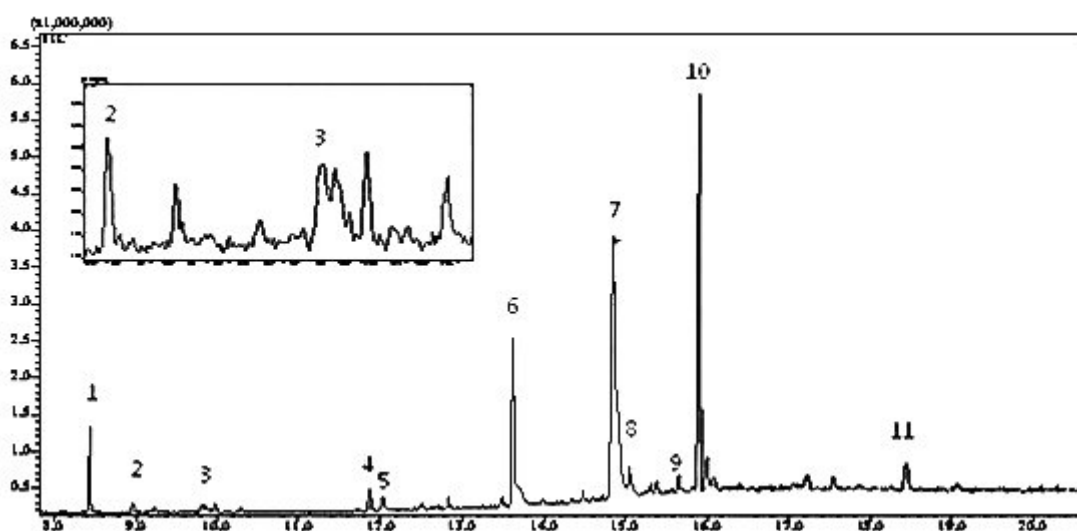


Figura 2: Cromatograma de corriente iónica total de la mezcla de extractos purificados de hojas de tabaco y coca y semillas de chamico y cebil. Componentes identificados: 1. Nicotina; 2: Anhidroecgonina metil éster; 3: Ecgonina metil éster; 4: Cotinina; 5: Ácido mirístico; 6: Ácido palmítico; 7: 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina; 8: Ácido esteárico; 9: Norcocaína; 10: Cocaína; 11: Cinamilcocaína.

Discusión

La metodología optimizada permite, a partir de una extracción simple con metanol, separar alcaloides pertenecientes a distintas familias químicas por cromatografía gaseosa e identificarlos en bajas concentraciones mediante el monitoreo selectivo de iones por espectrometría de masa. Los resultados obtenidos demuestran el consumo de sustancias alucinógenas provenientes de una planta nativa como el cebil por las sociedades prehispánicas que habitaron el Noroeste argentino y contribuyen al conocimiento sobre el uso de alucinógenos y pipas de fumar.

Muchas de las pipas completas del Noroeste argentino forman parte de colecciones privadas o de museos y carecen en general de datos contextuales y procedencias ciertas. Los análisis efectuados a las pipas del valle del Cajón presentaron evidencias inequívocas que las vinculan con el consumo de sustancias alucinógenas en los contextos de las actividades originales en los cuales eran usadas. Los resultados ratifican la firme adhesión que hubo hace dos mil años a la costumbre de fumar vegetales procedentes de regiones distantes y muestra la amplia dispersión de esas plantas útiles, la cual supera considerablemente sus límites naturales. Ello implica la existencia de un sistema de intercambio a larga distancia bien desarrollado para su distribución eficaz y extendida a sus consumidores habituales. También se confirma el alto valor que habrían tenido estas plantas en la economía de los pueblos prehispánicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo financiero para la realización de esta investigación. VPC, MFB, MCS y MSM son Miembros de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico de CONICET.

Referencias

1. **Pérez Gollán JA, Gordillo I** (1993) Alucinógenos y sociedades indígenas del Noroeste argentino. *Anales de Antropología* 30: 299-350.
2. **Johnson EL, Emche SD** (1994) Variation of alkaloid content in *Erythroxylum coca* leaves from leaf bud to leaf drop. *Annals of Botany* 73: 645-650.
3. **Sisson VA, Severson RF** (1990) Alkaloid composition of the *Nicotiana* species. *Beiträge zur Tabakforschung International* 14: 327-339.
4. **Von Reis Altschul S** (1972) The genus *Anadenanthera* in Amerindian cultures. Botanical Museum, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 96 pp.
5. **Bongiorno de Pfirter GM, Mandrile EL** (1983) Principios activos con acción alucinógena II. Bufotenina y otras triptaminas. Su presencia en *Anadenanthera peregrina* (L.) Spegazzini (Leguminosae). *Acta Farmacéutica Bonaerense* 2: 47-54.
6. **Padura LZ, Bandoni AL, Rondina RVD, Coussio JD** (1976) Quantitative determination of total alkaloids and scopolamine in *Datura ferox* growing in Argentina. *Planta Medica* 29: 357-360.
7. **Echeverría J, Planella MT, Niemeyer HM** (2014) Nicotine in residues of smoking pipes and other artifacts of the smoking complex from Early Ceramic period archeological site in central Chile. *Journal of Archeological Science* 44: 55-60.
8. **Gili F, Echeverría J, Stovel E, Deibel M, Niemeyer HM** (2017) Las pipas del salar de Atacama: reevaluando su origen y uso. *Estudios Atacameños* 54: 37-64.
9. **Echeverría J, Niemeyer HM** (2013) Nicotine in the hair of mummies from San Pedro de Atacama (Northern Chile). *Journal of Archeological Science* 40: 3561-3568.
10. **Musshof F, Rosendahl W, Madea B** (2009) Determination of nicotine in hair samples of pre-columbian mummies. *Forensic Science International* 185: 84-88.
11. **Rosso C, Spano R** (2005-2006) Evidencias del uso de alucinógenos en pipas halladas en dos sitios tempranos de los Valles Calchaquíes. *Arqueología* 13: 79-99.

12. **Lema VS, Andreoni D, Capparelli A, Ortiz G, Spano R, Quesada M, Zorzi F** (2015) Protocolos y avances en el estudio de residuos de pipas arqueológicas de Argentina. Aportes para el entendimiento de metodologías actuales y prácticas pasadas. *Estudios Atacameños* 51: 77-97.
13. **Torres CM, Repke DB, Chan K, McKenna D, Llagostera A, Schultes RE** (1991) Snuff powders from Pre-Hispanic San Pedro de Atacama: chemical and contextual analysis. *Current Anthropology* 32: 640-649.
14. **Ogalde JP, Arriaza BT, Soto EC** (2009) Identification of psychoactive alkaloids in ancient Andean human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Archeological Science* 36: 467-472.
15. **Rafferty SM** (2002) Identification of nicotine by gas chromatography/mass spectroscopy analysis of smoking pipe residue. *Journal of Archaeological Science* 29: 897-907.
16. **Hossain AM, Salehuddin SM** (2013) Analytical determination of nicotine in tobacco leaves by gas chromatography-mass spectrometry. *Arabian Journal of Chemistry* 6: 275-278.
17. **Mercolini L, Mandrioli R, Saladini B, Conti M, Baccini C, Raggi MA** (2008) Quantitative analysis of cocaine in human hair by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48: 456-461.
18. **Jakabová S, Vincze L, Farkas A, Kilár F, Boros B, Felinger A** (2012) Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid-chromatography-mass spectrometry in plant organs of *Datura* species. *Journal of Chromatography A* 1232: 295-301.
19. **Strano-Rossi S, Bermejo AM, de la Torre X, Botré F** (2011) Fast GC-MS method for the simultaneous screening of TCH-COOH, cocaine, opiates and analogues including buprenorphine and fentanyl, and their metabolites in urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399: 1623-1630.
20. **Shakleya DM, Huestis MA** (2009) Optimization and validation of a liquid chromatography- tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of nicotine, cotinine, *trans*-3'-hydroxycotinine and norcotinine in human oral fluid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395: 2349-2357.
21. **Joya X, Pujadas M, Falcón M, Civit E, García-Algar O, Vall O, Pichini S, Luna A, de la Torre R** (2010) Gas chromatography-mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation. *Forensic Science International* 196: 38-42.
22. **Scattolin MC, Bugliani MF, Cortés LI, Calo CM, Pereyra Domingorena L, Izeta AD** (2009) Pequeños mundos: habitat, maneras de hacer y afinidades en aldeas del valle del Cajón, Catamarca. *Relaciones de la Sociedad Argentina de Antropología* XXXIV: 251-274.
23. **Scattolin MC, Bugliani MF, Pereyra Domingorena L, Cortés LI, Lazzari M, Izeta A, Calo M** (2015). Habitar, circular, hacer. El punto de vista de La Quebrada. En: Crónicas materiales precolombinas. Arqueología de los primeros poblados del Noroeste Argentino Editado por: A. Korstanje et al, Capítulo 13, pp. 427-464. Buenos Aires: *Sociedad Argentina de Antropología*.
24. **Vitale AA, Acher A, Pomilio AB** (1995) Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 49: 81-89.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista *QuímicaViva*

Número 2, año 17, agosto 2018

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

La condición de protón como ejercicio introductorio a la programación científica

Luciano A. Abriata

Laboratory for Biomolecular Modeling and Protein Purification and Structure Facility, School of Life Sciences, École Polytechnique Fédérale de Lausanne; and Swiss Institute of Bioinformatics. Lausanne, Suiza

luciano.abriata@epfl.ch

Recibido 15/05/2018 - Aceptado 18/07/2018

Resumen

Este artículo tiene como objetivo proveer versiones modernas de los tres pequeños programas provistos en el libro *Equilibrios Ácido Base en Solución Acuosa – Aplicaciones de la Condición de Protón*, para mantener este material didáctico en un formato vigente que los alumnos puedan hoy en día implementar fácilmente. Las conversiones son al lenguaje HTML + JavaScript, con lo cual los programas pueden ejecutarse en cualquier computadora, tableta o teléfono con un navegador web moderno.

Palabras claves: titulación, ácido-base, condición de protón, JavaScript, programación, métodos numéricos

Introducing web programming for science by solving proton condition equations

Abstract

This article provides modern versions of the three small programs proposed as extension activities in the book *Equilibrios Ácido-Base en Solución Acuosa – Aplicaciones de la Condición de Protón (Acid-Base Equilibria in Aqueous Solution – Applications of the Proton Condition)*. The goal is to keep this valuable didactic material in a modern format that students can implement seamlessly today. The conversions are to HTML + JavaScript code, which allows running the programs in virtually any device with a modern web browser.

Keywords: titration, acid-base, proton condition, JavaScript, programming, numerical methods

Introducción

El libro *Equilibrios Ácido Base en Solución Acuosa – Aplicaciones de la Condición de Protón* [1] (Prof. Alejandro Olivieri, Universidad Nacional de Rosario, Argentina) explora, en secciones tituladas: *Para quienes se interesan por la computación*, la matemática de equilibrios ácido-base complejos mediante pequeños programas de computadora (también descrita en [2–5]). Estos ejercicios de extensión muestran claramente cómo algunos problemas científicos requieren computadoras para su correcta simulación y resolución, y proveen situaciones concretas donde aquellos alumnos de química interesados en la programación pueden plasmar un algoritmo en un programa funcional.

Los programas provistos en dicho libro están escritos para QBASIC, un intérprete provisto con todos los sistemas operativos basados en MS-DOS, lo cual los hacía accesibles a cualquier alumno con acceso a una computadora personal. Pero casi dos décadas más tarde de la publicación del libro, ni QBASIC ni sus alternativas están fácilmente disponibles. Pero a cambio, los alumnos tienen hoy en día acceso a una herramienta gratuita y muy poderosa que funciona en cualquier computadora e inclusive en teléfonos celulares y otros dispositivos, con la cual pueden aprender programación: los navegadores web. Estos programas (como Google Chrome, Firefox, Edge, Safari, entre los más populares) pueden procesar programas escritos en el lenguaje *JavaScript*, que provee interactividad y poder de cálculo dentro de páginas web. Con un simple editor de texto, es posible escribir páginas web con contenido estático (código HTML, por *Hyper Text Markup Language*) y contenido dinámico (código JavaScript). El objetivo particular de este artículo es proveer todo el código del citado libro transcrito a HTML + JavaScript, para mantener este interesante material didáctico en un formato vigente que los alumnos puedan hoy en día implementar fácilmente. El lector interesado en el poder de JavaScript en el ámbito científico puede remitirse a [6,7]. Un buen punto de entrada más general al mundo de la programación web es la W3schools (<https://www.w3schools.com/>).

Primeros pasos

Los requerimientos de estas actividades son muy modestos: una computadora o un teléfono tipo *Smartphone* o una *tablet*, que tengan un programa editor de texto (como el bloc de notas en sistemas Windows) y un navegador web funcional. En el editor de texto se escribe el código del programa, creando una página web que incluirá los cálculos y mostrará los resultados. Todo el código HTML de la página se escribe entre *tags* `<html>` y `</html>`, y dentro del mismo, se escribe código JavaScript entre *tags* `<script>` y `</script>` (Figura 1). El archivo de texto debe salvarse con extensión `.html` para que al efectuar doble clic sobre el mismo este se abra directamente en el navegador web predeterminado. Los ejemplos han sido reescritos en la forma más concisa y cercana posibles al original.

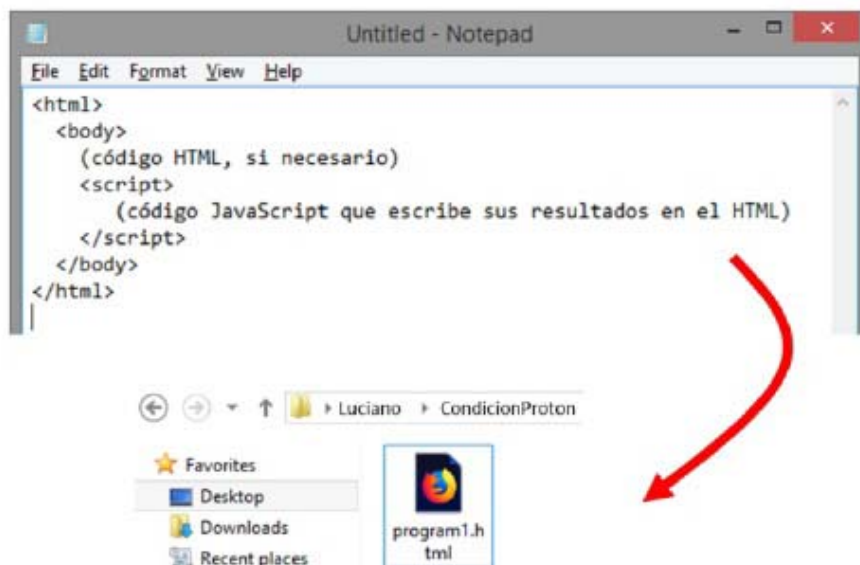


Figura 1. Esquema que indica cómo preparar estos programas. Debe escribirse el código dentro de un archivo de texto, salvado con extensión .html. Luego ese archivo se abre en cualquier navegador web moderno, resultando directamente en su ejecución y la presentación de los resultados.

Programa 1

El primer programa, descrito en la sección 1.10 del libro, utiliza un método recursivo para estimar la concentración de protones en una solución conteniendo múltiples especies activas en ácido-base, sin realizar ninguna aproximación acerca de las magnitudes relativas de las constantes de disociación. En particular el ejercicio propone una solución de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, donde tanto NH_4^+ como H_2PO_4^- se involucran en procesos ácido-base, y plantea considerar la condición de protón completa. Esto resulta en una ecuación polinómica cuya resolución se logra mediante un método iterativo de aproximaciones sucesivas, ilustrando directamente el potencial de los métodos numéricos ejecutados en computadora. El ejercicio concluye demostrando que aproximando una reacción mucho más desplazada hacia los productos que la otra, resultaría en un pH independiente de la cantidad total de compuesto, mientras que el cálculo preciso basado en la condición de protón completa resulta en valores de pH fuertemente dependientes de la concentración total de compuesto, tal como se observa en la práctica.

Mientras que los detalles matemáticos pueden consultarse en el libro, la conversión de QBASIC a HTML + JavaScript resulta en el código mostrado en la Figura 2 (disponible para su ejecución directa en <http://lucianoabriata.altervista.org/jsinscience/protoncondition/programa1.html>). En este código, la sección `<script>` comienza definiendo y asignando valores a las variables a utilizar, mediante el comando `var`. Luego un bucle `while` itera en la ecuación del cálculo de pH hasta que se alcance la convergencia dentro de la tolerancia preestablecida. Al final del bucle, el comando `document.write` escribe al HTML el pH calculado redondeado a dos cifras decimales. Este

código de JavaScript se ejecuta al cargar la página, con lo cual abriendo el archivo en un explorador web se mostrará ya el resultado final. El usuario puede modificar las concentraciones y valores de constantes en el archivo de texto y recargar la página para explorar los efectos de las distintas variables, por ejemplo variando la concentración entre 0,0001 y 0,1 como se explora en el libro. O un paso más avanzado, utilizando HTML se podría permitir al usuario indicar la concentración total y luego ejecutar el cálculo mediante un botón.

```
1. <html>
2. <body>
3. <script>
4. var c=0.001
5. var tol=0.001
6. varphnew = 4.67
7. varphold=1
8. var k1 = 0.0071
9. var k2 = 6.3e-08
10. var k3 = 4.2e-13
11. varkw = 1e-14
12. var kb = 1.8e-05
13. varka = kw / kb
14.
15. while ( Math.abs(phnew-phold) >tol ) {
16. varphold=phnew
17. var h = Math.pow(10, -phold)
18. var nh4 = c * h / (h + ka)
19. var d = h * h * h + k1 * h * h + k1 * k2 * h + k1 * k2 * k3
20. var h2p = c * k1 * h * h / d
21. varnum = nh4 * ka + h2p * k2 + 2 * h2p * k2 * k3 / h + kw
22. var den = 1 + h2p / k1
23. var h = Math.sqrt(num / den)
24. varphnew = -Math.log10(h)
25. }
26. document.write("pH = " + Math.round(phnew*100)/100 + "</b>")
27. </script>
28. </body>
29. </html>
```

Figura 2. Código para el Programa 1. También disponible en: <http://lucianoabriata.altervista.org/jsinscience/protoncondition/programa1.html> (donde el código puede verse presionando Ctrl+U en la mayoría de los navegadores web).

Programas 2 y 3

Los programas 2 y 3 simulan curvas de pH vs. volumen de titulante agregado en titulaciones ácido-base de un ácido fuerte (sección 2.3) o un ácido diprótico débil (sección 3.3). En el libro, estos programas escriben los datos en un archivo para su posterior inspección en un programa de gráficos. Aquí, en cambio, se utiliza la biblioteca de gráficos Google Charts (basada en código JavaScript) para insertar un gráfico interactivo de la titulación directamente en la página web.

El código del programa 2 se muestra en la Figura 3 y puede ejecutarse directamente en <http://lucianoabriata.altervista.org/jsinscience/protoncondition/programa2.html>. La tercera línea

indica al navegador que debe cargar la biblioteca de Google Charts, y la quinta crea un contenedor (*div*) que alojará al gráfico generado por la biblioteca. Luego, dentro del bloque `<script>` se definen primero la variable *pH* y los vectores *vols* y *pHs*, inicialmente vacíos pero que más abajo se cargarán con los elementos de la curva de titulación. Esta es una notación compacta donde se definen múltiples variables en una sola línea, que bien podrían definirse en líneas separadas.

```

1. <html>
2. <body>
3. <scripttype="text/javascript"src="https://www.gstatic.com/charts
   /loader.js"></script>
4.
5. <divid="chart_div_1"style="width: 500px; height: 500px;"></div>
6.
7. <script>
8.   var pH=0, vols=[], pHs=[]
9.   for (pH = 0; pH <14; pH=pH+0.05) {
10.    var h = Math.pow(10, -pH)
11.    r = 1e-14/h - h
12.    v = (20*r+2) / (0.1-r)
13.    if (v >0&& v<50) {
14.     document.write("<br>" + Math.round(v*100)/100 + " " +
       Math.round(pH*100)/100)
15.     vols.push(v)
16.     pHs.push(pH)
17.    }
18.  }
19.
20.  google.charts.load('current', {'packages':['corechart']});
   google.charts.setOnLoadCallback(drawCharts);
21.
22.  functiondrawCharts() {
23.   varCombined1 = newArray();
24.   Combined1[0] = ['Vol', 'pH'];
25.
26.   for (i=0;i<vols.length;i++) {
27.    Combined1[i+1] = [ parseFloat(vols[i]), parseFloat(pHs[i])]
28.   }
29.
30.   var data1 = google.visualization.arrayToDataTable(Combined1,
       false);
31.   var options1 = { title: 'Simulacion', hAxis: {title: 'Vol
       (ml)'}, vAxis: {title: 'pH'}, legend: 'none', pointSize: 1,
       explorer: {} };
32.   var chart1 = new
       google.visualization.LineChart(document.getElementById('chart_di
       v_1'));
33.   chart1.draw(data1, options1);
34. }
35. </script>
36. </body>
37. </html>

```

Figura 3. Código para el Programa 2. También disponible en: <http://lucianoabriata.altervista.org/jsinscience/protoncondition/programa2.html>.

Luego de definir las variables, un bucle *for* itera los valores de pH desde 0 hasta 14 cada 0,05 unidades de pH, calculando los volúmenes correspondientes en base a las ecuaciones descritas en el libro. En vez de escribir los valores de pH y volumen a un archivo como en el código del libro, este bucle escribe los datos directo al HTML mediante la línea *document.write* y agrega secuencialmente elementos a los vectores que listan pH y volumen (*vols.push* y *pHs.push*).

Después del bucle *for*, la línea que contiene los comandos *google.charts.load* y *google.charts.setOnLoadCallback* prepara primero la biblioteca de gráficos y luego indica que al terminar de cargarse la página debe ejecutar la función *drawCharts*. Esta función básicamente prepara una variable tipo *Array* (*Combined1*) que combina los datos en el formato requerido por la biblioteca de gráficos, y finalmente construye el gráfico con el comando *chart1.draw*.

El programa 3 sigue la misma base del programa 2, con las modificaciones necesarias para calcular curvas de titulación para un ácido diprótico débil, tal como se explican en el libro. El código se muestra en la Figura 4 y puede accederse en:

<http://lucianoabriata.altervista.org/jsinscience/protoncondition/programa3.html>.

```

1. <html>
2. <body>
3. <scripttype="text/javascript"src="https://www.gstatic.com/charts
   /loader.js"></script>
4.
5. <divid="chart div 1"style="width: 500px; height: 500px;"></div>
6.
7. <script>
8.   var pH=0, vols=[], pHs=[], k1=0.017, k2=6.4e-8
9.   for (pH = 0; pH <14; pH=pH+0.05) {
10.    var h = Math.pow(10, -pH)
11.    r = 1e-14/h - h
12.    d=k1*k2 + k1*h + h*h
13.    a=(2*k1*k2 + k1*h) / d
14.    if (r<0.1) {
15.     v = (20*r+2*a) / (0.1-r)
16.     if (v>0&& v<50) {
17.      document.write("<br>" + Math.round(v*100)/100 + " " +
   Math.round(pH*100)/100)
18.     vols.push(v)
19.     pHs.push(pH)
20.    }
21.  }
22. }
23.
24.   google.charts.load('current', {'packages':['corechart']});
   google.charts.setOnLoadCallback(drawCharts);
25.
26.   functiondrawCharts() {
27.    varCombined1 = newArray();
28.    Combined1[0] = ['Vol', 'pH'];
29.
30.    for (i=0;i<vols.length;i++) {
31.     Combined1[i+1] = [ parseFloat(vols[i]), parseFloat(pHs[i])]
32.    }

```



```
33.
34. var data1 = google.visualization.arrayToDataTable(Combined1,
    false);
35. var options1 = { title: 'Simulacion', hAxis: {title: 'Vol
    (ml)'}, vAxis: {title: 'pH'}, legend: 'none', pointSize: 1,
    explorer: {} };
36. var chart1 = new
    google.visualization.LineChart(document.getElementById('chart_di
    v_1'));
37. chart1.draw(data1, options1);
38. }
39. </script>
40. </body>
41. </html>
```

Figura 4. Código para el Programa 3. También disponible en:
<http://lucianoabriata.altervista.org/jsinscience/protoncondition/programa3.html>.

Conclusiones

Este artículo presentó versiones HTML + JavaScript de los pequeños programas del libro *Equilibrios Ácido Base en Solución Acuosa – Aplicaciones de la Condición de Protón*, con la intención de mantener ese material didáctico en un formato actualizado. En caso de problemas o para entender en mayor detalle los programas, el lector puede contactar a este autor en la dirección de email indicada así como referirse al libro (ver Nota luego de las Referencias) y los artículos originales [1–5].

Referencias

1. **Olivieri A** (2000) *Equilibrios ácido-base en solución acuosa: Aplicaciones de la condición de protón* Segunda edición. Buenos Aires: Ediciones Científicas Argentinas.
2. **Olivieri AC** (1990) Solution of acid-base equilibria by successive approximations. *Journal of Chemical Education* 67: 229-237
3. **Malinowski ER** (1990) Methods for calculating the pH of aqueous solutions of salts of monoprotic acids and bases. *Journal of Chemical Education* 67: 502-504
4. **Campanario JM, Ballesteros R** (1990) A short program for the automatic calculation of pH in solutions having many acids or bases. *Journal of Chemical Education* 67: 1036-1037
5. **Willis CJ** (1981) Another approach to titration curves: Which is the dependent variable?. *Journal of Chemical Education* 58, 659-663
6. **Abriata LA et al.** (2018) Augmenting research, education and outreach with client-side web programming. *Trends in Biotechnology* 36: 473-476
7. **Abriata LA** (2017) Web apps come of age for molecular sciences. *Informatics* 4: 28
doi:10.3390/informatics4030028

Nota: El libro *Equilibrios Ácido Base en Solución Acuosa – Aplicaciones de la Condición de Protón* está disponible en el sitio web de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina, para descarga gratuita:
http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/4490/mod_folder/content/0/Libro%20Condicion_de_proton.pdf



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 17, agosto 2018

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Norberto José Palleroni (1922-2018): semblanza de un pionero de la biología y taxonomía molecular del género *Pseudomonas*

Pablo I. Nickel

*The Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability,
Universidad Técnica de Dinamarca, 2800 Kgs. Lyngby, Dinamarca*

pabnik@biosustain.dtu.dk



**Norberto J. Palleroni
(1922-2018)**

Norberto J. Palleroni nació en Buenos Aires y se doctoró en la Universidad de Buenos Aires en 1947. Asistió a varios cursos en las áreas de Botánica, Taxonomía y Biología Fundamental (todas ellas relativamente nuevas para nuestro país en las décadas del 30 y del 40), lo cual le permitió recibirse como ingeniero agrónomo en la Facultad de Agronomía. En sus propias palabras: «*Fui un buen estudiante y, a pesar de las penurias económicas en mi hogar en aquel entonces, me recibí con honores y obtuve un hermoso diploma del cual cuelga una igualmente hermosa medalla dorada*». Su mentor fue el profesor Santos Soriano, ingeniero agrónomo nacido en Italia y formado profesionalmente en nuestro país. Soriano fue profesor de Microbiología y Microbiología Agrícola en la Universidad de Buenos Aires, y fue, asimismo, quien estableció una línea de investigación pionera sobre bacterias aisladas del suelo en la Facultad de Agronomía en los años 30, después de una estancia de investigación en el laboratorio de Martinus W. Beijerinck en Holanda.

Inmediatamente después de recibirse, y con financiamiento del Club Rotary Internacional, el Dr. Palleroni se desempeñó como investigador postdoctoral en la Universidad de Southern Illinois (Carbondale) durante algo más de un año. Trabajó bajo la dirección del

profesor Carl C. Lindegren¹, y eligió la genética de levaduras (que por entonces era un área de investigación *en vogue* en Estados Unidos) como tema de investigación para la que fuera su primera experiencia postdoctoral en el exterior [1]. Luego de esta primera estadía en los Estados Unidos, regresó a Argentina y se incorporó como profesor en la Universidad de Cuyo en Mendoza, institución en la cual ejerció activamente no solo como profesor sino también como director de los institutos de Microbiología y de Fermentaciones Industriales. Una curiosidad científica inagotable lo llevó nuevamente a Estados Unidos, en esta oportunidad, a la Universidad de California (Berkeley), institución en la cual desarrollaría un tema de investigación que marcaría un antes y un después en el metabolismo de azúcares en bacterias.

En esta oportunidad, el financiamiento fue provisto por la prestigiosa John Simon Guggenheim Memorial Foundation. Fue en este contexto, desde 1954 y hasta los primeros años de la década del 70, que el Dr. Palleroni se estableció como investigador postdoctoral en el laboratorio del Prof. Roger Stanier, en donde colaboró estrechamente con el Prof. Michael Doudoroff iniciando una línea de investigación en biología fundamental del género *Pseudomonas* que persistiría y se expandiría durante más de 20 años. La cepa bacteriana con la que Palleroni desarrolló sus investigaciones en aquella época es *Pseudomonas saccharophila*, la cual se consideraba un modelo de estudio en bioquímica fundamental [2] (y que, incidentalmente, ha sido rebautizada como *Pelomonas saccharophila*²). Palleroni trabajó con una enzima que es capaz de isomerizar azúcares (manosa, fructosa, y ramnosa) [3]. Luego de purificar la isomerasa y analizar su actividad en ensayos *in vitro*, descubrió que la enzima era capaz de sintetizar un nuevo disacárido estructuralmente similar a la sacarosa, la glucosil-D-ramnulosa [4]. Doudoroff se interesó en este trabajo y ofreció extender la estadía de Palleroni en su laboratorio financiando su salario cuando el estipendio que recibía de la John Simon Guggenheim Memorial Foundation llegó a su fin. Las líneas de investigación acerca del metabolismo de azúcares en bacterias en el laboratorio de Doudoroff (junto con el trabajo de Nathan Entner en ese mismo laboratorio) dieron como resultado el descubrimiento y caracterización de la ruta de Entner-Doudoroff [5]. Esta ruta catabólica está presente en la mayoría de los rizo-simbiontes y, en particular, en las bacterias del género *Pseudomonas* [6].

Palleroni mencionaba en sus innumerables charlas que, a pesar de que las cepas bacterianas con las que trabajaba el grupo de Doudoroff y Stanier tenían características unificadoras que permitían clasificarlas (como, por ejemplo, algunas propiedades bioquímicas), existían diferencias fundamentales entre los distintos aislamientos que requerían una

¹ El Prof. Lindegren ha sido un pionero en establecer el por entonces inexistente campo de genética molecular, y fue uno de los fundadores de la genética de levaduras. En este sentido, vale la pena leer la carta que le escribiera a Francis Crick (1916-2004) en ocasión de la publicación de sus estudios sobre la estructura del DNA. La carta puede leerse en <https://profiles.nlm.nih.gov/ps/retrieve/ResourceMetadata/SCBBSF>.

² Palleroni sostenía que, si un investigador decidía bautizar una especie bacteriana con su propio nombre, debía incluir tal nombre en el epíteto específico y no en la especie, dada la inopinada frecuencia con la que las especies bacterianas son renombradas. El renombramiento de *Pseudomonas saccharophila* refleja el contenido de este comentario con toda claridad.

clasificación rigurosa (la cual, por entonces, no existía). Stanier y Palleroni se embarcaron en una caracterización minuciosa de las propiedades fisiológicas, morfológicas, y bioquímicas de todos los aislamientos bacterianos clasificados como *Pseudomonas* (267, para ser más exactos) en la colección de cultivos en el laboratorio. De este esfuerzo mancomunado y sin precedentes contemporáneos surgió una publicación en el *Journal of General Microbiology* que se ha convertido en un clásico en el campo [7]. En Julio de 2018, y de acuerdo con la información disponible en *Google Scholar*, dicho artículo ha sido citado 2900 veces desde su publicación en 1966. A pesar de que este estudio resultó esencial para entender las diferencias taxonómicas entre las distintas especies de *Pseudomonas* (algunas de ellas ya no son tales, y han sido rebautizadas más de una vez), se echaba en falta una característica *realmente* unificadora que permitiese clasificar las bacterias en forma simple e inequívoca. Stanier propuso analizar secuencias de DNA que pudiesen usarse como marcadores para este fin, y Palleroni se dedicó a secuenciar y analizar las propiedades genéticas de los aislamientos que habían sido previamente caracterizados desde un punto de vista metabólico y morfológico. Para sorpresa de todos, los aislamientos presentaban un patrón heterogéneo en la secuencia del DNA que codifica el RNA de 16S y en ensayos de hibridación DNA-DNA, todo lo cual derivó en la definición de nuevas especies del género *Pseudomonas* (y en la redistribución de algunos miembros en grupos taxonómicos distintos), incluyendo *P. pseudomallei*, *P. acidovorans*, *P. testosteroni*, *P. solanacearum*, *P. diminuta*, *P. facilis*, *P. delafieldii*, *P. saccharophila*, y *P. palleronii*³ [8-11]. Un aspecto metodológico interesante de esta serie de estudios taxonómicos es que Palleroni no contaba con entrenamiento en el análisis de DNA codificante de RNA (en ese momento, los ensayos de hibridación DNA-DNA eran más populares para analizar diferencias genéticas entre especies distintas). Es por ello que fue al Departamento de Bacteriología de la Universidad de Washington (Seattle) para aprender técnicas de hibridación de RNA ribosomal. La aplicación de esta metodología en la clasificación de los aislamientos reveló un hecho sin precedentes: el por entonces considerado único género *Pseudomonas* estaba compuesto, en realidad, por al menos cinco géneros distintos. La misma técnica estaba siendo aplicada para bacterias anaerobias por John L. Johnson en el Instituto Politécnico de Virginia [12]. Palleroni mantuvo una estrecha colaboración (y amistad) con este investigador por años, dado que fue él quien incorporó la metodología de hibridación de ácidos nucleicos para facilitar la taxonomía de otros grupos bacterianos. Al mismo tiempo, una estrecha colaboración con Erika Ralston dio inicio a una serie de estudios taxonómicos en bacterias del género por entonces denominado *Hydrogenomonas* [13] (los detalles de la clasificación de este género bacteriano, que ha sido rebautizado como *Alcaligenes*, *Ralstonia*, y *Cupriavidus*, se pueden consultar en el artículo de Méndez *et al.* [14]).

³ Fiel a sus convicciones, es el epíteto específico de la forma binomial el que se deriva del nombre de Palleroni (la clasificación moderna de esta especie es *Hydrogenophaga palleronii*, y se trata de una especie capaz de fijar CO₂ utilizando H₂ como fuente de energía; véase Nota 2). Otras especies que llevan su nombre son *Actinoplanes palleronii* (un actinomiceto esporulador) y *Pseudomonas palleroniana* (aislada de arroz). Existe, además, un género de bacterias halófilas moderadas aisladas del Mediterráneo murciano bautizado en su honor (desde luego, no por él mismo), *Palleronia*, dentro del cual se encuentra la especie tipo *Palleronia marisminoris*.

En los primeros años de la década del 70, la línea de investigación iniciada en el laboratorio de Doudoroff y Stanier estaba llegando a su fin, entre otros motivos y según advirtiera consternadamente el propio Palleroni, porque Doudoroff desarrolló un cáncer difícil de curar, lo cual lo obligó a apartarse definitivamente de la investigación⁴. «*Ignorando el consejo de Buster Keaton*»⁵, según recordaría tiempo más tarde, el Prof. Palleroni se mudó a la costa este de los Estados Unidos y estableció una línea de investigación en la división de investigación y desarrollo de los laboratorios farmacéuticos Hoffmann-LaRoche en Nutley, New Jersey. Su principal misión allí fue el ejercer como curador de la inmensa colección de microorganismos que se utilizaban para la producción industrial de antibióticos. Esta actividad como experto en taxonomía microbiana no se restringía únicamente a los Estados Unidos, y Palleroni debía viajar frecuentemente a Japón y Suiza, países en los cuales la farmacéutica mantenía operaciones y líneas de producción de antimicrobianos⁶. El desarrollo e inclusión de nuevas técnicas para el aislamiento de bacterias productoras de compuestos biológicamente activos entre los años 1973 y 1985 derivó en que Palleroni estableciera un vínculo estrecho con la Universidad de Rutgers en New Brunswick, New Jersey, y, en particular, con dos investigadores del Departamento de Bioquímica y Microbiología. El Prof. Max M. Häggblom (quien aun se desempeña como profesor en la Universidad de Rutgers) y el Prof. Bongkeun Song (quien en la actualidad se desempeña como profesor asociado en el Instituto de Ciencias Marinas de Virginia, y cuyo supervisor fuera Palleroni) han sido sus colaboradores desde el inicio de sus carreras como investigadores. Palleroni recordaba cómo, décadas después de establecer un método para el aislamiento de especies de *Actinoplanes* con Max Häggblom, la metodología era aún utilizada por varios laboratorios por su simpleza y eficacia. En aquella época, el conocimiento fundamental sobre las actinobacterias (y sobre *Actinoplanes* en particular) se restringía a la descripción de unas pocas características fenotípicas generales, y la dificultad que representaba el aislar estas bacterias constituía una barrera importante para el desarrollo de nuevas estrategias de cultivo. Palleroni resolvió el problema ideando un método de selección basado en la movilidad de las esporas producidas por *Actinoplanes brasiliensis* (una característica única del género, descubierta por el mismo Palleroni [15]), valiéndose de la quimiotaxis positiva que presenta *Actinoplanes* hacia soluciones de cloruros o bromuros inorgánicos siguiendo un gradiente de concentración.

Palleroni se retiró de los laboratorios Hoffman-La Roche definitivamente en 1985, y aceptó el ofrecimiento de incorporarse al Instituto de Microbiología Waksman de la Universidad de Rutgers como Busch Visiting Scholar (1985-1986) y, posteriormente, se desempeñó como profesor adjunto en el Departamento de Microbiología de la Escuela de Medicina en la Universidad de New York. En 1992, Palleroni regresó a la Universidad de Rutgers, en esta

⁴ Palleroni indicaría tiempo más tarde que este desafortunado hecho lo alejó definitivamente del cigarrillo, costumbre que Stanier, Doudoroff y él mismo compartían.

⁵ Una referencia a la película de cine mudo «*Go West*» de 1925.

⁶ Lamentablemente, esta noble práctica ha caído en desuso, y los laboratorios de las grandes empresas farmacéuticas han cancelado sus actividades en esta área. El caso más reciente es el de Novartis, que decidió cerrar las líneas de investigación y desarrollo de nuevos antibióticos en Julio de 2018.

oportunidad en calidad de profesor de investigación en el recientemente establecido Centro de Biotecnología para la Agricultura y el Medio Ambiente, perteneciente al Departamento de Bioquímica y Microbiología. Fue allí donde, en colaboración con los grupos de investigación de Lily Young, Gerben J. Zylstra, y Max M. Häggblom, Palleroni describió la taxonomía molecular de otros géneros bacterianos, incluyendo *Burkholderia*, *Thauera*, *Stenotrophomonas*, *Azoarcus*, y *Paenibacillus* [16-18].

Norberto Palleroni publicó más de 150 artículos en Microbiología, en áreas tan diversas como taxonomía clásica, taxonomía molecular, técnicas de cultivo y aislamiento, y producción de compuestos bioactivos. Su contribución al campo de la taxonomía molecular de *Pseudomonas* queda reflejada en los capítulos que, sobre este tema, escribió para el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática en sus varias ediciones. Fue miembro de la Academia Americana de Microbiología y de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales en nuestro país (8 de Noviembre de 1984, ocasión en la cual dictó una conferencia magistral con el título «*Contribución de la Bacteriología a la Biología Moderna*», posteriormente publicada en los anales de la academia [19]). Entre las numerosas distinciones que recibió a lo largo de su carrera, Palleroni fue Doctor Honoris causa de la Universidad de Cuyo y de la Universidad de Buenos Aires, y recibió el premio de la Fundación Konex en Bioquímica y Microbiología en 1993. En los Estados Unidos, recibió el premio honorario como orador Selman A. Waksman conferido por la Sociedad Theobald Smith en 1986, y la medalla Bergey en 1995, en reconocimiento a su trayectoria en el campo de la sistemática de bacterias y arqueones. Su contribución a la docencia en nuestro país ha sido igualmente enriquecedora: en la última oportunidad, en diciembre de 1999, Palleroni participó en un curso de post-grado (*Tópicos de Microbiología del suelo*) organizado por el Prof. Marcelo Dankert en la Fundación Campomar. En el contexto de esta visita a Buenos Aires, también impartió una charla sobre transposición en bacterias como mecanismo de generación de diversidad génica.

Tal vez el aspecto más importante de la extensa lista de contribuciones científica de Norberto Palleroni haya sido el desarrollo de una taxonomía sistemática de las bacterias del género *Pseudomonas* [20, 21], tal y como se indicó anteriormente. Su enfoque personal, divertido, y dinámico fue reconocido por quienes, el autor de este artículo incluido, hemos tenido el placer de escucharlo hablar sobre el tema. A modo de conclusión, reproduzco aquí un fragmento del citado artículo publicado por Palleroni en ocasión de su investidura como miembro de la Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Buenos Aires: «*En resumen, el ejemplo de Pseudomonas [...] muestra que desde el punto de vista filogenético, las bacterias son mosaicos, con caracteres que derivan por una parte de antecesores remotos, pasados de una generación a la siguiente en forma "vertical", mientras que otros caracteres pueden haber sido adquiridos a distintos tiempos por transferencia "horizontal"*». Esta aseveración resume, en forma sucinta, más de tres décadas de investigación en taxonomía de *Pseudomonas* y permanece tan vigente como cuando fue originalmente acuñada.

Referencias

1. **Palleroni NJ, Sheffner AL, Lindegren CC** (1952) The absence of pre-adaptive oxidation of galactose by strains of *Saccharomyces*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 40: 22-27. DOI: 10.1016/0003-9861(52)90069-6.
2. **Palleroni NJ, Doudoroff M** (1965) Identity of *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of Bacteriology* 89: 264.
3. **Palleroni NJ, Doudoroff M** (1956) Mannose isomerase of *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of Biological Chemistry* 218: 535-548.
4. **Palleroni NJ, Doudoroff M** (1956) Preparation and properties of D-rhamnulose (6-deoxy-D-fructose) and glucosyl rhamnuloside. *Journal of Biological Chemistry*, 219: 957-962.
5. **Entner N, Doudoroff M** (1952) Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of Biological Chemistry* 196: 853-862.
6. **Nikel PI, Chavarría M, Fuhrer T, Sauer U, de Lorenzo V** (2015) *Pseudomonas putida* KT2440 strain metabolizes glucose through a cycle formed by enzymes of the Entner-Doudoroff, Embden-Meyerhof-Parnas, and pentose phosphate pathways. *Journal of Biological Chemistry* 290: 25920-25932. DOI: 10.1074/jbc.M115.687749.
7. **Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M** (1966) The aerobic pseudomonads: A taxonomic study. *Journal of General Microbiology* 43: 156-273. DOI: 10.1099/00221287-43-2-159.
8. **Palleroni NJ, Doudoroff M** (1971) Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology* 107: 690-696.
9. **Ballard RW, Palleroni NJ, Doudoroff M, Stanier RY, Mandel M** (1970) Taxonomy of the aerobic pseudomonads: *Pseudomonas cepacia*, *P. marginata*, *P. allnicola* and *P. caryophylli*. *Journal of General Microbiology* 60: 199-214. DOI: 10.1099/00221287-60-2-199.
10. **Palleroni NJ, Ballard RW, Ralston E, Doudoroff M** (1972) Deoxyribonucleic acid homologies among some *Pseudomonas* species. *Journal of Bacteriology* 110: 1-11.
11. **Martínez-Checa F, Quesada E, Martínez-Cánovas MJ, Llamas I, Béjar V** (2005) *Palleronia marisminoris* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium belonging to the 'Alphaproteobacteria', isolated from a saline soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2525-2530. DOI: 10.1099/ijs.0.63906-0.
12. **Johnson JL** (1973) Use of nucleic-acid homologies in the taxonomy of anaerobic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 23: 308-315. DOI: 10.1099/00207713-23-4-308.
13. **Ralston E, Palleroni NJ, Doudoroff M** (1972) Deoxyribonucleic acid homologies of some so-called "Hydrogenomonas" species. *Journal of Bacteriology* 109: 465-466.
14. **Méndez BS, Pettinari MJ, López NI** (2010) Cuando los nombres ocultan a los nombrados. *Química Viva* 9: 59-64.
15. **Palleroni NJ** (1976) Chemotaxis in *Actinoplanes*. *Archives in Microbiology* 110: 13-18. DOI: 10.1007/BF00416963.
16. **Song B, Young LY, Palleroni NJ** (1998) Identification of denitrifier strain T1 as *Thauera aromatica* and proposal for emendation of the genus *Thauera* definition. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 889-894. DOI: 10.1099/00207713-48-3-889.
17. **Song B, Palleroni NJ, Kerkhof LJ, Häggblom MM** (2001) Characterization of halobenzoate-degrading, denitrifying *Azoarcus* and *Thauera* isolates and description of *Thauera chlorobenzoica* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 589-602. DOI: 10.1099/00207713-51-2-589.
18. **Palleroni NJ, Bradbury JF** (1993) *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *International Journal of Systematic Bacteriology* 43: 606-609. DOI: 10.1099/00207713-43-3-606.
19. **Palleroni NJ** (1985) Contribución de la Bacteriología a la Biología Moderna. *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 37: 31-38.
20. **Palleroni NJ** (2003) Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiology* 141: 1-7. DOI: 10.1099/mic.0.25952-0.
21. **Palleroni NJ** (2010) The *Pseudomonas* story. *Environmental Microbiology* 12: 1377-1383. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x.

22. **Nikel PI, de Lorenzo V** (2018) *Pseudomonas putida* as a functional chassis for industrial biocatalysis: From native biochemistry to *trans*-metabolism. *Metabolic Engineering* DOI: 10.1016/j.ymben.2018.05.005.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 17, agosto 2018

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Hacia la reprogramación de crecimiento bacteriano mediante edición genómica: la bioinformática puesta a prueba

Alfonso Soler Bistue

Grupo Genómica de Vibrio, Laboratorio de Patogenia Microbiana, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas "Dr. Rodolfo A. Ugalde" Instituto Tecnológico de Chascomús, CONICET, Universidad Nacional de San Martín, San Martín, Buenos Aires, Argentina.

asoler@iib.unsam.edu.ar

Introducción

Gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación aumentó exponencialmente el número de genomas disponibles en bases de datos [1]. En paralelo, el costo de síntesis química de DNA se redujo de manera drástica [2]. Es decir, somos capaces de "leer" y "escribir" DNA de manera cada vez más eficiente. Esta revolución genómica se refleja en la síntesis de la primera célula artificial [3] y el diseño de la forma de vida cultivable de genoma más pequeño, *Mycoplasma mycoides* (JCV-Syn3.0) [4]. Más aún, ya existen cromosomas sintéticos de levaduras [5] y se ha planificado la construcción de una célula humana de genoma artificial [6]. A pesar de estos ejemplos de *big science*, aún es difícil predecir con exactitud el fenotipo de un organismo en base a la secuencia primaria de su genoma. Las bacterias poseen un genoma haploide de tamaño relativamente pequeño, 1×10^6 - 1×10^7 pares de bases (pb), por lo que han sido fundamentales para investigar esta temática [7]. Nuestro conocimiento de su genoma está evolucionando rápidamente. Hasta hace poco, se lo entendía como una molécula de DNA desnuda flotando estocásticamente en el citoplasma. Hoy sabemos que, por a su asociación a proteínas, se compacta unas 1000 veces para ocupar un 15-30% del volumen celular, con diferentes niveles de organización y plegamiento que permiten una disposición espacial específica que sigue una coreografía precisa a lo largo del ciclo celular [8-13]. Dicha estructura espacial se coordina en simultáneo con procesos fundamentales como son la replicación, la transcripción (a su vez acoplada a la traducción de proteínas) y la segregación del material genético. A pesar de estos avances, se desconoce aún cómo la organización del genoma influye en la fisiología celular y en la evolución de los microorganismos. Un parámetro que caracteriza muy bien ambas variables es la velocidad de crecimiento (interconvertible con el tiempo de generación que es el tiempo entre una división celular y la siguiente). Este es un parámetro clave que refleja la fisiología, la bioquímica y la competitividad celular [14]. La velocidad de crecimiento máxima varía drásticamente entre un microorganismo y otro con tiempos generacionales que pueden ir desde minutos a días o semanas. Por ejemplo, bacterias como *Vibrio natrigens*, *Pectinobacterium carotovorum* o *Clostridium perfringens* se dividen cada

10-15 minutos mientras que *Mycobacterium leprae* demora 10 días. A pesar de que la fisiología bacteriana es una disciplina con más de un siglo de estudio (por ejemplo las fases del crecimiento bacteriano se describieron ya en 1909 [15]) aún se desconoce qué factores genéticos moldean la velocidad máxima de crecimiento de una especie.

Organización del genoma bacteriano

Tras la secuenciación de más de 30.000 genomas emerge una nueva imagen del cromosoma bacteriano y su evolución [1]. En contraste con las células eucariotas, el genoma bacteriano posee un contenido genético muy variable. Su evolución ocurre principalmente por transferencia horizontal de genes. Así, dos aislamientos de la misma especie bacteriana pueden tener un 20% de divergencia en contenido génico. A pesar de tal flexibilidad, las bacterias muestran una organización muy estricta a nivel de secuencia del genoma conservada filogenéticamente [16, 17]. Universalmente, las bacterias presentan único origen de replicación (*oriC*) desde donde se inicia la duplicación del DNA bidireccionalmente hasta la región terminal (*ter*) en el extremo opuesto del cromosoma. Así, el genoma se organiza longitudinalmente a lo largo de un eje *ori-ter* que divide al DNA en dos *replichores* de un tamaño similar (Figura 1). Existen pocos estudios sobre cómo esta estructura influye en la fisiología celular y en la evolución del genoma [18, 26].

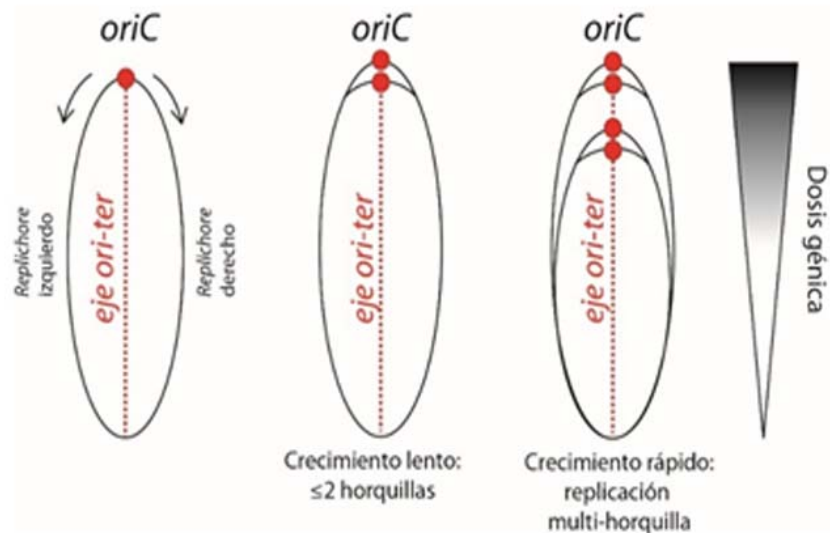


Figura 1. Estructura del genoma bacteriano. Izquierda y centro: la replicación comienza en el único *oriC* y procede (flechas) a lo largo de dos *replichores* simétricos. Cuando las bacterias crecen lentamente el genoma tiene tiempo para replicar el cromosoma antes de la división celular. **Derecha:** durante el crecimiento rápido, se superponen ciclos de replicación ya que el tiempo de división es más corto que el que requiere la duplicación del DNA. Esto genera un gradiente decreciente de dosis génica a lo largo de ambos replichores (triángulo) (Modificado [22]).

Varios trabajos muestran que esta organización influye fuertemente en la fisiología y en la evolución bacteriana. Por ejemplo, las inversiones de segmentos de DNA ocurren con una

frecuencia relativamente alta. Algunas abarcan cientos de kpb. En el caso de las grandes inversiones, generalmente solo son viables aquellas que ocurren simétricamente respecto del eje *ori-ter*. De esta manera ambos *replichores* mantienen un tamaño similar [16, 20, 27]. También se ha observado que los genes esenciales están co-orientados con la replicación. Motivos de secuencia implicados en la reparación y la segregación se encuentran más frecuentemente en la hebra líder de la replicación [16, 17]. Más específicamente, se han descrito también patrones en el genoma que podrían influir en la velocidad máxima de crecimiento bacteriana.

Localización genómica y expresión

La Genómica Comparada revela que la posición de ciertos genes en el cromosoma está ampliamente conservada. Los genes que codifican las proteínas asociadas al nucleoide, los factores sigma de la RNA polimerasa y las topoisomerasas tienen una localización conservada que se correlaciona además con su momento de expresión en las fases de crecimiento bacteriano: los genes que se expresan en la fase exponencial se localizan cerca del *oriC* mientras que aquellos que se expresan durante la fase estacionaria se ubican cerca de la región *ter* [28, 29]. Paralelamente, se descubrió que los genes que codifican para la maquinaria de expresión de la información genética como la RNAP, los RNAt, los RNAr y las proteínas ribosomales (PR) tienden a ubicarse cerca del *oriC*. Dicha correlación se observa solo en bacterias de crecimiento rápido lo que sugiere fuertemente que la localización de estos genes influiría en la fisiología celular [30, 31]. Se especuló entonces que esta localización traería el beneficio de aumentar mayor dosis génica durante la replicación (Figura 1). Esto es particularmente cierto en bacterias de crecimiento rápido como *Escherichia coli* o *Vibrio cholerae* que se dividen en un tiempo menor al requerido para la replicación del DNA. En consecuencia, inician la replicación más de una vez por división celular, fenómeno llamado replicación multi-horquilla (Figura 1). Así, las células hijas heredan un cromosoma parcialmente replicado evitándose la generación de células anucleadas. Esto conduce a que las regiones próximas al *oriC* posean 4, 8 o más copias que los genes en la región terminal lo que genera un gradiente de dosis y expresión a lo largo de ambos *replichores* (Figura 1). Así, la posición cromosómica puede condicionar el nivel de expresión que puede alcanzar un gen. Los genes para la maquinaria de traducción y transcripción están entonces en mayor dosis durante la fase exponencial de crecimiento, el momento en que más se los requiere.

Estudios recientes demuestran que la expresión de un fenotipo no depende solo de la presencia o ausencia de su(s) gen(es) codificantes sino también del contexto genómico en el que se encuentra(n). Por ejemplo, para que el programa de esporulación funcione correctamente en *Bacillus subtilis*, dos de los genes reguladores de la cadena de fosfotransferencia deben estar en extremos opuestos del cromosoma [23]. Análogamente, la localización genómica del operón *comCDE* en *Streptococcus pneumoniae* es crucial para que la bacteria pueda inducir su programa de competencia natural frente a lesiones en el DNA [24].

De la misma manera, recientemente describimos que la posición de los genes que codifican para las PR impactan fuertemente en la velocidad de crecimiento, la aptitud adaptativa (*fitness*) y la infectividad de *V. cholerae* (ver más adelante) [21, 22]. Otro caso paradigmático es el gen *fis* de *E. coli*, cuya relocalización reduce su *fitness* por la modificación simultánea de diversos fenotipos [19]. Los trabajos citados apuntan, en líneas generales, a dos mecanismos principales por los cuales la posición en el cromosoma afecta al fenotipo: por un cambio de dosis del gen en cuestión [18] o bien, debido a la alteración de su localización física [19, 32].

Sintonía fina de la velocidad de crecimiento: relocalización del principal locus de PR en *V. cholerae*

Recientemente, investigamos experimentalmente cómo la estructura del genoma influye en la fisiología celular. Como modelo usamos *V. cholerae*, un patógeno de relevancia local y global. Como agente etiológico del cólera, afecta anualmente a entre 1,4 y 4,3 millones de personas causando entre 21.000 y 143.000 muertes [33]. Desde 2016 se desarrolla en Yemen la epidemia más grande de la historia con más de un millón de infectados y 2.200 muertes. En nuestra región se desarrolló una gran epidemia a fines de los '90 y más recientemente, fue célebre la ocurrida en Haití en 2010 [33, 35]. *V. cholerae* es un habitante de aguas costeras con un ciclo de vida que alterna entre un período de amplificación, durante la infección, y una fase de persistencia en el ambiente [36]. El crecimiento rápido se asocia con el período de amplificación, mientras que el crecimiento lento se asemeja a las condiciones ambientales de la fase de persistencia.

Además de la importancia sanitaria, *V. cholerae* es particularmente interesante porque, con un tiempo generacional de 17 minutos, está entre las bacterias de crecimiento más rápido conocidas. Este rasgo correlaciona con una estructura genómica que sigue las tendencias observadas en organismos de crecimiento veloz: alto número de operones ribosomales y RNAs así como genes de PR y RNAP cercanos al *oriC* del cromosoma principal (*oriC1*). Otro rasgo interesante es que es un microorganismo que rompe con otro paradigma. Habitualmente se piensa que las bacterias poseen un solo cromosoma. Sin embargo, al menos un 10% de las bacterias poseen al menos 2 cromosomas. *V. cholerae* es uno de los modelos mejor estudiados de bacterias con múltiples cromosomas. Posee un cromosoma principal de ~3 Mpb que aloja a la mayoría de los genes esenciales y un cromosoma secundario de ~1 Mpb con mayoría de genes de función desconocida. La replicación de ambos cromosomas está perfectamente coordinada: el cromosoma principal comienza su replicación y cuando alcanza los 2/3 del *replichore* se gatilla el *oriC* del cromosoma secundario. De esta manera la replicación de ambos cromosomas concluye simultáneamente.

Para entender los vínculos entre la estructura del genoma y la fisiología celular, nos focalizamos en el locus *s10-spec- α* (S10), un sitio de 13,2 Kpb que alberga la mitad de los genes de PR. Para ello, desarrollamos herramientas de recombinación basadas en fagos

lamboides que permiten una manipulación sin precedentes del genoma bacteriano [21]. Gracias a este desarrollo, generamos un set de cepas isogénicas donde S10 fue relocalizado a distintos sitios del genoma de manera de colocar el *locus* a diferentes distancias del *oriC1* e incluso en el cromosoma secundario (Figura 2a).

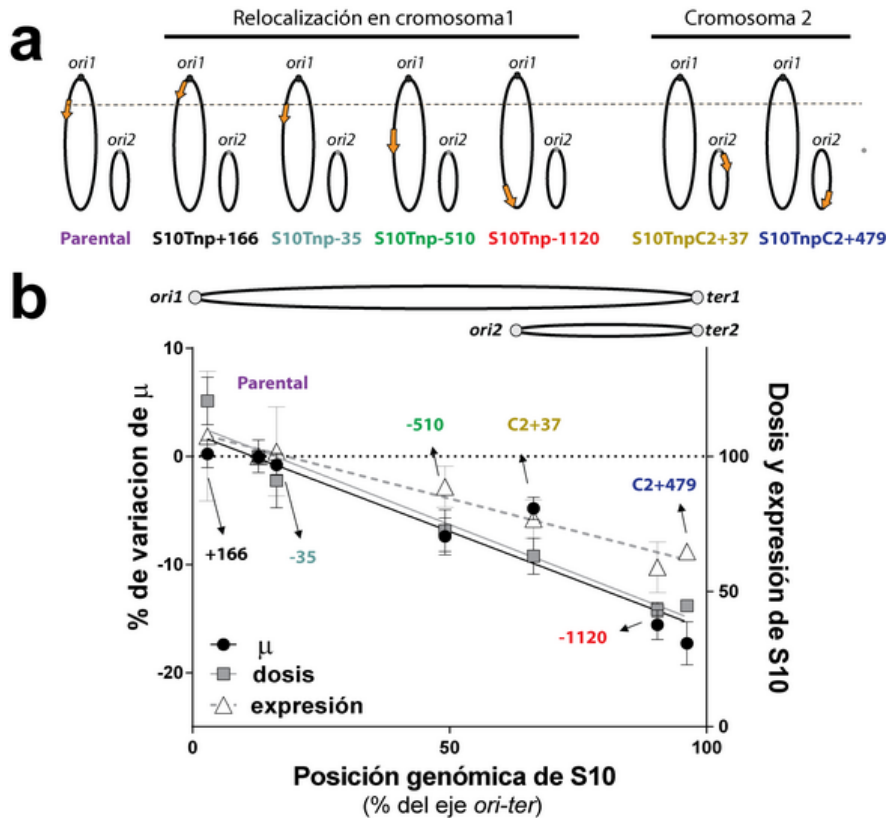


Figura 2. La posición genómica de S10 determina la dosis del locus su expresividad y determina la velocidad de crecimiento (μ) de *V. cholerae*. **a**) Mediante edición del genoma se reubicó S10 (flecha naranja) en diferentes sitios del genoma generándose una colección de cepas que permite estudiar la relación localización-fenotipo. **b**) Determinación de la velocidad de crecimiento (negro, eje izquierdo), la dosis (gris, ordenada derecha) y la expresión (blanco, eje derecho) de S10 en las diferentes cepas. Se observa una fuerte correlación de las 3 variables con la posición genómica de S10 (abscisa) (Modificado [22]).

Para nuestra sorpresa, ninguna de estas derivadas resultó afectada en su viabilidad ni en su morfología macroscópica o microscópica. Es decir que la localización genómica del locus es flexible. Luego, analizamos esta colección de cepas en condiciones óptimas de crecimiento. Descubrimos que la velocidad máxima de crecimiento de cada cepa, la dosis génica y la expresión de S10 variaban en proporción inversa a la distancia entre S10 y *oriC1* (Figura 2b) [21].

En medio mínimo, cuando no ocurre la replicación multi-horquilla (Figura 1), la velocidad de crecimiento resultó independiente de la posición genómica del locus. Todos estos experimentos sugerían fuertemente que la localización de S10 determina la velocidad máxima de crecimiento al proveer una dosis de S10 que maximiza la expresión de estas PR. Sin

embargo, al relocalizar S10 se altera simultáneamente la dosis y la sublocalización celular del locus. De esta manera, si la reubicación de estos genes es deletérea por motivos ajenos a la dosis génica (por ejemplo, si la inserción *per se* es perjudicial o si S10 es requerido en *cis*), los efectos observados serían similares. Para clarificar esta cuestión, se construyeron mutantes con dos copias de S10 lejos del *oriC1*. De esta manera se generaron cepas donde, si bien se alteró la localización espacial de S10, se mantiene su dosis génica. Estas cepas complementaron el defecto en la velocidad de crecimiento demostrando que la posición genómica del locus es importante para la fisiología celular dado que provee la dosis de S10 esencial para la fisiología bacteriana [21]. Por otro lado, experimentos de infección en *Drosophila melanogaster*, la mosca de la fruta, mostraron que la relocalización de S10 reduce de manera drástica la infectividad de *V. cholerae* lo que sugiere que la posición de estos genes es importante en las condiciones ambientales que afronta el patógeno [21].

Con el objeto de revelar efectos independientes de la dosis estudiamos en detalle estas cepas en medio mínimo empleando ensayos de competencia [22]. Estos son más sensibles que las curvas de crecimiento para determinar reducciones en el *fitness* [37]. Así detectamos que cuando desplazamos S10 a la región *ter* del cromosoma 1 o del cromosoma 2, el *fitness* de la bacteria se reduce de manera muy significativa. Esto sugería que se trataba de efectos independientes de la dosis. Sin embargo, para nuestra sorpresa, la adición de una segunda copia de S10 restituyó el *fitness* de la bacteria. Mediante la secuenciación masiva de estas cepas hallamos, que la relocalización de S10 produce una reducción del 30% de la dosis génica de S10 en ausencia de replicación multi-horquilla. Los cambios en la dosis correlacionan muy ajustadamente con los efectos observados en el *fitness* de las cepas. En contraste con lo que proponían los estudios bioinformáticos, la posición genómica de las PR es fundamental para proveer la dosis génica óptima independientemente de la presencia de la replicación multi-horquilla [22]. En el caso de *V. cholerae* implica que la posición de estos genes impacta en ambos estadios de su ciclo de vida, tanto en la fase infectiva de la bacteria (crecimiento rápido) como durante su persistencia en el ambiente (crecimiento lento). Pero además esto sugiere que el posicionamiento genómico de los genes que codifican para el flujo de la información genética podría influenciar la evolución de las bacterias de crecimiento lento. Así esta clase de aproximación puede emplearse para reprogramar la velocidad del crecimiento bacteriano. Por otro lado, la dosis de S10 podría ser limitante del crecimiento bacteriano. O dicho de otra manera, quizás aumentando su dosis podríamos acelerar su crecimiento. Para probar esta posibilidad creamos cepas con 2, 3 y hasta 4 copias del locus (Figuras 3a y 3b).

Es decir, creamos cepas merodiploides, merotriploides y merotetraploides para S10. Las cepas merodiploides mostraron un crecimiento similar al de la cepa parental indicando que un pequeño exceso de S10 no es perjudicial. Mientras tanto, la adición de una tercera y cuarta copia del locus impactó en el crecimiento celular, ya que las cepas merotriploides y la

merotetraploide mostraron reducciones significativas de su velocidad de crecimiento con respecto a la parental (Figura 3c).

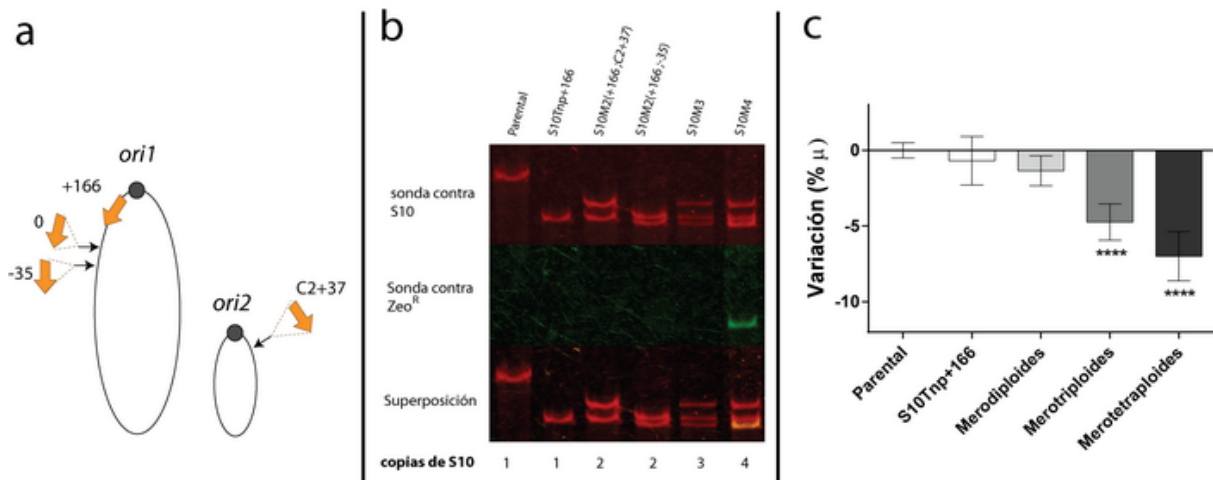


Figura 3: Impacto del aumento de la ploidía de S10 en *V. cholerae*. **a)** Se insertaron varias copias S10 (flechas naranjas) dentro del genoma de la cepa + 166. Los sitios de inserción, dibujados como flechas negras y las coordenadas (en pares de kilobases desde la ubicación original), se muestran sobre una representación de los cromosomas de *V. cholerae*. **b)** Southern Blot con DNA genómico digerido con una enzima de restricción de las cepas indicadas en el panel superior. Las sondas se dirigieron a S10 (rojo) o a un marcador asociado (ZeoR) cuando los tamaños obtenidos eran similares (verde). Los cambios en el genotipo se evidencian por el cambio de tamaño de S10 al moverse (parental vs. S10Tnp + 166). Luego se agrega la segunda y tercera copia de S10Tnp-35 y S10TnpC2+37 (flechas negras). La cuarta copia de S10 viene de una cepa que origina un fragmento de restricción con un tamaño similar al del alelo proveniente de +166. Sin embargo, puede distinguirse por una señal de sonda S10 incrementada y la sonda verde. La ploidía de S10 para cada cepa se muestra en el panel inferior. **c)** El efecto de ploidía S10 en la velocidad de crecimiento se cuantificó promediando la tasa de crecimiento (μ) obtenida en varios experimentos independientes para cada cepa mutante y normalizándolo a μ de la cepa parental. Los resultados se expresan como porcentaje de la variación (% μ) con respecto a la cepa parental (Modificado [22]).

Por lo tanto, la velocidad de crecimiento no puede mejorarse mediante el aumento de la dosis de S10, lo que demuestra que el número de copias del locus no es limitante para el crecimiento bacteriano. La célula puede tolerar los efectos perjudiciales putativos de una copia extra, pero aumentar la ploidía de S10 aún más, como en las cepas merotriploide y merotetraploide, perjudica la fisiología celular (Figura 3c). Estos resultados, sumados a la flexibilidad en la localización genómica de S10, sugieren que el locus, a lo largo de la evolución, derivó a la posición genómica óptima para el crecimiento de *V. cholerae*.

Remarcas finales

A lo largo de nuestro trabajo mostramos un efecto claro del reposicionamiento de S10 sobre la fisiología, la infectividad y la competitividad de *V. cholerae*. Creemos que este locus es la punta del iceberg de muchos más grupos de genes por descubrir. También las herramientas

experimentales que desarrollamos y el marco teórico que empleamos servirán para poner a prueba muchas hipótesis que provienen de la genómica comparada pero que no se han puesto a prueba experimentalmente. Ya hemos comenzado la búsqueda de nuevos casos, por ejemplo, ya estamos estudiando el rol de la localización de los genes de la RNA polimerasa bacteriana. Además, estamos iniciando el estudio de otros modelos bacterianos, en particular, nos interesa acelerar el tiempo generacional de bacterias de crecimiento lento. La aplicación de esta metodología a otras bacterias y a otros genes proporcionará información sobre las reglas de la organización del genoma. Además, comprender los factores genómicos que afectan la velocidad de crecimiento permitirá reprogramar el crecimiento bacteriano, ayudar a predecir el comportamiento de sistemas biológicos más complejos y desarrollar mejores modelos teóricos [38,39]. Nuestros estudios contribuirán al desarrollo del diseño de genomas, la bioingeniería y la biotecnología en el contexto del surgimiento de la Biología Sintética y de la invención de nuevas herramientas para la edición de genomas.

Agradecimientos

Agradezco a las estudiantes de mi grupo Belén Bordignon, Leila Bartrolí y Julieta Viglino por leer cuidadosamente este artículo.

Referencias

1. **Land M. et al.** (2015) Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional & integrative genomics* 15:141-161. doi:10.1007/s10142-015-0433-4
2. **Kosuri S, Church GM** (2014) Large-scale de novo DNA synthesis: technologies and applications. *Nature methods* 11: 499-507. doi:10.1038/nmeth.2918
3. **Gibson DG et al.** (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* 329: 52-56. doi:10.1126/science.1190719.
4. **Hutchison CA 3rd et al.** (2016) Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* 351, aad6253. doi:10.1126/science.aad6253.
5. **Annaluru N et al.** (2014) Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science* 344: 55-58. doi:10.1126/science.1249252.
6. **Boeke JD et al.** (2016) GENOME ENGINEERING. The Genome Project-Write. *Science* 353: 126-127. doi:10.1126/science.aaf6850
7. **Robinson NP, Bell SD** (2005) Origins of DNA replication in the three domains of life. *The FEBS Journal* 272: 3757-3766. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04768.x.
8. **LeTB, Laub MT** (2014) New approaches to understanding the spatial organization of bacterial genomes. *Current opinion in microbiology* 22: 15-21. doi:10.1016/j.mib.2014.09.014.
9. **Reyes-Lamothe R, Nicolas E, Sherratt DJ** (2012) Chromosome replication and segregation in bacteria. *Annual review of genetics* 46: 121-143. doi:10.1146/annurev-genet-110711-155421.
10. **Dorman CJ** (2013) Genome architecture and global gene regulation in bacteria: making progress towards a unified model? *Nature Reviews Microbiology* 11: 349-355. doi:10.1038/nrmicro3007.

11. **Toro E, Shapiro L** (2010) Bacterial chromosome organization and segregation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000349. doi:10.1101/cshperspect.a000349.
12. **Campos M, Jacobs-Wagner C** (2013) Cellular organization of the transfer of genetic information. *Current opinion in microbiology* 16: 171-176. doi:10.1016/j.mib.2013.01.007.
13. **Liyo V S et al.** (2018) Multiscale structuring of the *E. coli* chromosome by nucleoid-associated and condensin proteins. *Cell* 172: 771-783 e718. doi:10.1016/j.cell.2017.12.027.
14. **Monod J** (1949) The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Reviews in Microbiology* 3: 371-3949.
15. **Lane-Clayton JE** (1909) Multiplication of Bacteria and the Influence of Temperature and some other Conditions thereon. *The Journal of hygiene* 9: 239-248.
16. **Rocha EP** (2008) The organization of the bacterial genome. *Annual review of genetics* 42: 211-233. doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091653.
17. **Touchon M, Rocha EP** (2016) Coevolution of the Organization and Structure of Prokaryotic Genomes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8, a018168. doi:10.1101/cshperspect.a018168.
18. **Slager J, Veening JW** (2016) Hard-Wired Control of Bacterial Processes by Chromosomal Gene Location. *Trends in microbiology* 24: 788-800. doi:10.1016/j.tim.2016.06.003.
19. **Gerganova V et al** (2015) Chromosomal position shift of a regulatory gene alters the bacterial phenotype. *Nucleic acids research* 43: 8215-8226. doi:10.1093/nar/gkv709.
20. **Esnault E, Valens M, Espeli O, Boccard F** (2007) Chromosome structuring limits genome plasticity in *Escherichia coli*. *PLoS genetics* 3, e226. doi:10.1371/journal.pgen.0030226.
21. **Soler-Bistue A et al.** (2015) Genomic location of the major ribosomal protein gene locus determines *Vibrio cholerae* global growth and infectivity. *PLoS genetics* 11, e1005156. doi:10.1371/journal.pgen.1005156.
22. **Soler-Bistue A, Timmermans M, Mazel D** (2017) The proximity of ribosomal protein genes to *oriC* enhances *Vibrio cholerae* fitness in the absence of multifork replication. *mBio* 8. doi:10.1128/mBio.00097-17.
23. **Narula J et al**(2015) Chromosomal arrangement of phosphorelay genes couples sporulation and DNA replication. *Cell* 162: 328-337. doi:10.1016/j.cell.2015.06.012 (2015).
24. **Slager J, Kjos M, Attaiech L, Veening JW** (2014) Antibiotic-induced replication stress triggers bacterial competence by increasing gene dosage near the origin. *Cell* 157: 395-406. doi:10.1016/j.cell.2014.01.068.
25. **Fitzgerald S et al** (2015) Re-engineering cellular physiology by rewiring high-level global regulatory genes. *Scientific reports* 5, 17653. doi:10.1038/srep17653.
26. **Sobetzko P, Glinkowska M, Travers A, Muskhelishvili G** (2013) DNA thermodynamic stability and supercoil dynamics determine the gene expression program during the bacterial growth cycle. *Molecular bioSystems* 9: 1643-1651. doi:10.1039/c3mb25515h.
27. **Repar J, Warnecke T** (2017) Non-Random inversion landscapes in prokaryotic genomes are shaped by heterogeneous selection pressures. *Molecular biology and evolution* 34: 1902-1911. doi:10.1093/molbev/msx127.
28. **Muskhelishvili G, Travers A** (2014) Order from the order: how a spatiotemporal genetic program is encoded in a 2-D genetic map of the bacterial chromosome. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 24: 332-343. doi:10.1159/000368852.
29. **Sobetzko P, Travers A, Muskhelishvili G** (2012) Gene order and chromosome dynamics coordinate spatiotemporal gene expression during the bacterial growth cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: E42-50. doi:10.1073/pnas.1108229109.
30. **Couturier E, Rocha EP** (2006) Replication-associated gene dosage effects shape the genomes of fast-growing bacteria but only for transcription and translation genes. *Molecular microbiology* 59: 1506-1518. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05046.x.

31. **Vieira-Silva S, Rocha EP** (2010) The systemic imprint of growth and its uses in ecological (meta)genomics. *PLoS genetics* 6, e1000808. doi:10.1371/journal.pgen.1000808.
32. **Bryant JA, Sellars LE, Busby SJ, Lee DJ** (2014) Chromosome position effects on gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic acids research* 42: 11383-11392. doi:10.1093/nar/gku828.
33. **Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB** (2012) Cholera. *Lancet* 379: 2466-2476. doi:10.1016/S0140-6736(12)60436-X.
34. **Domman, D et al.** (2017) Integrated view of *Vibrio cholerae* in the Americas. *Science* 358: 789-793. doi:10.1126/science.aao2136.
35. **Hu D et al** (2016) Origins of the current seventh cholera pandemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: E7730-E7739. doi:10.1073/pnas.1608732113.
36. **Nelson EJ, Harris J B, Morris J G Jr., Calderwood, SB, Camilli A** (2009) Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic. *Nature reviews. Microbiology* 7: 693-702. doi:10.1038/nrmicro2204.
37. **Concepcion-Acevedo J, Weiss H N, Chaudhry WN, Levin BR** (2015) Malthusian Parameters as Estimators of the Fitness of Microbes: A Cautionary Tale about the Low Side of High Throughput. *PloS one* 10, e0126915. doi:10.1371/journal.pone.0126915.
38. **Karr JR et al.** (2012) A whole-cell computational model predicts phenotype from genotype. *Cell* 150: 389-401. doi:10.1016/j.cell.2012.05.044.
39. **Scott M, Hwa T** (2011) Bacterial growth laws and their applications. *Current opinion in biotechnology* 22: 559-565. doi:10.1016/j.copbio.2011.04.014.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 17, agosto 2018

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

Identificación de alcaloides psicoactivos de plantas por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa. Aplicación en pipas cerámicas de dos sitios arqueológicos de Catamarca

Valeria P. Careaga¹, Gerardo Gottas¹, María Fabiana Bugliani², María Cristina Scattolin² y Marta S. Maier¹

¹UMYMFOR – Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Pabellón 2, Ciudad Universitaria, ²Instituto de las Culturas (IDECU), UBA, CONICET, Museo Etnográfico, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

maier@qo.fcen.uba.ar

Recibido 13/08/2018-Aceptado 15/08/2018

Resumen

Las culturas precolombinas de América utilizaron plantas que contienen alcaloides psicoactivos en ceremonias rituales y como medicinas. En este trabajo se optimizaron las condiciones de análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa para la identificación simultánea de los alcaloides presentes en hojas de tabaco y coca y en semillas de chamico y cebil con el objeto de contar con una metodología de análisis para su identificación en materiales arqueológicos. La metodología desarrollada se aplicó a la identificación de alcaloides en siete fragmentos de pipas cerámicas y sedimentos asociados provenientes de dos sitios arqueológicos del valle del Cajón en la provincia de Catamarca, Argentina. Se identificó 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina en dos hornillos y en los sedimentos contenidos en un hornillo y en dos tubos de tres pipas cerámicas. Sólo se identificó nicotina en el hornillo de una de las pipas. Los resultados demuestran el uso de cebil como alucinógeno por los antiguos pobladores de Catamarca.

Palabras clave: alcaloides psicoactivos, cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa, pipas, patrimonio cultural

Identification of plant psychoactive alkaloids by gas chromatography – mass spectrometry. Application in ceramic pipes from two archaeological sites in Catamarca

Abstract

The pre-Columbian cultures of America used plants containing psychoactive alkaloids in ritual ceremonies and as medicines. In this research we have optimized the analytical conditions of gas chromatography coupled to mass spectrometry for the simultaneous identification of alkaloids from tobacco and coca leaves as well as chamico and cebil seeds with the aim of developing an analytical methodology for their identification in archaeological remains. The optimized methodology was applied to the identification of alkaloids in seven fragments of ceramic pipes and sediments from two archaeological sites from the Cajón valley in Catamarca province, Argentina. We have identified 5-hydroxy-*N,N*-dimethyltryptamine in two pipe furnaces and in the sediments contained in the furnace and tubes from three ceramic pipes. We have identified nicotine only in one pipe furnace. These results indicate the use of cebil as hallucinogen by ancient inhabitants of Catamarca.

Keywords: psychoactive alkaloids, gas chromatography – mass spectrometry, pipes, cultural heritage

Introducción

Fuentes etnográficas y etnohistóricas indican que el consumo de sustancias alucinógenas derivadas de plantas jugó un papel importante en la vida de los pueblos originarios de América. Los modos de consumo variaban de acuerdo con el efecto buscado, ya sea como sustancias medicinales o en ceremonias rituales o religiosas. Las sustancias podían beberse, mascarse, inhalarse mediante el uso de tubos y tabletas, fumarse en cigarrillos o pipas, o aplicarse a través de enemas [1]. Entre las partes de las plantas más utilizadas podemos mencionar las semillas de cebil (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*), las hojas de tabaco (*Nicotiana* sp) y de coca (*Erythroxylum coca*) y las hojas o semillas de chamico (*Datura ferox*). Todas estas plantas se caracterizan por contener alcaloides. La hoja de coca contiene principalmente cocaína [2], mientras que la hoja de tabaco se caracteriza por su contenido en nicotina y cotinina, su producto de oxidación [3]. El cebil es un árbol que se encuentra desde Perú y el noroeste de Bolivia, Brasil y Paraguay hasta las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, Corrientes, Misiones y Córdoba. Sus semillas constituyen la parte de la planta con mayor concentración de alcaloides triptamínicos, tales como 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltryptamina (bufotenina), *N,N*-dimetiltryptamina y 5-metoxi-*N,N*-dimetiltryptamina [4,5]. En cuanto al chamico, sus semillas contienen alcaloides derivados del tropano, como atropina y escopolamina [6].

La utilización de plantas que contienen alcaloides psicoactivos por las culturas precolombinas de Sudamérica fue demostrado en numerosos estudios. Se han identificado restos de nicotina en pipas [7,8] y cabellos de momias precolombinas [9,10] de sitios arqueológicos de Chile, así como alcaloides del cebil en pipas arqueológicas del noroeste argentino [11,12] y en objetos hallados en contextos funerarios en el área de San Pedro de Atacama, en el norte de Chile [13].

En la literatura científica se encuentra descrito el análisis de alcaloides psicoactivos mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-EM) [14-16], cromatografía líquida de alta resolución [17] y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa [18]. Numerosos trabajos demuestran el interés en el desarrollo de metodologías basadas en técnicas de espectrometría de masa para la identificación de alcaloides pertenecientes a diferentes familias de compuestos, particularmente en matrices biológicas [19-21]. Sin embargo, no se ha reportado una metodología para la determinación simultánea de los alcaloides del tabaco, cebil, coca y chamico, la cual sería una herramienta analítica valiosa para la identificación de estas sustancias en materiales arqueológicos de Sudamérica. Por consiguiente, el objetivo del presente trabajo fue la optimización del análisis de una mezcla de extractos de hojas de coca y tabaco y semillas de cebil y chamico por CG-EM y su posterior aplicación a la identificación de alcaloides en pipas cerámicas recuperadas de dos sitios arqueológicos del valle del Cajón en la provincia de Catamarca, Argentina.

Materiales y métodos

Material biológico

Las hojas de coca fueron adquiridas en un mercado en Arica (Chile) mientras que los frutos de chamico fueron proporcionados por el Lic. Gustavo Álvarez. Las hojas de tabaco y las semillas de *Anadenanthera colubrina* var. cebil fueron provistas por la Dra. Ana María Llamazares.

Extracción de los alcaloides de las especies vegetales

Las semillas de cebil y chamico se molieron en un mortero y se extrajeron con metanol (calidad para cromatografía líquida, Merck) a temperatura ambiente durante 24 horas. Las hojas de coca y tabaco fueron extraídas con metanol en las mismas condiciones. Posteriormente, cada extracto metanólico se filtró y evaporó a sequedad a presión reducida. Los extractos fueron disueltos en metanol y analizados por cromatografía en capa delgada (CCD) de sílica gel utilizando como solventes de elución cloroformo:metanol (9:1) para los extractos de coca, tabaco y chamico y *n*-butanol:ácido acético:agua (12:3:5) para el extracto de cebil. En todos los casos se utilizó el reactivo de Dragendorff como revelador para la detección de alcaloides.

Los extractos metanólicos fueron purificados por extracción en fase sólida utilizando un cartucho de sílica gel (Strata, Phenomenex, 500 mg/3 ml). Se utilizaron cloroformo, mezclas de cloroformo:metanol de polaridad creciente y metanol como solventes de elución. Las fracciones eluidas se analizaron por CCD de sílica gel en las condiciones descriptas anteriormente. Las fracciones de cada extracto que contenían mayoritariamente alcaloides se unificaron y se analizaron por CG-EM.

Análisis de los extractos con alcaloides por CG-EM

Las fracciones purificadas que contenían alcaloides se disolvieron en metanol y se analizaron en un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masa Shimadzu GCMSQP5050A con una columna capilar Zebron ZB-5 (Phenomenex, 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano, 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y un espesor de film de 0,25 μm). Se utilizó helio como gas portador (1,5 ml/min de flujo). La temperatura del inyector fue de 240 °C y la del detector de 280 °C. El programa de temperatura comprendió una temperatura inicial de 80 °C (2 min) con una rampa de temperatura de 15 °C/min hasta una temperatura final de 280 °C que se mantuvo constante durante 15 min. El espectrómetro de masa fue operado en modo de ionización electrónica a 70 eV en un rango de masa/carga (m/z) de 40 a 650.

A continuación se detallan los alcaloides identificados en los extractos metanólicos purificados de cada especie vegetal junto con sus tiempos de retención (t_r) y los valores de m/z y de intensidad relativa (%) de los iones del espectro de masa.

Alcaloides del extracto de hojas de coca: anhidroecgonina metil éster ($t_r = 8,99$ min; $m/z = 57$ (7); 68 (5); 82 (15); 94 (10); 120 (10); 122 (16); 152 (100); 153 (13); 166 (12); 181 (33)), ecgonina metil éster ($t_r = 9,83$ min; $m/z = 55$ (17); 56 (7); 68 (8); 82 (100); 83 (60); 84 (9); 94 (29); 96 (81); 97 (40); 112 (9); 140 (11); 168 (7); 182 (7); 199 (12)), cocaína ($t_r = 15,91$ min; $m/z = 51$ (15); 55 (8); 77 (42); 82 (100); 83 (37); 94 (34); 96 (26); 105 (44); 122 (10); 183 (8); 198 (10); 272 (6); 303(21)), norcocaína ($t_r = 15,66$ min; $m/z = 51$ (9); 67 (7); 68 (33); 69 (10); 77 (25); 81 (5); 82 (11); 83 (8); 105 (26); 108 (20); 168 (100); 169 (9); 289 (8)), cinamilcocaína ($t_r = 17,58$ min y 19,07 min; $m/z = 77$ (20); 81 (11); 82 (100); 83 (57); 94 (33); 96 (65); 97 (15); 103 (28); 131 (18); 168 (11); 182 (62); 183 (8); 238 (24); 329 (19)), y benzoilecgonina ($t_r = 20,02$ min; $m/z = 51$ (16); 57 (13); 67 (10); 77 (37); 82 (65); 83 (29); 93 (21); 94 (28); 95 (13); 96 (22); 105 (42); 122 (10); 124 (100); 168 (57); 289 (8)).

Alcaloides del extracto de hojas de tabaco: nicotina ($t_r = 8,44$ min; $m/z = 51$ (4); 55 (4); 65 (4); 78 (4); 82 (6); 84 (100); 85 (6); 92 (6); 119 (5); 130 (4); 133 (24); 161 (14); 162 (15); 163 (1)) y cotinina ($t_r = 11,88$ min; $m/z = 51$ (8); 65 (7); 69 (7); 70 (6); 78 (8); 91 (6); 98 (100); 99 (7); 117 (6); 118 (16); 119 (14,5); 121 (8); 147 (10); 176 (40); 175 (10); 177 (5)).

Alcaloides del extracto de semillas de cebil: *N,N*-dimetilriptamina ($t_r = 12,57$ min; $m/z = 58$ (100); 59 (2); 63 (2); 77 (2); 89 (1); 116 (1); 130 (6); 143 (4); 188 (3)) y 5-hidroxi-*N,N*-

dimetiltriptamina ($t_r = 14,85$ min; $m/z = 58$ (100); 59 (3); 91 (2); 117 (1); 146 (4); 159 (1); 160 (2); 204 (7)).

Alcaloides del extracto de semillas de chamico: escopolamina ($t_r = 17.13$ min; $m/z = 77$ (23); 81 (27); 91 (21); 94 (100); 97 (20); 103 (24), 108 (49); 110 (12); 120 (17); 136 (34); 137 (13); 138 (60); 154 (30); 303 (18)).

Pipas cerámicas y contexto arqueológico

Las pipas cerámicas estudiadas (Figura 1) provienen de dos sitios arqueológicos localizados en el sector meridional del valle del Cajón (provincia de Catamarca, Argentina) en una estrecha quebrada al borde de la puna. Cardonal y Bordo Marcial son asentamientos aldeanos de los primeros siglos de la era cristiana que se emplazan en dos terrazas de escasa pendiente que bordean un cerro de mayor altura [22,23].



Figura 1: Fragmentos de pipas arqueológicas del valle del Cajón, provincia de Catamarca.

Estas aldeas están formadas por más de 100 estructuras circulares y subcirculares que se agrupan configurando núcleos habitacionales de entre tres y seis recintos cada uno. En el caso de Cardonal, uno de ellos, el Núcleo 1, fue excavado en su totalidad y mostró evidencias de la vida cotidiana de quienes habitaron esta aldea. En las distintas habitaciones se hallaron una docena de recipientes cerámicos semicompletos, puntas de proyectil, decenas de instrumentos líticos tallados y pulidos, improntas de cestería, restos vegetales carbonizados, fragmentos óseos faunísticos, una pipa cerámica completa, además de 64 fragmentos cerámicos correspondientes a otras pipas de similares características. Por otra parte, en Bordo Marcial, se excavó de forma total un recinto circular en el cual se halló el tubo completo de una pipa cerámica y algunos fragmentos pequeños de otras pipas. Los fragmentos de las pipas arqueológicas se describen en la Tabla I. La pipa completa hallada en el sitio Cardonal está compuesta por el hornillo (C497-H1) (muestra 1, Tabla I) y dos fragmentos del tubo

posteriormente reconstituido (C497-H2+C425) (muestra 2, Tabla I). Las muestras 1, 2, 3 y 5 (Tabla I) proceden de la misma habitación, la Estructura 1, que fue utilizada como cocina. Asimismo se analizó un pequeño fragmento de otra pipa (C399-T8, muestra 7) hallada en la Estructura 5, un patio, y otro fragmento de hornillo y pie (C161, muestra 6) recolectado en la superficie del sitio. Del sitio Bordo Marcial se analizó un tubo de pipa (C874-T1) y los sedimentos extraídos del mismo (muestra 4), hallados en la Estructura 18.

Los sedimentos asociados a los fragmentos de las pipas correspondientes a las muestras 1, 2, y 4 se extrajeron en el laboratorio.

Tabla I. Muestras analizadas: descripción y datos de procedencia

Muestra	N° catálogo PASCAL	Descripción	Datos de procedencia
1	C497-H1	Hornillo de pipa con rostro modelado y sedimentos extraídos del hornillo.	Sitio arqueológico Cardonal. C497. Estructura 1. Sector NW-SW. Piso de ocupación.
2	C497-H2 + C425	Tubo de pipa y sedimentos extraídos del interior del tubo.	Sitio arqueológico Cardonal. C497. Estructura 1. Sector NW-SW. Piso de ocupación.
3	C241 Hallazgo #19	Hornillo de pipa	Sitio arqueológico Cardonal. Estructura 1. Unidad 2. Nivel 1.
4	C874-T1	Tubo de pipa y sedimentos extraídos del interior del tubo.	Sitio arqueológico Bordo Marcial. Núcleo 2. Estructura 18. Cuadrícula 29. Nivel 2.
5	C238 Hallazgo #17	Fragmento de tubo de pipa reconstruido.	Sitio arqueológico Cardonal. Sector 1. Estructura 1. Unidad 4. Nivel 4.
6	C161	Fragmento de hornillo y pie	Sitio arqueológico Cardonal. Recolección de superficie.
7	C399-T8	Hornillo de pipa con interior cilíndrico correspondiente al tubo.	Sitio arqueológico Cardonal. Núcleo 1. Estructura 5. Unidad NW. Cuadrícula D. Nivel 6.

Extracción de los alcaloides de las pipas arqueológicas

Con excepción del fragmento de la pipa C399-T8 (muestra 7), el cual se sumergió en metanol durante 24 horas para la extracción de los alcaloides, en el caso de los fragmentos de las otras pipas, se raspó material de su interior (100 mg) y el sólido se dejó en contacto con

metanol (5 ml) durante 2-3 horas a temperatura ambiente. De la misma manera se procedió con los sedimentos asociados a las muestras 1, 2 y 4. Cada extracto metanólico se separó del sólido por centrifugación y la solución se evaporó a sequedad a presión reducida para su posterior análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (CG-EM).

Resultados

Los extractos purificados de las partes de cada una de las especies vegetales se analizaron por CG-EM con el objeto de identificar los alcaloides mayoritarios a partir del análisis de sus espectros de masa. El extracto de hojas de coca reveló la presencia de cocaína como compuesto mayoritario y cantidades minoritarias de anhidroecgonina metil éster, el éster metílico de ecgonina, norcocaína y benzoilecgonina, además de dos picos a tiempos de retención de 17,58 y 19,07 minutos correspondientes a los isómeros *cis* y *trans* de la cinamilcocaína. El extracto de tabaco indicó la presencia de nicotina y cotinina, su producto de oxidación, mientras que en el extracto de cebil se identificó 5-hidroxi-*N,N*-dimetilriptamina como componente mayoritario y *N,N*-dimetilriptamina. El análisis por CG-EM del extracto de las semillas de chamico indicó la presencia de escopolamina como único alcaloide, ya que su proporción es mucho mayor que la de atropina/hiosciamina [24]. Una vez identificados los alcaloides en los extractos purificados de las cuatro especies vegetales, se preparó una mezcla de los cuatro extractos y se analizó por CG-EM en las mismas condiciones de análisis con el objeto de su detección simultánea en un único análisis cromatográfico. El cromatograma de corriente iónica total (Figura 2) muestra la identificación de los alcaloides nicotina, anhidroecgonina metil éster, el éster metílico de ecgonina, cotinina, 5-hidroxi-*N,N*-dimetilriptamina, norcocaína, cocaína y cinamilcocaína, además de los ácidos grasos saturados mirístico (14:0), palmítico (16:0) y esteárico (18:0), comunes a distintas especies vegetales. No se detectaron escopolamina, *N,N*-dimetilriptamina y benzoilecgonina debido a su baja concentración en el extracto, sin embargo, los tiempos de retención de cada uno de estos alcaloides (ver Materiales y métodos) permitirían su separación e identificación por CG-EM en el caso de encontrarse en mayor proporción y en mezclas conteniendo algunos de los otros alcaloides psicoactivos.

La metodología optimizada se aplicó al análisis de los fragmentos de pipas y sedimentos asociados provenientes de los sitios arqueológicos Cardonal y Bordo Marcial ubicados en el valle del Cajón, Catamarca (Figura 1, Tabla I). Los fragmentos de las pipas y los sedimentos fueron extraídos con metanol y los extractos metanólicos analizados por CG-EM realizando un barrido completo de los iones en el rango de *m/z* de 40 a 650. En todos los extractos se detectaron únicamente ácidos grasos de 8 a 18 átomos de carbono y en algunos casos se identificaron también sus ésteres metílicos. En función de este resultado, se reanalizaron las muestras por CG-EM realizando un monitoreo selectivo de iones, lo cual favorece la identificación de componentes que se encuentran en muy bajas proporciones. Se

seleccionaron los iones principales para la identificación de nicotina ($m/z = 84, 133, 161, 162$), cotinina ($m/z = 98, 176$), *N,N*-dimetiltriptamina ($m/z = 58, 77, 130, 188$), 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina ($m/z = 58, 91, 146, 160, 204$), norcocaína/benzoilecgonina ($m/z = 82, 289$), cocaína ($m/z = 82, 94, 303$) y escopolamina ($m/z = 94, 138, 303$). La metodología se aplicó al análisis de los extractos metanólicos de las pipas cerámicas y sedimentos descriptos en la Tabla I. En el extracto metanólico del hornillo de la pipa C497-H1 (muestra 1) se identificó nicotina mientras que en el sedimento asociado al fragmento se detectó 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina. Este alcaloide fue identificado en los hornillos de las pipas C241 Hallazgo #19 (muestra 3) y C399-T8 (muestra 7) y en los sedimentos contenidos en los tubos C497-H2+C425 (muestra 2) y C874-T1 (muestra 4). Por otra parte, en las muestras 5 y 6 no se identificaron alcaloides.

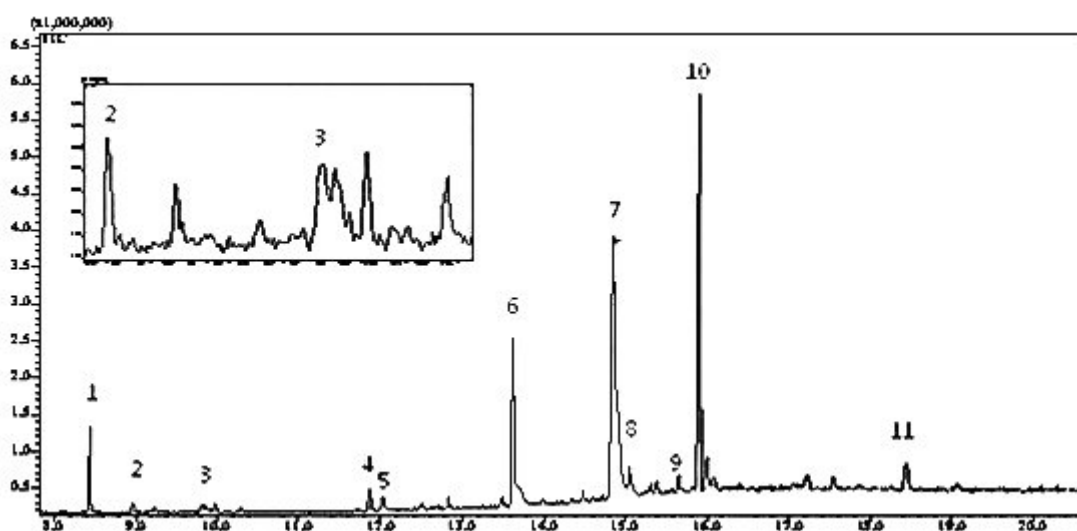


Figura 2: Cromatograma de corriente iónica total de la mezcla de extractos purificados de hojas de tabaco y coca y semillas de chamico y cebil. Componentes identificados: 1. Nicotina; 2: Anhidroecgonina metil éster; 3: Ecgonina metil éster; 4: Cotinina; 5: Ácido mirístico; 6: Ácido palmítico; 7: 5-hidroxi-*N,N*-dimetiltriptamina; 8: Ácido esteárico; 9: Norcocaína; 10: Cocaína; 11: Cinamilcocaína.

Discusión

La metodología optimizada permite, a partir de una extracción simple con metanol, separar alcaloides pertenecientes a distintas familias químicas por cromatografía gaseosa e identificarlos en bajas concentraciones mediante el monitoreo selectivo de iones por espectrometría de masa. Los resultados obtenidos demuestran el consumo de sustancias alucinógenas provenientes de una planta nativa como el cebil por las sociedades prehispánicas que habitaron el Noroeste argentino y contribuyen al conocimiento sobre el uso de alucinógenos y pipas de fumar.

Muchas de las pipas completas del Noroeste argentino forman parte de colecciones privadas o de museos y carecen en general de datos contextuales y procedencias ciertas. Los análisis efectuados a las pipas del valle del Cajón presentaron evidencias inequívocas que las vinculan con el consumo de sustancias alucinógenas en los contextos de las actividades originales en los cuales eran usadas. Los resultados ratifican la firme adhesión que hubo hace dos mil años a la costumbre de fumar vegetales procedentes de regiones distantes y muestra la amplia dispersión de esas plantas útiles, la cual supera considerablemente sus límites naturales. Ello implica la existencia de un sistema de intercambio a larga distancia bien desarrollado para su distribución eficaz y extendida a sus consumidores habituales. También se confirma el alto valor que habrían tenido estas plantas en la economía de los pueblos prehispánicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo financiero para la realización de esta investigación. VPC, MFB, MCS y MSM son Miembros de la Carrera del Investigador Científico y Tecnológico de CONICET.

Referencias

1. **Pérez Gollán JA, Gordillo I** (1993) Alucinógenos y sociedades indígenas del Noroeste argentino. *Anales de Antropología* 30: 299-350.
2. **Johnson EL, Emche SD** (1994) Variation of alkaloid content in *Erythroxylum coca* leaves from leaf bud to leaf drop. *Annals of Botany* 73: 645-650.
3. **Sisson VA, Severson RF** (1990) Alkaloid composition of the *Nicotiana* species. *Beiträge zur Tabakforschung International* 14: 327-339.
4. **Von Reis Altschul S** (1972) The genus *Anadenanthera* in Amerindian cultures. Botanical Museum, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 96 pp.
5. **Bongiorno de Pfirter GM, Mandrile EL** (1983) Principios activos con acción alucinógena II. Bufotenina y otras triptaminas. Su presencia en *Anadenanthera peregrina* (L.) Spegazzini (Leguminosae). *Acta Farmacéutica Bonaerense* 2: 47-54.
6. **Padura LZ, Bandoni AL, Rondina RVD, Coussio JD** (1976) Quantitative determination of total alkaloids and scopolamine in *Datura ferox* growing in Argentina. *Planta Medica* 29: 357-360.
7. **Echeverría J, Planella MT, Niemeyer HM** (2014) Nicotine in residues of smoking pipes and other artifacts of the smoking complex from Early Ceramic period archeological site in central Chile. *Journal of Archeological Science* 44: 55-60.
8. **Gili F, Echeverría J, Stovel E, Deibel M, Niemeyer HM** (2017) Las pipas del salar de Atacama: reevaluando su origen y uso. *Estudios Atacameños* 54: 37-64.
9. **Echeverría J, Niemeyer HM** (2013) Nicotine in the hair of mummies from San Pedro de Atacama (Northern Chile). *Journal of Archeological Science* 40: 3561-3568.
10. **Musshof F, Rosendahl W, Madea B** (2009) Determination of nicotine in hair samples of pre-columbian mummies. *Forensic Science International* 185: 84-88.
11. **Rosso C, Spano R** (2005-2006) Evidencias del uso de alucinógenos en pipas halladas en dos sitios tempranos de los Valles Calchaquíes. *Arqueología* 13: 79-99.

12. **Lema VS, Andreoni D, Capparelli A, Ortiz G, Spano R, Quesada M, Zorzi F** (2015) Protocolos y avances en el estudio de residuos de pipas arqueológicas de Argentina. Aportes para el entendimiento de metodologías actuales y prácticas pasadas. *Estudios Atacameños* 51: 77-97.
13. **Torres CM, Repke DB, Chan K, McKenna D, Llagostera A, Schultes RE** (1991) Snuff powders from Pre-Hispanic San Pedro de Atacama: chemical and contextual analysis. *Current Anthropology* 32: 640-649.
14. **Ogalde JP, Arriaza BT, Soto EC** (2009) Identification of psychoactive alkaloids in ancient Andean human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Archeological Science* 36: 467-472.
15. **Rafferty SM** (2002) Identification of nicotine by gas chromatography/mass spectroscopy analysis of smoking pipe residue. *Journal of Archaeological Science* 29: 897-907.
16. **Hossain AM, Salehuddin SM** (2013) Analytical determination of nicotine in tobacco leaves by gas chromatography-mass spectrometry. *Arabian Journal of Chemistry* 6: 275-278.
17. **Mercolini L, Mandrioli R, Saladini B, Conti M, Baccini C, Raggi MA** (2008) Quantitative analysis of cocaine in human hair by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48: 456-461.
18. **Jakabová S, Vincze L, Farkas A, Kilár F, Boros B, Felinger A** (2012) Determination of tropane alkaloids atropine and scopolamine by liquid-chromatography-mass spectrometry in plant organs of *Datura* species. *Journal of Chromatography A* 1232: 295-301.
19. **Strano-Rossi S, Bermejo AM, de la Torre X, Botré F** (2011) Fast GC-MS method for the simultaneous screening of TCH-COOH, cocaine, opiates and analogues including buprenorphine and fentanyl, and their metabolites in urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399: 1623-1630.
20. **Shakleya DM, Huestis MA** (2009) Optimization and validation of a liquid chromatography- tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of nicotine, cotinine, *trans*-3'-hydroxycotinine and norcotinine in human oral fluid. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395: 2349-2357.
21. **Joya X, Pujadas M, Falcón M, Civit E, García-Algar O, Vall O, Pichini S, Luna A, de la Torre R** (2010) Gas chromatography-mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of drugs of abuse in human placenta at 12th week of gestation. *Forensic Science International* 196: 38-42.
22. **Scattolin MC, Bugliani MF, Cortés LI, Calo CM, Pereyra Domingorena L, Izeta AD** (2009) Pequeños mundos: habitat, maneras de hacer y afinidades en aldeas del valle del Cajón, Catamarca. *Relaciones de la Sociedad Argentina de Antropología* XXXIV: 251-274.
23. **Scattolin MC, Bugliani MF, Pereyra Domingorena L, Cortés LI, Lazzari M, Izeta A, Calo M** (2015). Habitar, circular, hacer. El punto de vista de La Quebrada. En: Crónicas materiales precolombinas. Arqueología de los primeros poblados del Noroeste Argentino Editado por: A. Korstanje et al, Capítulo 13, pp. 427-464. *Buenos Aires: Sociedad Argentina de Antropología*.
24. **Vitale AA, Acher A, Pomilio AB** (1995) Alkaloids of *Datura ferox* from Argentina. *Journal of Ethnopharmacology* 49: 81-89.



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista *QuímicaViva*

Número 2, año 17, agosto 2018

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar

La condición de protón como ejercicio introductorio a la programación científica

Luciano A. Abriata

Laboratory for Biomolecular Modeling and Protein Purification and Structure Facility, School of Life Sciences, École Polytechnique Fédérale de Lausanne; and Swiss Institute of Bioinformatics. Lausanne, Suiza

luciano.abriata@epfl.ch

Recibido 15/05/2018 - Aceptado 18/07/2018

Resumen

Este artículo tiene como objetivo proveer versiones modernas de los tres pequeños programas provistos en el libro *Equilibrios Ácido Base en Solución Acuosa – Aplicaciones de la Condición de Protón*, para mantener este material didáctico en un formato vigente que los alumnos puedan hoy en día implementar fácilmente. Las conversiones son al lenguaje HTML + JavaScript, con lo cual los programas pueden ejecutarse en cualquier computadora, tableta o teléfono con un navegador web moderno.

Palabras claves: titulación, ácido-base, condición de protón, JavaScript, programación, métodos numéricos

Introducing web programming for science by solving proton condition equations

Abstract

This article provides modern versions of the three small programs proposed as extension activities in the book *Equilibrios Ácido-Base en Solución Acuosa – Aplicaciones de la Condición de Protón (Acid-Base Equilibria in Aqueous Solution – Applications of the Proton Condition)*. The goal is to keep this valuable didactic material in a modern format that students can implement seamlessly today. The conversions are to HTML + JavaScript code, which allows running the programs in virtually any device with a modern web browser.

Keywords: titration, acid-base, proton condition, JavaScript, programming, numerical methods

Introducción

El libro *Equilibrios Ácido Base en Solución Acuosa – Aplicaciones de la Condición de Protón* [1] (Prof. Alejandro Olivieri, Universidad Nacional de Rosario, Argentina) explora, en secciones tituladas: *Para quienes se interesan por la computación*, la matemática de equilibrios ácido-base complejos mediante pequeños programas de computadora (también descrita en [2–5]). Estos ejercicios de extensión muestran claramente cómo algunos problemas científicos requieren computadoras para su correcta simulación y resolución, y proveen situaciones concretas donde aquellos alumnos de química interesados en la programación pueden plasmar un algoritmo en un programa funcional.

Los programas provistos en dicho libro están escritos para QBASIC, un intérprete provisto con todos los sistemas operativos basados en MS-DOS, lo cual los hacía accesibles a cualquier alumno con acceso a una computadora personal. Pero casi dos décadas más tarde de la publicación del libro, ni QBASIC ni sus alternativas están fácilmente disponibles. Pero a cambio, los alumnos tienen hoy en día acceso a una herramienta gratuita y muy poderosa que funciona en cualquier computadora e inclusive en teléfonos celulares y otros dispositivos, con la cual pueden aprender programación: los navegadores web. Estos programas (como Google Chrome, Firefox, Edge, Safari, entre los más populares) pueden procesar programas escritos en el lenguaje *JavaScript*, que provee interactividad y poder de cálculo dentro de páginas web. Con un simple editor de texto, es posible escribir páginas web con contenido estático (código HTML, por *Hyper Text Markup Language*) y contenido dinámico (código JavaScript). El objetivo particular de este artículo es proveer todo el código del citado libro transcrito a HTML + JavaScript, para mantener este interesante material didáctico en un formato vigente que los alumnos puedan hoy en día implementar fácilmente. El lector interesado en el poder de JavaScript en el ámbito científico puede remitirse a [6,7]. Un buen punto de entrada más general al mundo de la programación web es la W3schools (<https://www.w3schools.com/>).

Primeros pasos

Los requerimientos de estas actividades son muy modestos: una computadora o un teléfono tipo *Smartphone* o una *tablet*, que tengan un programa editor de texto (como el bloc de notas en sistemas Windows) y un navegador web funcional. En el editor de texto se escribe el código del programa, creando una página web que incluirá los cálculos y mostrará los resultados. Todo el código HTML de la página se escribe entre *tags* `<html>` y `</html>`, y dentro del mismo, se escribe código JavaScript entre *tags* `<script>` y `</script>` (Figura 1). El archivo de texto debe salvarse con extensión `.html` para que al efectuar doble clic sobre el mismo este se abra directamente en el navegador web predeterminado. Los ejemplos han sido reescritos en la forma más concisa y cercana posibles al original.

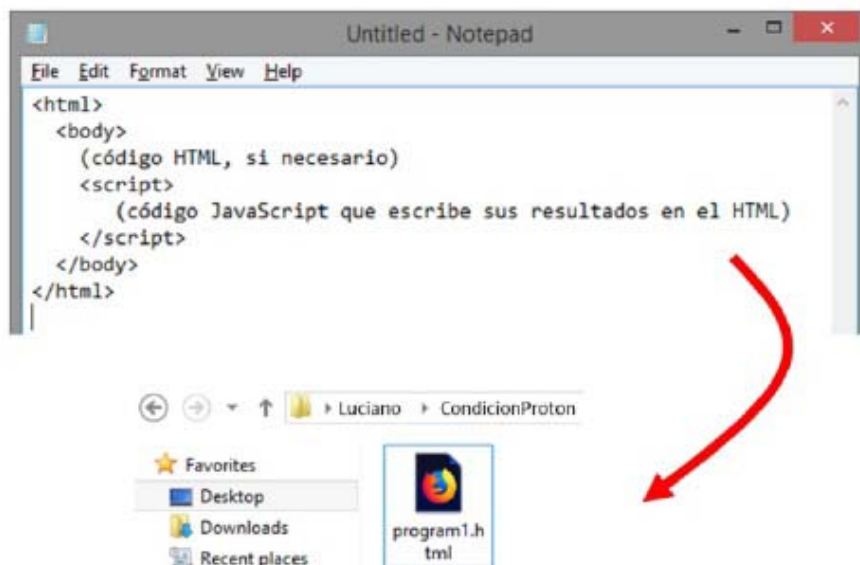


Figura 1. Esquema que indica cómo preparar estos programas. Debe escribirse el código dentro de un archivo de texto, salvado con extensión .html. Luego ese archivo se abre en cualquier navegador web moderno, resultando directamente en su ejecución y la presentación de los resultados.

Programa 1

El primer programa, descrito en la sección 1.10 del libro, utiliza un método recursivo para estimar la concentración de protones en una solución conteniendo múltiples especies activas en ácido-base, sin realizar ninguna aproximación acerca de las magnitudes relativas de las constantes de disociación. En particular el ejercicio propone una solución de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, donde tanto NH_4^+ como H_2PO_4^- se involucran en procesos ácido-base, y plantea considerar la condición de protón completa. Esto resulta en una ecuación polinómica cuya resolución se logra mediante un método iterativo de aproximaciones sucesivas, ilustrando directamente el potencial de los métodos numéricos ejecutados en computadora. El ejercicio concluye demostrando que aproximando una reacción mucho más desplazada hacia los productos que la otra, resultaría en un pH independiente de la cantidad total de compuesto, mientras que el cálculo preciso basado en la condición de protón completa resulta en valores de pH fuertemente dependientes de la concentración total de compuesto, tal como se observa en la práctica.

Mientras que los detalles matemáticos pueden consultarse en el libro, la conversión de QBASIC a HTML + JavaScript resulta en el código mostrado en la Figura 2 (disponible para su ejecución directa en <http://lucianoabriata.altervista.org/jsinscience/protoncondition/programa1.html>). En este código, la sección `<script>` comienza definiendo y asignando valores a las variables a utilizar, mediante el comando `var`. Luego un bucle `while` itera en la ecuación del cálculo de pH hasta que se alcance la convergencia dentro de la tolerancia preestablecida. Al final del bucle, el comando `document.write` escribe al HTML el pH calculado redondeado a dos cifras decimales. Este

código de JavaScript se ejecuta al cargar la página, con lo cual abriendo el archivo en un explorador web se mostrará ya el resultado final. El usuario puede modificar las concentraciones y valores de constantes en el archivo de texto y recargar la página para explorar los efectos de las distintas variables, por ejemplo variando la concentración entre 0,0001 y 0,1 como se explora en el libro. O un paso más avanzado, utilizando HTML se podría permitir al usuario indicar la concentración total y luego ejecutar el cálculo mediante un botón.

```
1. <html>
2. <body>
3. <script>
4. var c=0.001
5. var tol=0.001
6. varphnew = 4.67
7. varphold=1
8. var k1 = 0.0071
9. var k2 = 6.3e-08
10. var k3 = 4.2e-13
11. varkw = 1e-14
12. var kb = 1.8e-05
13. varka = kw / kb
14.
15. while ( Math.abs(phnew-phold) >tol ) {
16. varphold=phnew
17. var h = Math.pow(10, -phold)
18. var nh4 = c * h / (h + ka)
19. var d = h * h * h + k1 * h * h + k1 * k2 * h + k1 * k2 * k3
20. var h2p = c * k1 * h * h / d
21. varnum = nh4 * ka + h2p * k2 + 2 * h2p * k2 * k3 / h + kw
22. var den = 1 + h2p / k1
23. var h = Math.sqrt(num / den)
24. varphnew = -Math.log10(h)
25. }
26. document.write("pH = " + Math.round(phnew*100)/100 + "</b>")
27. </script>
28. </body>
29. </html>
```

Figura 2. Código para el Programa 1. También disponible en: <http://lucianoabriata.altervista.org/jsinscience/protoncondition/programa1.html> (donde el código puede verse presionando Ctrl+U en la mayoría de los navegadores web).

Programas 2 y 3

Los programas 2 y 3 simulan curvas de pH vs. volumen de titulante agregado en titulaciones ácido-base de un ácido fuerte (sección 2.3) o un ácido diprótico débil (sección 3.3). En el libro, estos programas escriben los datos en un archivo para su posterior inspección en un programa de gráficos. Aquí, en cambio, se utiliza la biblioteca de gráficos Google Charts (basada en código JavaScript) para insertar un gráfico interactivo de la titulación directamente en la página web.

El código del programa 2 se muestra en la Figura 3 y puede ejecutarse directamente en <http://lucianoabriata.altervista.org/jsinscience/protoncondition/programa2.html>. La tercera línea

indica al navegador que debe cargar la biblioteca de Google Charts, y la quinta crea un contenedor (*div*) que alojará al gráfico generado por la biblioteca. Luego, dentro del bloque `<script>` se definen primero la variable *pH* y los vectores *vols* y *pHs*, inicialmente vacíos pero que más abajo se cargarán con los elementos de la curva de titulación. Esta es una notación compacta donde se definen múltiples variables en una sola línea, que bien podrían definirse en líneas separadas.

```

1. <html>
2. <body>
3. <scripttype="text/javascript"src="https://www.gstatic.com/charts
   /loader.js"></script>
4.
5. <divid="chart_div_1"style="width: 500px; height: 500px;"></div>
6.
7. <script>
8.   var pH=0, vols=[], pHs=[]
9.   for (pH = 0; pH <14; pH=pH+0.05) {
10.    var h = Math.pow(10, -pH)
11.    r = 1e-14/h - h
12.    v = (20*r+2) / (0.1-r)
13.    if (v >0&& v<50) {
14.     document.write("<br>" + Math.round(v*100)/100 + " " +
       Math.round(pH*100)/100)
15.     vols.push(v)
16.     pHs.push(pH)
17.    }
18.  }
19.
20.  google.charts.load('current', {'packages':['corechart']});
   google.charts.setOnLoadCallback(drawCharts);
21.
22.  functiondrawCharts() {
23.   varCombined1 = newArray();
24.   Combined1[0] = ['Vol', 'pH'];
25.
26.   for (i=0;i<vols.length;i++) {
27.    Combined1[i+1] = [ parseFloat(vols[i]), parseFloat(pHs[i])]
28.   }
29.
30.   var data1 = google.visualization.arrayToDataTable(Combined1,
       false);
31.   var options1 = { title: 'Simulacion', hAxis: {title: 'Vol
       (ml)'}, vAxis: {title: 'pH'}, legend: 'none', pointSize: 1,
       explorer: {} };
32.   var chart1 = new
       google.visualization.LineChart(document.getElementById('chart_di
       v_1'));
33.   chart1.draw(data1, options1);
34. }
35. </script>
36. </body>
37. </html>

```

Figura 3. Código para el Programa 2. También disponible en: <http://lucianoabriata.altervista.org/jsinscience/protoncondition/programa2.html>.

Luego de definir las variables, un bucle *for* itera los valores de pH desde 0 hasta 14 cada 0,05 unidades de pH, calculando los volúmenes correspondientes en base a las ecuaciones descriptas en el libro. En vez de escribir los valores de pH y volumen a un archivo como en el código del libro, este bucle escribe los datos directo al HTML mediante la línea *document.write* y agrega secuencialmente elementos a los vectores que listan pH y volumen (*vols.push* y *pHs.push*).

Después del bucle *for*, la línea que contiene los comandos *google.charts.load* y *google.charts.setOnLoadCallback* prepara primero la biblioteca de gráficos y luego indica que al terminar de cargarse la página debe ejecutar la función *drawCharts*. Esta función básicamente prepara una variable tipo *Array* (*Combined1*) que combina los datos en el formato requerido por la biblioteca de gráficos, y finalmente construye el gráfico con el comando *chart1.draw*.

El programa 3 sigue la misma base del programa 2, con las modificaciones necesarias para calcular curvas de titulación para un ácido diprótico débil, tal como se explican en el libro. El código se muestra en la Figura 4 y puede accederse en:

<http://lucianoabriata.altervista.org/jsinscience/protoncondition/programa3.html>.

```

1. <html>
2. <body>
3. <scripttype="text/javascript"src="https://www.gstatic.com/charts
   /loader.js"></script>
4.
5. <divid="chart div 1"style="width: 500px; height: 500px;"></div>
6.
7. <script>
8.   var pH=0, vols=[], pHs=[], k1=0.017, k2=6.4e-8
9.   for (pH = 0; pH <14; pH=pH+0.05) {
10.    var h = Math.pow(10, -pH)
11.    r = 1e-14/h - h
12.    d=k1*k2 + k1*h + h*h
13.    a=(2*k1*k2 + k1*h) / d
14.    if (r<0.1) {
15.     v = (20*r+2*a) / (0.1-r)
16.     if (v>0&& v<50) {
17.      document.write("<br>" + Math.round(v*100)/100 + " " +
   Math.round(pH*100)/100)
18.     vols.push(v)
19.     pHs.push(pH)
20.    }
21.  }
22. }
23.
24.   google.charts.load('current', {'packages':['corechart']});
   google.charts.setOnLoadCallback(drawCharts);
25.
26.   functiondrawCharts() {
27.    varCombined1 = newArray();
28.    Combined1[0] = ['Vol', 'pH'];
29.
30.    for (i=0;i<vols.length;i++) {
31.     Combined1[i+1] = [ parseFloat(vols[i]), parseFloat(pHs[i])]
32.    }

```

```
33.
34. var data1 = google.visualization.arrayToDataTable(Combined1,
    false);
35. var options1 = { title: 'Simulacion', hAxis: {title: 'Vol
    (ml)'}, vAxis: {title: 'pH'}, legend: 'none', pointSize: 1,
    explorer: {} };
36. var chart1 = new
    google.visualization.LineChart(document.getElementById('chart_di
    v_1'));
37. chart1.draw(data1, options1);
38. }
39. </script>
40. </body>
41. </html>
```

Figura 4. Código para el Programa 3. También disponible en: <http://lucianoabriata.altervista.org/jsinscience/protoncondition/programa3.html>.

Conclusiones

Este artículo presentó versiones HTML + JavaScript de los pequeños programas del libro *Equilibrios Ácido Base en Solución Acuosa – Aplicaciones de la Condición de Protón*, con la intención de mantener ese material didáctico en un formato actualizado. En caso de problemas o para entender en mayor detalle los programas, el lector puede contactar a este autor en la dirección de email indicada así como referirse al libro (ver Nota luego de las Referencias) y los artículos originales [1–5].

Referencias

1. **Olivieri A** (2000) *Equilibrios ácido-base en solución acuosa: Aplicaciones de la condición de protón* Segunda edición. Buenos Aires: Ediciones Científicas Argentinas.
2. **Olivieri AC** (1990) Solution of acid-base equilibria by successive approximations. *Journal of Chemical Education* 67: 229-237
3. **Malinowski ER** (1990) Methods for calculating the pH of aqueous solutions of salts of monoprotic acids and bases. *Journal of Chemical Education* 67: 502-504
4. **Campanario JM, Ballesteros R** (1990) A short program for the automatic calculation of pH in solutions having many acids or bases. *Journal of Chemical Education* 67: 1036-1037
5. **Willis CJ** (1981) Another approach to titration curves: Which is the dependent variable?. *Journal of Chemical Education* 58, 659-663
6. **Abriata LA et al.** (2018) Augmenting research, education and outreach with client-side web programming. *Trends in Biotechnology* 36: 473-476
7. **Abriata LA** (2017) Web apps come of age for molecular sciences. *Informatics* 4: 28
doi:10.3390/informatics4030028

Nota: El libro *Equilibrios Ácido Base en Solución Acuosa – Aplicaciones de la Condición de Protón* está disponible en el sitio web de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario, Argentina, para descarga gratuita: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/4490/mod_folder/content/0/Libro%20Condicion_de_proton.pdf



ISSN 1666-7948

www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Revista **QuímicaViva**

Número 2, año 17, agosto 2018

quimicaviva@qb.fcen.uba.ar