

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE BIORREACCIÓN PARA LA PRODUCCIÓN  
DE ESCOPOLAMINA POR CULTIVO DE RAÍCES DE *Brugmansia candida***

**Ing. MSc. Ángela María Otálvaro A.**

**Director. Dr. Ing. Mario Enrique Velásquez L.**

**Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ingeniería  
Departamento de Ingeniería Química y Ambiental  
Bogotá, 2009**

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE BIORREACCIÓN PARA LA PRODUCCIÓN  
DE ESCOPOLAMINA POR CULTIVO DE RAÍCES DE *Brugmansia candida***

**Ing. MSc. ÁNGELA MARÍA OTÁLVARO A.**

**CÓDIGO: 299022**

**Trabajo de grado presentado para optar el título de: Doctora en Ingeniería**

**DIRIGIDO POR:**

**Dr. Ing. MARIO ENRIQUE VELÁSQUEZ L.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL  
Bogotá, 2009**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Colciencias, por su colaboración a través de su programa de Apoyo a Doctorados Nacionales, Convocatoria 2005.

A la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, y en especial al Departamento de Ingeniería Química y Ambiental del cual hace parte el programa de Doctorado en Ingeniería Química, por el apoyo y acompañamiento institucional.

A la División de Investigación de la Sede Bogotá, y al programa de Semilleros de la Facultad de Ingeniería, de la Universidad Nacional de Colombia, por financiar proyectos relacionados con el tema de estudio.

A la Universidad de Buenos Aires, y en especial a la Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por el apoyo recibido durante la pasantía realizada en sus instalaciones.

Al ingeniero Mario Enrique Velásquez Lozano, por su dedicación como director de esta investigación.

A las Doctoras Margarita Perea D. y Ana María Giulietti por su constante colaboración desinteresada como orientadora en los temas relacionados con la biología y bioquímica involucrada en el tema de estudio.

A los Ingenieros Luis Caicedo y Néstor Algecira por sus consejos claves para el adecuado desarrollo del proyecto.

Al personal de la planta piloto de Ingeniería Química y del ICTA por su disposición y colaboración para llevar a cabo diferentes actividades relacionadas al proyecto.

A Dios, a mi familia, a mis amigos y compañeros.

## PUBLICACIONES

- Alejandra B. Cardillo, Ángela María Otálvaro A, Ariel Calabro Lopez, Mario Enrique Velásquez L, Julián Rodríguez Talou and Ana María Giulietti. “Anisodamine production from natural sources: seedlings and hairy root cultures of Argentinean and Colombian *Brugmansia candida* plants Anisodamine”. *Planta Medica*. ISSN: 00320943. E-ISSN: 1439-0221. En Prensa
- Ángela M. Otálvaro A., Mario Enrique Velásquez L. “Naphthalen acetic acid (NAA) effect on *in vitro* rooting in *Brugmansia candida*”. Trabajo presentado en el 8th World Congress of Chemical Engineering, realizado en Montreal, Canadá, en el mes de Agosto de 2009.
- Alejandra B. Cardillo, Ángela María Otálvaro A, Ariel Calabro López, Mario Enrique Velásquez L, Julián Rodríguez Talou, Ana María Giulietti. “Anisodamine production by Argentinean and Colombian *Brugmansia candida in vitro* cultures”. Trabajo presentado en el VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO - Argentina, II Congreso Internacional – Redbio - Argentina, realizado en Rosario, Argentina, en el mes de Abril de 2009.
- Ángela M. Otálvaro A., Mario E. Velásquez I., Yineth Piñeros C. “Diseño de un sistema de biorreacción para la producción de escopolamina por cultivo *in vitro* de raíces de *Brugmansia candida*”. Trabajo presentado en el III Simposio sobre Biofabricas, Medellín, Colombia, en 2007.

### Trabajos en Redacción:

- Evaluación de la producción de anisodamina por cultivo sumergido a partir del cultivo raíces transformadas de *Brugmansia candida*.
- Evaluación de la producción de escopolamina en un sistema de biorreacción compuesto por dos unidades a partir del cultivo de raíces normales de *Brugmansia candida*.

### **Proyectos desarrollados durante esta investigación:**

- Obtención de escopolamina mediante el cultivo *in vitro* de raíces modificadas de *Brugmansia candida* en un biorreactor de 2 l. Financiado por la facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Colombia, en la modalidad de Semilleros de Investigación convocatoria 2006.
- Evaluación de un sistema de biorreacción para la producción de escopolamina por cultivo de raíces de *Brugmansia candida*. Financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Sede Bogotá, en la modalidad de Apoyo a Tesis Doctorales, Año 2008.

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	18
1. ESTADO DEL ARTE .....	21
2.1 CULTIVO DE PLANTAS COMO FUENTE DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS.....	21
2.2 <i>BRUGMANSIA</i> .....	22
2.2.1 <i>Brugmansia candida</i> .....	23
2.3 ALCALOIDES DEL TROPANO .....	24
2.3.1 Escopolamina.....	25
2.3.2 Hiosciamina.....	32
2.3.3 Anisodamina.....	33
2.4 OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS A PARTIR DE ESPECIES VEGETALES ..	34
2.4.1 Cultivos <i>in vitro</i> para la producción de metabolitos secundarios .....	35
2.4.2 Cultivos <i>in vitro</i> de órganos de especies vegetales para la producción de metabolitos secundarios.....	36
2.4.3 Efecto de la aplicación de factores de crecimiento (hormonas) sobre cultivos <i>in vitro</i> .....	36
2.5 PRODUCCIÓN DE ESCOPOLAMINA POR CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE RAÍCES .....	37
2.6 CULTIVO DE RAÍCES EN BIORREACTOR.....	46
3. DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN .....	66
3.1 CULTIVOS DE RAÍCES NORMALES DE <i>BRUGMANSIA CANDIDA</i> .....	66
3.1.1 Material Vegetal.....	67
3.1.1.1 Obtención de Raíces Estériles Normales de <i>B. candida</i> .....	67
3.1.2 Proceso de germinación de los cultivos de <i>B. candida</i> .....	68
3.1.3 Efecto de la adición de ácido naftalenacético sobre el desarrollo de los embriones para la producción de raíces de <i>Brugmansia candida</i> .....	69
3.1.4 Desarrollo de una curva de crecimiento para las raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> .....	70
3.1.5 Adaptación del sistema de biorreacción para el cultivo de raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> .....	71
3.1.6 Preparación de los inóculos de raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> usados en el sistema de biorreacción .....	74
3.1.7 Operación del sistema de biorreacción para el crecimiento de raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> .....	74

3.1.8 Seguimiento del cultivo de las raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> en el reactor .....	76
3.1.9 Procedimiento de elicitación de las raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> en el sistema de biorreacción .....	77
3.1.10 Desmonte del sistema de biorreacción empleado para el crecimiento de raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> .....	77
3.1.11 Recolección de las raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> que crecieron en el sistema de biorreacción .....	77
3.1.12 Determinaciones Analíticas .....	78
3.1.12.1 Determinación de peso fresco.....	78
3.1.12.2 Determinación del peso seco .....	78
3.1.12.3 Determinación de la humedad .....	78
3.1.12.4 Índice de crecimiento .....	79
3.1.12.5 Extracción de alcaloides.....	79
3.1.12.6 Determinación de la escopolamina por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) .....	81
3.1.12.7 Determinación de azúcares por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) .....	81
3.1.12.8 Determinación de nitrógeno presente en el medio de cultivo por espectrofotometría .....	82
3.2 CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE <i>BRUGMANSIA CANDIDA</i> ...	83
3.2.1 Cultivo de raíces transformadas de <i>Brugmansia candida</i> .....	83
3.2.2 Protocolo para la extracción de los alcaloides desde los clones transformados .....	86
3.2.3 Metodología para el análisis por CLAE de los alcaloides presentes en las raíces transformadas.....	87
3.2.4 Curva de crecimiento para el clon Arg3 correspondiente a raíces transformadas de <i>Brugmansia candida</i> .....	87
3.2.5 Crecimiento del clon Arg3 correspondiente a raíces transformadas de <i>Brugmansia candida</i> en los sistemas de biorreacción.....	88
3.2.5.1 Generación de inóculos del clon Arg3 correspondiente a raíces transformadas de <i>Brugmansia candida</i> para el crecimiento en biorreactor .....	88
3.2.5.2 CASO I: Crecimiento del clon Arg3 correspondiente a raíces transformadas de <i>Brugmansia candida</i> por cultivo sumergido en un reactor de tanque agitado. ....	89
3.2.5.3 CASO II: Crecimiento del clon Arg3 correspondiente a raíces transformadas de <i>Brugmansia candida</i> en un sistema de biorreacción compuesto por dos unidades. ....	90
4. RESULTADOS .....	92
4.1 CRECIMIENTO DE RAÍCES NORMALES DE <i>BRUGMANSIA CANDIDA</i> .....	92
4.1.1 Proceso de Germinación de los embriones de <i>Brugmansia candida</i> .....	92

4.1.2 Efecto de la adición de ácido naftalenacético sobre el desarrollo de los embriones para la producción de raíces de <i>Brugmansia candida</i> .....	95
4.1.3 Curva de crecimiento para las raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> .....	99
4.1.4 Operación del sistema de biorreacción .....	107
4.1.4.1 Caso 1: El aire contribuye a la aspersión del medio de cultivo sobre las raíces y es introducido directamente en la unidad de crecimiento .....	107
4.1.4.2 Caso 2: El aire enriquece el medio de cultivo en la unidad de reservorio y luego se gotea sobre las raíces en la unidad de crecimiento.	116
4.2 CRECIMIENTO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE <i>BRUGMANSIA CANDIDA</i> .....	120
4.2.1 Resultados correspondientes a la germinación de los embriones usados para la generación de plántulas de <i>Brugmansia candida</i> .....	121
4.2.2 Desarrollo de clones de raíces transformadas de <i>B. candida</i> .....	122
4.2.3 Curva de crecimiento para un clon de raíces de <i>Brugmansia candida</i> transformada (Arg3) .....	124
4.2.4 Crecimiento en el Biorreactor del clon Arg3 correspondiente a raíces transformadas de <i>B. candida</i> .....	135
4.2.4.1 Caso I. Cultivo sumergido .....	135
4.2.4.2 Caso II. Cultivo en el sistema de biorreacción de dos unidades. ...	138
4.3 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA INVESTIGACIÓN .....	141
5. CONCLUSIONES.....	151
6. RECOMENDACIONES .....	156
7. REFERENCIAS.....	159
TABLA DE ANEXOS.....	174

## TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Flor de <i>Brugmansia candida</i> . .....	23
Figura 2. Estructura de la Escopolamina (Boswell, <i>et al.</i> , 1999). .....	25
Figura 3. Millones de dólares correspondientes a las importaciones de escopolamina, sus sales y derivados en el periodo comprendido entre 1997 y 2006 (Mincomex, 2006). .....	27
Figura 4. Toneladas métricas correspondientes a las importaciones de escopolamina, sus sales y derivados en el periodo comprendido entre 1997 y 2006 (Mincomex, 2006). .....	27
Figura 5. Ruta de biosíntesis de la escopolamina. ....	28
Figura 6. Obtención de 3 $\alpha$ -acetoxitrop-6-eno por dos rutas. ....	30
Figura 7. Síntesis de 3- $\alpha$ -acetoxitrop-6-eno por la tercera ruta propuesta. ....	31
Figura 8. Síntesis de escopolamina a partir de 3- $\alpha$ -acetoxitrop-6-eno. ....	32
Figura 9. Estructura de la Hiosciamina. ....	33
Figura 10. Estructura de la anisodamina (58). ....	34
Figura 11. Diagrama de un biorreactor integral con separador. (1) soportes para la biomasa, (2) plato distribuidor de medio, (3) y (4) entradas y salidas de aire, (5) puerto de inoculación, (6) bomba peristáltica, (7) reservorio de medio, (8) agitador magnético, (9) filtro de aire, (10) columna con resina de intercambio para separación, (11) puerto para tomar las muestras (102). ....	50
Figura 12. Diagrama de un biorreactor de rocío acústico, mostrando: (A) Generador y cámara de rocío colocada sobre la base húmeda, (B) Cámara de crecimiento con las raíces soportadas sobre anillos empacados, (C) Cámara de micropropagación conectada al generador de niebla (103). ....	51
Figura 14. Biorreactor de columna simple. (1) columna de crecimiento, (2) raíces modificadas, (3) malla de acero inoxidable, (4) fibra de vidrio, (5) unidad de crecimiento, (6) tanque de aireación, (7) sensor de oxígeno disuelto, (8) bomba, (9) electrodo de conductividad, (10) filtro, (11) condensador de agua, (12) humidificador, (13) entrada de gas, (14) salida de gas (95). ....	53

Figura 15. (A) Biorreactor de flujo radial. (B) Tanque de crecimiento. (1) tanque de crecimiento, (2) columna de aireación, (3) sensor de oxígeno disuelto, (4) bombas, (5) electrodo de conductividad, (6) filtro, (7) condensador de agua, (8) humidificador, (9) entrada de gas, (10) salida de gas, (11) raíces modificadas, (12) malla de acero inoxidable, (13) alambres e acero inoxidable, (14) entrada de medio, (15) salida de medio (95).	54
Figura 16. Diagrama de un biorreactor de columna simple, (1) PC, (2) manómetro, (3) columna de crecimiento con diámetro de 38 mm, (4) tanque de aireación, (5) sensor de oxígeno disuelto en el líquido que entra a la columna, (6) sensor de oxígeno disuelto en el líquido que sale de la columna, (7) raíces modificadas, (8) lana de vidrio, (9) esferas de vidrio, (10) bomba, (11) electrodo de conductividad, (12) humidificador, (13) filtro de aire (104).	55
Figura 17. Sistema de biorreacción para el cultivo de <i>Beta vulgaris</i> . (1)PC, (2) caja Petri con diámetro interno de 90 mm, (3) raíces en medio sólido, (4) cámara y monitor, (5) columna de crecimiento con diámetro interno de 38 mm, (6) tanque de aireación, (7) raíces modificadas, (8) fibra de vidrio, (9) esferas de vidrio, (10) bomba, (11) electrodo de conductividad, (12) electrodo de oxígeno, (13) filtro de aire, (13) humidificador (105).	56
Figura 18. (a) Biorreactor de columna de burbujeo, (b) Biorreactor de niebla (106).	57
Figura 19. Biorreactor de niebla para el cultivo de raíces de <i>Stizolobium hassjoo</i> (108)	59
Figura 20. Biorreactor de niebla acústico para el cultivo de raíces de <i>T. patula</i> (111).	61
Figura 21. Biorreactor de columna de burbujeo para el cultivo de raíces de <i>T. patula</i> (111).	61
Figura 22. Reactor con aspersión de nutrientes para el cultivo de raíces de <i>T. patula</i> (111).	62
Figura 23. Biorreactor de burbujeo y canasta para el cultivo de raíces de.....	63
Figura 24. Frutos de <i>Brugmansia candida</i> listos para el lavado y posterior extracción de embriones.	67
Figura 25. Desinfección y siembra de embriones de <i>Brugmansia candida</i> para la obtención de raíces normales.	68
Figura 26. Configuración del sistema de biorreacción empleado para el cultivo de raíces de <i>Brugmansia candida</i> .	73

Figura 27. Configuración del sistema de biorreacción para el cultivo de raíces de <i>Brugmansia candida</i> . Caso 1. Aireación en la unidad de crecimiento, mezcla de las corrientes de medio y aire en un dispositivo colocado sobre la tapa de la unidad.	75
Figura 28. Configuración del sistema de biorreacción para el cultivo de raíces de <i>Brugmansia candida</i> . Caso 2. El medio es enriquecido con aire en la unidad de control dentro de la que es administrado por medio de un distribuidor.	76
Figura 29. Metodología para la extracción de escopolamina desde el medio líquido.	80
Figura 30. Metodología para la extracción de escopolamina desde raíces secas de <i>Brugmansia candida</i> no transformadas.	80
Figura 31. Procedimiento para la obtención de raíces modificadas de <i>Brugmansia candida</i> .	85
Figura 32. (a) Configuración del biorreactor empleado para el cultivo sumergido de raíces transformadas de <i>Brugmansia candida</i> . (b) Vista superior y (c) Vista lateral de la malla usada como soporte.	90
Figura 33. Aislamiento de embriones de <i>Brugmansia candida</i> con el tamaño adecuado para ser transferidos desde el medio B5 sólido al medio B5 líquido.	93
Figura 34. Imágenes de raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> obtenidas en los ensayos correspondientes a la aplicación de ácido naftalenacético en adición al medio B5 usado en el cultivo (ensayo 1: 0 ppm durante 60 días, ensayo 2: 1 ppm durante 30 días, ensayo 3: 2 ppm durante 30 días, ensayo 4: 3 ppm durante 30 días, ensayo 5: 1 ppm durante 60 días, ensayo 6: 2 ppm durante 60 días, ensayo 7: 3 ppm durante 60 días).	96
Figura 35. Escopolamina producida luego de 60 días de cultivo de raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> por unidad experimental (frasco), para cada una de las condiciones de aplicación de ANA evaluadas.	98
Figura 36. Comportamiento de la conductividad del medio, a lo largo de 34 días, para el cultivo raíces normales de <i>B. candida</i> en Erlenmeyer.	99
Figura 37. Comportamiento del pH del medio a lo largo de 34 días, para el cultivo de raíces normales de <i>B. candida</i> en Erlenmeyer.	100
Figura 38. Comportamiento de la concentración de azúcares del medio, a lo largo de 34 días, para el cultivo de raíces normales de <i>B. candida</i> en Erlenmeyer.	101
Figura 39. Comportamiento del peso fresco de las raíces normales de <i>B. candida</i> (biomasa), a lo largo de 34 días de cultivo en Erlenmeyer.	101

Figura 40. Etapa de crecimiento exponencial de las raíces normales de <i>B. candida</i> cultivadas en Erlenmeyer durante 34 días.....	102
Figura 41. Concentración de Anisodamina y Escopolamina en las raíces normales de <i>B. candida</i> , cultivadas en Erlenmeyer a lo largo de 34 días.....	103
Figura 42. Relación entre el IC y el % de Ko, para el cultivo de raíces normales de <i>B. candida</i> usando medio B5 en Erlenmeyer.....	105
Figura 43. Relación entre el IC y el % de So, para un cultivo de raíces normales de <i>B. candida</i> desarrollado en Erlenmeyer usando medio B5. ....	106
Figura 44. Desgaste en las mangueras conductoras de medio, evidenciado en los cambios de diámetro de las mismas, ocasionado por las bombas peristálticas empleadas en el sistema de biorreacción adoptado para el cultivo de raíces de <i>Brugmansia candida</i> . ....	108
Figura 45. Comportamiento del pH del medio, para los 21 días de cultivo de raíces normales de <i>B. candida</i> en el sistema de biorreacción de dos unidades, caso I. ....	110
Figura 46. Comportamiento de la fuente de carbono presente en el medio, para los 21 días de cultivo de raíces normales de <i>B. candida</i> en el sistema de biorreacción de dos unidades, caso I.....	111
Figura 47. Crecimiento de las raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> en el reactor usando medio B5, temperatura ambiente y condición de oscuridad. Caso 1: Aireación en la unidad de crecimiento. ....	114
Figura 48. Crecimiento de las raíces normales en el reactor, usando medio B5, temperatura ambiente y condición de oscuridad. Caso 1: Aireación en la unidad de crecimiento.....	115
Figura 49. Comportamiento del pH del medio, para los 21 días de cultivo de raíces normales de <i>B. candida</i> en el sistema de biorreacción de dos unidades, empleando medio B5, temperatura ambiente y condición de oscuridad. Caso 2: Aireación en la unidad de control de medio. ....	117
Figura 50. Comportamiento de la concentración de azúcares del medio, para los 21 días de cultivo de raíces normales de <i>B. candida</i> en el sistema de biorreacción de dos unidades, empleando medio B5, temperatura ambiente y condición de oscuridad. Caso 2: Aireación en la unidad de control de medio. ....	118
Figura 51. Raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> producidas en el reactor, empleando medio B5, temperatura ambiente y condición de oscuridad. Caso 2: Aireación en la unidad de control de medio. ....	120

Figura 52. Perfil de los alcaloides para los clones de <i>B. candida</i> de origen argentino y colombiano. Estos clones se desarrollaron en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m <sup>2</sup> .....	123
Figura 53. Evolución del pH para el cultivo del clon Arg3, durante los 36 días de cultivo en Erlenmeyer. Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m <sup>2</sup> .....	125
Figura 54. Evolución de la conductividad para el cultivo del clon Arg3, durante los 36 días de cultivo en Erlenmeyer. Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m <sup>2</sup> .....	126
Figura 55. Evolución de la concentración de azúcares para el cultivo del clon Arg3, durante los 36 días de cultivo en Erlenmeyer. Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m <sup>2</sup> .....	126
Figura 56. Evolución de la biomasa para el cultivo del clon Arg3, durante los 36 días de cultivo en Erlenmeyer. Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m <sup>2</sup> .....	127
Figura 57. Evolución del peso fresco del clon Arg3, para los 36 días de cultivo en Erlenmeyer. Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m <sup>2</sup> .....	127
Figura 58. Relación entre el IC y el % de Ko, para un cultivo de raíces transformadas de <i>B. candida</i> (clon Arg3). Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m <sup>2</sup> .....	130
Figura 59. Relación entre el IC y el % de So, para un cultivo de raíces normales de <i>B. candida</i> (clon Arg3). Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de	

25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m <sup>2</sup> .....	132
Figura 60. Perfil de alcaloides para el clon Arg3 a lo largo de 36 días de cultivo de las raíces en Erlenmeyer. Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m <sup>2</sup> .....	134
Figura 61. Disminución en la conductividad y en la concentración de sacarosa para los 21 días de cultivo en el biorreactor del clon Arg3 correspondiente a raíces transformadas de <i>B. candida</i> . Caso I. Cultivo sumergido. ....	135
Figura 62. Raíces de <i>Brugmansia candida</i> transformadas (clon Arg3) obtenidas al interior y sobre la malla empleada como soporte en el reactor par el cultivo sumergido.....	136
Figura 63. Raíces de <i>Brugmansia candida</i> transformadas (clon Arg3) obtenidas al interior del reactor, sobre la malla empleada como soporte en el sistema de dos unidades. ....	140
Figura 64. Perfil de alcaloides para diferentes explantes de plantas de <i>B. candida</i> de origen colombiano y argentino cultivadas <i>in vitro</i> en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, a una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m <sup>2</sup> .....	146

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características del medio de cultivo para los diferentes tratamientos de aplicación de ANA sobre embriones y raíces de <i>Brugmansia candida</i> .....	70
Tabla 2. Resultados correspondientes al proceso de germinación de embriones de <i>Brugmansia candida</i> en medio B5 libre de hormonas.....	93
Tabla 3. Crecimiento de raíces de <i>Brugmansia candida</i> y producción de alcaloides en medio líquido, usando inóculos que provienen de cultivos sobre medio B5 sólido de dos edades diferentes (30 y 45 días).....	94
Tabla 4. Masa seca de raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> obtenida a partir del cultivo de los embriones, para cada una de las condiciones estudiadas de aplicación de ácido naftalenacético luego de 60 días.....	97
Tabla 5. Escopolamina extraída de raíces normales de <i>Brugmansia candida</i> en cada uno de los ensayos realizados, aplicando concentraciones de ácido naftaleancetico variando entre 0 y 3 ppm. ....	98
Tabla 6. Valores de IC y % de Ko evaluados a cada condición de tiempo durante los 34 días de cultivo de las raíces normales de <i>B. candida</i> en Erlenmeyer. ....	104
Tabla 7. Valores de IC y % de So evaluados a cada condición de tiempo durante los 34 días de cultivo de las raíces normales de <i>B. candida</i> desarrollado en Erlenmeyer.....	106
Tabla 8.Cálculo de la biomasa (PF de raíces de <i>Brugmansia candida</i> no transformada) en el reactor al final de cultivo de acuerdo con la concentración de azúcar, caso I.....	112
Tabla 9.Determinación de la biomasa en el reactor al final de cultivo de acuerdo a la concentración de azúcar, empleando medio B5, temperatura ambiente y condición de oscuridad. Caso 2: Aireación en la unidad de control de medio. ....	119
Tabla 10. Resultados correspondientes al proceso de germinación de embriones de <i>Brugmansia candida</i> en medio B5, luego del tratamiento con ácido giberélico. ....	121
Tabla 11. pH, conductividad y concentración de sacarosa en el medio de cultivo, y, de masa de raíces frescas para el clon Arg3 crecido en Erlenmeyers agitados, empleando medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, a una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m <sup>2</sup> .....	124

Tabla 12. Valores de IC y % de Ko evaluados a cada condición de tiempo durante 36 días de cultivo de las raíces transformadas de <i>B. candida</i> clon Arg3). Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m <sup>2</sup> .....	129
Tabla 13. Valores de IC y % de So evaluados a cada condición de tiempo durante los 36 días de cultivo de las raíces transformadas de <i>B. candida</i> (clon Arg3). Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m <sup>2</sup> .....	131
Tabla 14. Registro del contenido de escopolamina, anisodamina e hiosciamina en las raíces del clon Arg3 en Erlenmeyer durante 25 días de crecimiento. Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m <sup>2</sup> .....	133
Tabla 15. Alcaloides liberados al medio de cultivo durante los 21 días de crecimiento en el biorreactor del clon Arg3 correspondiente a raíces transformadas de <i>B. candida</i> . .....	136
Tabla 16. Contenido de alcaloides en las raíces transformadas de <i>B. candida</i> (clon Arg3) de acuerdo con su ubicación en el biorreactor al día final del cultivo.....	137
Tabla 17. Cálculo de la biomasa en el reactor al final de cultivo sumergido de las raíces transformadas de <i>B. candida</i> (clon Arg3) de acuerdo con la conductividad y la concentración de azúcar. ....	137
Tabla 18. pH, conductividad y concentración de azúcares en el medio de cultivo, para los 21 días de cultivo en el biorreactor de raíces transformadas de <i>B. candida</i> (Arg3). Caso II.....	138
Tabla 19. Alcaloides extraídos desde las raíces transformadas de <i>B. candida</i> (clon Arg3) obtenidas en el reactor al día 21 del cultivo. ....	139
Tabla 20. Cálculo de la biomasa en el reactor al final de cultivo de raíces transformadas de <i>B. candida</i> (Arg3) de acuerdo con la conductividad y la concentración de azúcares en el biorreactor de dos unidades. ....	141
Tabla 21. Comparación de los IC alcanzados por las raíces de <i>Brugmansia candida</i> al día 21 de cultivo, para cada uno de los ensayos.....	142
Tabla 22. Comparación de la concentración de escopolamina intracelular alcanzada por las raíces de <i>Brugmansia candida</i> al día 21 de cultivo, para cada uno de los ensayos. ....	145

Tabla 23. Perfil de alcaloides para las raíces normales y las líneas celulares de *Brugmansia candida* obtenidas de origen colombiano y argentino. Los clones se desarrollaron en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.....148

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad las plantas además de ser consideradas como fuente de alimento, han sido empleadas por sus propiedades terapéuticas en diversos tratamientos medicinales.

Es así como se han abierto las puertas a diferentes estudios sobre los compuestos presentes en ellas y las propiedades curativas que estos puedan llegar a tener.

Los estudios se han orientado por diferentes vías, que incluyen la clasificación del material biológico, las metodologías de extracción, purificación y caracterización de los compuestos de interés y las técnicas para producir de manera masiva determinadas compuestos.

Respecto a la producción de estos compuestos, se han buscado alternativas, que además de satisfacer las demandas del mercado, faciliten su producción, permitiendo disminuir tiempos y costos y evitando inconvenientes asociados a los cultivos agronómicos (disposición de suelos, alteraciones climatológicas, heterogeneidad de los cultivos, baja productividad, etc).

Dentro de las alternativas antes mencionadas, se encuentra el desarrollo de los cultivos *in vitro* como una opción que permite dar solución a muchos de los inconvenientes mencionados. A partir de estos cultivos, se han generado metodologías aplicadas a la producción de metabolitos secundarios, sustancias que son sintetizados por las plantas y que aparentemente no cumplen una función esencial dentro de ellas, aunque son las encargadas de las respuestas generadas debido a las interacciones con el medio.

Estos metabolitos secundarios, en muchos casos hacen parte de los compuestos activos con aplicaciones farmacéuticas que pueden ser producidos por las plantas de ahí que su estudio genere gran interés. Dentro de las drogas aisladas desde plantas algunas de las más importantes son el taxol, artemisina, glicósidos cardiacos, opio,  $\beta$ - sitoesterol, esteroides, alcaloides del tropano, camolina,

echinacea, alliina, linaza, ginseng, menta, mentol, ginger, vinblastina y vincristina (1-28)

En el caso particular que es objeto de estudio, se seleccionó una especie perteneciente a la familia de las Solanaceas, para mejorar la producción masiva de alcaloides del tropano.

La especie seleccionada fue la *Brugmansia candida*, que específicamente produce un grupo de alcaloides que incluye la escopolamina, la anisodamina y la hiosciamina, compuestos que poseen una amplia gama de aplicaciones dentro de la medicina, como agentes anticolinérgicos, antiespasmódicos, midriáticos, sedantes.

De acuerdo con estudios anteriores, se estableció que estos alcaloides eran sintetizados en las raíces de la planta y que luego viajan a través del xilema de ésta hasta ubicarse en sus hojas (29). Esta es la razón por la cual en la actualidad, la producción masiva de estos alcaloides, se da a través de la extracción de toneladas de hojas de cultivos de plantas que ya han alcanzado la madurez. Pero, debido las características desfavorables de los cultivos agronómicos antes mencionadas, continuamente se buscan alternativas para su producción que resulten más ventajosas.

Dentro de ellas, el cultivo *in vitro* de raíces se presenta como una buena opción. Hasta ahora, estos cultivos se han desarrollado a nivel de banco, y la producción de estos compuestos por esta vía es todavía muy limitada. Por esta razón, en este estudio se pretende hacer un acercamiento a la producción industrial por medio del uso de un biorreactor, que facilite el cultivo masivo de raíces y una mayor producción de alcaloides por parte de ellas (30-34).

Como hipótesis de trabajo se postuló la posibilidad de establecer un sistema de biorreacción, para la producción de escopolamina a partir del cultivo *in vitro* de raíces de *Brugmansia candida*, que permita realizar un posterior escalamiento.

Objetivo general:

- Establecer un sistema de obtención de escopolamina por medio del cultivo *in vitro* de raíces de *Brugmansia candida* a nivel de biorreactor.

Objetivos específicos:

- Estandarizar una técnica de producción de raíces de *Brugmansia candida in vitro* que permita la obtención de material homogéneo, para su posterior utilización como inóculo en el sistema de biorreacción.
- Adaptar un sistema de biorreacción para el cultivo de raíces *in vitro* de *Brugmansia candida* y para la producción de escopolamina.
- Estandarizar las técnicas de control y cuantificación requeridas para evaluar el funcionamiento del sistema de biorreacción.
- Establecer la técnica para la extracción y cuantificación de la escopolamina obtenida por el cultivo *in vitro* de raíces en el sistema de biorreacción construido.

## 1. ESTADO DEL ARTE

Dentro de este capítulo se exponen algunos aspectos teóricos relacionados con el tema de estudio.

De este modo, se inicia con una descripción del material biológico usado, la *Brugmansia candida*, indicando algunas de sus características físicas, y presentando la ruta de biosíntesis por medio de la cual esta especie sintetiza los alcaloides del tropano.

Respecto a estos alcaloides, se presenta una descripción de tres de ellos, la escopolamina, la hiosciamina y la anisodamina, mencionando aspectos relacionados a sus estructuras, algunas de sus propiedades, y en el caso particular de la escopolamina se ilustra su síntesis química.

Así mismo, se reseñan algunos aspectos sobre las metodologías usadas para producir este tipo de sustancias, consideradas como metabolitos secundarios, por medio de cultivos agronómicos y por cultivos *in vitro*.

Para terminar, se profundiza un poco en el tema de los cultivos *in vitro*, describiendo aspectos básicos relacionados a ellos, así como algunos de los desarrollos que se han realizado, para acercar este tipo de tecnologías a la producción industrial de metabolitos secundarios, mediante la adaptación de biorreactores en donde se pueda llevar a cabo su producción masiva.

### 2.1 CULTIVO DE PLANTAS COMO FUENTE DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS

Se estima que alrededor del mundo, 3 billones de personas continúan usando la medicina tradicional, basada en la utilización de plantas, como agentes bioactivos con propiedades curativas como tratamiento primario a diferentes enfermedades; de hecho, en países como Estados Unidos, el 25 % de las drogas prescritas contienen una sustancia activa aislada desde plantas. Esto hace que el estudio de éstas, como productoras de una amplia gama de moléculas generadas a partir de

sus metabolismos primario, o, secundario, se convierta en un campo abierto a la exploración para la obtención de nuevos y mejores medicamentos, alimentos funcionales, y otras sustancias con actividad biológica ya comprobada. (5, 35).

## 2.2 *Brugmansia*

El género *Brugmansia* junto a los géneros *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Hyoscyamus*, *Mandrágora* y *Scopolia* hacen parte de la familia de las Solanaceas, caracterizadas por ser productoras de alcaloides del tropano (36, 37).

En particular, a las plantas del género *Brugmansia* se les conoce vulgarmente como: borrachero, huacachi, huanto, chamico, campanilla, floripondio, cacao sabanero, tonga y toa. Dicho género, es nativo de Sur América y está compuesto por 8 especies: *B. arborea*, *B. aurea*, *B. candida*, *B. dolichcarpa*, *B. insignis*, *B. sanguinea*, *B. versicolor* y *B. vulcanicola*, todas ellas caracterizadas por crecer en forma de arbustos. De éstas, la *Brugmansia aurea* es la que se encuentra más distribuida en el continente, cruzándolo desde Colombia hasta el Norte de Chile, creciendo a altitudes comprendidas entre 2500 y 3000 m.s.n.m.; seguida por la *Brugmansia sanguinea*, nativa de Colombia y Perú y caracterizada por el llamativo color rojo de sus flores (38, 39).

Todas ellas se caracterizan por compartir junto con las especies de *Datura*, su uso potencial como fuentes de alcaloides del tropano (escopolamina, atropina e hiosciamina), alcaloides que a nivel médico tienen un amplio espectro de aplicaciones como anticolinérgicos, antiespasmódicos, midriáticos, etc. (31, 36).

Por ejemplo, la producción de alcaloides del tropano desde hojas secas de *B. sanguinea*, llevada a cabo en Ecuador, donde se producen 400 toneladas métricas de hojas por año. Estas hojas, tienen un contenido aproximado de 0.8% de escopolamina; la vida útil reportada de las plantaciones es de 10 años. Otro caso, está situado en Australia, en donde se cultivan híbridos de *B. candida*, para

producir hojas jóvenes con un contenido de escopolamina equivalente al 0,34 % de la masa de las mismas. La producción promedio en un cultivo no fertilizado fue de 4360 Kg de hojas secas por hectárea y por año, lo que se traduce en una producción de 14,8 Kg de escopolamina por hectárea cultivada y por año. Otros cultivos evaluados de *Duboisia*, reportan una producción de 15,7 Kg de escopolamina por hectárea cultivada y por año (38).

Estos reportes son un indicativo de las implicaciones que tiene la producción de estas sustancias por medio de cultivos agronómicos, y sugieren la búsqueda de alternativas para minimizar el consumo de suelos y de tiempo que está ligado a la producción de alcaloides aplicando esta metodología.

### 2.2.1 *Brugmansia candida*

Esta especie, conocida por ser un híbrido entre la *Brugmansia aurea* y la *Brugmansia versicolor*, es un arbusto de 3 a 5 m de alto, con abundantes flores solitarias pendulares, grandes y de color blanco alabastro, hojas muy variadas aovadas y lanceoladas (36, 40).



**Figura 1.** Flor de *Brugmansia candida*.

Respecto a la toxicidad de esta especie, el envenenamiento está asociado a su consumo directo y se evidencia por sus efectos alucinógenos, cuando se habla de dosis bajas, que pueden llegar a convertirse en serias alteraciones sobre el sistema nervioso central cuando la dosis se incrementa. Además, se ha considerado el efecto tóxico inducido por el desprendimiento de volátiles presentes en las hojas, o, en las flores, cuando estas se encuentran en espacios cerrados. Dichos compuestos incluyen la trans-oscimina (38 – 52 % de los volátiles totales), el 1,8- cineole (5 – 19 %), y algunos que están en menor cantidad como terpenoides, bencenoides y compuestos del tipo indol (40).

La toxicidad por consumo directo antes mencionada, está relacionada con la presencia de los alcaloides del tropano (escopolamina, hiosciamina, anisodamina y atropina) contenidos en la especie. Alcaloides, que extraídos de la manera adecuada, la convierten en una fuente potencial de diferentes ingredientes activos incluidos en formulaciones farmacológicas.

Además de los alcaloides mencionados, se ha reportado la presencia de otras sustancias como la cadaverina, en cultivos de raíces transformadas de *Brugmansia candida*. Esta sustancia es una poliamina que ha sido detectada también en el género *Datura*, que no se hace presente en la totalidad de los tejidos de la planta y que se obtienen únicamente como consecuencia de una respuesta a un factor de estrés (41).

### 2.3 ALCALOIDES DEL TROPANO

Los alcaloides incluidos en esta definición son aquellos cuya estructura contiene átomos de nitrógeno secundario, terciario y cuaternario. Algunos de ellos son producidos como metabolitos secundarios por algunas plantas y funcionan como fitoalexinas, es decir como sustancias implicadas en los mecanismos de defensa de algunas especies vegetales. Estos compuestos son reconocidos debido a su

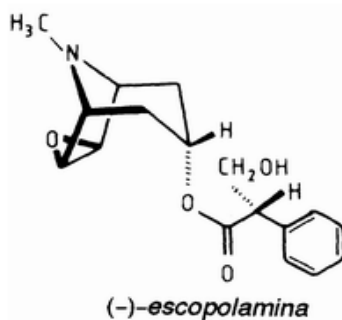
aplicación como estimulantes y narcóticos. Como ya se había mencionado, estas sustancias son producidas por diferentes especies pertenecientes a la familia *Solanacea* (42).

A nivel industrial los alcaloides del tropano pueden ser obtenidos básicamente por dos vías diferentes, la primera consiste en su extracción desde material vegetal directamente (comúnmente del género *Datura*), además de la obtención por medio de síntesis química. Esta última alternativa resulta ser menos viable, debido a sus elevados costos y su alto grado de dificultad.

### 2.3.1 Escopolamina

La escopolamina, que hace parte del grupo de alcaloides del tropano, es un compuesto heterocíclico con un centro sencillo quiral unido a un grupo MeOH, y se presenta como enantiomero de la hyoscina ((-) - escopolamina). Este esteroisómero (-) se encuentra presente en algunas plantas.

En la figura 2, se presenta la estructura química de esta molécula.



**Figura 2.** Estructura de la Escopolamina (Boswell, *et al.*, 1999).

En su fórmula molecular simple C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>, su peso molecular es de 303.06 g/mol. Y la distribución de sus componentes básicos es C: 67.31%, H: 6.98%, N: 4.62%,

O: 21.10%. La rotación óptica de la l-escopolamina es de  $-18^\circ$  en jarabe de etanol y  $-28^\circ$  en agua. Y su pKa está entre 7.55 y 7.8.

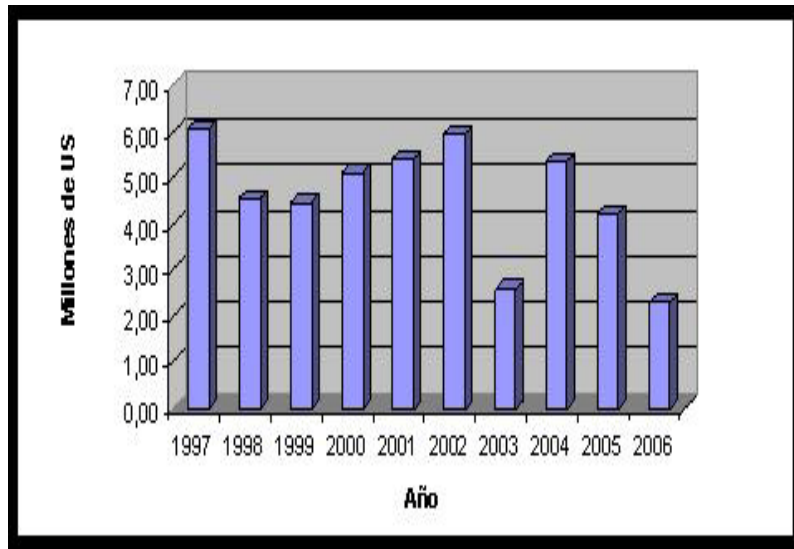
Puesto que este compuesto se descompone fácilmente, es común encontrarlo en la forma de un halógeno hidratado, normalmente esto se logra por su precipitación con HBr, o HCl. En el caso particular de la escopolamina hidrobromuro, la fórmula molecular del compuesto  $C_{17}H_{21}NO_4HBr \cdot 3H_2O$ , su peso molecular es 438.31 g/mol, su punto de fusión está entre  $194 - 197^\circ C$ , y su apariencia es la de un sólido blanco.

La importancia de la escopolamina radica en las aplicaciones farmacológicas que presenta, dado que es empleada en diferentes formulaciones que requieren su actividad biológica como anticolinérgico, broncodilatador, antihipertensivo, antimalárico, analgésico, midriático y citotóxico. La acción de este tipo de alcaloides es de dos tipos fundamentalmente, como anticolinérgica o parasimpaticolítica, que se manifiesta por bloqueo de la acción muscarínica de la acetil-colina (puede tener acción anti-secretoria, es decir, disminución de las secreciones glandulares, o antiespasmódica) y por su acción estimulante, o, depresora sobre el sistema nervioso central, según la concentración empleada (36, 39).

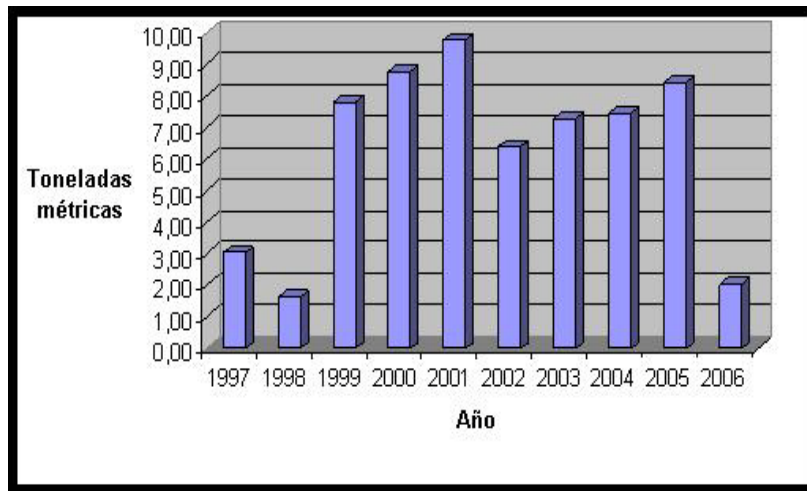
Dentro de las formulaciones comerciales que contienen escopolamina se encuentran: Buscopan <sup>TM</sup>, Hyospasmol <sup>TM</sup>, Lotanal <sup>TM</sup>, Oportunin <sup>TM</sup>, Scop <sup>TM</sup>, Scopoderm T <sup>TM</sup>, Spasmofen <sup>TM</sup>.

Según el registro Invima, en Colombia los medicamentos que contienen este tipo de ingrediente activo son la butil escopolamina (60 mg) y la metil escopolamina (12 mg), usadas para el tratamiento de los desordenes gastrointestinales y como antiespasmódicos. Además, la escopolamina en su forma simple es utilizada para controlar las náuseas, como agente hipnótico, sedante y midriático (Invima, 2006).

En Colombia las importaciones de escopolamina, sus sales derivados representan cifras importantes como se consignan en las figuras 3 y 4 (Mincomex, 2006).



**Figura 3.** Millones de dólares correspondientes a las importaciones de escopolamina, sus sales y derivados en el periodo comprendido entre 1997 y 2006 (Mincomex, 2006).

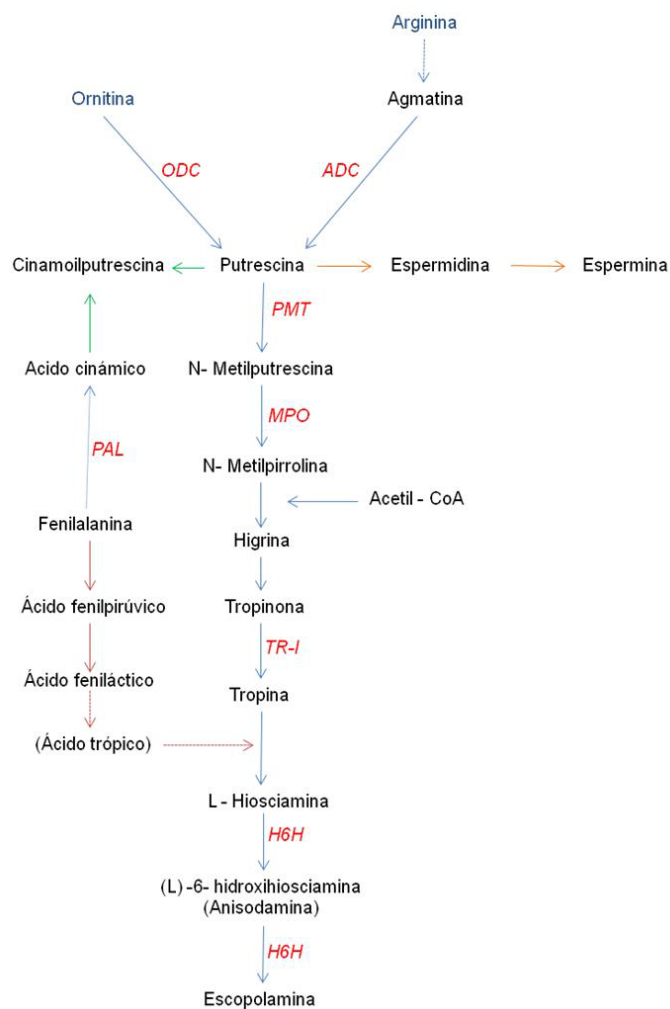


**Figura 4.** Toneladas métricas correspondientes a las importaciones de escopolamina, sus sales y derivados en el periodo comprendido entre 1997 y 2006 (Mincomex, 2006).

En las figuras 3 y 4, se aprecia que en promedio se importan por año 6.73 toneladas métricas de estas sustancias, que tienen un valor de aproximado de 4.86 millones de dólares.

La escopolamina que llega al mercado puede ser obtenida a partir de su extracción desde material vegetal, o, puede ser sintetizada químicamente.

En la figura 5, se presenta la ruta de biosíntesis, por medio de la cual este alcaloide es producido (36).



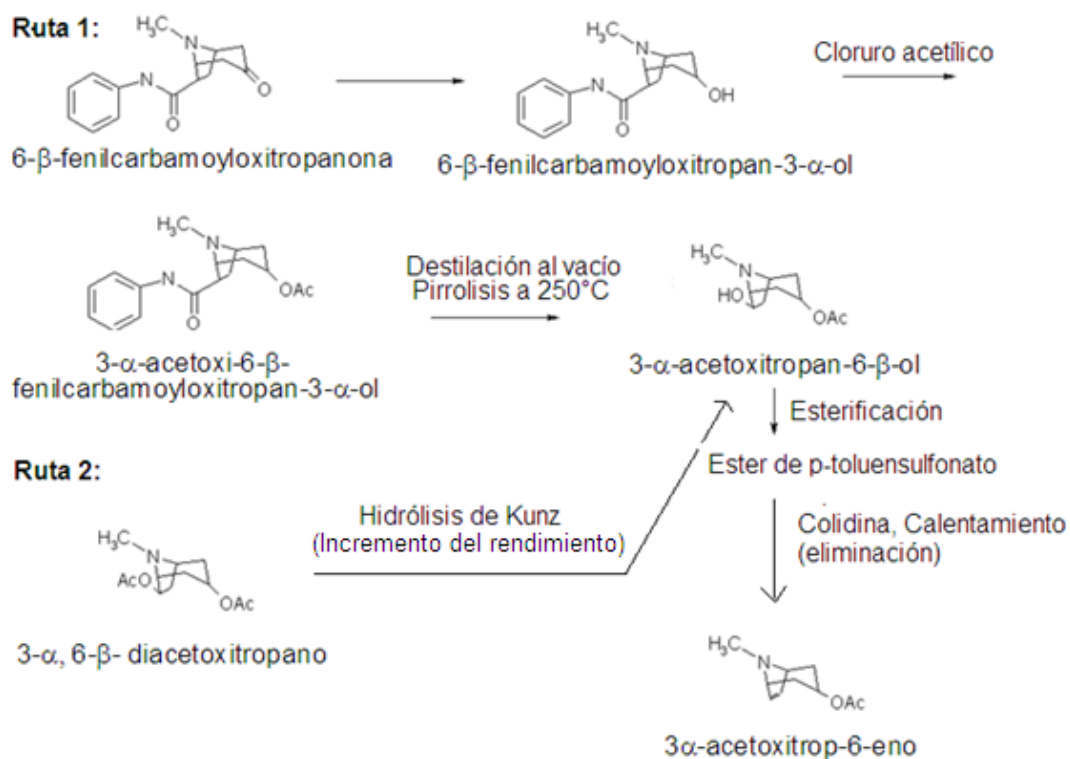
**Figura 5.** Ruta de biosíntesis de la escopolamina.

Al final de la ruta metabólica, se visualiza que la escopolamina es formada desde la hiosciamina vía 6- $\beta$ - hidroxihiosciamina por acción de la enzima bifuncional hiosciamina 6-  $\beta$  – hidroxilasa (H6H), es por esta razón que realizando manipulación del gen h6h se pueden controlar la expresión y distribución de los alcaloides del tropano (43).

Binotto (2001), presenta el primer reporte de aislamiento de escopolamina, en una mezcla con hioscina fue realizado por Albert Ladenburg, quien estudió algunos extractos aislados desde *Hyoseyamus*. De otro lado, la síntesis química de escopolamina fue propuesta por Fodor en 1957, quién propuso su obtención a partir del 3  $\alpha$ -acetoxitrop-6-eno, que puede ser obtenido por 3 rutas diferentes a través de algunos intermedios de los alcaloides.(44)

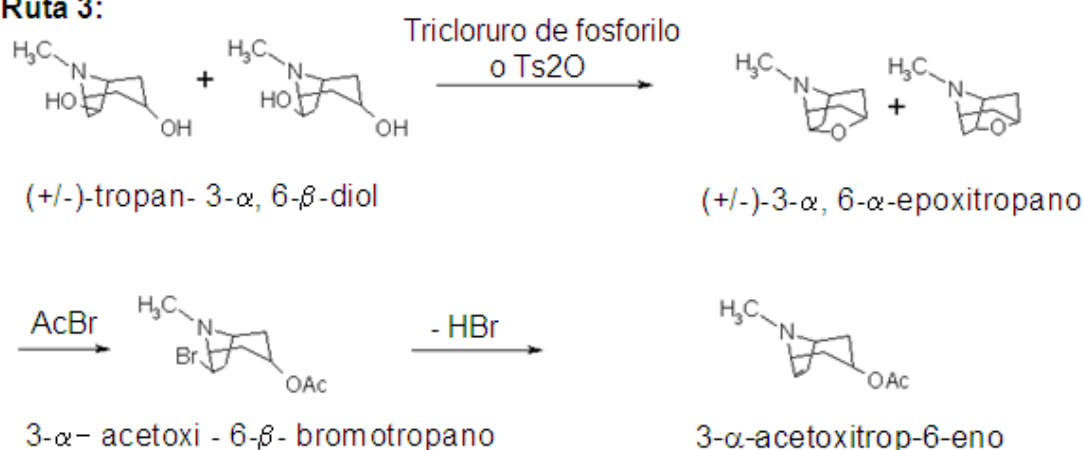
Por la primera ruta, la 6- $\beta$ - fenilcarbamoiloxitropanona es convertida a 6 -  $\beta$  fenilcarbamoiloxitropan-3- $\alpha$ -ol. El paso siguiente es la esterificación con acetilcloruro produciendo 3- $\alpha$ - acetoxo -6-  $\beta$ -carbamoiloxitropan-3- $\alpha$ -ol. Finalmente se realiza la purificación del compuesto por destilación al vacío y pirrolización a 250 °C.

Buscando hacer más eficiente el proceso, se sugirió una segunda ruta en la cual a partir de 3- $\alpha$ -,6- $\beta$ - diacetoxitropano se llega a 3- $\alpha$ -acetoxitropan-6-  $\beta$ -ol, por medio de la síntesis de Kunz. En ambos casos, el 3- $\alpha$ -acetoxitropan-6- $\beta$ -ol, es esterificado con p-tolueno ester sulfonato y tratado con colidina y calor para producir 3- $\alpha$ -acetoxitrop-6-eno por eliminación. Ver figura 6.



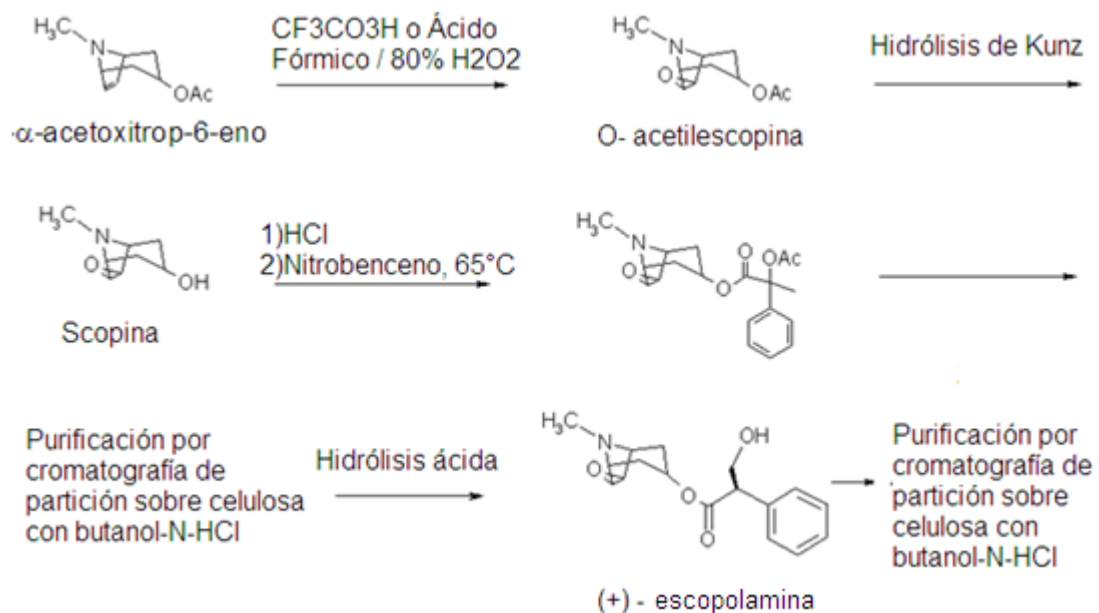
**Figura 6.** Obtención de 3 $\alpha$ -acetoxitrop-6-eno por dos rutas.

En una tercera ruta, la producción de éste compuesto se da a partir de una reacción de deshidratación del tropano -3 $\alpha$ - 6 - $\beta$  –diol, usando como catalizador Ts<sub>2</sub>O, o, PCl<sub>3</sub> para formar un epóxido entre los carbonos 3 y 6 sobre el anillo del tropano. Posteriormente se adiciona acetil bromuro en colidina y dietil anilina, cortando el puente epóxido, para producir 3-  $\alpha$ - acetoxi- 6-  $\beta$ - bromotropano. A partir de éste, por una reacción de dehidrobrominación, se produce 3- $\alpha$ -acetoxitrop-6-eno. Ver figura 7.

**Ruta 3:**

**Figura 7.** Síntesis de 3- $\alpha$ -acetoxitrop-6-eno por la tercera ruta propuesta.

En todos los casos, el 3- $\alpha$ -acetoxitrop-6-eno, se pone en contacto con ácido trifluoro-per-acético ( $\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$ ), o, ácido fórmico y una solución al 80% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , para romper los dobles enlaces entre los carbonos C6 y C7 de los anillos del tropano formando O-acetilescopina. Posteriormente la O-acetilescopina es convertida a escopina por la remoción del grupo Ac vía hidrólisis de Kunz, y luego se realiza un tratamiento con HCl y nitrobenzono a  $65^\circ\text{C}$  que permite la remoción de los grupos acetilo y la conversión a (+)-escopolamina. Finalmente, se proponía un paso de purificación por cromatografía de partición eluyendo con butanol-N-HCl sobre celulosa. Ver figura 8.



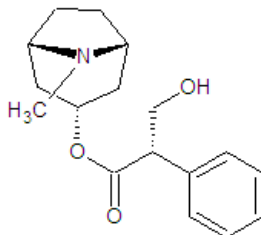
**Figura 8.** S\u00edntesis de escopolamina a partir de 3- $\alpha$ -acetoxitrop-6-eno.

Debido a la dificultad impl\u00edcita en estos procesos de s\u00edntesis y los elevados costos que genera la purificaci\u00f3n de los compuestos, se plantea como mejor alternativa su obtenci\u00f3n por medio de la extracci\u00f3n de especies vegetales productoras de los mismos.

### 2.3.2 Hiosciamina

Este alcaloide es antagonista competitivo de la acetil colina, desplazando al mediador a nivel de receptores. Por ello manifiesta su capacidad de bloquear los \u00f3rganos que reciben inervaci\u00f3n parasimp\u00e1tica. La hiosciamina es m\u00e1s activa y t\u00f3xica que la atropina. Igualmente, es un agente midri\u00e1tico muy potente. Su obtenci\u00f3n, b\u00e1sicamente se da a partir de dos especies productoras de \u00e9steres del tropanol, que son *H. muticus* y *D. leichardtii* (30, 45).

En la figura 9, se presenta la estructura química de este compuesto.

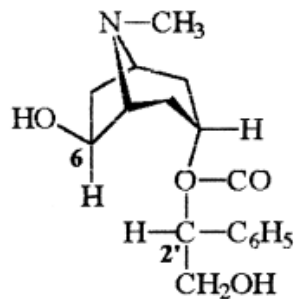


**Figura 9.** Estructura de la Hiosciamina.

### 2.3.3 Anisodamina

La anisodamina, es un alcaloide del tropano, caracterizado por ser el intermediario entre la hiosciamina y la escopolamina, de acuerdo a la ruta de biosíntesis antes presentada. Esta sustancia, ha despertado interés por su amplia gama de aplicaciones terapéuticas que incluyen el control de shock tóxicos, sépticos, envenenamientos con organofosforados, el tratamiento de enfermedades micro vasculares, glomerulonefritis, artritis reumatoide, cólicos gastrointestinales, enteritis necrótica hemorrágica y eclampsia (43, 46-50).

Anteriormente, se ha aislado de diferentes plantas pertenecientes a la familia Solanaceae, que incluyen *Hyoscyamus niger* L., *Anisodus tanguticus*, *Scopolia tangutica*, *Scopolia tangutica* Maxim, *Atropa belladonna* y algunas especies de *Datura* (49-57).



**Figura 10.** Estructura de la anisodamina (58).

## 2.4 OBTENCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS A PARTIR DE ESPECIES VEGETALES

Considerando los procesos de biosíntesis, como la alternativa más adecuada para la producción de algunos metabolitos secundarios, extraídos a partir de plantas procedentes de cultivos agronómicos, es necesario tener en cuenta algunos factores que pueden llegar a convertirse en desventajas a la hora de desarrollar procesos para su producción masiva. Entre estos se encuentran:

- La utilización de suelos para la producción de plantas completas y el tiempo que implica que éstas alcancen la madurez necesaria para ser productoras de los metabolitos.
- Los problemas asociados con el suministro, heterogeneidad, transporte y almacenamiento del material vegetal.
- Las constantes variaciones climáticas que pueden desencadenar daños irreparables a los cultivos.
- El ataque de algunas plagas que afecta la calidad del material vegetal.

Estos inconvenientes han dado lugar a la búsqueda de nuevas alternativas para su obtención, orientados a una producción comercial a gran escala.

Es este sentido, se emplea el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* como una estrategia importante para superar los inconvenientes antes mencionados.

#### 2.4.1 Cultivos *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios

Este tipo de cultivos comprende un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal: protoplasto, célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. A través de ellos es posible estudiar la fisiología, la genética y la bioquímica de las plantas, investigar los procesos de bioconversión y producción de compuestos útiles (metabolitos secundarios), incrementar la variabilidad genética de una especie, obtener plantas libres de patógenos, propagar, conservar e intercambiar germoplasma (59).

Dependiendo del explante y de las condiciones de cultivo, las células pueden preservar su estado de diferenciación bioquímica y morfológica, o retornar a su estado embriogénico no diferenciado. De ahí la importancia de una de sus características más importantes, la totipotencialidad, su capacidad de poseer y expresar el potencial genético total (formar el cuerpo completo y fértil de una planta) a partir de un explante cualquiera (6).

De hecho, aplicando los desarrollos alcanzados en el tema, se ha logrado establecer el cultivo de callos y células en suspensión de una gran variedad de especies productoras de metabolitos secundarios; sin embargo, no en todos los casos los rendimientos han sido comparables a los obtenidos a partir de plantas cultivadas en campo.

#### 2.4.2 Cultivos *in vitro* de órganos de especies vegetales para la producción de metabolitos secundarios

Debido a la relación que existe entre la diferenciación de las células vegetales y la producción de algunos metabolitos secundarios como consecuencia de la misma, se han estudiado procesos que involucran el cultivo específico de determinados órganos o conjuntos de células especializadas. En un caso como la producción de alcaloides del tropano, en donde estos alcaloides son sintetizados específicamente en raíces, se han buscado diferentes alternativas que permitan establecer de manera estable y productiva este tipo de cultivos. Dentro de ellas se ha estudiado la organogénesis directa por aplicación de factores de crecimiento a los medios de cultivo y la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*.

Sin embargo, debido a los bajos niveles de metabolitos obtenidos en algunos cultivos, ha sido necesario aplicar diferentes estrategias tendientes a incrementar la productividad de los procesos a nivel *in vitro*, entre ellas se cuentan: el estudio de medios de cultivo, la aplicación de diferentes concentraciones de fitorreguladores y las condiciones de cultivo, como luz, temperatura, etc., logrando en algunos casos, aumentar la producción de los mismos (46, 60-67).

#### 2.4.3 Efecto de la aplicación de factores de crecimiento (hormonas) sobre cultivos *in vitro*

La regulación de las actividades intracelulares en plantas puede controlarse mediante el uso de diferentes hormonas que interactúan con proteínas receptoras y específicas formando complejos activos. Tales hormonas pueden clasificarse en cuatro grupos: auxinas, citoquininas, giberelinas, y el etileno y el ácido abscísico (ABA). A su vez estos grupos pueden ser divididos en dos: el de las hormonas estimuladoras del crecimiento (hormonas relacionadas con la división celular, la elongación de las células, la organogénesis y diferenciación) entre el que se

incluyen las auxinas, las citoquininas y la giberelinas y el de las inhibidoras del crecimiento o antagonistas como el ABA y el etileno (59).

Sin embargo, es de aclarar que del balance hormonal y de la concentración de cada una de las hormonas que se aplique a un cultivo específico, dependen los resultados obtenidos como respuesta. Por ejemplo, en el caso específico de las auxinas, que estimulan la elongación de las células, se ha demostrado que concentraciones bajas estimulan el crecimiento de las raíces, mientras que concentraciones más altas pueden inhibir esta respuesta.

## 2.5 PRODUCCIÓN DE ESCOPOLAMINA POR CULTIVO *IN VITRO* DE RAÍCES

En el caso particular de este alcaloide, es importante mencionar que los sitios de síntesis y acumulación de la escopolamina varían dependiendo de factores como: el tipo de especies usadas, el material vegetal disponible para la extracción (hojas, segmentos de tallo, raíces, células, etc.), edad del material vegetal, tipo de cultivo (agronómico, *in vitro*), entre otros.

Puesto que este alcaloide es sintetizado en las raíces de especies como la *Brugmansia candida*, se han desarrollado estudios sobre su producción tratando de obtener líneas altamente productoras de escopolamina. Los cultivos de tejidos diferenciados de algunas *Solanaceae* producen escopolamina en concentraciones similares, o, mayores que en otros órganos de la planta completa (46, 60, 62, 64).

Sin embargo, el cultivo *in vitro* de raíces convencional, presenta algunas desventajas cuando es usado para este fin, entre ellas se encuentran:

la velocidad de producción de biomasa es lenta.

requiere de auxinas para su crecimiento, lo cual en algunos casos provoca una disminución en el contenido de alcaloides.

dificultad para mantener la estabilidad en cultivo.

la baja estabilidad en la producción de metabolitos secundarios.

Para superar estos inconvenientes, se ha reconocido el potencial que representa el cultivo de raíces transformadas, como herramienta para la obtención de productos vegetales que son sintetizados en la raíz (68-70).

Esta transformación se logra al infectar células de una planta con la bacteria *Agrobacterium rhizogenes*. En el proceso de infección se transfiere al genoma de la planta un segmento del plásmido Ri (Root inducing) contenido en la bacteria. Este proceso origina la formación de raíces pilosas en el sitio de la infección (71, 72, 73).

Este fenotipo de raíces pilosas (hairy roots) se caracteriza por tener una mayor estabilidad en cultivo y por crecer a velocidades mayores que las raíces normales. Reportes previos demuestran que los cultivos de raíces transformadas de *Nicotiana spp.*, *Beta vulgaris* (69), *Atropa belladonna* (70), *Hyoscyamus muticus* (68) y *Panax ginseng* (74), producen alcaloides de manera cualitativa y cuantitativamente semejante a la del patrón de la planta cultivada agronómicamente de la que provienen. Sin embargo, no se puede generalizar que para todas las especies se cumpla esta misma premisa.

Algunos de los estudios sobre la producción de escopolamina, son reportados por García (1986), describiendo diferentes investigaciones sobre la producción de alcaloides del tropano a partir del cultivo *in vitro* de tejidos de *Datura*. En su trabajo, se señala que Chan y Staba (1965) desarrollaron estudios sobre su producción en callos y células en suspensión de *Datura*, encontrando que la hioscina era el principal alcaloide presente en este tipo de cultivos. Luego Staba y Jindra (1968), estudiaron el efecto de la iluminación en los cultivos de callos y reportaron que los tejidos que contienen clorofila crecían más rápido y que

concentraciones altas de manganeso en el medio de cultivo estimulaban la producción de alcaloides menores (36, 75, 76).

Posteriormente, Romeike y Klobitz (1970), concluyeron que los cultivos de callos obtenidos de hojas y semillas de *Datura* presentaban una menor cantidad de alcaloides cuando se usaba una única fuente de nitrógeno. Así mismo, Hiraoka (1974), sugirió que la glucosa era la fuente de carbono que favorecía el crecimiento de la biomasa en los cultivos, aunque la mayor producción de alcaloides se daba en un medio con 3% de sacarosa (60, 77).

Más adelante, Lindsey y Yeoman (1983), indicaron que el contenido de alcaloides en cultivos de *Datura* disminuía al aumentar el crecimiento y la friabilidad de las células empleadas para su producción (61).

Además de describir los trabajos anteriores, García (1986) realizó algunos experimentos que le permitieron obtener extractos de callos de diferentes especies de *Brugmansia*, cultivados durante 7 semanas encontrando en ellos un contenido total de alcaloides entre 0.001% y 0.01 % con su método de extracción.

Continuando con estos experimentos, Trujillo y Berdugo (1989) concluyeron que la mejor condición para inducir la producción de callo a partir de explantes de *B. arborea*, *B. candida* y *B. sanguinea*, incluía oscuridad, medio M&S adicionado con 0.5 mg/l de 2,4 D y 2 mg/l de Kinetina. Además reportaron que no se lograba la inducción de raíces en explantes de hojas ni en callos de *B. arborea*, *B. candida* y *B. sanguinea* cultivados en luz y oscuridad y con diferentes concentraciones de reguladores. Estos investigadores identificaron en sus cultivos la presencia de atropina, escopolamina y otros dos alcaloides no identificados. reportaron un contenido de escopolamina entre diez y cuarenta veces mayor que el de atropina, variando entre 0.0052% y 0.084% (37).

Ramírez y Suárez (1993), estudiaron la producción de escopolamina en plantas del género *Brugmansia* de diferente procedencia y definieron el medio de cultivo para generar la mayor cantidad de alcaloides. Encontraron, que el medio ambiente donde se desarrollan las plantas, ecotopo, determina la producción de alcaloides en la raíz. Establecieron que de los lugares evaluados, las plantas provenientes de Choachí, Cundinamarca, eran las que poseían una mayor cantidad de alcaloides. Así mismo, sugirieron que el medio de cultivo que más favorecía la producción de éstos era el de White y Bonner (W&B). La cantidad de escopolamina liberada al medio fue de 6.79 mg/g de raíz seca (78).

Otros trabajos han evaluado el contenido de escopolamina e hiosciamina en diferentes órganos de la especie *Datura stramonium*, observando las diferencias en las concentraciones de algunos alcaloides en plantas de diferentes edades. Como resultado, se ha establecido que la hiosciamina es el componente presente en mayor proporción en todos los casos. Y que en las raíces, la escopolamina únicamente se encuentra presente en las plantas más jóvenes ( $0,014 \pm 0,004$  mg/g de raíz fresca) (79).

Como ya se había mencionado, se ha planteado el uso de raíces modificadas para la producción de alcaloides del tropano. Es así, como se ha estudiado el uso de *B. candida* y una cepa de *A. rhizogenes* LBA 9402, buscando estrategias para preservar la morfología normal de las raíces sin alterar la producción de alcaloides. De los resultados presentados se puede inferir que para lograr dicha estabilidad es necesario: a) mantener bajas las concentraciones de nutrientes minerales y de sacarosa evitando el estrés osmótico sobre las raíces, b) emplear antiauxinas en condiciones controladas, c) mantener las raíces en medio sólido antes de iniciar los procesos de producción de los alcaloides en medio líquido. Además el trabajo sugiere que se debe desarrollar el proceso en dos etapas, una inicial con bajas concentraciones de sacarosa para la producción de biomasa y una segunda incrementado la concentración de sacarosa, para la producción de

alcaloides. Para raíces de *Brugmansia candida* obtenidas y mantenidas de acuerdo a las condiciones expuestas, se ha observado que en el cultivo de las mismas en Erlenmeyer, la producción de biomasa se incrementa cuando existe agitación, sin embargo este mismo factor, afecta negativamente la producción de alcaloides. Igualmente se observó un máximo en la producción de escopolamina e hiosciamina al día 20 del cultivo. Los valores reportados para la producción de escopolamina a los 20 días de cultivo son de 0,4 y 0,780 mg/g de raíz fresca para cultivos con y sin agitación respectivamente (31, 80).

La especie *Hyoscyamus muticus*, también ha sido sometida a transformación con *Agrobacterium rhizogenes*, obteniendo líneas celulares como la KB7, con la que se ha alcanzado una producción de escopolamina de 1,52 mg/g de raíz seca, luego de 28 días de cultivo en Erlenmeyer (81).

Otros estudios como el de Flores (1993), han presentado otras propuestas como el estudio de raíces foto-autotróficas de *Datura stramonium*, a las que se les aplicó luz y CO<sub>2</sub> y que producían escopolamina alcanzando rendimientos que oscilaron entre 0,013 y 0,049% (en base seca) (82).

Así mismo se ha realizado la transformación de híbridos como lo es el caso específico del híbrido de *Duboisia* obtenido a partir de *Duboisia myoporoides* x *Duboisia leichardtii*, del cual se han evaluado 7 clones, obteniendo que la línea celular número 22 es la mayor productora de escopolamina (13 mg/g de raíz seca), luego de 4 semanas de cultivo (83). De igual manera, este híbrido ha sido sometido a otro tipo de transformación buscando sobre-expresar la enzima PMT y H6H. En el caso de la enzima PMT, las líneas celulares A4 y PMT han sido las que permiten obtener mayores producciones de escopolamina 15 y 12,5 mg/g de raíz seca respectivamente, luego de 4 semanas de cultivo (84). Para el caso de la enzima H6H la línea celular, H6H-2 es la que ha permitido obtener mayores rendimientos en cuanto a escopolamina, permitiendo alcanzar concentraciones de

12,051 ± 0,109 mg/g (base seca) y 3,973 ± 0,032 mg/g (base seca) en hojas y raíces respectivamente (43). A este respecto, también se presentan trabajos con otras especies como lo es la *Nicotiana tabacum* que ha sido sometida a transformación con *Agrobacterium rhizogenes* con el doble propósito de generar las raíces pilosas, y modificar la actividad de la enzima H6H. En este caso se obtuvo el clon H6H-101 como el mayor productor de escopolamina, siendo capaz de alcanzar rendimientos de 11,0 ± 0,3 g/l de medio luego de 4 semanas de cultivo en Erlenmeyer (85).

Desde el momento en el cual se ha contado con material transformado, que crece rápidamente y produce una cantidad de alcaloides representativa, aparece la necesidad de estudiar las técnicas para llevar a cabo una producción masiva de estas sustancias empleando biorreactores. A este respecto, se presenta un estudio en donde se usa un reactor dual para obtener escopolamina por cultivo de *Atropa belladonna* y *Duboisia*, logrando rendimientos de 0,25 mg/g de raíces secas. En el diseño empleado, se usó periódicamente una turbina Rushton para causar daño a las raíces, generándoles estrés, con el fin de incrementar la producción de los alcaloides (33).

A nivel de biorreactor, también se puede mencionar un estudio sobre la producción de escopolamina en raíces transformadas de *Datura metel*, cultivadas en un reactor airlift de 4 l, en donde se observó que el cambio de escala desde el nivel de Erlenmeyer no afectó la producción de dicho alcaloide. En este caso la línea celular que permitió producir la mayor cantidad de escopolamina luego de 4 semanas (4,0 mg/g de raíz seca) fue la L25 (86). A nivel de biorreactor, también se han establecido cultivos de *Scopolia parviflora*, evaluando el efecto de la densidad del inóculo y la aireación en una columna de burbujeo de 0,3l de capacidad usada para el crecimiento de raíces transformadas. De las dos variables estudiadas fue la aireación la que afectó en mayor grado el crecimiento de las raíces y la producción de alcaloides, la mejor condición de las probadas fue 0,4 vvm, 3 g de

inóculo y 15 días de cultivo. Para este caso, la concentración de escopolamina obtenida fue de 1,82 mg/g de raíz seca (87).

Teniendo en cuenta que para mejorar la producción de los alcaloides en los biorreactores es necesario partir de unas condiciones óptimas, existen diversos estudios que analizan la influencia de los factores involucrados en los cultivos sobre la generación de biomasa y la producción de metabolitos. De este modo, se ha evaluado el efecto de la aireación sobre cultivos de raíces de *Atropa belladonna* en frascos, en donde se ha observado que una aireación cercana a 1 vvm tiene un efecto positivo sobre la distribución de los alcaloides del tropano en el cultivo, generando incrementos en la escopolamina acumulada en las raíces sobre la hiosciamina, en este caso se produjo 1mg de escopolamina / g de raíz seca. También se estableció que un déficit de oxígeno puede inducir la liberación de alcaloides al medio de cultivo, puesto que la actividad de la enzima H6H se incrementa a medida que se incrementa la presencia de oxígeno molecular.

Así mismo, se ha estudiado la influencia de diferentes elicitores bióticos y abióticos (ácidos salicílico, nitrato de plata, extracto de levadura, cloruro de calcio) sobre el perfil de alcaloides del tropano obtenidos por cultivo de raíces modificadas de *Brugmansia candida*, concluyendo que el ácido salicílico incrementa la producción de escopolamina e hiosciamina, el nitrato de plata, favorece únicamente la producción de escopolamina y su acumulación en las raíces, el extracto de levadura aumenta el contenido intracelular de ambos alcaloides y finalmente, el cloruro de calcio genera problemas al crecimiento de las raíces (88).

Dentro de los estudios realizados con elicitores, también se cuentan las pruebas realizadas con bacterias sobre cultivos de raíces adventicias de *Scopolia parviflora* (procedente de Korea) para la producción de escopolamina. En ese caso se emplearon las cepas *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1750, *Bacillus cereus* KCTC 1012, y *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, como elicitores, estableciendo

que su aplicación afectaba el perfil de alcaloides del tropano obtenidos, incrementando la concentración de escopolamina (89).

También se ha evaluado el efecto elicitor del metil jasmonato y el ácido salicílico sobre cultivos de raíces de *Scopolia parviflora*, de donde se ha concluido que el uso del metil jasmonato genera un incremento en la concentración de escopolamina e hiosciamina, generando una creciente inhibición sobre el crecimiento de las raíces, mientras que la aplicación de ácido salicílico permite incrementar la producción de escopolamina sin alterar el crecimiento de biomasa. Además, en este estudio se infirió que estas dos sustancias regulan la expresión de las enzimas PMT y H6H y por tanto la biosíntesis de los alcaloides del tropano y su liberación al medio de cultivo. En este caso, se logró producir un máximo de escopolamina de 0,703 mg/g de raíces secas (90).

Sobre la producción de escopolamina por cultivo de raíces normales de *Brugmansia candida*, se ha estudiado la aplicación de ANA (ácido naftalenacético), en cultivos desarrollados en Erlenmeyer, observando que esta estrategia permite alcanzar una producción máxima de escopolamina al día 24 con un valor igual a  $3,94 \pm 0,01$  mg/g de raíz seca (32).

Piñeros (2005), realizó estudios sobre la producción *in vitro* de escopolamina en cultivos de raíces de *Brugmansia candida* concluyendo que:

- El protocolo más adecuado para la desinfección del material vegetal para el cultivo de raíces consiste en: sumergir los frutos en hipoclorito de sodio al 5% por 5 minutos y luego las semillas sin la cubierta en hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos, y por último sumergirlas en etanol al 70% por 10 minutos.
- Es posible obtener escopolamina mediante el cultivo de raíces de *B. candida* empleando medio B5 (Gamborg), suplementado con 20 g de

sacarosa/l y en condiciones de oscuridad. Con una velocidad de agitación orbital de 70 rpm y una temperatura de 20 °C.

- La aplicación de ANA (ácido naftalénacético) como auxina, en el medio donde se desarrollan los embriones zigóticos, no favorece el crecimiento de las raíces ocasionando la atrofia de las mismas.
- La aplicación de elicitores (ácido jasmónico, ácido salicílico y sulfato de cobre) favorece la liberación al medio de cultivo de los alcaloides. De las sustancias probadas, el sulfato de cobre 0.2 mM, aplicado durante 24 horas sobre las raíces a los 24 días de cultivo, fue el que mejor resultados presentó.
- En este trabajo se alcanzó una productividad de 7.582 mg de escopolamina / g de raíces secas por medio de la aplicación de elicitor (39).

Estudios de este tipo sobre plantas del género *Solanacea* como la *Atropa*, *Datura*, *Duboisia*, *Hyosciamus*, y *Scopolia*, han permitido llegar al establecimiento de técnicas para la cuantificación de los alcaloides, como la separación por cromatografía líquida. Ejemplo de ello, es el trabajo realizado con *Datura innoxia* y *Atropa belladonna*, en el cual se ha determinado que el uso de columnas C18 en fase reversa permiten alcanzar una recuperación de alcaloides superior al 96%. Los clones evaluados en este trabajo reportaron contenidos de escopolamina de  $1,89 \pm 0,175$  (clon 410-D *Datura innoxia*) y  $0,230 \pm 0,030$  mg/g de raíz seca (clon *Atropa belladonna*) (91). En otro trabajo, se evaluaron diferentes metodologías para la extracción de los alcaloides, probando tratamientos con cloroformo, diclorometano, metanol y amoniaco, que han permitido establecer que no existen diferencias significativas debido al uso de estos solventes en cuanto a los rendimientos de la extracción, la especie con la evaluación fue *Atropa belladonna*, y la concentración de escopolamina obtenida en raíces transformadas de la misma fue de 3,25 a 3,53 mg/g de raíz seca (92).

Dentro de las técnicas de separación de los alcaloides también se ha estudiado el uso de la electroforesis capilar acoplada a un sistema de detección por quimioluminiscencia, que ha permitido separar atropina, escopolamina y anisodamina en extractos de *Flos daturae*, estableciendo que en esta especie la concentración de escopolamina es de 4,5 mg/g (base seca) (93).

Estas técnicas, han permitido comparar el potencial de diferentes especies y permiten verificar la influencia de los factores asociados a los cultivos, de modo que se puede trabajar en pro de mejorar los rendimientos de los mismos con miras a su producción industrial (91).

## 2.6 CULTIVO DE RAÍCES EN BIORREACTOR

Inicialmente los cultivos de órganos vegetales son llevados a cabo en frascos, con volúmenes de medio pequeños y probando los efectos de diferentes variables sobre el cultivo, hasta establecer las mejores condiciones para el mismo. Las condiciones deben permitir un balance adecuado entre la generación de biomasa y la producción del metabolito buscado. Luego de dar este paso, se busca llevar los procesos viables a una escala de producción mayor, pasando de los frascos al biorreactor.

Es necesario considerar que cuando se da este paso, se presentan ciertas limitaciones principalmente asociadas a problemas de transferencia de masa (oxígeno, nutrientes, etc.) y homogeneidad de las células del cultivo. Estos inconvenientes pueden conducir a la generación de estrés y en algunos casos a la lisis celular generando la pérdida del cultivo (94, 95).

Como ejemplo de este problema, se tiene el daño que las raíces presentan cuando se emplean agitadores mecánicos y mallas de acero inoxidable en los biorreactores, elementos que bajan los rendimientos en cuanto a metabolitos

debido al daño generado sobre el cultivo. Para evitar esta situación, se ha pensado en cultivos donde se emplee una matriz de soporte más afin a las raíces para inmovilizarlas (96).

Al igual que para la producción de microorganismos, los procesos de cultivo se pueden llevar a cabo por lotes, lote alimentado y continuo, orientando el proceso. De acuerdo con la relación que exista entre el crecimiento, la síntesis y la eliminación o no al medio de cultivo de los metabolitos. Por ejemplo, en el caso de un metabolito cuya producción se dé una vez finalizada la etapa de crecimiento de la biomasa, se debe considerar un proceso de dos etapas, donde la primera incluya un biorreactor diseñado para el crecimiento de la biomasa y la segunda un equipo empleado para la producción del metabolito.

Así mismo, cuando la producción del metabolito está asociada al crecimiento de la biomasa, un biorreactor de una etapa es suficiente para el crecimiento de las células y la recuperación de las moléculas al mismo tiempo. De otro lado, cuando los metabolitos son intracelulares, es necesario considerar una etapa de extracción de esas sustancias desde las células, que puede facilitarse empleando procesos por lote, o, lote alimentado. En estos casos también pueden adicionarse sustancias que promuevan la liberación de los metabolitos desde los tejidos hacia al medio de cultivo.

Cuando la producción del metabolito sea extracelular, se evita la destrucción de la biomasa para su obtención, ya que éste pueden tomarse directamente del medio, lo que resulta característico de sistemas continuos en donde se alcanzan mayores productividades que en sistemas por lotes (97).

Además de estas técnicas empleadas para la producción de metabolitos secundarios por cultivo de células, segmentos nodales y raíces, se ha venido estudiando la posibilidad de obtenerlos mediante el uso de cultivos hidropónicos,

los cuales combinan la permeabilización natural y forzada con resultados prometedores. Como ejemplos se presenta los casos del cultivo hidropónico de *Datura* y *Taxus*, demostrando que es posible usar este tipo de cultivos como herramienta clave para la producción a escala industrial de metabolitos (34).

Resumiendo, la producción de metabolitos en biorreactor está sujeta a ciertos factores, entre los que se encuentran:

- Reguladores del crecimiento, especialmente auxinas y citocianinas, que inducen la dediferenciación celular y promueven la proliferación *in vitro*. El efecto de estas sustancias varía entre las especies y de producto a producto. Las giberelinas, por ejemplo, son usadas como fitohormonas para estimular los procesos de germinación. Para aplicaciones prácticas en la producción de metabolitos, es deseable realizar el cultivo sin la presencia de fitohormonas especialmente cuando los productos son empleados como extractos crudos, porque puede producirse contaminación con las mismas que pueda influenciar la salud humana (32, 39).
  
- Variaciones en la concentración de nutrientes del medio, que dependen de los objetivos del cultivo. De este modo, en los casos en que se presenta una correlación negativa entre la proliferación de células y el metabolismo secundario, es posible que exista una manipulación del medio para inhibir el crecimiento celular y favorecer el metabolismo secundario. Estableciendo dos etapas para el proceso: una primera etapa de crecimiento de biomasa y una etapa final de producción del metabolito de interés, en donde se empleen dos medios diferentes que estimulen adecuadamente los órganos en cada caso (97).
  
- Elicitores, son componentes activos que inducen una respuesta cuando son aplicados en los tejidos vegetales. Los elicitores como microorganismos y plantas, se denominan elicitores bióticos, mientras que los que ocasionan

estrés físico, o, químico se conocen como elicitores abióticos. Estas sustancias involucran varios compuestos señaladores como lo son las especies reactivas de oxígeno, ácido jasmónico, sulfato de cobre, ácido salicílico, etc. (88, 89, 98).

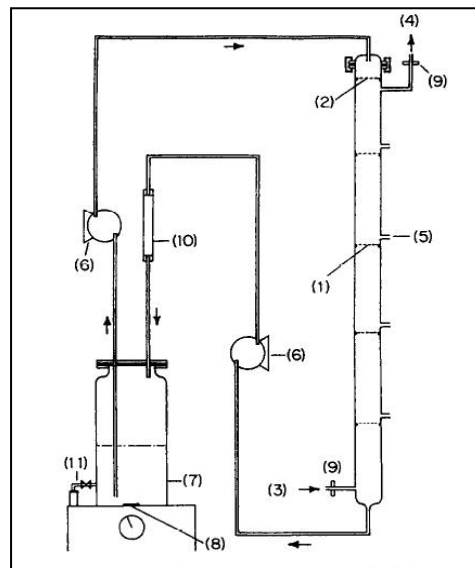
- Factores físicos, incluyen la luz, la temperatura, el pH del medio, la aireación, la densidad celular, etc. La iluminación, generalmente induce diferenciación de los cloroplastos, lo cual en algunas ocasiones favorece el metabolismo secundario. La temperatura, en la mayoría de los casos encuentra su condición óptima entre 20 y 25°C y el pH debe mantenerse entre 5.6 y 6.0. La aireación está directamente relacionada al crecimiento celular, a mayor aireación más crecimiento. Y la densidad celular, que está determinada por el tamaño del inóculo, llega a ser un factor importante que afecta el rendimiento del producto (95, 99, 100).
  
- Factores biológicos, como mutaciones y demás alteraciones genéticas inducidas (2, 33, 73, 101).

Además de estas condiciones, también se debe considerar la configuración del biorreactor, de modo que ésta sea la más adecuada para la producción del metabolito deseado. Para ello se deben analizar los modelos reportados (airlift, columna simple, columna de burbujeo, biorreactor de niebla, biorreactor de tanque agitado, etc.) y las características del crecimiento del cultivo de acuerdo a sus necesidades particulares.

A continuación se mencionarán algunos ejemplos, en los cuales se prueban configuraciones diferentes en la producción de metabolitos secundarios por cultivo de raíces, describiendo algunos de los aspectos más relevantes relacionados en cada caso.

**Green y Thomas (1996)**, desarrollaron un sistema de biorreacción que incluía un biorreactor integral y un separador. El volumen de medio que se manejó fue de 8 litros, empleados para el cultivo de explantes de *Nicotiana glauca*, *Nicotiana rustica* y *Datura stramonium*. Las raíces de *N. glauca* se obtuvieron por transformación con la cepa LBA9402 de *Agrobacterium rhizogenes*.

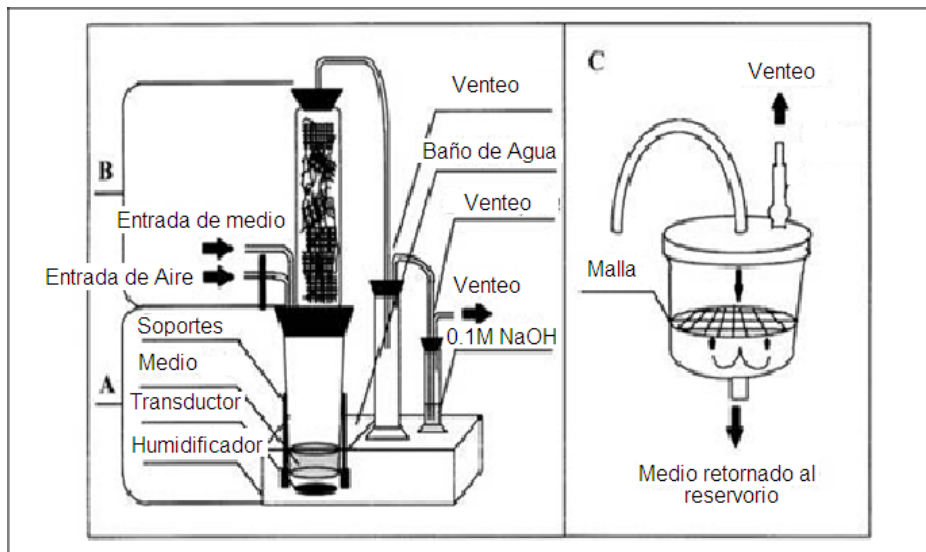
Este trabajo permitió establecer que la demanda de oxígeno de las raíces transformadas allí empleadas era baja (demanda máxima de la *Nicotiana glauca* 0.07 mmol de O<sub>2</sub>/h/g peso fresco). Además se encontraron dos inconvenientes para el cultivo en el biorreactor, el primero de ellos era establecer una técnica de inoculación aséptica considerando la morfología de las raíces, y el segundo estaba relacionado con el seguimiento de la biomasa que debía realizarse por métodos indirectos como el registro de la conductividad y de la disminución en la concentración de azúcar.



**Figura 11.** Diagrama de un biorreactor integral con separador. (1) soportes para la biomasa, (2) plato distribuidor de medio, (3) y (4) entradas y salidas de aire, (5) puerto de inoculación, (6) bomba peristáltica, (7) reservorio de medio, (8) agitador magnético, (9) filtro de aire, (10) columna con resina de intercambio para separación, (11) puerto para tomar las muestras (102).

**Chatterjee, et al. (1997)**, propusieron el crecimiento de raíces transformadas de *Artemisia annua* en un biorreactor de rocío de 1 litro. En este caso, el montaje constaba de dos unidades, una como reservorio y otra, en donde se generaba el rocío y se daba el crecimiento de las raíces. Para generar el rocío, contaron con un transductor ultrasónico, que se colocó en la parte inferior de la unidad de crecimiento.

Empleando este sistema las raíces se desarrollaron adecuadamente hasta el día 12, cuando mostraron signos de necrosis, a los 24 días de cultivo las raíces y el medio presentaron un color café que posiblemente se debe al deterioro de las mismas por falta de nutrientes, o, por la presencia de sustancias tóxicas asociadas a su crecimiento. Por lo que se sugiere la adición continua de medio fresco al cultivo.



**Figura 12.** Diagrama de un biorreactor de rocío acústico, mostrando: (A) Generador y cámara de rocío colocada sobre la base húmeda, (B) Cámara de crecimiento con las raíces soportadas sobre anillos empacados, (C) Cámara de micropropagación conectada al generador de niebla (103).

**Jung, et al. (1998)**, emplearon un biorreactor de columna de burbujeo de 2 l, para el cultivo de raíces de *Catharanthus roseus*. Para realizar el seguimiento de la producción de biomasa se estimó el consumo de nutrientes en el medio líquido, estableciendo relaciones entre la composición del medio con la conductividad, puesto que ésta permite determinar la concentración de sales inorgánicas que son consumidas a medida que se da la generación de biomasa.

En este trabajo se estableció que para obtener un cultivo de alta densidad es necesario reponer constantemente los nutrientes del medio, usando técnicas de cultivo como lote alimentado, lotes repetidos, o, el cultivo continuo. Siendo los dos primeros los más recomendados para cultivos a gran escala.(99)

**Mahagamasekera y Doran (1998)**, estudiaron el cultivo de *Atropa belladonna* y *Duboisia* en reactores de 2 y 2.5 litros de volumen de medio líquido. Emplearon como inóculo 7 g de raíces y 7 g de segmentos nodales por cada 2 l. Se uso un agitador de turbina Rushton (diámetro de 50 mm colocado a 45 mm del fondo del biorreactor) periódicamente para dañar las raíces, generando una condición de estrés.

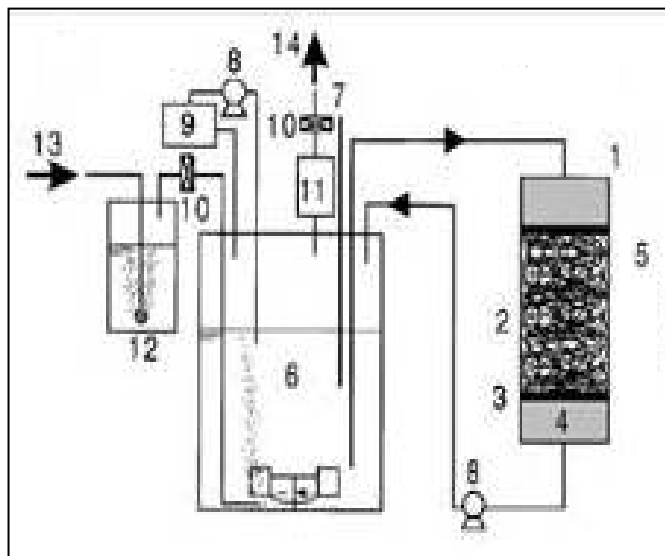
Se obtuvo una producción de escopolamina de 0,25 mg/ g de materia seca. El estrés generando por el daño sobre los tejidos para afectar la producción de metabolitos secundarios, se inició el día 11 del cultivo, operando la turbina a 80 rpm por 3 minutos. Luego las raíces se sometieron a daño cada tercer día, logrando los objetivos deseados en cuanto a liberación del metabolito al medio de cultivo (33).

**Kino-Oka et al. (1999)**, estudiaron el crecimiento de raíces de *Beta vulgaris L.* empleando como sistema de crecimiento un reactor de columna sencilla, manejando una velocidad superficial de medio de 2 - 28m / h, usando 1l de medio. Este estudio permitió verificar que la condición de flujo del medio líquido se refleja

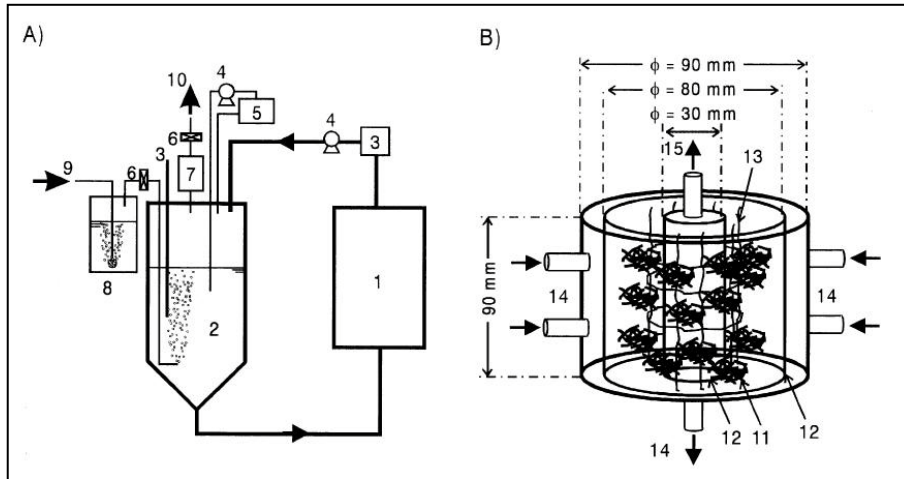
en la concentración de oxígeno disuelto y en el estrés hidráulico que puede presentar el cultivo.

El reactor de columna sencilla se consideró como la unidad de crecimiento y estaba unido a un tanque de aireación. En la columna de crecimiento, se realizó la inoculación sobre mallas de acero inoxidable. Los resultados sugirieron la presencia de inconvenientes generados por la alta densidad de los cultivos.

Del mismo modo, este grupo se encargó de probar un reactor de flujo radial para mantener cultivos de alta densidad. Este sistema, consta de un tanque con flujo radial y una columna de aireación para enriquecimiento del medio con oxígeno.



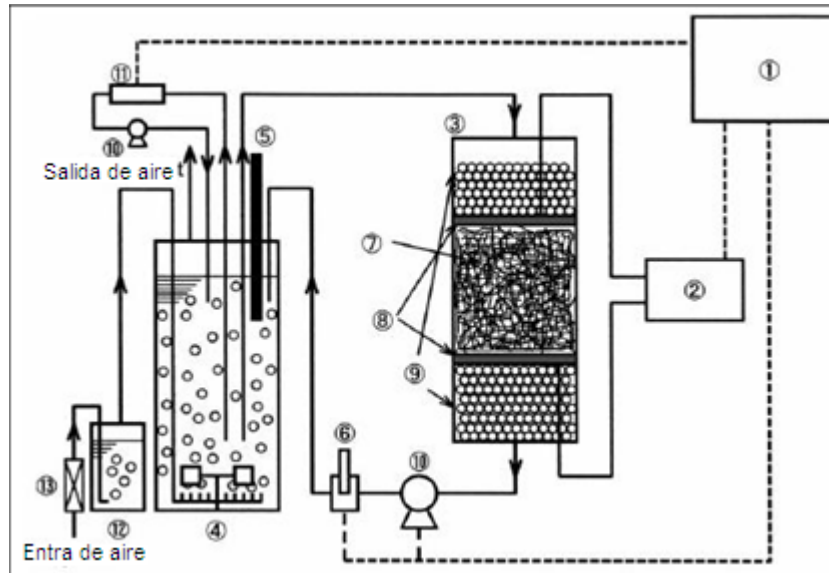
**Figura 13.** Biorreactor de columna simple. (1) columna de crecimiento, (2) raíces modificadas, (3) malla de acero inoxidable, (4) fibra de vidrio, (5) unidad de crecimiento, (6) tanque de aireación, (7) sensor de oxígeno disuelto, (8) bomba, (9) electrodo de conductividad, (10) filtro, (11) condensador de agua, (12) humidificador, (13) entrada de gas, (14) salida de gas (95).



**Figura 14.** (A) Biorreactor de flujo radial. (B) Tanque de crecimiento. (1) tanque de crecimiento, (2) columna de aireación, (3) sensor de oxígeno disuelto, (4) bombas, (5) electrodo de conductividad, (6) filtro, (7) condensador de agua, (8) humidificador, (9) entrada de gas, (10) salida de gas, (11) raíces modificadas, (12) malla de acero inoxidable, (13) alambres e acero inoxidable, (14) entrada de medio, (15) salida de medio (95).

**Hitaka et al. (2000)**, propusieron el uso de reactores de columna simple para el cultivo de raíces de *Beta vulgaris L.* Como conclusiones establecieron que el flujo de líquido en el biorreactor afecta el crecimiento de las raíces modificadas debido a las fluctuaciones en la eficiencia con que se suministra el oxígeno y al estrés deformativo sobre la superficie de las raíces. De esta manera, cuando se incrementa la concentración de oxígeno disuelto en la superficie de las raíces, la elongación de las mismas aumenta.

Las raíces modificadas fueron cultivadas en un reactor de columna simple empleando medio M&S, adicionado con 20 Kg/m<sup>3</sup> fructosa, el sistema de biorreacción estaba compuesto por una columna de crecimiento y un tanque de aireación. Inicialmente, la columna se cargó con 20 g de peso fresco de raíces modificadas. El estrés deformativo se evaluó manteniendo el flujo de medio nutritivo entre 0.3 – 2 l/min.

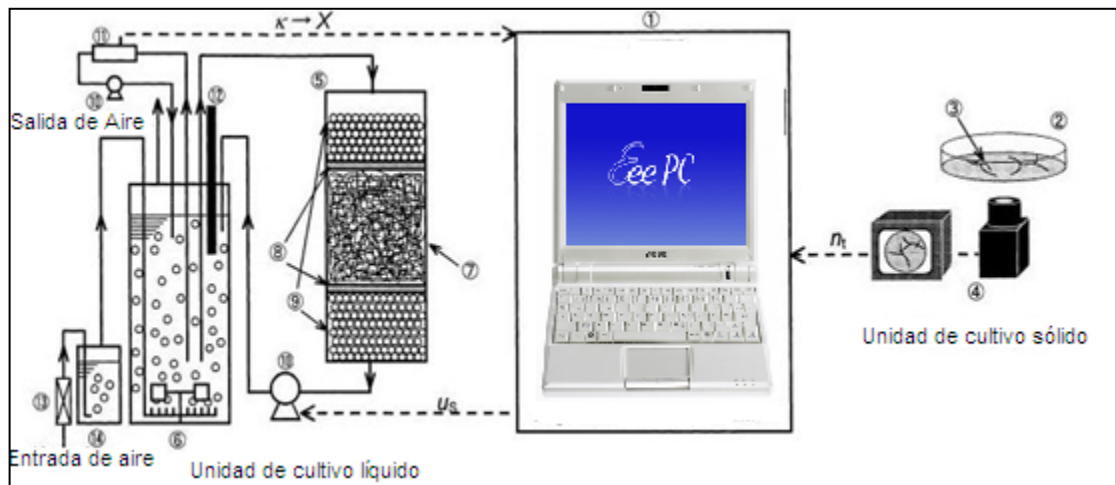


**Figura 15.** Diagrama de un biorreactor de columna simple, (1) PC, (2) manómetro, (3) columna de crecimiento con diámetro de 38 mm, (4) tanque de aireación, (5) sensor de oxígeno disuelto en el líquido que entra a la columna, (6) sensor de oxígeno disuelto en el líquido que sale de la columna, (7) raíces modificadas, (8) lana de vidrio, (9) esferas de vidrio, (10) bomba, (11) electrodo de conductividad, (12) humidificador, (13) filtro de aire (104).

**Shiao y Doran (2000)**, propusieron el uso de un biorreactor de columna, para el cultivo de raíces de *A. thaliana*, estudiando los problemas de flujo y transferencia de oxígeno producidos por el aumento en la biomasa. Para ello realizaron algunos ensayos de filtración en donde evaluaron este efecto.

Los ensayos consistían en determinar la permeabilidad de lechos empacados de raíces, estableciendo que ésta disminuye significativamente con el incremento de la masa de raíces (biomasa). Los ensayos emplearon raíces modificadas y sin modificar, encontrando que la mayor cantidad de pilosidades presentes en las raíces modificadas les confiere una mayor resistencia a la transferencia de oxígeno (100).

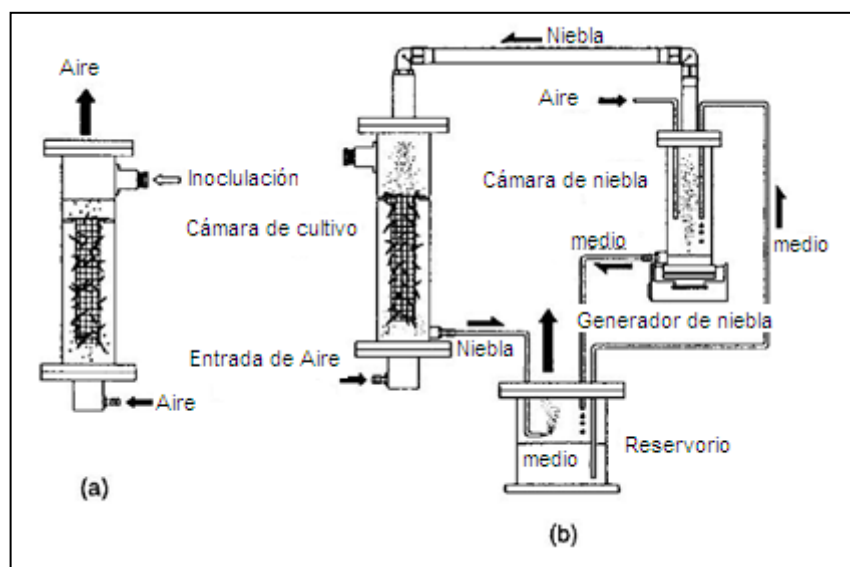
**Takahashi et al. (2001)**, trabajaron para la producción de raíces modificadas de *Beta vulgaris* en un reactor tipo columna. Como inóculo emplearon raíces precultivadas de 5 a 11 días. El sistema de biorreacción compuesto por dos unidades de cultivo, una sólida y otra líquida, operó a 25 °C.



**Figura 16.** Sistema de biorreacción para el cultivo de *Beta vulgaris*. (1)PC, (2) caja Petri con diámetro interno de 90 mm, (3) raíces en medio sólido, (4) cámara y monitor, (5) columna de crecimiento con diámetro interno de 38 mm, (6) tanque de aireación, (7) raíces modificadas, (8) fibra de vidrio, (9) esferas de vidrio, (10) bomba, (11) electrodo de conductividad, (12) electrodo de oxígeno, (13) filtro de aire, (13) humidificador (105).

Este estudio, permitió demostrar que era posible realizar el seguimiento de la biomasa por medio del análisis de imágenes tomadas a lo largo del tiempo de duración del cultivo.

**Weathers y Kim (2001)**, evaluaron el crecimiento de raíces de *Artemisia annua*, *Beta vulgaris*, y *Pisum sativum* en diferentes sistemas (erlenmeyer, caja Petri, columna de burbujeo, reactor de niebla), manejando un volumen de trabajo en los biorreactores de 1.5 l e inoculando con 1.9 g de materia fresca / l.



**Figura 17.** (a) Biorreactor de columna de burbujeo, (b) Biorreactor de niebla (106).

Los biorreactores fueron fabricados en policarbonato y las raíces se inmovilizaron sobre mallas de acero inoxidable. Su estudio, identificó la influencia de algunos factores sobre el fenómeno de aglomeración presente en las células que se encuentran formando la superficie de las raíces conocidas como “*border cells*”.

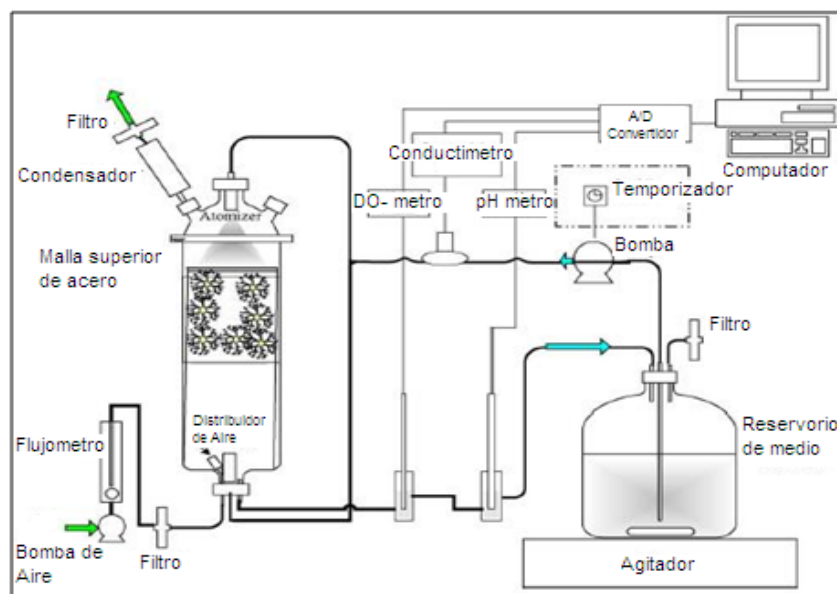
**Zobayed y Saxena (2003)**, en el trabajo con *Hypericum perforatum* L. emplearon un biorreactor de inmersión temporal, un biorreactor airlift y un Erlenmeyer. El biorreactor de inmersión temporal era de 1l y contenía 350 ml de medio líquido, con inmersión en el medio de nutrientes cada 3 horas por 5 minutos durante los primeros quince días y luego cada 24 horas por 5 minutos hasta el final. El reactor tipo balón airlift tenía una capacidad de 2l y contenía un litro de medio líquido. En su fondo se ubicó un distribuidor de aire. El otro tipo de biorreactor, el erlenmeyer tenía una capacidad de 250 ml y se cargó con 100 ml de medio líquido que se incubó con agitación a 100 rpm. Los autores concluyen que el tipo de biorreactor que más favorecía la regeneración de explantes era el de inmersión temporal, para el cual se tenía un valor de regeneración de 209 segmentos regenerados por explante, y el sistema menos apropiado era el erlenmeyer, en donde la

regeneración era casi la mitad del valor obtenido para el reactor de inmersión temporal.

Del mismo modo se estableció que al trabajar con esta especie, la mayor capacidad regenerativa la presentan las raíces sobre otro tipo de explantes, de ahí que se considere su cultivo como una buena alternativa para la propagación masiva de esta especie (107).

**Huang et al. (2004)**, trabajaron con *Stizolobium hassjoo*, modificado con *A. rhizogenes* para la producción de L-Dopa en un reactor de niebla de 3 l (Mist trickling reactor) y el inóculo empleado fue de 80 – 120 segmentos de raíz. Se estableció una relación lineal entre la producción de biomasa y el consumo de sacarosa, con una disminución en la conductividad del medio en frascos que luego sirvió para caracterizar el reactor. El medio se suministraba intermitentemente cada hora. Este tipo de biorreactores ofrecen la posibilidad de disminuir el estrés generado a las raíces durante el cultivo, aumentando la transferencia de nutrientes debido al incremento del área de transferencia, la rápida adecuación de nutrientes, la remoción de metabolitos tóxicos, y las facilidades para la operación y el escalado.

En este tipo de biorreactor las raíces están suspendidas sobre una solución de nutrientes que es impulsada en forma de lluvia hacia arriba por un motor (generador ultrasónico).



**Figura 18.** Biorreactor de niebla para el cultivo de raíces de *Stizolobium hassjoo* (108)

**Suresh et al. (2004)**, establecieron un cultivo de raíces de *Beta vulgaris*, empleando una columna de burbujeo de 3 l e inoculando con 10 g de raíces frescas. En este caso el objetivo era estudiar la producción de pigmentos bajo la acción de poliaminas y elicitors. El reactor fue hecho con una columna de vidrio de 22 cm de altura y 14 cm de diámetro con una capacidad de 3 l, el volumen de trabajo manejado fue de 1.75 l.

Estos ensayos les permitieron establecer que la aplicación de elicitors en los biorreactores puede ser una estrategia biotecnológicamente valiosa para favorecer la producción de los metabolitos, reduciendo los costos de la misma (109).

**Zobayed et al. (2004)**, continuaron su trabajo con la especie *Hypericum perforatum* L. empleando 6 diferentes sistemas de cultivo, biorreactor tipo balón de burbujeo, biorreactor de inmersión temporal, biorreactor de inmersión por zonas temporal, Erlenmeyer, reactor de tanque con ventilación forzada, botellas magenta, para compararlas con cultivos desarrollados en invernaderos.

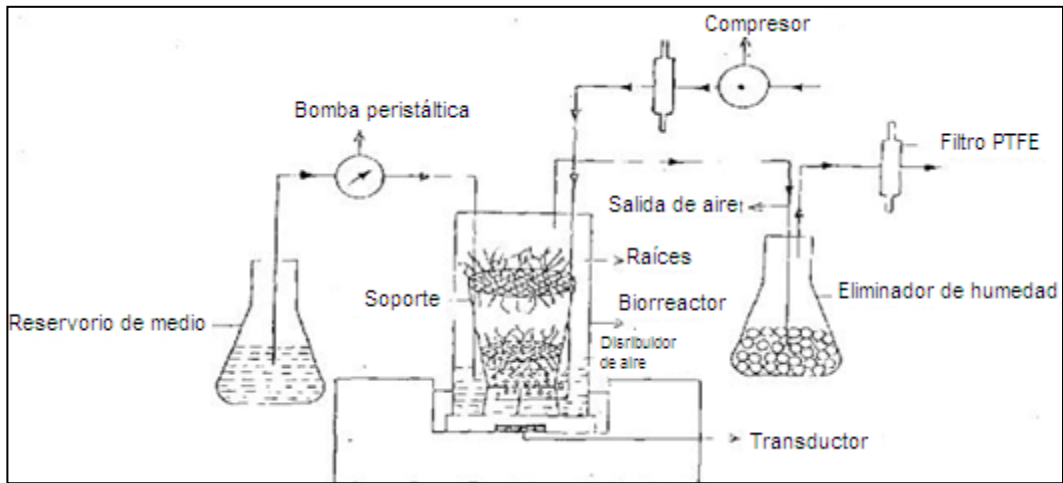
Entre las características más relevantes se encuentran: mientras en los biorreactores tipo balón con burbujeo y erlenmeyer las raíces están inmersas en el medio todo el tiempo. En el reactor de inmersión temporal, los explantes eran sumergidos en él cada 3 h por 5 min.

Luego de 25 días de cultivo se concluyó que el biorreactor de tipo balón de burbujeo fue el que generó una mayor cantidad de plantas frescas por encima de los otros sistemas *in vitro* y de los cultivos hidropónicos. De otro lado, algunos metabolitos se generaron en mayor cantidad en el sistema con ventilación forzada, o, en los biorreactores de inmersión temporal (110).

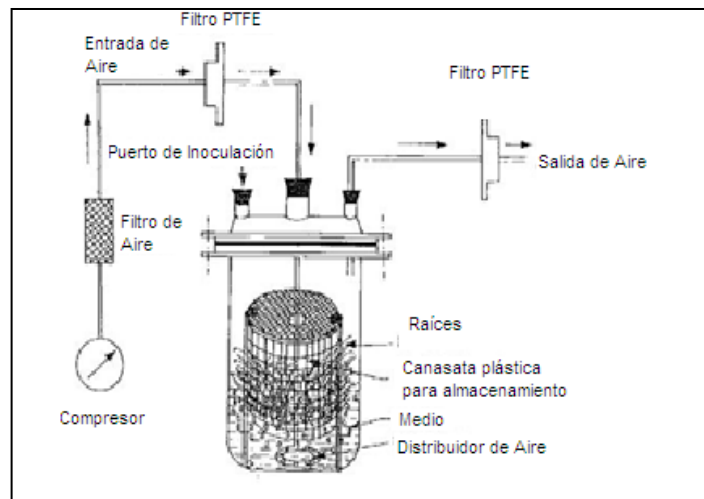
**Suresh et al. (2005)**, propusieron el uso de varios tipos de biorreactores como los de niebla, las columnas de burbujeo y los reactores con aspersion para el cultivo de *T. patula*. Establecieron que en los cultivos de raíces transformadas los inconvenientes en la transferencia de oxígeno, resultan en una disminución en el crecimiento y la producción de los metabolitos. Los reactores de niebla empleados en estos cultivos presentan problemas asociados a la distribución no uniforme de la niebla. La biomasa se evaluó al iniciar y al finalizar la operación en el biorreactor; teniendo en la cuenta los días del cultivo se evaluó la tasa de crecimiento. También se registraron continuamente la conductividad del medio y la osmolaridad, como medidas indirectas de la concentración de biomasa.

En este caso el biorreactor tipo columna de burbujeo, estaba compuesto por una columna de vidrio de 22 cm de alto por 14 cm de ancho, 3l de capacidad con un volumen de trabajo de 1.75l

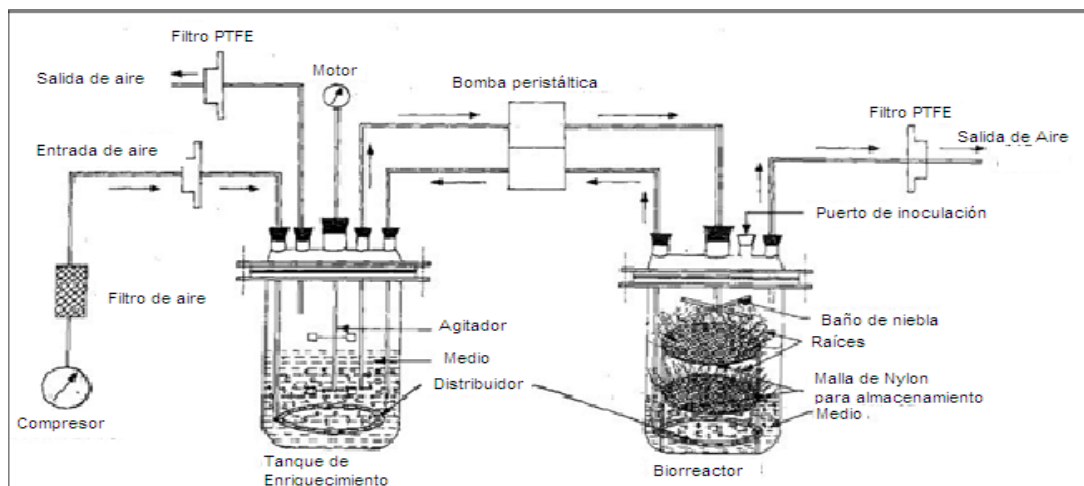
De otro lado, el biorreactor con aspersion de nutrientes, empleó dos tanques arreglados en serie, uno para almacenar los nutrientes (1.5 l) y otro para el crecimiento de las raíces (1 l). El reservorio tenía puertos para la entrada y salida del aire, el agitador y otros accesorios.



**Figura 19.** Biorreactor de niebla acústico para el cultivo de raíces de *T. patula* (111).



**Figura 20.** Biorreactor de columna de burbujeo para el cultivo de raíces de *T. patula* (111).



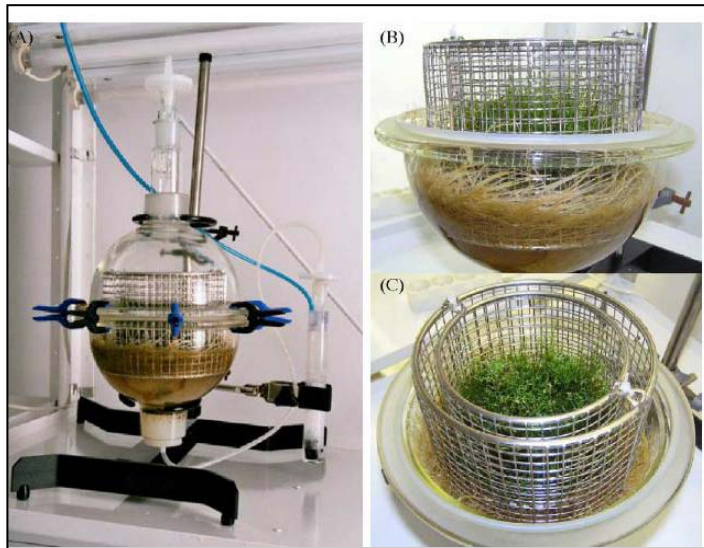
**Figura 21.** Reactor con aspersión de nutrientes para el cultivo de raíces de *T. patula* (111).

De los tres diseños probados, el reactor de niebla fue el más eficiente, debido a que ofrece una menor resistencia a la transferencia de masa. Otras ventajas adicionales son la eficiencia energética, la simplicidad en la operación, el fácil escalado y la posibilidad de manejar densidades altas de biomasa para obtener mayores productividades. La única desventaja es el daño ocasionado al transductor (usado para generar la niebla), por el autoclavado.

**Łuczkiwicz y Kokotkiewicz (2005)**, propusieron el uso de un biorreactor de burbujeo y canasta para el cultivo de raíces de *G. tinctoria*. En este caso se empleó como inóculo 5 g de peso fresco de vástagos y fragmentos de raíces por cada 100 ml de medio, en recipientes de 250 ml. El medio empleado era S&H suplementado con 3% de sacarosa y 24.6 mmol/l de IBA.

Al finalizar el estudio se estableció que los cultivos en el biorreactor fueron más efectivos, en términos de producción de biomasa y de producción de isoflavonas, que los co-cultivos realizados en Erlenmeyers. Se sugieren además algunos puntos para el mejoramiento del biorreactor que incluyen: un equipo toma-muestras, más puertos suplementarios y electrodos para medir pH y oxígeno

disuelto, de modo que se pueda llegar a la producción de fitoestrógenos a escala industrial. Además se demostró que era posible tener el crecimiento de dos tipos diferentes de tejidos (raíces y segmentos), en un mismo equipo superando las limitaciones relacionadas con este tema.



**Figura 22.** Biorreactor de burbujeo y canasta para el cultivo de raíces de *G. tinctoria* (112).

**Martin y Vermette (2005)**, propusieron el uso de raíces transformadas para la producción de fármacos, pesticidas, saborizantes, etc. Sugirieron que las raíces modificadas eran las más estables y productivas, dado que éstas presentan actividad y crecen en medios libres de hormonas, produciendo metabolitos secundarios en niveles similares, o, superiores a las raíces de las plantas sin tratamiento. Además, mencionaron que los biorreactores para cultivos de raíces requieren disminuir el daño mecánico para evitar debilitar las raíces frágiles, y a la vez, deben considerar la transferencia de oxígeno y de nutrientes. Estas variables son importantes porque las raíces modificadas son heterotróficas y por tanto el oxígeno juega un papel importante en su metabolismo, para la respiración.

Entre los tipos de reactores empleados para el cultivo de raíces, mencionaron que los primeros fueron los reactores de tanque agitado, llegando a volúmenes de 20 l. Sin embargo, estos sistemas causan mucho daño a las raíces debilitándolas. Para superar este inconveniente, plantearon el uso de columnas de burbujeo del tipo biorreactores airlift, o, biorreactores con agitación modificados. En ellos las raíces son inmovilizadas empleando mallas horizontales espaciadas por lo menos a 2.5 cm.

También sugirieron que las columnas de burbujeo son los biorreactores menos eficientes de los probados para los cultivos de raíces y como causa de su ineficiencia se tiene la baja disponibilidad de oxígeno. Otro tipo de biorreactor que puede ser empleado es el de flujo por pulsos, con el cual se han alcanzado altas productividades controlando las velocidades de flujo de líquido, responsable de maximizar la transferencia de masa y disminuir el riesgo de daño mecánico (96).

**Savitha et al. (2005)**, emplearon una columna de burbujeo para el crecimiento de raíces de *Beta vulgaris* L.. Para ello, tomaron como inóculo 100 mg de raíces que crecieron durante una semana con agitación hasta alcanzar 10 g de peso fresco para transferirlos a la canasta. La columna de vidrio empleada era de 22 cm de alto por 14 cm de diámetro, 3 l de capacidad y trabajaron con 1.75 l de medio. Obtuvieron buenos resultados en cuanto a la producción del metabolito (98).

**Guillon et al. (2006)**, mencionan en su trabajo que el escalado de los biorreactores para el cultivo de raíces es fundamental para aprovechar sus aplicaciones biotecnológicas. A este respecto, existen dos tipos de biorreactores que se han usado con éxito. Entre ellos están los modelos inspirados en la tecnología airlift, como la columna de burbujeo que se emplea para escalar la producción de *Beta vulgaris* y *Artemisia annua*, y el biorreactor tipo canasta con burbujeo empleado para producir raíces de *Astragalus membranaceus* y *Genista tinctoria*. El segundo tipo son los biorreactores de niebla, en donde se emplean

mallas para soportar las raíces. Estos sistemas tienen por ventaja reducir el volumen de medio de cultivo y de ese modo obtener una solución concentrada de los metabolitos secundarios. A parte de estos dos tipos de biorreactores empleados para escalar procesos, se recomienda el uso de cultivos hidropónicos cuando no se requieren condiciones de esterilidad en la producción (113).

**Sivakumar (2006)**, en su estudio sobre nuevas herramientas para la producción de moléculas bioactivas y biofármacos desde raíces de plantas, menciona aspectos sobre los desarrollos tecnológicos de los biorreactores. Entre ellos, dice que parte del éxito con el biorreactor está en la capacidad que se tenga de controlar y monitorear variables de proceso importantes como el pH, la temperatura, el oxígeno disuelto, el dióxido de carbono y la gravedad específica.

Además, insiste en que una de las mayores complicaciones del escalado es garantizar la transferencia de oxígeno empleando condiciones de mezcla que no generen un estrés de deformación. Puesto que éste puede causar daño irreparable al cultivo, por lo que se sugieren nuevas tecnologías en donde se plantee el desarrollo de sistemas sin tecnologías convencionales de agitación.

En este caso se mencionan algunos ejemplos de la producción industrial de proteínas recombinantes y vacunas por cultivos de raíces de diferentes especies (114).

Con base en esta información bibliográfica es posible hacerse una idea de los requerimientos de los cultivos de raíces y de las condiciones de diseño requeridas para construir un biorreactor para su cultivo.

### 3. DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

#### 3.1 CULTIVOS DE RAÍCES NORMALES DE *Brugmansia candida*

La primera parte de este capítulo pretende mostrar el proceso llevado a cabo desde la recolección de los frutos de *Brugmansia candida*, hasta el cultivo de raíces normales de esta especie en un sistema de biorreacción compuesto por dos unidades.

Para ello se partirá de la descripción del material vegetal, de las técnicas de desinfección para cultivar los embriones y desarrollar las raíces, de la manera en que se generó una curva de crecimiento de las raíces normales, de las técnicas de generación de inóculos para el biorreactor y de las condiciones de cultivo empleadas; además, se realizará una descripción del sistema de biorreacción y la manera en que se desarrolló el cultivo en él, para proseguir con la etapa de extracción y cuantificación de los metabolitos requerida para la evaluación del sistema.

También se presentan algunos ensayos que se realizaron con el propósito de facilitar la generación de las raíces y mejorar el desempeño de las mismas en el reactor, dentro de los que se encuentra la evaluación de la adición de ANA a los medios de cultivo en la etapa de generación de inóculos y la aplicación de sulfato de cobre, como elicitador al final del ensayo en el biorreactor, con el fin de permitir la liberación del metabolito desde las raíces al medio de cultivo.

### 3.1.1 Material Vegetal

Se emplearon semillas de *Brugmansia candida* recolectadas en el campus de la Universidad Nacional de Colombia. El árbol del que provenía el material, esta inventariado en el Herbario Nacional del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, bajo el código 223783.

#### 3.1.1.1 Obtención de Raíces Estériles Normales de *B. candida*

- 1) Desinfección de los frutos de *Brugmansia candida*. Los frutos fueron recolectados cuando se consideraban maduros, es decir cuando tenían una edad promedio de 2 meses. Luego de su recolección fueron lavados con jabón líquido y se sometieron a un procedimiento para retirar la cáscara y liberar las semillas.



**Figura 23.**Frutos de *Brugmansia candida* listos para el lavado y posterior extracción de embriones.

- 2) Luego de liberar las semillas se siguió el procedimiento descrito por Piñeros (2005) para realizar el rescate de los embriones y realizar la desinfección de los mismos antes de proceder a su cultivo *in vitro*. Este procedimiento se lleva a cabo en cabina de flujo laminar y consiste en retirar la cubierta seminal externa de las semillas y colocarlas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 10 minutos. Luego se colocan en una solución de etanol al 70% por 10 minutos y finalmente se realizan tres lavados con agua destilada estéril para eliminar los agentes de desinfección (39).



**Figura 24.** Desinfección y siembra de embriones de *Brugmansia candida* para la obtención de raíces normales.

- 3) Finalizado el rescate de los embriones estos son sembrados en 15 ml de medio B5 (Gamborg *et al.*, 1969), suplementado con 20 g/l de sacarosa, sin hormonas vegetales y adicionado con Agar a una proporción de 10 g/l. Este procedimiento se llevó a cabo en frascos de 50 ml con cubiertas de papel aluminio. En cada frasco se plantaron entre dos y tres embriones. La incubación se realizó a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad.

### 3.1.2 Proceso de germinación de los cultivos de *B. candida*

Para el caso de las raíces normales de *B. candida*, se evaluaron dos tiempos de cultivo de los embriones sobre el medio sólido, en cuanto al porcentaje de germinación y el porcentaje de contaminación. El porcentaje de germinación está establecido como la relación entre el número de embriones que ha germinado y generado una radícula de 1,5 a 2 cm aproximadamente y el número total de embriones sembrados, mientras que el porcentaje de contaminación, representa la relación entre el número de embriones contaminados y el número total de embriones sembrados.

### 3.1.3 Efecto de la adición de ácido naftalenacético sobre el desarrollo de los embriones para la producción de raíces de *Brugmansia candida*

Antes de llevar a cabo la producción de escopolamina en el biorreactor, se evaluó la posibilidad de obtener los inóculos desde embriones tratados con ANA, puesto que ha sido reconocida la actividad de esta auxina en la inducción de raíces (32, 39).

Para ello, se planteó un experimento para determinar el efecto de la adición de ácido naftalenacético sobre los embriones, adicionando esta hormona, al medio de cultivo sólido en 3 niveles diferentes de concentración: 1, 2, y 3 ppm. Los resultados obtenidos a nivel cuantitativo y cualitativo se compararon con los resultados obtenidos cuando los embriones crecieron en medio libre de hormonas. Los embriones rescatados luego de la desinfección fueron sembrados en medio B5, suplementado con 20 g/l de sacarosa, 10 g/l de Agar y la correspondiente concentración de ANA (1, 2 y 3 ppm). Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad durante 30 días. Transcurrido este tiempo, las raíces se cortaron y se colocaron en medio B5 líquido, suplementado con 20 g/l de sacarosa. A una parte de las muestras se les adicionó ANA y la otra se dejó libre de éste, para evaluar el efecto de la hormona sobre el desarrollo de las raíces en medio líquido, cuando éstas son usadas como inóculos para la producción de escopolamina. Los cultivos se desarrollaron en un agitador orbital operando a 70 rpm a temperatura ambiente y en condición de oscuridad.

Pasado el tiempo total de crecimiento y desarrollo de los cultivos, se procedió a reemplazar los medios con una solución de sulfato de cobre 0,2 mM, evaluando el efecto de esta sustancia como agente elicitor. El tiempo de elicitación fue de 24 horas durante las cuales las raíces se mantuvieron a temperatura ambiente, en oscuridad, y a una agitación de 70 rpm. Luego, se procedió a secar las raíces y disponer las mismas para la extracción y cuantificación del metabolito de estudio

(escopolamina). Se determinó la escopolamina presente en el medio de cultivo al día 60, y en la solución de sulfato de cobre, con el fin de evaluar el efecto elicitor de esta sal.

El total de experimentos realizados fue 7, y están descritos en la tabla 1.

**Tabla 1.** Características del medio de cultivo para los diferentes tratamientos de aplicación de ANA sobre embriones y raíces de *Brugmansia candida*.

<b>Ensayo</b>	<b>Día 1 a 30</b>	<b>Día 30 a 60</b>
1	B5	B5
2	B5 + 1 ppm ANA	B5
3	B5 + 2 ppm ANA	B5
4	B5 + 3 ppm ANA	B5
5	B5 + 1 ppm ANA	B5 + 1 ppm ANA
6	B5 + 2 ppm ANA	B5 + 2 ppm ANA
7	B5 + 3 ppm ANA	B5 + 3 ppm ANA

El número de réplicas para cada uno de los ensayos fue de 5.

#### 3.1.4 Desarrollo de una curva de crecimiento para las raíces normales de *Brugmansia candida*

Para la elaboración de la curva de crecimiento, se hizo el seguimiento a raíces normales de *Brugmansia candida* provenientes de la etapa de germinación. Inicialmente, se inocularon de manera simultánea 25 Erlenmeyers de 125 ml, con 25 ml de medio B5, y una cantidad de inóculo aproximada de 0,15 g de raíces frescas (raíces de 30 días que se cortaron separándose del resto del embrión), de modo que se tiene una concentración de inóculo de 6 g/l. Allí, continuaron su desarrollo durante 34 días (si se extiende este tiempo, los cultivos empiezan a verse de color oscuro lo que indica pérdida de viabilidad). Cada 5 días se tomaron

muestras del medio líquido, a las cuales se les realizaba pruebas de conductividad, pH, azúcares y contenido de alcaloides (escopolamina y anisodamina) y de la masa sólida a la que se le cuantificó el peso fresco y el contenido de alcaloides. Cada 5 días se seleccionaron al azar 3 Erlenmeyers para realizar las mediciones correspondientes.

Para evaluar el desarrollo de las raíces se recurrió al índice de crecimiento, que es una relación entre el incremento en la masa de las raíces en un tiempo determinado y la masa inicial de las raíces.

Se realizaron curvas de índice de crecimiento contra porcentaje de conductividad inicial y el índice de crecimiento contra el porcentaje de azúcares iniciales con el fin de establecer correlaciones que permitieran estudiar la biomasa de manera indirecta.

### 3.1.5 Adaptación del sistema de biorreacción para el cultivo de raíces normales de *Brugmansia candida*

Luego de analizar las diferentes configuraciones de los sistemas de biorreacción presentados para el cultivo de raíces de diferentes especies y teniendo en cuenta las condiciones de operación de los mismos, sus ventajas y desventajas, se optó por adaptar un sistema de dos unidades para el cultivo de las raíces normales de *Brugmansia candida*.

En este sistema existe una unidad llamada reservorio, es decir, una unidad de almacenamiento de medio en donde se pueden mantener constantes las condiciones de pH, temperatura, oxígeno disuelto del mismo. Esta unidad permitiría implementar en un futuro, sistemas con reemplazo de medio, para facilitar la extracción de un producto, o, para controlar accidentes debidos a contaminación. A nivel experimental se contó con un reactor Applikon

Z61101C006, de 3.2 l de capacidad ( $H/D=1.9$ ). El acondicionamiento de este equipo consistió en la instalación dentro del mismo de un sistema de control de temperatura por medio de un intercambiador de calor. Así mismo, se ubicaron en su interior sensores de temperatura y pH, acompañados de una sonda para la toma de muestras, un sistema de agitación (turbina Rushton) y una sonda para la salida constante de medio hacia la unidad de crecimiento.

Cada cinco días se hacía el seguimiento al contenido de azúcares, nitrógeno y escopolamina del medio de cultivo, retirando del reactor 20 ml del mismo.

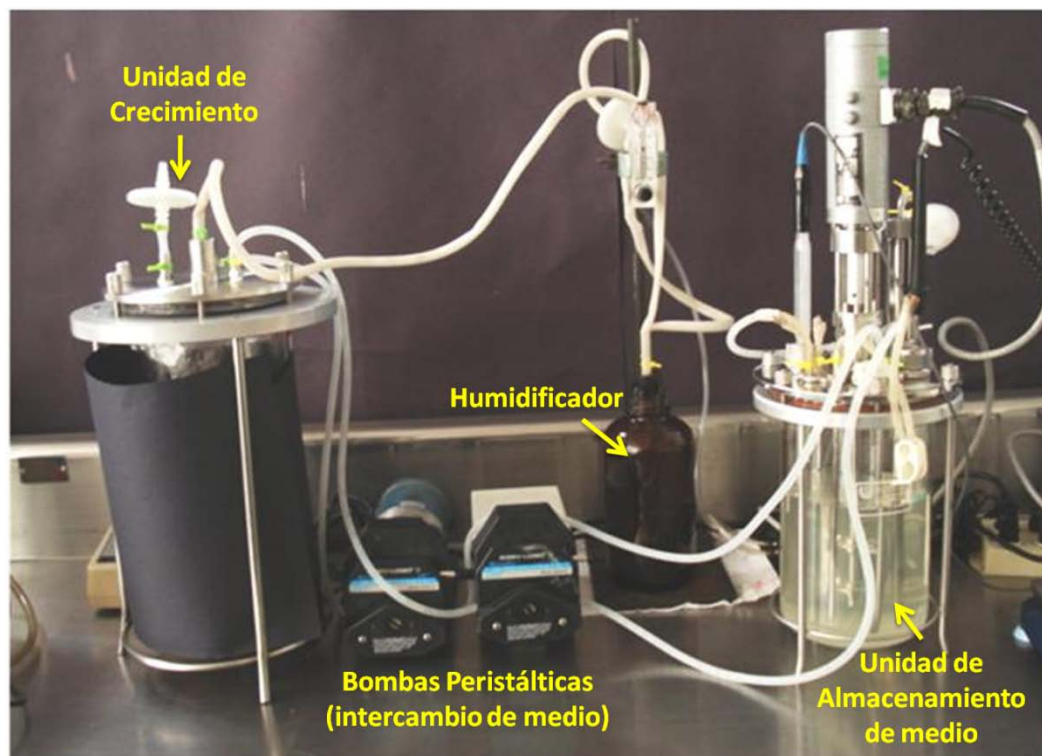
Para todos los ensayos, la unidad se cargó inicialmente con 2 l de medio de cultivo, que fueron esterilizados en su interior en una etapa previa.

El sistema de biorreacción completo contaba además con una unidad de crecimiento, compuesta por un recipiente de vidrio de doble fondo (que permitía la circulación de agua para mantener constante la temperatura en su interior) y una malla de acero inoxidable que actuaba como soporte de las raíces.

La malla soporte de acero inoxidable, tenía una amplitud de poro de 1 mm y se ubicó a 5 cm de la tapa y 18 cm del fondo de la unidad de crecimiento, con el fin de dar espacio para el desarrollo completo de las raíces, que alcanzan una elongación máxima de 20 cm durante el periodo de cultivo según lo reportado por Piñeros (2005).

En la tapa del biorreactor, se ubicó una boquilla para el suministro de medio. La distancia entre la malla y la tapa, y el diseño de la boquilla, garantizaron que la aspersión fuese homogénea sobre toda el área de la malla, dando un cubrimiento completo a toda la masa de raíces ubicada allí.

Además de la boquilla para la entrada de medio, la tapa de esta unidad tenía 2 puertos, uno donde se ubicó una sonda que permitió la salida de medio desde la unidad de crecimiento hacia la de almacenamiento y otro acondicionado con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  para la salida del aire que ingresaba a la unidad.



**Figura 25.** Configuración del sistema de biorreacción empleado para el cultivo de raíces de *Brugmansia candida*.

El aire empleado para el crecimiento provenía de un aireador, y era conducido a través de mangueras de silicona a una unidad de humidificación antes de su ingreso al proceso.

La unidad de crecimiento se cubrió para generar oscuridad en su interior, ya que cuando los cultivos se desarrollaban en presencia de luz, el crecimiento de las raíces se daba paralelo al desarrollo de segmentos de tallo.

### 3.1.6 Preparación de los inóculos de raíces normales de *Brugmansia candida* usados en el sistema de biorreacción

Los inóculos usados en el sistema de biorreacción correspondían a las raíces estériles producidas en el laboratorio según el protocolo descrito con anterioridad (numeral 3.1.1.1). Consistía de las raíces de 1,5 a 2 cm, obtenidas de los frascos con medio sólido en donde se cultivaron los embriones por 30 días.

Para preparar el inóculo, se realizó el corte de las raíces desde los embriones y la separación de los segmentos de tallo, en la cámara de flujo laminar. El material se reunió en un recipiente estéril, y se registró el peso fresco total que representa la masa de inóculo.

### 3.1.7 Operación del sistema de biorreacción para el crecimiento de raíces normales de *Brugmansia candida*

Dos días antes de la siembra, se realizaba el lavado de todas las partes que componían el sistema de reacción y se llevaba a cabo el montaje. La esterilización de las partes constituyentes del sistema se hacía de forma independiente.

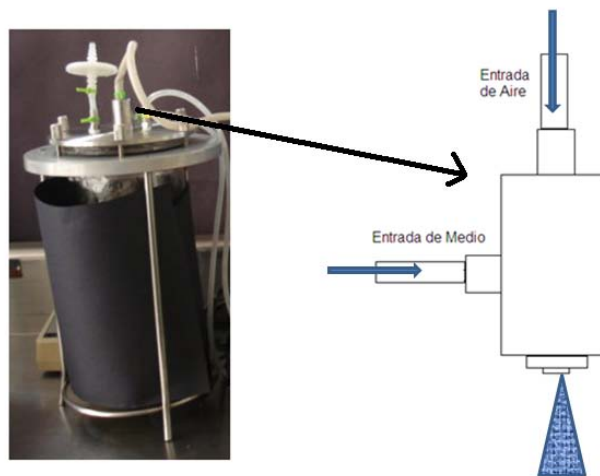
El día previo al ensayo, se preparaba el medio de cultivo y se colocaba dentro de la unidad denominada reservorio. Luego, todo el conjunto era sometido a esterilización usando un autoclave de vapor directo, en donde se mantenía la presión en 20 psig por 20 minutos.

Después de la esterilización todo el sistema se trasladaba a la cámara de flujo laminar, en donde se llevaban a cabo las conexiones necesarias para ligar las dos unidades. Cuando el sistema se enfriaba por completo, se preparaba el inóculo como se describió y se procedía a introducirlo dentro del reactor. Para ello, se retiraba la cubierta del puerto correspondiente a la purga de aire y con ayuda de

una pinza, se acomodaban las raíces centradas sobre la malla de acero inoxidable. Luego de esta etapa, el medio de cultivo ubicado en el reservorio se adicionaba con 0,5 g/l de ampicilina y 0,5 ml/l nistatina (100.000 UI/ml), para evitar posibles contaminaciones, y se agitaba mediante la Rushton a 150 rpm por 2 minutos para homogeneizarlo antes de iniciar su transporte a la unidad de crecimiento.

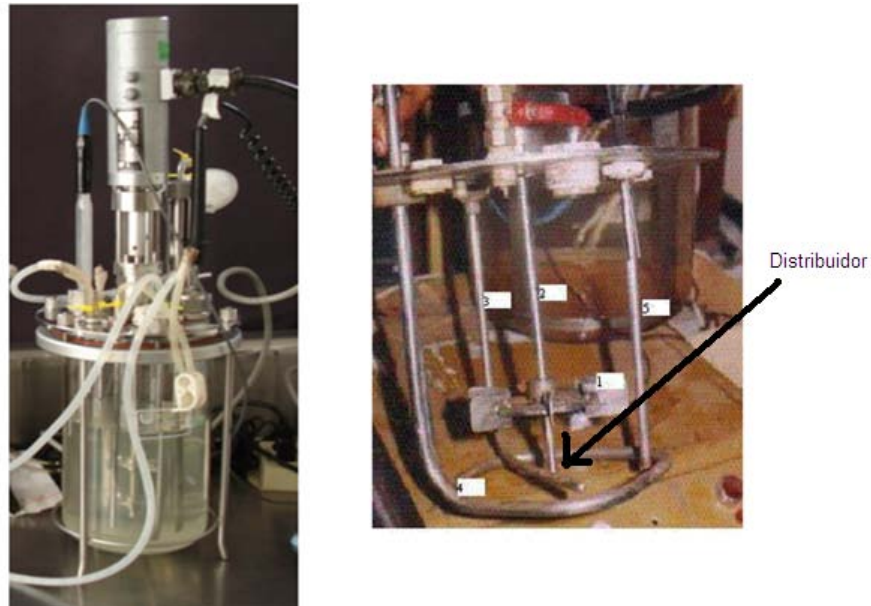
Para evitar la deshidratación y pérdida de viabilidad de las raíces, el flujo de aire y de medio debía iniciarse rápidamente. Para todos los ensayos, el flujo volumétrico de medio entre las dos unidades era aproximadamente de 0,35 ml/s.

La operación en el sistema de biorreacción se desarrolló de dos formas diferentes, en un primer caso, el aire ingresó directamente a la unidad de crecimiento, de este modo, además de suministrar el oxígeno que las raíces requerían para su crecimiento, esta corriente permitió realizar una aspersion más fina del medio de cultivo. En este caso el inóculo usado en el biorreactor fue de 3,0 g/l. Ver figura 26.



**Figura 26.** Configuración del sistema de biorreacción para el cultivo de raíces de *Brugmansia candida*. Caso 1. Aireación en la unidad de crecimiento, mezcla de las corrientes de medio y aire en un dispositivo colocado sobre la tapa de la unidad.

En un segundo caso, el aire ingresó al sistema de biorreacción en la unidad de control de medio, es decir, el aire se burbujeo dentro del medio con ayuda de de un distribuidor. Y la concentración de inóculo usada fue de 5,3. Ver figura 27.



**Figura 27.** Configuración del sistema de biorreacción para el cultivo de raíces de *Brugmansia candida*. Caso 2. El medio es enriquecido con aire en la unidad de control dentro de la que es administrado por medio de un distribuidor.

### 3.1.8 Seguimiento del cultivo de las raíces normales de *Brugmansia candida* en el reactor

Las condiciones en la unidad reservorio es decir el pH y la temperatura del medio, se registraban a diario (Anexo A). De otra parte en la unidad de crecimiento se realizaba una evaluación visual de posibles contaminaciones y del crecimiento relativo de las raíces.

Cada 5 días, se tomaba de una muestra del medio de cultivo, para determinar la concentración de alcaloides y azúcares en el mismo.

### 3.1.9 Procedimiento de elicitación de las raíces normales de *Brugmansia candida* en el sistema de biorreacción

De acuerdo con los desarrollos obtenidos por Piñeros (2005), quien estableció las ventajas del uso de sulfato de cobre como elicitor, se realizó la aplicación de esta sustancia al medio de cultivo en la dosis indicada (0,2 mM) al día 21, manteniendo las mismas condiciones de proceso del periodo de crecimiento.

### 3.1.10 Desmonte del sistema de biorreacción empleado para el crecimiento de raíces normales de *Brugmansia candida*

El elicitor se dejó actuar por un periodo de 24 horas después de su aplicación. Al final del cual se daba por terminado el ensayo. En este momento se procedía a detener las bombas, el suministro de aire y se procedía a abrir ambas unidades, recogiendo una última muestra del medio líquido y colectando las raíces.

### 3.1.11 Recolección de las raíces normales de *Brugmansia candida* que crecieron en el sistema de biorreacción

La realización de este procedimiento requería que las raíces fueran separadas cuidadosamente de la malla sobre la que habían crecido, puesto que era necesario no incurrir en pérdidas de masa ya que se pretendía determinar el peso fresco de las mismas, para indicar cuál era su índice de crecimiento.

Para ello, se tomó un frasco previamente pesado y en él se iban depositando las raíces desprendidas de la malla. También era necesario verificar que las raíces no se hubieran desprendido de la malla; en el caso de que esta situación se hubiese presentado, se requería recoger las que se encontrarán depositadas en el fondo

de la unidad de crecimiento. En ninguno de los ensayos realizados hubo transferencia de este material, a través de las mangueras, entre las dos unidades.

La masa de las raíces obtenidas se lavaba sobre un colador de plástico para retirar el medio adherido a ellas. Posteriormente se secaban ligeramente con papel absorbente, antes de ser pesadas y trasladadas a una estufa para determinar su humedad.

### 3.1.12 Determinaciones Analíticas

#### 3.1.12.1 Determinación de peso fresco

El peso fresco de las raíces (PF) se determinó luego de filtrar el medio de cultivo, lavar las raíces con abundante agua y dar un secado rápido a las mismas con papel absorbente.

#### 3.1.12.2 Determinación del peso seco

El peso seco de las raíces (PS) se determinó luego de secarlas en una estufa a 80 °C hasta peso constante (115).

#### 3.1.12.3 Determinación de la humedad

La humedad se determinó usando la información del PF y PS, por medio de la ecuación:

$$\% H = \frac{(PF-PS)}{PF} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

#### 3.1.12.4 Índice de crecimiento

El índice de crecimiento está definido como:

$$IC_t = (X_t - X_0)/X_0 \quad \text{Ecuación 2}$$

$IC_t$  : Índice de crecimiento en el tiempo t.

$X_t$  : Biomasa en el tiempo t.

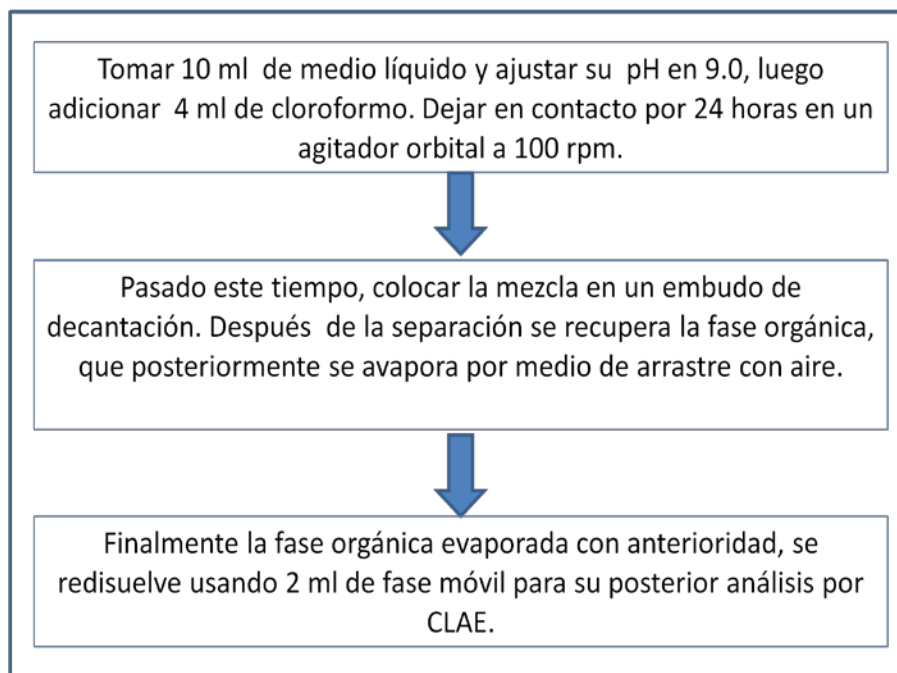
$X_0$  : Biomasa inoculada (t=0).

Este índice es usado para evaluar la generación de biomasa durante el tiempo de cultivo (31). Los índices reportados en este trabajo son calculados con respecto a pesos frescos.

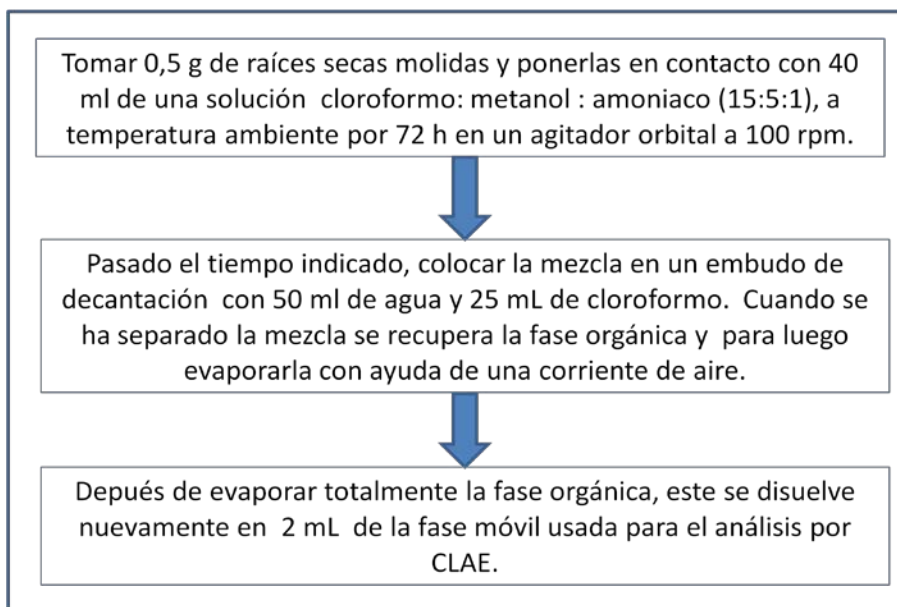
#### 3.1.12.5 Extracción de alcaloides

Para la cuantificación de la escopolamina presente, tanto en las raíces como en los medios de cultivo, se hizo necesario realizar la extracción de la misma.

La extracción se realizó aplicando los protocolos empleados por Piñeros (2005), ilustrados en las figuras 28 y 29 presentadas a continuación:



**Figura 28.** Metodología para la extracción de escopolamina desde el medio líquido.



**Figura 29.** Metodología para la extracción de escopolamina desde raíces secas de *Brugmansia candida* no transformadas.

#### 3.1.12.6 Determinación de la escopolamina por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

Para esta determinación se empleó el método descrito por Piñeros (2005). La escopolamina fue identificada tomando como base el tiempo de retención del estándar (-) Escopolamina HBr trihidratada (Sigma Aldrich) y la cuantificación se llevó a cabo por medio de una curva de calibración.

Para la realización de este ensayo se contó con un equipo Waters® (Milford, MA, USA), con un detector de absorbancia UV 486 programado a 210 nm. El software para el análisis de los datos usado fue el Millennium 2000 de Waters (Milford, MA, USA). Para el análisis de este alcaloide se usó como fase móvil una mezcla que contenía 10% en volumen de acetonitrilo y 89% de una solución 50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y un 1% de trietanolamina. El pH de la fase móvil se ajustó en 3,5 empleando ácido fosfórico y su flujo correspondió a 1 ml/ min. La columna empleada para la separación fue una  $\text{C}_{18}$  en fase reversa (Chromolith performance RP-18e de 100 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro, Merck KGA 64271 Darmstadt, Alemania). Todas las corridas se desarrollaron a temperatura ambiente y se estableció el tiempo para cada una en 15 minutos.

El tiempo de retención para la escopolamina se determinó en  $4,8 \pm 0,5$  minutos. La curva de calibración correspondiente a la escopolamina se presenta en el Anexo B.

#### 3.1.12.7 Determinación de azúcares por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

La determinación se realizó cuantificando la cantidad de sacarosa, glucosa, y fructosa presentes en el medio de cultivo durante el transcurso de los cultivos. Los azúcares se identificaron con base en los tiempos de retención de los estándares de sacarosa, glucosa y fructosa (Sigma Aldrich) y la cuantificación se llevó a cabo por medio de una curva de calibración.

Para la realización de este ensayo se contó con un equipo Waters ® (Milford, MA, USA), que contó con un detector de índice de refracción IR 410. El software para el análisis de los datos usado fue el Millenium 2000 de Waters (Milford, MA, USA). Para este análisis, se usó como fase móvil agua desionizada, a un flujo volumétrico de 0,5 ml/ min. La columna empleada para la separación fue una Sugar Pak de 300 mm de longitud y 6,5 mm de diámetro. Todas las corridas se desarrollaron a una temperatura de 84°C. Se estableció el tiempo para cada corrida en 15 minutos.

Los tiempos de retención aproximados para los tres azúcares evaluados fueron: sacarosa  $7,49 \pm 0,2$  min, glucosa  $9,46 \pm 0,09$  min y fructosa  $11,8 \pm 0,04$  min. La curva de calibración correspondiente a los azúcares estudiados se presenta en el Anexo C.

#### 3.1.12.8 Determinación de nitrógeno presente en el medio de cultivo por espectrofotometría

Esta determinación se realizó solamente en uno de los ensayos y buscaba caracterizar un poco el consumo de nutrientes, específicamente de las fuentes de nitrógeno a lo largo del tiempo de crecimiento de las raíces.

Para ello, se usó un fotómetro NANOCOLOR® 500 D, la determinación se realizó a 365 nm luego que las muestras se pusieran en contacto con 2,6- dimetil fenol mezclado con ácido sulfúrico/ ácido fosfórico. Según lo descrito en el Test 1- 65 del catalogo del equipo empleado, para la determinación de nitratos.

Para la cuantificación se realizó una curva de calibración que se presenta junto con los resultados en el Anexo D.

### 3.2 CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *Brugmansia candida*

Dentro de esta segunda parte del capítulo, se describe el proceso desde la recolección de los frutos de *Brugmansia candida*, hasta el cultivo de raíces transformadas de esta especie en dos sistemas diferentes de biorreacción.

Para ello se partirá de la descripción del material vegetal usado, de las técnicas de infección y desarrollo de las raíces transformadas, de la manera en que se generó una curva de crecimiento para éstas, de las técnicas de generación de inóculos para el biorreactor y de las condiciones de cultivo empleadas; además, se realizará una descripción de los sistemas de biorreacción para evaluar la producción de alcaloides y el desarrollo de los cultivos en ellos, para proseguir con la etapa de extracción y cuantificación de los metabolitos, de modo que se pueda hacer una evaluación de los sistemas empleados.

#### 3.2.1 Cultivo de raíces transformadas de *Brugmansia candida*

Para la obtención de cultivos de raíces transformadas de *B. candida* se siguió el protocolo de la Cátedra de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad de Buenos Aires.

Como material vegetal de partida, se usaron plántulas cultivadas *in vitro* de dicha especie que tuvieran hojas bien desarrolladas.

Igualmente, se emplearon para la inducción de las raíces transformadas cultivos de *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402 (la descripción del plásmido se presenta en el Anexo E), activados 24 horas antes de la infección por resiembra en caja Petri sobre medio YMB, adicionado con Rifampicina (100 µg/ml), que en este caso actúa como marcador de selección.

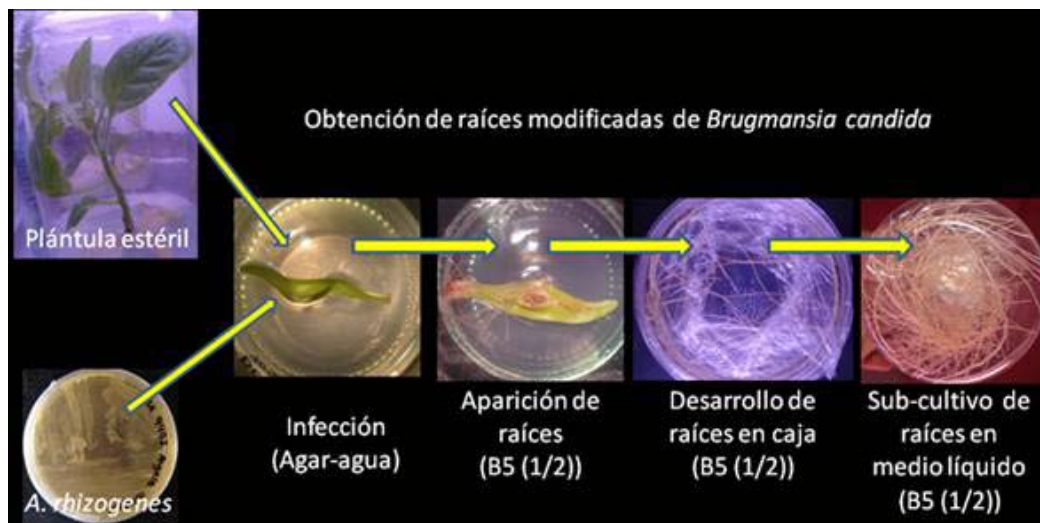
Para agilizar la obtención de las hojas provenientes de plántulas estériles, se modificó el procedimiento seguido en la etapa de germinación de los embriones, de modo que luego de su desinfección y antes de que fueran sembrados en el medio sólido, se sometieron a tratamiento con ácido giberélico al 0,1 % durante 24 horas.

Cuando las plántulas ya se habían desarrollado por completo sobre el medio sólido, se llevaron a la cámara de flujo laminar, en donde se cortaron las hojas, para luego someterlas a incisiones en la nervadura central con un bisturí impregnado con *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402, antes de sembrarlas en un medio sólido Agar-Agua (8%), en donde se mantuvieron por 5 días con el fin de facilitar la infección, y controlar la proliferación de la bacteria. Al día 5, las hojas se trasladan a medio B5 a la mitad.

Pasados aproximadamente 15 días, desde el día de la siembra de las hojas en este medio, se observa la aparición de un pequeño callo en la zona en donde se realizaron los cortes. A partir de éste, se aprecia el inicio de la formación de las raíces.

Luego de la aparición de las raíces, éstas tardaron entre 5 y 10 días en alcanzar una longitud aproximada de 5 cm, momento en el cual se cortaron en cámara de flujo laminar y se sembraron por separado en cajas Petri. Cada una de estas raíces corresponde a un clon transformado. En la caja de Petri los clones se mantuvieron hasta que las raíces cubrieron la superficie de la caja, en ese momento se transfirieron a medio líquido B5 a la mitad, en donde se continuó su cultivo.

Desde que las raíces pasan al medio B5 a la mitad de la concentración de sales, éste se encuentra adicionado con ampicilina (1 g/l) para evitar la reaparición de la bacteria.



**Figura 30.** Procedimiento para la obtención de raíces modificadas de *Brugmansia candida*.

En esta etapa del trabajo, se desarrollaron diferentes clones de raíces de *Brugmansia candida* transformadas, que incluyeron clones procedentes de plántulas colombianas y argentinas.

El material vegetal colombiano, tenía el mismo origen que el usado en los ensayos anteriores, es decir provenía del árbol situado en el campus de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, mientras que el material argentino provenía del Jardín Botánico de la ciudad de Buenos Aires.

Con el fin de caracterizar los clones obtenidos, se llevó a cabo la evaluación de la escopolamina, la hiosciamina y la anisodamina presente en ellos, y se evaluó cualitativamente también su velocidad de crecimiento. Para ello, se hizo necesario realizar la extracción y cuantificación de los alcaloides de acuerdo a los protocolos descritos a continuación.

### 3.2.2 Protocolo para la extracción de los alcaloides desde los clones transformados

Se pesa una masa de raíces de aproximada de 0,2 g (PF). Posteriormente esta masa se muele en un mortero añadiendo nitrógeno líquido para facilitar el rompimiento de los tejidos. Cuando las raíces han sido reducidas a un polvo húmedo, éste es depositado en un tubo falcon de 50 ml, al cual se adicionan 5 ml de solución de ácido sulfúrico 0,2 M que permita realizar una hidrólisis del material vegetal. El tubo falcon con la mezcla permanece en un agitador orbital a 90 rpm durante 2 h.

Transcurrido este tiempo, las raíces se filtran mediante vacío (15 pulgadas de Hg). Los sólidos se lavan sobre el filtro con 7 ml de agua destilada, y se recupera el filtrado al que se le ajusta el pH a 12, empleando una solución de NaOH 1N. Después de alcalinizar la solución se debe proceder rápidamente para evitar la pérdida de los alcaloides por degradación.

A la solución resultante, se le añaden 5 ml de cloroformo para realizar la extracción de los alcaloides. Esta mezcla se agita en el vortex por 2 minutos y luego se centrifuga por 5 minutos más a una velocidad de 252 g.

Después de centrifugar se separan las dos fases y se conserva la fase clorofórmica. La fase acuosa se extrae dos veces más para evitar pérdidas.

Luego de las tres extracciones, a la fase clorofórmica se le evapora el solvente, con ayuda de una corriente de nitrógeno gaseoso, hasta desecación total. Para su posterior análisis por CLAE los sólidos se redisuelven en la fase móvil empleada.

3.2.3 Metodología para el análisis por CLAE de los alcaloides presentes en las raíces transformadas.

Para este análisis se usa la metodología desarrollada en la cátedra de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires y consiste en la separación por CLAE usando un equipo Shimadzu LC-20AT con pre-columna y columna (LiChro CART 125-4 Lichrospher 60 RP-select B (5  $\mu$ m), Merck, Darmstadt, Alemania). La temperatura del ensayo fue de 40°C, y la fase móvil correspondió a una solución de ácido octanosulfónico 0.01M a pH 3 / Metanol (65:35 v/v) con un flujo volumétrico de 1 ml/ min. La detección se realizó a 220nm.

Por medio de esta metodología fue posible separar escopolamina (Tiempo de residencia, Tr: 8,51  $\pm$  0,12 minutos), anisodamina (Tr: 9,42  $\pm$  0,14 minutos) e hiosciamina (Tr: 13,65  $\pm$  0,23 minutos). En el Anexo F se presentan las curvas de calibración para estos tres alcaloides.

Aplicando esta metodología se seleccionó el clon Arg3 como el más viable para llevar a cabo la producción de los alcaloides, por esta razón es el usado como inóculo en los ensayos realizados en los dos sistemas de biorreacción probados.

3.2.4 Curva de crecimiento para el clon Arg3 correspondiente a raíces transformadas de *Brugmansia candida*

Para evaluar el crecimiento del clon Arg3 se realizó una curva de crecimiento en Erlenmeyer a lo largo de 25 días.

Para ello se emplearon Erlenmeyers de 125 ml, conteniendo 25 ml de medio B5 a la mitad de la concentración salina, usando como inóculo 0,11  $\pm$  0,01 g de raíces frescas (RF). Por tanto la concentración de inóculo fue de 4 g/l. Los frascos se

incubaron en un agitador orbital a 100 rpm y 25°C, con fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1,8 W/m<sup>2</sup>. En este caso se manejaron condiciones de luz diferentes (condiciones del cuarto de cultivo disponible) puesto que estas raíces no requerían de oscuridad.

Se tomaron muestras cada 5 días sacrificando 3 frascos para realizar las determinaciones de peso fresco, pH, conductividad, azúcares y alcaloides presentes en las raíces y liberados al medio de cultivo.

Caracterizado el clon, se procedió a su cultivo en los sistemas de biorreacción.

### 3.2.5 Crecimiento del clon Arg3 correspondiente a raíces transformadas de *Brugmansia candida* en los sistemas de biorreacción

La evaluación correspondiente al crecimiento del clon Arg3 en un sistema de biorreacción incluyó dos etapas:

En la primera etapa, se realizó el cultivo sumergido del clon, usando un reactor de tanque agitado de 1,5 l de capacidad (BIOFLO III, New Brunswick Scientific, U.S.A), y en la segunda, se hizo el cultivo del clon en el sistema usado para el crecimiento de raíces normales descrito anteriormente, que consiste en dos unidades, una de crecimiento y un reservorio de medio.

#### 3.2.5.1 Generación de inóculos del clon Arg3 correspondiente a raíces

transformadas de *Brugmansia candida* para el crecimiento en biorreactor

En el caso de las raíces transformadas, la producción del inóculo que se usó en el biorreactor es más sencilla, puesto que luego de generar el clon, sólo se requiere repicarlo cada 20 días para mantenerlo. Por tanto, los inóculos usados en el biorreactor tienen esta edad. Es importante destacar, que cuando se realiza el subcultivo, se debe eliminar la parte de las raíces en donde se observe

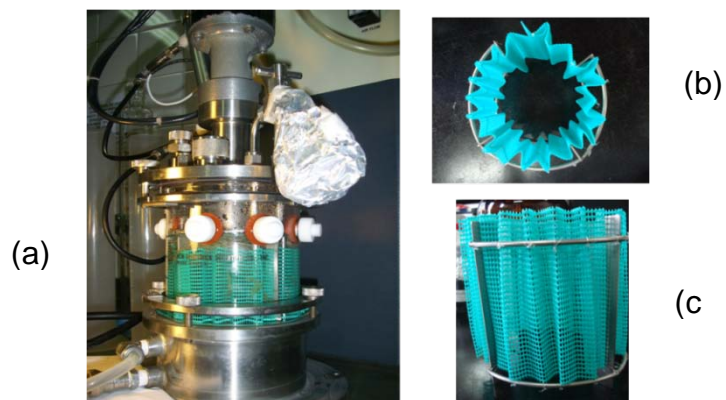
pardeamiento, pues ésta corresponde a las raíces más viejas y su capacidad para continuar de creciendo es casi nula.

#### 3.2.5.2 CASO I: Crecimiento del clon Arg3 correspondiente a raíces transformadas de *Brugmansia candida* por cultivo sumergido en un reactor de tanque agitado.

Se usó un reactor de tanque agitado de 1,5 l (BIOFLO III, New Brunswick Scientific, U.S.A), que consta de un tanque de vidrio, 4 baffles, una tapa de acero inoxidable con múltiples puertos y una turbina de agitación tipo Rushton. Además de los elementos antes mencionados, se incluyó en el sistema una malla plástica con poros de 2,5 mm que recubrió el sistema de deflectores formando un grupo de canales para dar soporte a las raíces.

Para el cultivo se emplearon 1,2 l de medio B5 a la mitad, adicionado con 20 g/l de sacarosa y 1 g/l de ampicilina. Para lograr una distribución homogénea de las raíces en el reactor, inicialmente éste se agitó durante 10 minutos a 50 rpm. Este sistema se inoculó con 10 g de RF, por tanto la concentración de inóculo fue de 8,3 g/l. El flujo de aire se mantuvo en 0,5 vvm. En la figura 29 se puede observar el montaje empleado.

Cada cinco días, se determinaron la conductividad, el pH, el contenido de sacarosa y alcaloides liberados en el medio de cultivo. Debido a los resultados obtenidos en la curva de crecimiento desarrollada en los Erlenmeyer en cuanto a la producción de biomasa y alcaloides, se decidió dar por terminados los ensayos al día 21. Terminado el experimento, el sistema fue desmontado y se recolectaron las raíces.



**Figura 31.** (a) Configuración del biorreactor empleado para el cultivo sumergido de raíces transformadas de *Brugmansia candida*. (b) Vista superior y (c) Vista lateral de la malla usada como soporte.

Las raíces que crecieron en el reactor, se separaron cuidadosamente de la malla con la cual se habían entrecruzado. Se pesaron y conservaron a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para realizar la determinación de alcaloides, lo que permitía acumular las muestras antes de realizar los análisis por CLAE. Este análisis se realizó tomando muestras de raíces ubicadas sobre la malla en distintas posiciones dentro del biorreactor (parte superior, central interna y externa y parte inferior).

#### 3.2.5.3 CASO II: Crecimiento del clon Arg3 correspondiente a raíces

transformadas de *Brugmansia candida* en un sistema de biorreacción compuesto por dos unidades.

Se usó el sistema descrito en el numeral 3.1.5 para el crecimiento de raíces normales de *Brugmansia candida*. La única diferencia operacional, consistió en la eliminación del cubrimiento de la unidad, pues las raíces transformadas no requieren de la condición de oscuridad para su desarrollo.

Para el cultivo se emplearon 2 l de medio B5/2, adicionado con 20 g/l de sacarosa, 1 g/l de ampicilina y 10 mg/l de anfotericina. Para inocular el reactor, se emplearon las raíces de un subcultivo en frasco, se eliminaron de estas las regiones pardeadas, y se introdujeron en la unidad de crecimiento ubicándolas sobre la

malla dispuesta como soporte. La concentración del inóculo empleada fue de 6,5 g/l.

Cada cinco días se determinaron la conductividad, el pH y el contenido de sacarosa. En este caso, los alcaloides liberados al medio de cultivo durante el crecimiento sólo fueron cuantificados para la última muestra.

Luego de 21 días de cultivo se dió por terminado el experimento, el sistema se desmontó y se recolectaron las raíces.

Las raíces cultivadas en la unidad de crecimiento se separaron cuidadosamente de la malla con la cual se habían entrecruzado. Se pesaron y conservaron a  $-10^{\circ}\text{C}$  para realizar la determinación de alcaloides (éste tipo de conservación no permitía acumular muestras, por tanto los análisis por CLAE debían realizarse en un tiempo no superior a 1 semana). Este análisis se realizó teniendo en cuenta distintas posiciones en el biorreactor.

En ninguno de los ensayos realizados con el clon Arg3, se realizó la aplicación del sulfato de cobre como elicitador, pues de la evaluación de su desempeño sobre las raíces normales, se concluyó que su efecto no era apreciable.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CRECIMIENTO DE RAÍCES NORMALES DE *Brugmansia candida*

La primera parte de este capítulo, muestra cuales fueron los resultados obtenidos, al cultivar raíces normales de *Brugmansia candida*, en el sistema de biorreacción compuesto por dos unidades adaptado para tal fin.

Estos resultados incluyen información sobre la germinación de los embriones, las características del crecimiento de las raíces no transformadas y su desempeño en un sistema de biorreacción de dos unidades, operando de dos modos diferentes: con suministro de aire en la unidad de crecimiento, o, con suministro de aire en la unidad denominada reservorio de medio.

#### 4.1.1 Proceso de Germinación de los embriones de *Brugmansia candida*

Siguiendo los protocolos descritos en la parte de materiales y métodos (numerales 3.1.1 y 3.2.1) para la producción de raíces no transformadas de *Brugmansia candida*, los primeros ensayos condujeron a los siguientes resultados respecto a los tiempos de germinación, ver tabla 2.

Del total de embriones sembrados, al día 30, 115 embriones no habían germinado ni se habían contaminado. Al día 45, eran 29 los embriones que no habían incurrido en los procesos descritos anteriormente.

**Tabla 2.** Resultados correspondientes al proceso de germinación de embriones de *Brugmansia candida* en medio B5 libre de hormonas.

Embriones sembrados	Embriones no contaminados, Germinados		Embriones contaminados		%Germinación no Contaminadas		% Contaminación	
	Día 30	Día 45	Día 30	Día 45	Día 30	Día 45	Día 30	Día 45
246	87	165	44	52	43	85	18	21

Para complementar este experimento, se observó el crecimiento de estas raíces después de inocularlas en medio líquido B5. En esta etapa experimental se evaluaron dos condiciones distintas, la primera con radículas de 1,5 a 2 cm obtenidas luego de 30 días de germinación. La segunda alternativa estudiada consistió en realizar ensayos con los inóculos que alcanzaron dicha condición luego de 45 días de cultivo de los embriones sobre el medio sólido.



**Figura 32.** Aislamiento de embriones de *Brugmansia candida* con el tamaño adecuado para ser transferidos desde el medio B5 sólido al medio B5 líquido.

Las fracciones radiculares se sembraron en medios líquidos B5, suplementados con sacarosa a 20 g/l. Luego de 21 días de cultivo se estudió el cambio en el peso fresco y la concentración de los alcaloides, los resultados se consignan en la tabla 3:

**Tabla 3.** Crecimiento de raíces de *Brugmansia candida* y producción de alcaloides en medio líquido, usando inóculos que provienen de cultivos sobre medio B5 sólido de dos edades diferentes (30 y 45 días).

Edad de las raíces usadas como inóculo (días)	Masa inicial de Inóculo (gramos)	Masa final luego de 21 días de cultivo (gramos)	% de Incremento de masa	Producción específica de escopolamina mg / g de raíz (peso seco)
30	0,24 ± 0,06	0,70 ± 0,21	194,54	11,2 ± 1,7
45	0,18 ± 0,04	0,33 ± 0,16	80,56	6,6 ± 0,6

Los datos presentados en la tabla 3, corresponden a los promedios obtenidos con 3 réplicas.

De estos resultados, se puede decir que los embriones que germinaron dando lugar a raíces de una longitud aproximada de 2 cm, en un periodo de 30 días, produjeron después de ser usados como inóculos en cultivos en medio líquido, masas finales equivalentes a 2,95 veces su masa inicial. Mientras que las raíces procedentes de embriones que se dejaron desarrollar durante 45 días, antes de ser usados como inóculos en medio líquido, alcanzaban masas finales iguales a 1,38 veces la masa inicial. En ambos casos las condiciones de los cultivos en medio líquido fueron temperatura ambiente y agitación de 70 rpm. Lo que puede traducirse, en que las raíces que tardaron más tiempo en alcanzar la condición requerida para convertirse en inóculos, continúan con una tendencia a crecer de manera más lenta luego de ser transplantadas al medio líquido. Igualmente se observó una disminución en la producción de alcaloides en ellas, pues las raíces

que tardaron 30 días en la fase inicial del proceso produjeron 11,2 mg de escopolamina/gramo de raíz (masa seca), mientras que las raíces de 45 días produjeron 6,6 mg de escopolamina/ g de raíz (masa seca).

Todos estos elementos llevaron a concluir que los inóculos empleados en el sistema de biorreacción deberían corresponder a raíces generadas luego de 30 días desde la siembra del embrión sobre el medio sólido.

#### 4.1.2 Efecto de la adición de ácido naftalenacético sobre el desarrollo de los embriones para la producción de raíces de *Brugmansia candida*

Este experimento fue realizado con el fin de evaluar si la adición de ANA, a los medios de cultivo, favorecía la obtención de raíces normales de *B. candida* a partir del cultivo de embriones. Se encontró que esta hormona sí afectó el desarrollo de las raíces, de modo que la morfología de las mismas variaba de manera apreciable entre un ensayo y otro.

En ausencia de ANA las raíces eran alargadas y delgadas, mientras que en los casos en donde se aplicaba ANA, las raíces presentaban deformaciones que se intensificaban a medida que se incrementaba la concentración de esta sustancia, haciéndose cada vez más cortas y gruesas, llegando en algunos casos a dar lugar a la formación de agrupaciones de células no diferenciadas (callos) sobre ellas.

En la figura 33, se ve que las raíces que crecen en medio suplementado con ANA, durante 60 días (ensayos 5, 6 y 7), tienen tendencia a producir agrupaciones celulares. Lo anterior indica que en estos casos la adición de la hormona se puede presentar como alternativa para el establecimiento de cultivos celulares y se debe descartar como alternativa para la rizogénesis directa a partir de los embriones.



**Figura 33.** Imágenes de raíces normales de *Brugmansia candida* obtenidas en los ensayos correspondientes a la aplicación de ácido naftalenacético en adición al medio B5 usado en el cultivo (**ensayo 1:** 0 ppm durante 60 días, **ensayo 2:** 1 ppm durante 30 días, **ensayo 3:** 2 ppm durante 30 días, **ensayo 4:** 3 ppm durante 30 días, **ensayo 5:** 1 ppm durante 60 días, **ensayo 6:** 2 ppm durante 60 días, **ensayo 7:** 3 ppm durante 60 días).

En la tabla 4, se consignan los resultados correspondientes al peso seco de las raíces obtenidas en cada uno de los ensayos. A partir de dicha información se infiere que las raíces que crecieron en medio con ANA durante los 30 primeros días, y que luego fueron transferidas a medio libre de esta hormona, fueron las que alcanzaron mayores pesos. Esto indica que esta condición permite obtener la mayor cantidad de biomasa dentro de todas las opciones. De los tres

experimentos que cumplieron con este requisito, el ensayo 4 (medio suplementado con 3 ppm de ANA), fue el que presentó la mayor producción de biomasa.

**Tabla 4.** Masa seca de raíces normales de *Brugmansia candida* obtenida a partir del cultivo de los embriones, para cada una de las condiciones estudiadas de aplicación de ácido naftalenacético luego de 60 días.

<b>Ensayo</b>	<b>Masa de raíces secas por frasco (g)<sup>x</sup></b>
1	0,05 ± 0,01
2	0,07 ± 0,03
3	0,08 ± 0,01
4	0,14 ± 0,04
5	0,07 ± 0,02
6	0,04 ± 0,01
7	0,06 ± 0,02

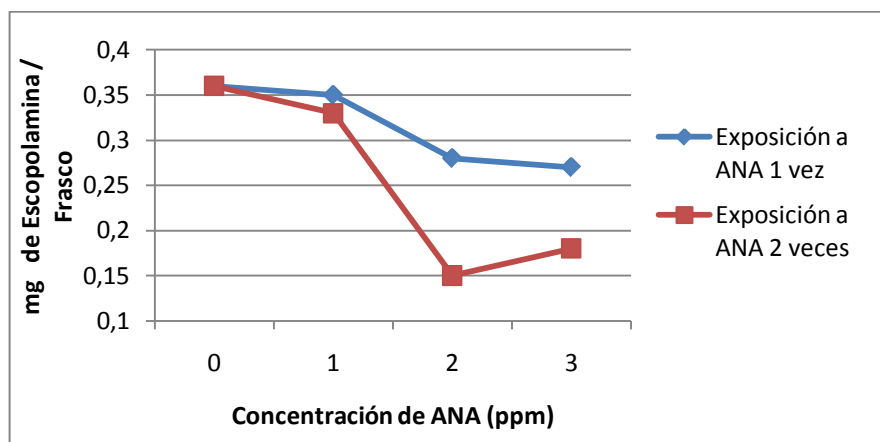
<sup>x</sup> Los valores incluyen la desviación estándar obtenida con las 5 replicas.

Se evaluó además el efecto del ANA sobre la producción de escopolamina (tanto la liberada al medio de cultivo como la retenida en los tejidos vegetales). La máxima cantidad de escopolamina extraída, 7,24 mg/ g de raíces secas, se obtuvo para el ensayo 1 (medio libre de ANA durante los 60 días). Como se muestra en la tabla 5, es claro que si el objetivo del cultivo es la producción del alcaloide, el emplear un medio libre de esta hormona es una buena alternativa.

**Tabla 5.** Escopolamina extraída de raíces normales de *Brugmansia candida* en cada uno de los ensayos realizados, aplicando concentraciones de ácido naftaleancético variando entre 0 y 3 ppm.

Ensayo	Escopolamina extraída (mg/g raíces secas)	Escopolamina promedio producida en cada uno de los ensayos (mg/frasco)
1	7,24 ± 0,72	0,36
2	5,07 ± 0,31	0,35
3	3,51 ± 0,28	0,28
4	1,96 ± 0,24	0,27
5	4,71 ± 0,28	0,33
6	3,69 ± 0,32	0,15
7	2,99 ± 0,33	0,18

Por lo general, los tratamientos en donde el ANA estuvo presente mostraron menores niveles de producción de escopolamina. Sin embargo, al comparar las dos condiciones evaluadas aplicando la hormona, se nota que el alcaloide está presente en una menor concentración, en las raíces que estuvieron en contacto con una mayor concentración de ANA durante los 60 días de cultivo.

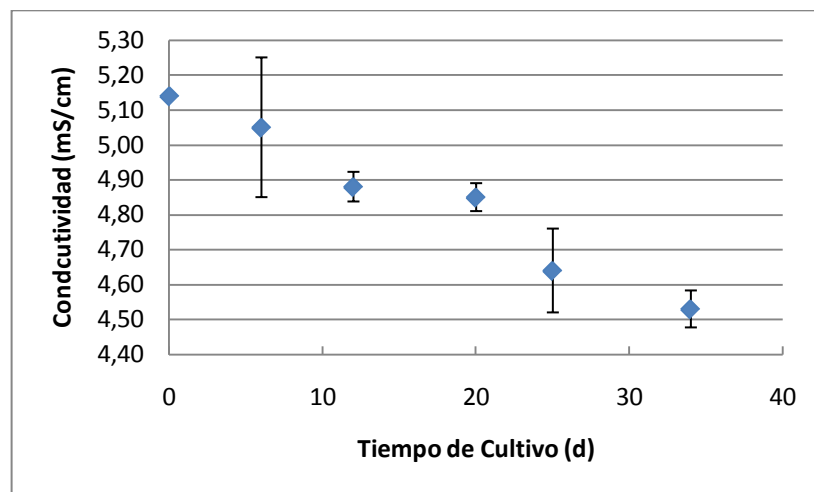


**Figura 34.** Escopolamina producida luego de 60 días de cultivo de raíces normales de *Brugmansia candida* por unidad experimental (frasco), para cada una de las condiciones de aplicación de ANA evaluadas.

De estos resultados, que indican que la hormona causa deformación en las raíces y pérdida en su capacidad para producir escopolamina, se infiere que es mejor alternativa generar los inóculos a partir de cultivos de embriones desarrollados en medio libre de ella.

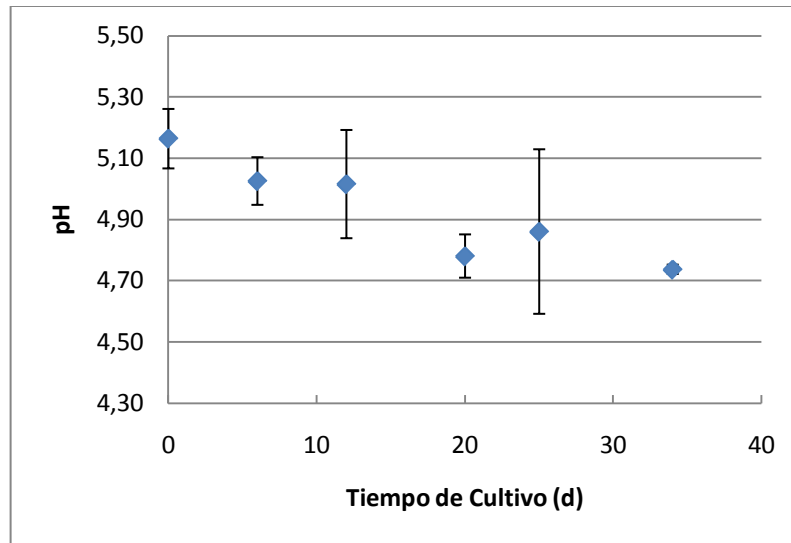
#### 4.1.3 Curva de crecimiento para las raíces normales de *Brugmansia candida*

Los resultados correspondientes a esta parte, están relacionados con el seguimiento que se realizó sobre un cultivo de raíces normales de *B. candida*. Se registraron la conductividad, el pH, la concentración en el medio de cultivo de sacarosa y alcaloides (escopolamina y anisodamina) y el incremento de la masa de las raíces a lo largo de 34 días. En primer lugar, se presenta el comportamiento de la conductividad, variable que tiende a disminuir a lo largo del tiempo de cultivo debido al consumo de las sales que se encuentran disueltas en el medio. Ver figura 35.



**Figura 35. Comportamiento de la conductividad del medio, a lo largo de 34 días, para el cultivo raíces normales de *B. candida* en Erlenmeyer.**

De acuerdo con la figura 36, se puede observar que el pH del medio disminuye ligeramente durante el tiempo de cultivo. Prueba de ello, es que el valor reportado a los 34 días de cultivo difiere en menos de un 10 % del valor inicial de pH.



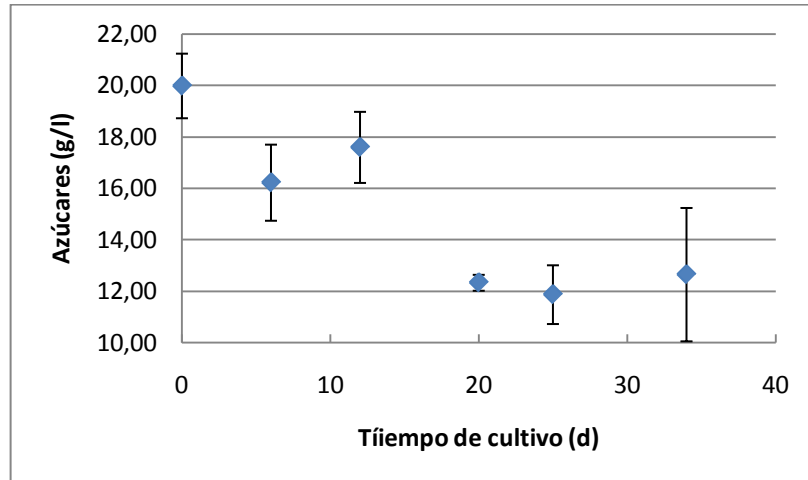
**Figura 36.** Comportamiento del pH del medio a lo largo de 34 días, para el cultivo de raíces normales de *B. candida* en Erlenmeyer.

Otra de las variables estudiadas, fue el contenido de azúcares en el medio de cultivo, que representa la concentración de sacarosa, fructosa y glucosa. Éstas conforman la fuente de carbono disponible para el crecimiento de las raíces.

En la figura 37, se puede apreciar cómo el mayor consumo de la fuente de carbono se presenta entre los días 12 y 20, mientras que después de este período, parece no existir cambio en dicha variable. El consumo total de la misma durante el tiempo de estudio no excede el 50 % del total disponible.

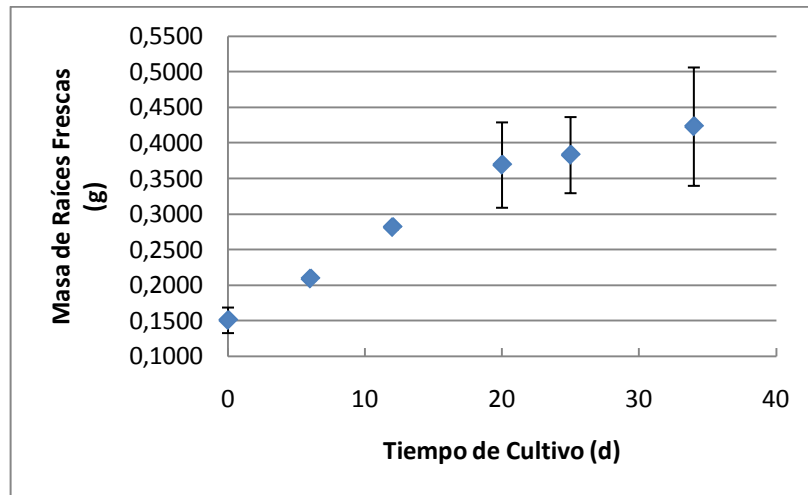
En los cromatogramas obtenidos como resultado del análisis de los azúcares en el medio de cultivo, se observó que la sacarosa se hidroliza a glucosa y fructosa y de esa forma es consumida por las células. También se observa que la glucosa es consumida preferencialmente sobre la fructosa como se muestra en el Anexo G.

En este mismo anexo se presenta una figura en donde de manera simultánea se puede apreciar el consumo de cada uno de los azúcares presentes y analizados en el medio de cultivo y el crecimiento de la biomasa.



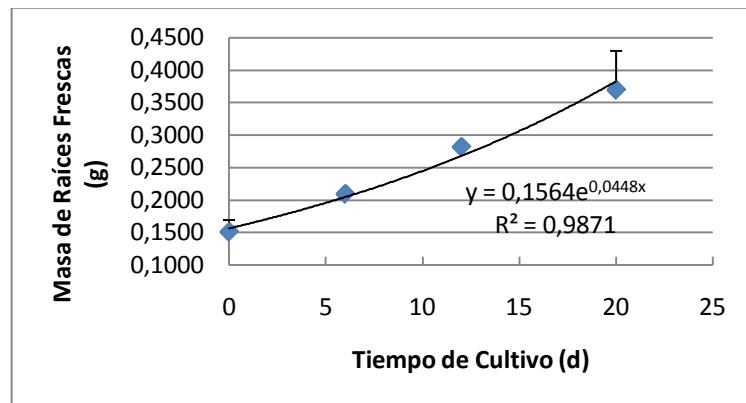
**Figura 37.** Comportamiento de la concentración de azúcares del medio, a lo largo de 34 días, para el cultivo de raíces normales de *B. candida* en Erlenmeyer.

El registro del peso fresco de las raíces, considerado como la biomasa, se ilustra en la figura 38. Este presenta un incremento marcado durante los primeros 20 días de cultivo, después de los cuales tiende a mantenerse casi constante.



**Figura 38.** Comportamiento del peso fresco de las raíces normales de *B. candida* (biomasa), a lo largo de 34 días de cultivo en Erlenmeyer.

Tomando los datos correspondientes a la fase exponencial, es decir el periodo comprendido entre el día 0 y 20, se puede establecer una relación para determinar la velocidad específica de crecimiento de las raíces, tal y como se ve en la figura 39.

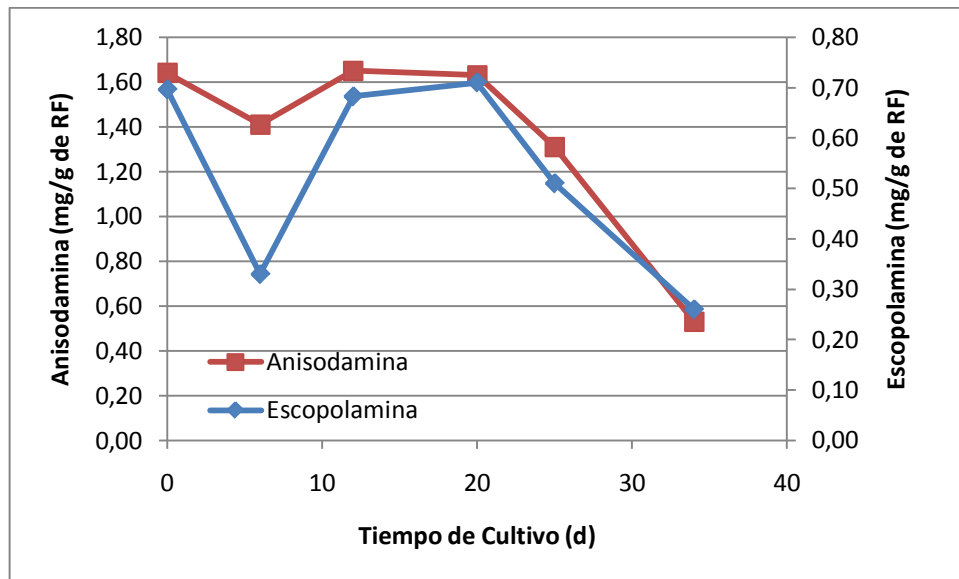


**Figura 39.** Etapa de crecimiento exponencial de las raíces normales de *B. candida* cultivadas en Erlenmeyer durante 34 días.

Puede decirse entonces que la biomasa durante esta etapa tiene un crecimiento del tipo:  $X = X_0 e^{\mu t}$ , en donde X corresponde a la biomasa en un tiempo t,  $X_0$  es la masa del inóculo,  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento y t es el tiempo.

De acuerdo con lo anterior, la velocidad específica de crecimiento de las raíces normales de *B. candida*, durante su etapa de crecimiento exponencial, es de  $0,045 \text{ d}^{-1}$ , valor similar al reportado por Piñeros (2005) para este mismo tipo de raíces.

Así mismo, durante el período de crecimiento de las raíces, se realizó el seguimiento del contenido de escopolamina y anisodamina. Resulta interesante el comportamiento similar de dichos alcaloides. Su concentración se incrementa durante los primeros 20 días y luego muestra una clara tendencia a disminuir. Ver figura 40.



**Figura 40.** Concentración de Anisodamina y Escopolamina en las raíces normales de *B. candida*, cultivadas en Erlenmeyer a lo largo de 34 días.

En la figura 40 no se incluye una desviación estándar, puesto que para realizar la cuantificación de los alcaloides, se reunieron las raíces provenientes de un mismo tiempo para hacer la extracción de los alcaloides, convirtiéndose las replicas en una sola muestra, para evitar errores inducidos por la escasa cantidad de muestra.

Este último resultado permite sugerir, que en los ensayos realizados en el sistema de biorreacción, el tiempo de duración del cultivo debe ser inferior a 25 días, pues a pesar que después del día 20 la biomasa se incrementa levemente, la disminución en el contenido de alcaloides hace que no se justifique la extensión del mismo.

Con base en los resultados anteriores y pensando en el modo de realizar una medida indirecta de la biomasa en el biorreactor, se realizaron dos correlaciones. La primera entre la biomasa y la conductividad y la segunda entre la biomasa y la concentración de azúcares.

En el primer caso, se establecieron dos nuevas variables a partir de los datos existentes, para relacionar la conductividad con la de biomasa. Estas variables fueron: El Índice de Crecimiento (IC), que ha sido descrito anteriormente (numeral 3.1.12.4), y el porcentaje de la Conductividad Inicial (% de Ko), que corresponde a la relación entre la conductividad en un tiempo t y la conductividad inicial.

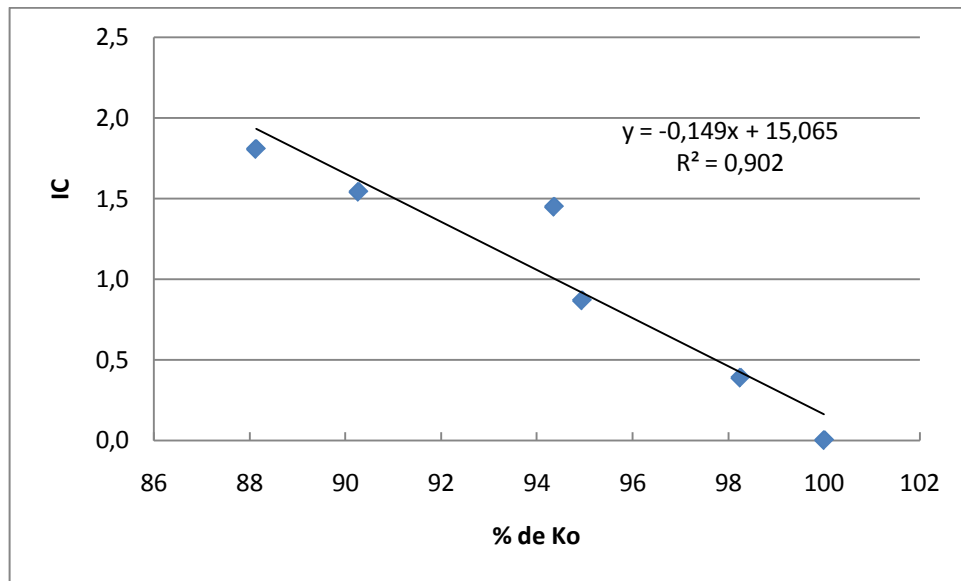
Al procesar los datos presentados anteriormente, se obtienen los valores requeridos para relacionar las variables de interés, ver tabla 6:

**Tabla 6.** Valores de IC y % de Ko evaluados a cada condición de tiempo durante los 34 días de cultivo de las raíces normales de *B. candida* en Erlenmeyer.

Tiempo de Cultivo (d)	% de Ko*	IC*
0	100,00	0,0
6	98,25	0,4
12	94,94	0,9
20	94,36	1,4
25	90,27	1,5
34	88,13	1,8

\*Los valores iniciales de Ko y Xo, son 5,14 mS/cm y 0,1509 g respectivamente.

Con estos valores se procedió a realizar una gráfica para establecer una relación lineal entre ellos. Ver figura 41.



**Figura 41.** Relación entre el IC y el % de Ko, para el cultivo de raíces normales de *B. candida* usando medio B5 en Erlenmeyer.

De la figura 41 se puede obtener la relación:

$$IC_t = [-0,15 * (K_t/K_o) * 100] + 15,07 \quad \text{Ecuación 3}$$

IC<sub>t</sub>: Índice de crecimiento en un tiempo t.

K<sub>o</sub>: Conductividad inicial.

K: Conductividad en el tiempo t.

Para los datos experimentales obtenidos se tiene un índice de correlación de 0,95. En este caso si se quisiera determinar la biomasa en un tiempo t, esta sería equivalente a:

$$x_t = (x_o * IC_t) + x_o \quad \text{Ecuación 4}$$

De otro lado, para relacionar la concentración de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) con el incremento de la biomasa, se establece una nueva variable que es

el % de azúcares iniciales (% de So), que corresponde a la relación entre la concentración de azúcares en un tiempo t y la concentración inicial de azúcar.

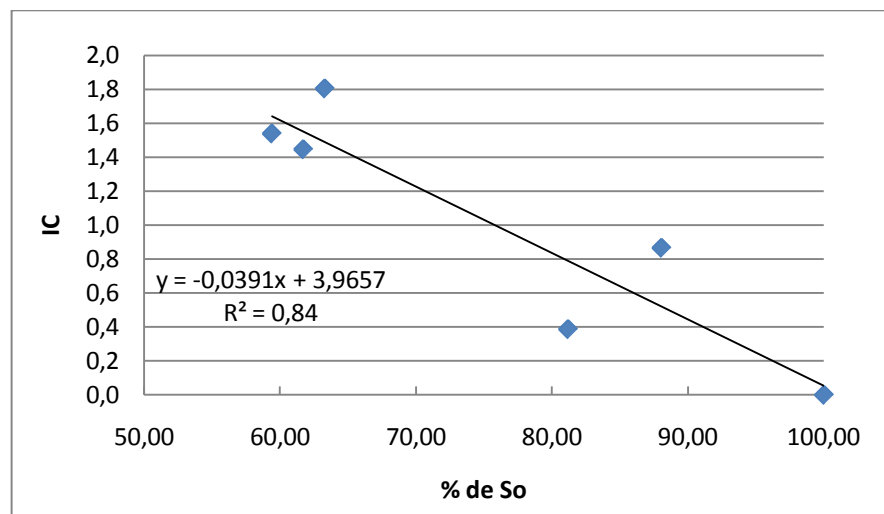
En la tabla 7 se encuentran los valores empleados para relacionar estas variables:

**Tabla 7.** Valores de IC y % de So evaluados a cada condición de tiempo durante los 34 días de cultivo de las raíces normales de *B. candida* desarrollado en Erlenmeyer.

Tiempo de Cultivo (d)	% de So*	IC*
0	100,00	0,0
6	81,18	0,4
12	88,05	0,9
20	61,71	1,4
25	59,40	1,5
34	63,29	1,8

\*Los valores iniciales de So y Xo, son 20 g/L y 0,1509 g respectivamente.

Los datos experimentales se graficaron y se hizo un ajuste lineal, que se presenta en la figura 42.



**Figura 42.** Relación entre el IC y el % de So, para un cultivo de raíces normales de *B. candida* desarrollado en Erlenmeyer usando medio B5.

En este caso la correlación obtenida está dada por la expresión:

$$IC_t = [-0,04 * (S_t/S_o) * 100] + 3,97 \quad \text{Ecuación 5}$$

Con una correlación equivalente a 0,92.

Es importante destacar, que de las dos variables usadas para determinar de manera indirecta el incremento de la biomasa, es la conductividad, la que en este caso permite hacer una mejor aproximación, sin que esta sea del todo aceptable, dada la correlación que presentan los datos. En el Anexo K, se presenta la relación entre estas correlaciones y el rendimiento biomasa – sustrato.

#### 4.1.4 Operación del sistema de biorreacción

Como se indicó en el numeral 3.1.7, la operación en el sistema de biorreacción se llevó a cabo de dos maneras diferentes, en la primera el aire se empleó para impulsar el medio de cultivo y realizar la aspersion del mismo sobre las raíces en la unidad de crecimiento, y en el segundo caso, el aire se burbujeo dentro del medio de cultivo en la unidad denominada reservorio y desde ahí, el medio aireado fue alimentado a través de una bomba a la unidad de crecimiento. Cada uno de los ensayos se realizó por duplicado.

##### 4.1.4.1 Caso 1: El aire contribuye a la aspersion del medio de cultivo sobre las raíces y es introducido directamente en la unidad de crecimiento

Parte de los resultados de la adaptación de este sistema de cultivo, al caso particular de estudio, tiene que ver con el establecimiento de protocolos para desarrollar de manera satisfactoria los cultivos.

A este respecto, se deben tener en cuenta tres aspectos importantes:

- Cuando el aire es suministrado en la unidad de crecimiento, pueden presentarse inconvenientes respecto a la manera de evacuarlo, puesto que la unidad, cuenta únicamente con una salida, y esta a su vez está afectada por la caída de presión a través de un filtro de 0,20  $\mu\text{m}$ . Lo que ocasiona problemas de incremento de la presión en el sistema. Para superar estos inconvenientes, es necesario cambiar el filtro por lo menos una vez durante el cultivo para evitar que se tapone, y añadir otras salidas para facilitar la evacuación del aire que esté presente en exceso.
- A nivel de laboratorio se usaron mangueras de silicona para el transporte de medio entre las dos unidades. La fragilidad de éstas y el continuo desgaste al que se ven sometidos por la acción de las bombas peristálticas sobre ellas, hace pensar que a una escala superior se deben considerar otro tipo de ductos para el transporte el medio entre las unidades. Ver figura 43.



**Figura 43.** Desgaste en las mangueras conductoras de medio, evidenciado en los cambios de diámetro de las mismas, ocasionado por las bombas peristálticas empleadas en el sistema de biorreacción adoptado para el cultivo de raíces de *Brugmansia candida*.

- La inoculación de las raíces debe realizarse rápida y cuidadosamente para disminuir los riesgos de contaminación. De otro lado, es necesario que el inóculo se encuentre libre de contaminación, pues de él depende en gran medida el éxito del cultivo.

En este caso, la inoculación se realizó por medio de uno de los puertos ubicados en la tapa de la unidad de crecimiento. A través de éste, las raíces fueron

introducidas rápidamente con ayuda de pinzas para ubicarlas en el centro de la malla empleada como soporte.

Superados, estos inconvenientes técnicos, se procedió a la realización de los cultivos. A lo largo del tiempo de experimentación, se realizó el seguimiento del pH, la conductividad y el contenido de azúcares. Además de éstas variables, también se tomaron muestras para el análisis por CLAE de la escopolamina a nivel intracelular, ya que se determinó que extracelularmente la concentración de dicho alcaloide en la etapa de crecimiento no es detectable.

**Información relativa al ensayo:**

El inóculo correspondiente a 3 g/l de raíces obtenidas a partir de embriones cultivados durante 30 días en medio sólido (B5 + 20 g/l de sacarosa + 10 g/l de Agar pH: 5.8).

**Medio:** B5 suplementado con sacarosa 20 g/l.

**Filtros usados para el aire:** 0,22  $\mu\text{m}$ .

**Adiciones al medio:**

Ampicilina: 1 g/ 2l de medio.

Nistatina: 1ml/ 2l de medio (de suspensión de 100.000 UI por ml).

**pH del medio antes de las adiciones:** 5.8

**pH del medio después de las adiciones:** Aprox. 7.0

**Flujo de Aire:** 0,47 l/min (0,24 vvm).

**Transferencia de medio:**

La calibración de la bomba usada para conducir el medio desde la unidad reservorio hacia la unidad de crecimiento y desde esta unidad hacia el reservorio, se presentan en el Anexo H.

**Flujo medio de la bomba de entrada:** 0,30 ml/s.

**Flujo medio a la salida:** 0,39 ml/s.

El flujo entre las dos unidades se ajustó de este modo para evitar que el medio se acumulara en la unidad de crecimiento, y garantizar así su continuo movimiento entre las dos unidades. Sin embargo, esta situación ocasionaba que

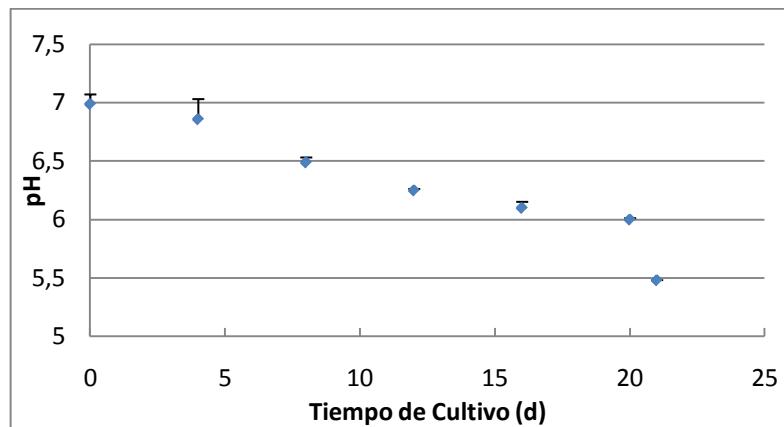
en algunos momentos, la bomba de salida succionara aire sin que esto interfiriera con el proceso.

**Muestreo:**

Se tomaron muestras del medio de cultivo cada 4 días, retirando en cada ocasión 20 ml de medio del tanque reservorio.

El registro de pH en el reactor se realizó empleando el electrodo incluido dentro de los accesorios del reactor Applikon usado como tanque reservorio.

Esta información se presenta en la figura 44.



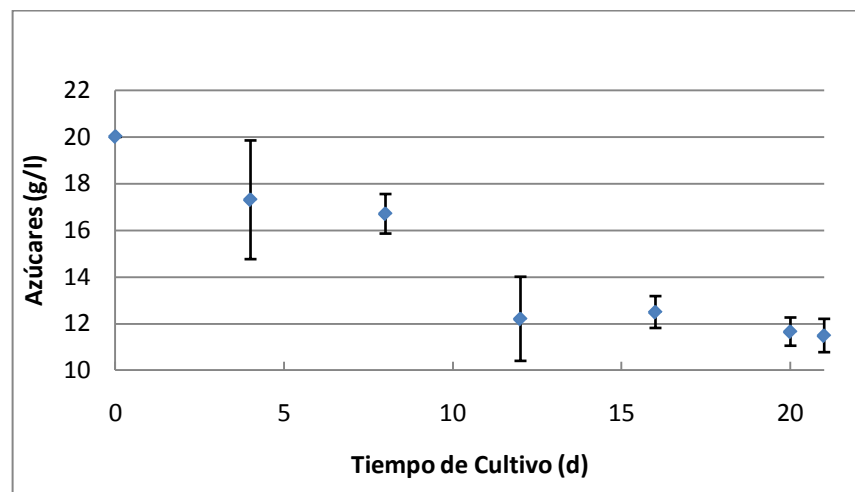
**Figura 44.** Comportamiento del pH del medio, para los 21 días de cultivo de raíces normales de *B. candida* en el sistema de biorreacción de dos unidades, caso I.

El pH inicia en un valor de 7.0 debido a la adición que se hizo al medio de cultivo de antibiótico y antimicótico, puesto que estas sustancias son de carácter básico. Este incrementó en el pH no tiene un efecto significativo sobre el crecimiento de las raíces y la producción de alcaloides, puesto que es un pH neutro, de otro lado si el cambio en el pH fuese más brusco, pH superiores a 9.0, o, inferiores a 4.5, esta variable podría influenciar la acumulación de los alcaloides dentro de las vacuolas de las células, o, podría interferir con los procesos de absorción de los nutrientes (29, 116).

Es importante destacar que al adicionar el sulfato de cobre durante el último día del ensayo, el pH se disminuyó de manera considerable, esto se debe obviamente al carácter ácido de esta sal.

Así mismo, se determinó que otra de las razones para que se presentara una disminución del pH fue la presencia del antibiótico. Al realizar un seguimiento paralelo de un medio adicionado con antibiótico y sin raíces, para un tiempo de 21 días, se observó este mismo fenómeno.

Los resultados correspondientes al cambio en la concentración de azúcares en el medio de cultivo se presentan en la figura 45, en donde se puede observar que el mayor consumo de azúcares se presenta para los 12 primeros días del cultivo, después de los cuales esta variable tiende a estabilizarse.



**Figura 45.** Comportamiento de la fuente de carbono presente en el medio, para los 21 días de cultivo de raíces normales de *B. candida* en el sistema de biorreacción de dos unidades, caso I.

### Crecimiento de las raíces

Respecto al incremento en la biomasa se tiene que:

**Peso de raíces inóculo:**  $5,95 \pm 0,07$  g.

**Peso de raíces al finalizar cultivo:** 15,36 ± 1,33 g.

Estos pesos son de raíces frescas.

### Índice de Crecimiento

Utilizando los valores promedio de la biomasa al inicio y al final y la ecuación 1, se tiene:

$$IC = \frac{(15,36 - 5,95)}{5,95}$$

$$IC = 1,58.$$

En este caso se tiene un índice de crecimiento igual a 1,58, que es un valor muy similar al obtenido para las raíces evaluadas en la curva de crecimiento cuando el cultivo era realizado en erlenmeyers de 125 ml, en donde se alcanzó un valor de IC de 1,4.

En la tabla 8, se presentan los resultados correspondientes al cálculo indirecto de la biomasa en el reactor, de acuerdo con la correlación obtenida entre esta variable y la concentración de sacarosa para los cultivos realizados en Erlenmeyer.

**Tabla 8.** Cálculo de la biomasa (PF de raíces de *Brugmansia candida* no transformada) en el reactor al final de cultivo de acuerdo con la concentración de azúcar, caso I.

Relación usada	Valor inicial de la variable	Valor final de la variable	IC	Biomasa final según IC (PF)	% error*
Sacarosa – Biomasa	So = 20 g/L	S = 11, 49 g/L	1,7	16,07g	4,6

\*El error se calcula respecto al valor real de biomasa al finalizar el cultivo (15,36 g de PF).

La determinación indirecta de la biomasa, a partir de la concentración de azúcares en el medio, dio una muy buena aproximación a los resultados reales obtenidos para el crecimiento de las raíces en el biorreactor, Caso I.

**Humedad de las raíces:**

La humedad de las raíces fue  $92,5 \pm 0,7$  %.

**Análisis cuantitativo del metabolito por CLAE:**

Se realizó el análisis a las muestras del medio de cultivo tomadas los días 4, 8, 12, 16, 20 y 21. En ninguna de las muestras se observó la presencia del metabolito en cantidades detectables (nivel de detección mínimo: 0,01 mg de escopolamina/ml). Estos resultados, indican que no hubo liberación del alcaloide al medio de cultivo, o que si la hubo, fue muy pequeña y no se detectó en los análisis.

Con estos resultados se confirmó el hecho presentado por otros investigadores, en el sentido que no se evidencia la presencia del metabolito en el medio en cultivos que no han sido expuestos a un agente elicitor (31, 39).

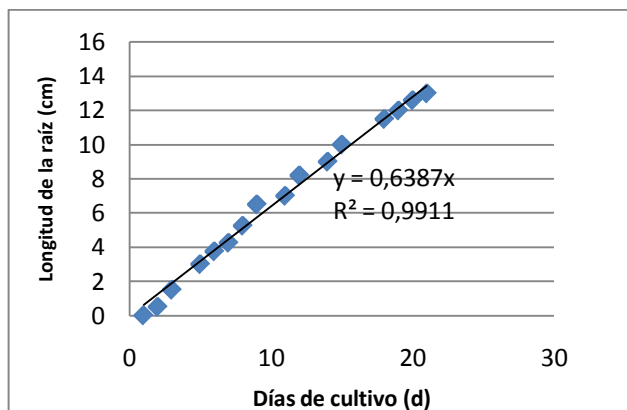
La aplicación del sulfato de cobre 0.2 mM, con el propósito inicial de favorecer la liberación del metabolito al medio, bajo las condiciones experimentales probadas, no arrojó un resultado positivo. Se presume que esta situación se debe a que el contacto entre el elicitor y la masa de raíces no es suficiente en este caso, así como lo fue para unidades experimentales de menor volumen y cultivos sumergidos, donde la probabilidad de interacción entre la biomasa y el compuesto elicitor es mucho mayor.

Se determinó una concentración de escopolamina igual que  $9,5 \pm 3,04$  g mg/ g de RS, dicho resultado es menor que el encontrado por Piñeros (2005). Para comparar los resultados del biorreactor con los obtenidos en la curva de crecimiento es necesario expresar los primeros en términos de mg/ de RF. En ese caso la producción de escopolamina en el biorreactor es equivalente a  $0,73 \pm 0,23$  mg/ g de RF, un valor muy similar al alcanzado por las raíces al día 20 del crecimiento, figura 46.



**Figura 46.** Crecimiento de las raíces normales de *Brugmansia candida* en el reactor usando medio B5, temperatura ambiente y condición de oscuridad. Caso 1: Aireación en la unidad de crecimiento.

Además de los datos antes reportados, se realizó una medida de la elongación máxima que presentaron las raíces cultivadas en el reactor. Para ello, se tomó como referencia la altura de la malla, y se midió la distancia que el frente de las raíces alcanzaban a partir de ésta en sentido vertical durante el tiempo de cultivo. Los resultados se presentan en la figura 47. Esta medida sólo se realizó para uno de los ensayos y buscando establecer si la altura de la malla era suficiente para garantizar que las raíces no quedaran sumergidas en el líquido que se podría acumular en la sección inferior de la unidad de crecimiento.



**Figura 47.** Crecimiento de las raíces normales en el reactor, usando medio B5, temperatura ambiente y condición de oscuridad. Caso 1: Aireación en la unidad de crecimiento.

En la figura 47, se aprecia, que el crecimiento del frente de las raíces no se detiene durante los 21 días de la observación (hay que aclarar que el frente de las raíces no corresponde a una fracción másica importante dentro de la masa total de las raíces, por tanto, así su elongación continúe, es probable que la biomasa en general ya haya alcanzado un estado estacionario al día 21 del cultivo).

De acuerdo con esta información, las raíces alcanzaron una velocidad promedio de elongación de 0,62 cm/día, garantizando que durante los primeros 21 días de cultivo, éstas no tocaran el fondo de la unidad de crecimiento.

Terminados estos ensayos, y debido a los inconvenientes con la aplicación directa del aire sobre las raíces, que resultó en problemas de control de la presión del aire en la unidad de crecimiento, se realizó un ensayo en donde el aire se aplicara directamente a la unidad reservorio. De esta manera, se permitió que el medio enriquecido con aire llegara a la unidad de crecimiento evitando los problemas asociados con el control de la presión en esta unidad.

En este caso, el medio de cultivo ya no se distribuye sobre las raíces como una nube (aspersión fina), sino que se esparce a manera de gotas sobre las mismas.

4.1.4.2 Caso 2: El aire enriquece el medio de cultivo en la unidad de reservorio y luego se gotea sobre las raíces en la unidad de crecimiento.

**Información relativa al ensayo:**

El inóculo que se colocó en la unidad de crecimiento, consistió en raíces obtenidas a partir de embriones, cultivadas durante 30 días sobre medio sólido (B5 + 20 g/l de sacarosa + 10 g/l de Agar pH: 5.8).

Las demás condiciones usadas fueron:

**Medio:** B5 suplementado con sacarosa 20 g/l.

**Tamaño de poro de los filtros de aire:** 0,22  $\mu\text{m}$ .

**Otras adiciones al medio:**

Ampicilina: 1 g/ 2l de medio.

Nistatina: 1ml/ 2l de medio (de una suspensión 100.000 UI /ml).

**pH del medio líquido usado en el cultivo:** 5.8

**Flujo de Aire:** 0,47 l/min (0,24 vvm)

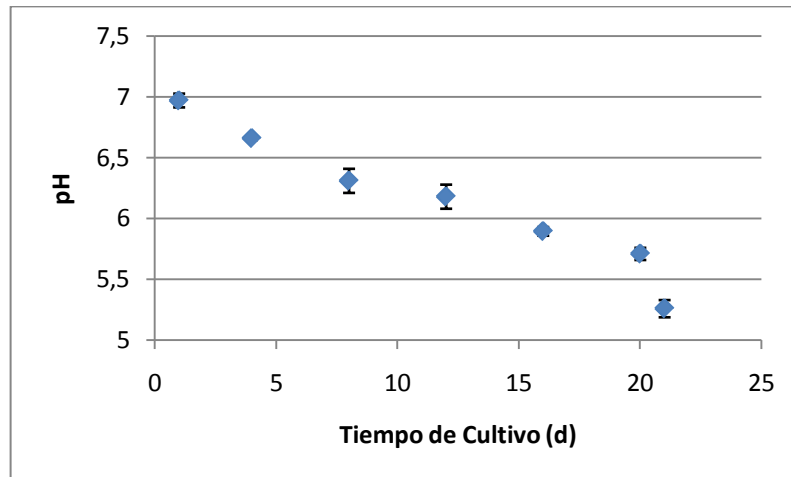
**Transferencia de medio:**

Se usaron las mismas bombas con igual régimen de flujo que en el ensayo anterior, es decir el medio entraba en la unidad de crecimiento a una velocidad de 0,30 ml/s y salía a 0,39 ml/s, garantizando que no hubiera acumulación en esta unidad.

**Muestreo:**

Se tomó una muestra de 20 ml de medio de cultivo del tanque reservorio cada 4 días.

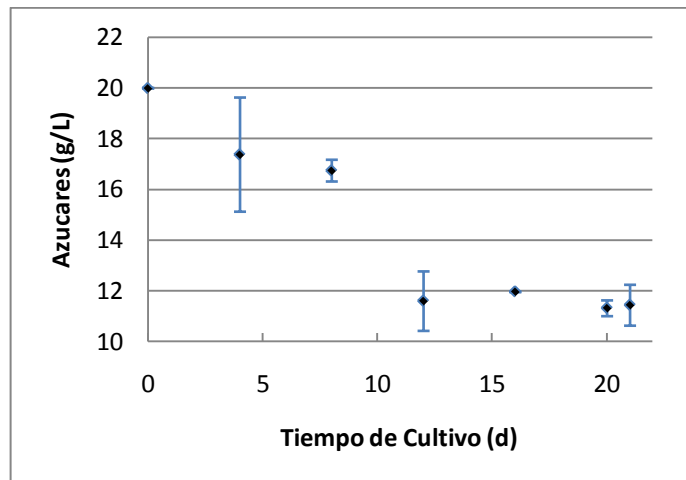
El monitoreo del pH del medio, presentado en la figura 48, se realizó con el electrodo original del reactor Applikon, empleado en este caso como tanque reservorio.



**Figura 48.** Comportamiento del pH del medio, para los 21 días de cultivo de raíces normales de *B. candida* en el sistema de biorreacción de dos unidades, empleando medio B5, temperatura ambiente y condición de oscuridad. Caso 2: Aireación en la unidad de control de medio.

Igual que en el ensayo anterior se observa una tendencia del pH a disminuir, notándose una variación marcada luego de la adición del sulfato de cobre al día 21 del cultivo.

Así mismo, se realizó el seguimiento del consumo de azúcares durante el crecimiento de las raíces, los resultados se presentan en la figura 49:



**Figura 49.** Comportamiento de la concentración de azúcares del medio, para los 21 días de cultivo de raíces normales de *B. candida* en el sistema de biorreacción de dos unidades, empleando medio B5, temperatura ambiente y condición de oscuridad. Caso 2: Aireación en la unidad de control de medio.

En donde se puede observar que el mayor consumo de azúcares se sucede durante los 12 primeros días del cultivo, después de los cuales, esta variable tiende a estabilizarse. De igual forma a como ocurrió en el caso I.

### Crecimiento de las raíces

Respecto al incremento de la biomasa se tiene que:

**Peso de raíces inóculo:**  $10,67 \pm 0,1$  g.

**Peso de raíces al finalizar cultivo:**  $18,10 \pm 1,07$  g.

Estos pesos son de raíces frescas.

### Índice de Crecimiento alcanzado en el biorreactor

Utilizando los valores promedio de la biomasa al inicio y al final del cultivo se tiene:

$$IC = \frac{(18,1 - 10,67)}{10,67}$$

$$IC = 0,7$$

En este caso, el índice de crecimiento igual a 0,7, que es inferior al obtenido para las raíces cuando estas crecieron bajo la configuración I del sistema de bioreacción.

En la tabla 9 se presenta el valor correspondiente a la aproximación realizada a la biomasa final, día 21 de cultivo, empleando para el cálculo la relación IC - concentración de azúcar.

**Tabla 9.** Determinación de la biomasa en el reactor al final de cultivo de acuerdo a la concentración de azúcar, empleando medio B5, temperatura ambiente y condición de oscuridad. Caso 2: Aireación en la unidad de control de medio.

Relación usada	Valor inicial de la variable	Valor final de la variable	IC	Biomasa final según IC	% error*
Sacarosa – Biomasa	So = 20 g/L	S = 11, 44 g/L	1,7	28,8 g	59,2

\*El error se calcula respecto al valor real de biomasa al finalizar el cultivo (18,1 g).

En este caso la determinación indirecta de la biomasa a partir de la concentración de azúcares en el medio, presentó una baja aproximación a los resultados reales obtenidos para el crecimiento de las raíces en el biorreactor, Caso II.

#### **Humedad de las raíces:**

La humedad de las raíces fue  $93,1 \pm 0,7$  %.

#### **Análisis cuantitativo del metabolito por CLAE:**

Puesto que en el ensayo anterior se determinó que la presencia de alcaloides en el medio era despreciable en este ensayo solo se evaluó la escopolamina intracelular, es decir la que se obtuvo por extracción de las raíces.

La concentración de escopolamina presente en las raíces fue de  $6,07 \pm 0,41$  mg/ g de RS, un valor ligeramente más bajo que el obtenido en la otra configuración del sistema de biorreacción. Por tanto se descarta la configuración en donde el aire se añade a la unidad de reservorio como alternativa para el cultivo de raíces de *Brugmansia candida* enfocados a la producción de escopolamina.

En la figura 50 se presenta una imagen de las raíces obtenidas al día 21 del cultivo, para el caso II.



**Figura 50.** Raíces normales de *Brugmansia candida* producidas en el reactor, empleando medio B5, temperatura ambiente y condición de oscuridad. Caso 2: Aireación en la unidad de control de medio.

#### 4.2 CRECIMIENTO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *Brugmansia candida*

En esta segunda parte del capítulo, se presentarán los resultados correspondientes a los ensayos realizados con raíces transformadas.

El orden en que son presentados es el siguiente: se inicia con los datos de crecimiento de los embriones luego del tratamiento con ácido giberélico. Posteriormente, se presentan los aspectos relacionados a la obtención de los

diferentes clones de *B. candida*, es decir los clones procedentes de la especie colombiana y los de origen argentino.

Luego se muestra la caracterización de los clones en cuanto a producción de alcaloides (escopolamina, hiosciamina y anisodamina), y se selecciona un clon, que es el usado para llevar a cabo la curva de crecimiento de biomasa.

Caracterizado el clon, se inician los ensayos en biorreactores, que dan origen a resultados respecto al crecimiento bajo dos condiciones diferentes, el cultivo sumergido y el cultivo en un sistema de dos unidades.

Finalmente, se comparan los resultados obtenidos para establecer algunas conclusiones.

#### 4.2.1 Resultados correspondientes a la germinación de los embriones usados para la generación de plántulas de *Brugmansia candida*

Como se hizo necesario contar con hojas provenientes de plántulas estériles como explantes para la inducción de las raíces transformadas, fue necesario generar este material. Para ello, se partió de embriones que germinaron en medio B5, para dar lugar a las plántulas. Como se mencionó, para agilizar la obtención de las plántulas, se usó ácido giberélico. El reporte correspondiente al proceso de germinación de estos embriones se encuentra consignado en la tabla 10.

**Tabla 10.** Resultados correspondientes al proceso de germinación de embriones de *Brugmansia candida* en medio B5, luego del tratamiento con ácido giberélico.

Tiempo de Cultivo (días)	Embriones Germinados	Embriones contaminados	% Contaminación	%Germinación no contaminadas
15	2	0	0	33
20	6	0	0	100

Total de embriones sembrados: 6

Aunque la muestra en este caso es pequeña, sería importante considerar la aplicación del ácido giberélico como promotor de la germinación, al reducir el tiempo de duración de la misma.

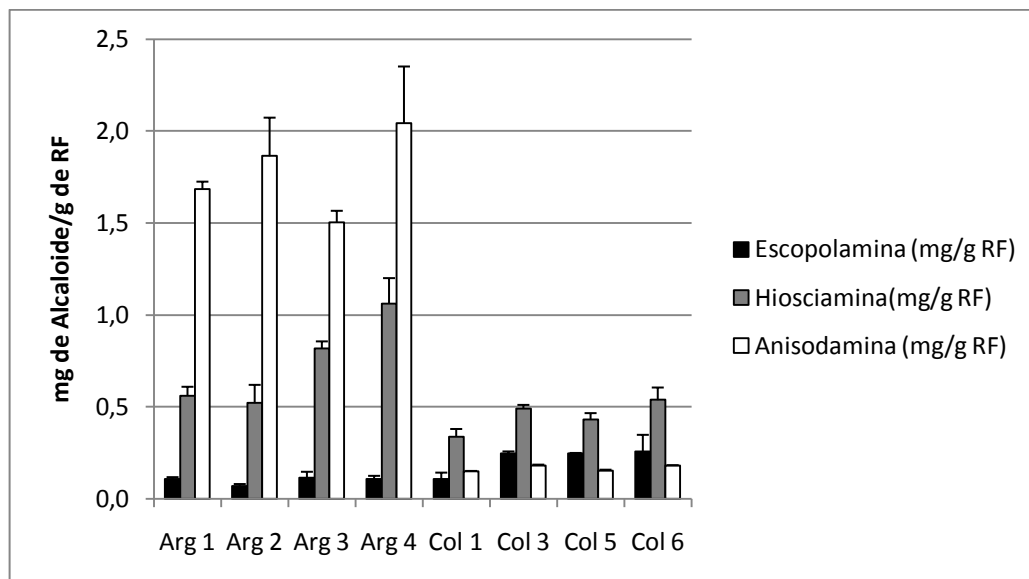
En el reporte que presenta Pitta (1998), los resultados de la aplicación de la metodología antes descrita le permitían alcanzar un índice de germinación del 80% en un periodo de tiempo de tres a cuatro semanas, coincidiendo con los resultados aquí obtenidos.

#### 4.2.2 Desarrollo de clones de raíces transformadas de *B. candida*

Aplicando el protocolo descrito con anterioridad (numeral 3.2.1), para la obtención de las raíces transformadas de *Brugmansia candida*, se obtuvieron clones procedentes de la especie cultivada en Argentina y de la misma cultivada en Colombia. Se estableció, que el origen influye sobre el perfil de alcaloides obtenido para los clones.

En total se generaron 8 clones, cuatro por cada uno de los orígenes evaluados, para diferenciar los clones, los procedentes de material biológico argentino se denominaron Arg1, Arg2, Arg3 y Arg4, mientras que los originados a partir de material biológico colombiano se denominaron Col1, Col2, Col3 y Col4.

A continuación en la figura 51, se presenta el perfil de alcaloides obtenido para cada uno de los clones cultivados durante 20 días en medio líquido B5 a la mitad de la concentración de sales en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup> (los clones fueron evaluados por triplicado):



**Figura 51.** Perfil de los alcaloides para los clones de *B. candida* de origen argentino y colombiano. Estos clones se desarrollaron en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.

En la figura 51, se hace evidente el efecto del origen sobre el perfil de alcaloides. De ella, se infiere que los clones de origen argentino son mejores productores de hiosciamina y anisodamina, mientras que los clones colombianos se destacan en la producción de escopolamina. Así mismo, para los clones argentinos la conversión de la hiosciamina, de acuerdo con la ruta metabólica, se queda en el paso al intermediario anisodamina, mientras que la epoxidación se da en menor grado impidiendo que se llegue en una alta proporción al producto final escopolamina.

Además de caracterizar los clones en cuanto a su contenido de alcaloides, se observó su capacidad de generar biomasa, y aunque no se hizo un registro cuantitativo de la misma, se estableció que el clon Arg3 sobresalía de los demás por la velocidad con la que se multiplicaba. Por esta razón fue el elegido para continuar con la experimentación.

#### 4.2.3 Curva de crecimiento para un clon de raíces de *Brugmansia candida* transformada (Arg3)

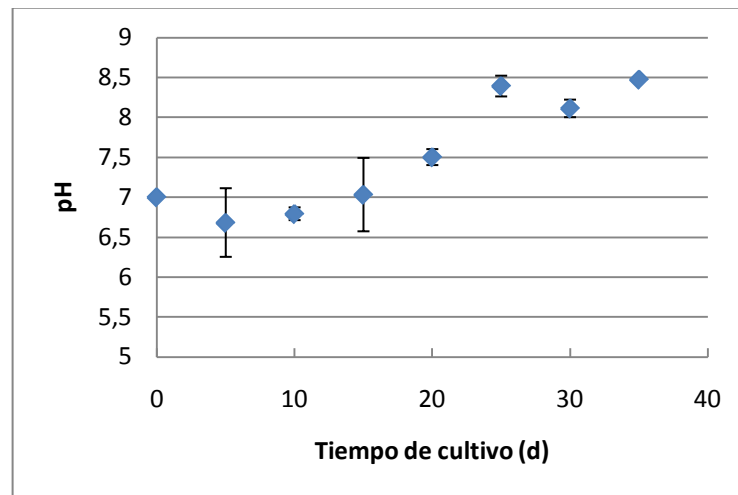
Caracterizados los clones, se tomó el clon Arg3, para la realización de una curva de crecimiento que permitiera estudiar su desarrollo en función del tiempo. Como se mencionó en los protocolos, se evaluó el incremento de la biomasa, el perfil de alcaloides, y las variables de pH, conductividad y contenido de azúcares en el medio a lo largo de 36 días de cultivo.

A continuación en la tabla 11 se presentan los resultados obtenidos. Teniendo en cuenta la desviación en los triplicados.

**Tabla 11.** pH, conductividad y concentración de sacarosa en el medio de cultivo, y, de masa de raíces frescas para el clon Arg3 crecido en Erlenmeyers agitados, empleando medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, a una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.

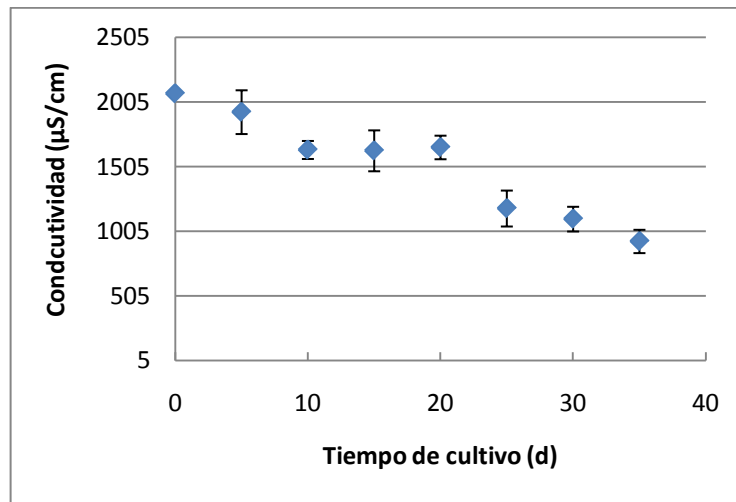
Días de cultivo	pH	Conductividad (μS/cm)	Azúcares (g/l)	Peso Fresco de las Raíces (g)
0	7,0	2070	20	0,1
5	6,68 ± 0,43	1926,67 ± 169,21	20,00 ± 5,37	0,14 ± 0,02
10	6,79 ± 0,08	1634,33 ± 69,67	17,17 ± 3,93	0,25 ± 0,03
15	7,03 ± 0,46	1627,67 ± 158,24	17,82 ± 6,44	0,41 ± 0,19
20	7,50 ± 0,10	1653,67 ± 91,19	12,91 ± 0,37	0,43 ± 0,10
25	8,39 ± 0,13	1181,33 ± 139,0	8,59 ± 3,93	0,98 ± 0,20
30	8,11 ± 0,11	1099,33 ± 95,57	6,39 ± 4,03	1,30 ± 0,32
36	8,47 ± 0,0	926,67 ± 90,12	10,58 ± 1,07	1,03 ± 0,32

De este modo, para cultivos en Erlenmeyer se observó un incremento del pH del medio de cultivo en el tiempo, que puede estar relacionado con una respuesta al cambio en la concentración de los alcaloides liberados, dado el carácter básico de dichas sustancias. Ver figura 52.

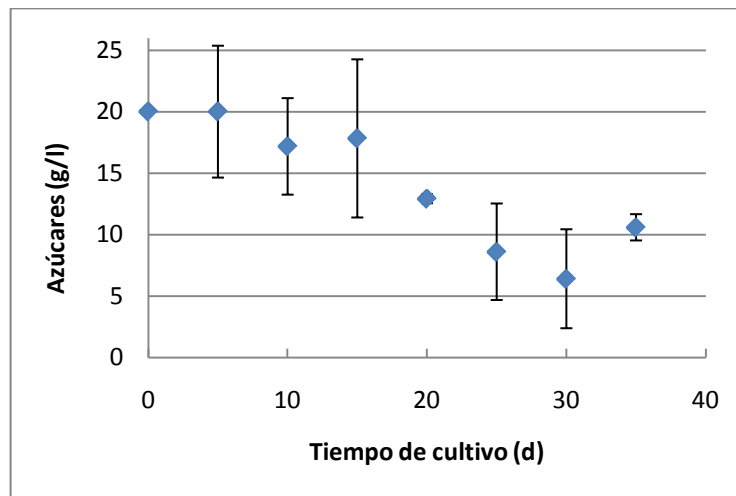


**Figura 52.** Evolución del pH para el cultivo del clon Arg3, durante los 36 días de cultivo en Erlenmeyer. Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.

Analizando el comportamiento de la concentración de azúcares y de la conductividad del medio de cultivo (tabla11) se observa que éstas disminuyen a medida que la biomasa se incrementa. Para el crecimiento en Erlenmeyers, entre el día 15 y el 25 del cultivo, se aprecia un mayor descenso en el valor de ambas variables. Ver figuras 53 y 54.

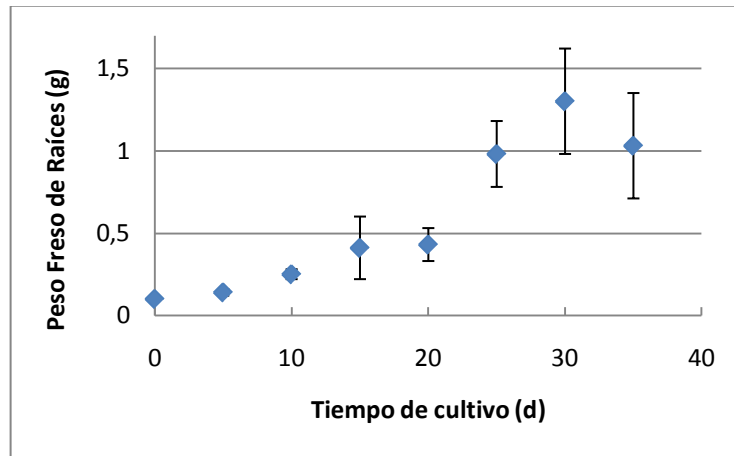


**Figura 53.** Evolución de la conductividad para el cultivo del clon Arg3, durante los 36 días de cultivo en Erlenmeyer. Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.

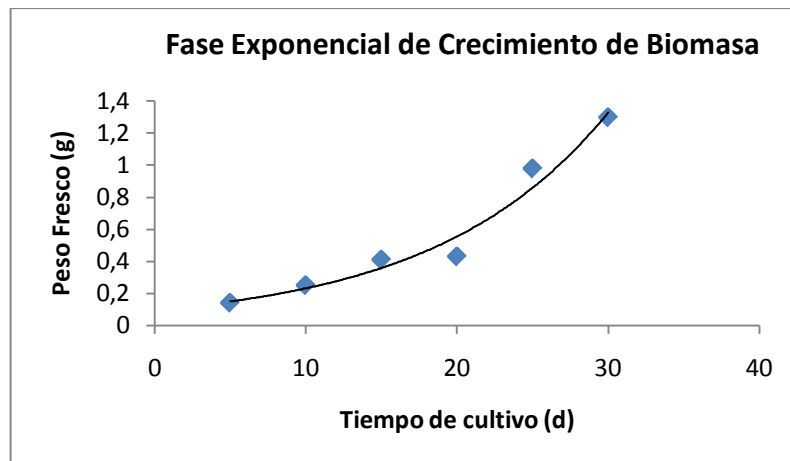


**Figura 54.** Evolución de la concentración de azúcares para el cultivo del clon Arg3, durante los 36 días de cultivo en Erlenmeyer. Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.

De los datos de peso fresco de las raíces, tomados cada 5 días, se estableció la fase exponencial del crecimiento de las raíces (del día 5 al 30), para generar una ecuación que describiera el comportamiento de la biomasa en función del tiempo ( $X = X_0 e^{\mu t}$ ) en esta etapa específica. Ver figuras 55 y 56.



**Figura 55.** Evolución de la biomasa para el cultivo del clon Arg3, durante los 36 días de cultivo en Erlenmeyer. Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.



**Figura 56.** Evolución del peso fresco del clon Arg3, para los 36 días de cultivo en Erlenmeyer. Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.

El resultado de esta relación, es la expresión que se presenta a continuación:

$$\text{Peso fresco}_t = 0,096 * e^{0,087*t} \quad \text{Ecuación 6}$$

t: tiempo de cultivo (días).

La correlación de los datos experimentales, con los valores obtenidos usando la expresión es de 0,99, esto indica que ésta permite hacer una buena aproximación de la realidad.

De acuerdo con la ecuación 6, el valor de la velocidad específica de crecimiento para las raíces transformadas en la fase exponencial es  $0.087 \text{ d}^{-1}$ , un valor que equivale a casi dos veces el valor hallado para las raíces no transformadas. Se determinó también la masa de raíces a 21 días, y con este valor, se calculó el valor del IC para el cultivo en Erlenmeyers, que en este caso es igual a 4,18.

A partir de estos datos, también se relacionó el incremento de la biomasa con el cambio en la conductividad y el contenido de sacarosa en el medio de cultivo.

Igual que para las raíces normales, se calcularon los valores de IC y % de Ko, a lo largo del tiempo de cultivo; el reporte se presenta en la tabla 12.

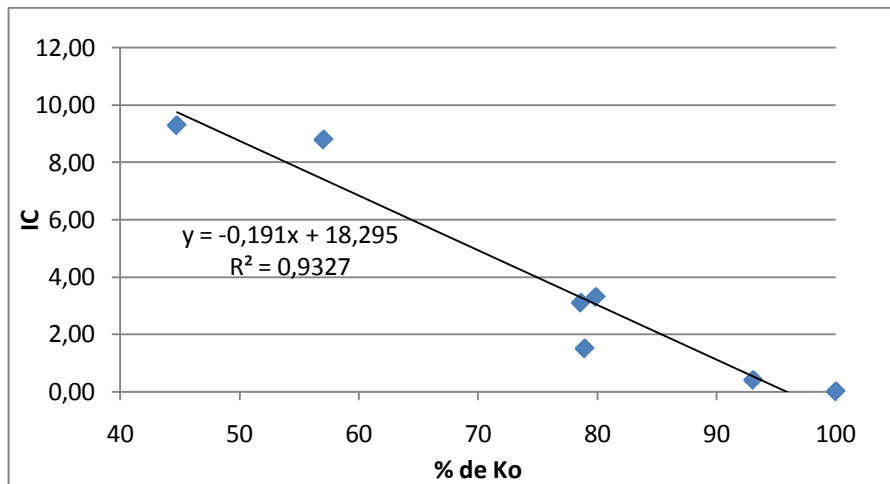
**Tabla 12.** Valores de IC y % de Ko evaluados a cada condición de tiempo durante 36 días de cultivo de las raíces transformadas de *B. candida* clon Arg3). Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.

Tiempo de Cultivo (d)	% de Ko*	IC*
0	100	0
5	93,07	0,4
10	78,95	1,5
15	78,63	3,1
20	79,89	3,3
25	57,07	8,8
30	53,11	12,0
36	44,77	9,3

\*Los valores iniciales de Ko y Xo, son 2070  $\mu\text{S}/\text{cm}$  y 0,1 g respectivamente.

Con estos valores se realizó una gráfica, para evaluar la posibilidad de establecer una relación lineal entre ellos.

Hay que aclarar que el punto correspondiente al día 30 se omitió, por considerar que no presentaba la tendencia de los demás datos. Ver figura 57.



**Figura 57.** Relación entre el IC y el % de Ko, para un cultivo de raíces transformadas de *B. candida* (clon Arg3). Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.

Esta figura permite extraer la correlación:

$$IC_t = [-0,191 * (K_t/K_o) * 100] + 18,295 \quad \text{Ecuación 7}$$

IC<sub>t</sub>: Índice de crecimiento en un tiempo t.

Ko: Conductividad inicial.

Kt: Conductividad en el tiempo t.

Esta relación presentó un índice de correlación de 0,96.

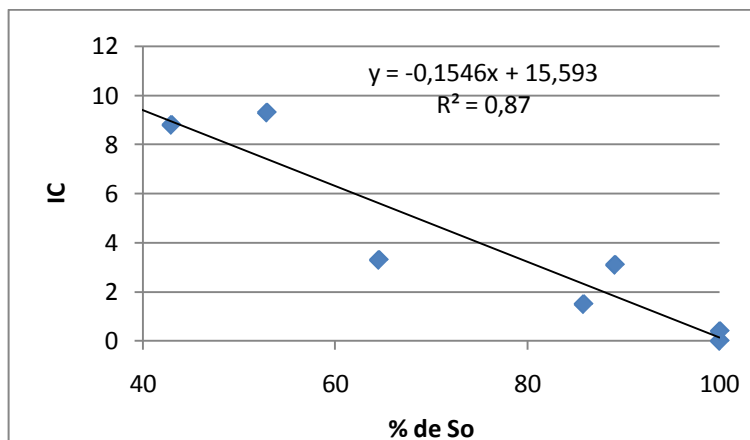
De otro lado, la información requerida para relacionar la concentración de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) con el incremento de la biomasa, se presenta en la tabla 13.

**Tabla 13.** Valores de IC y % de So evaluados a cada condición de tiempo durante los 36 días de cultivo de las raíces transformadas de *B. candida* (clon Arg3). Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.

Tiempo de Cultivo (d)	% de So*	IC*
0	100,00	0
5	100,00	0,4
10	85,83	1,5
15	89,10	3,1
20	64,53	3,3
25	42,94	8,8
30	31,94	12,0
36	52,87	9,3

\*Los valores iniciales de So y Xo, son 20 g/l y 0,1 g respectivamente.

Con estos valores se procedió a realizar una gráfica, para evaluar si se presentaba una relación lineal entre las variables estudiadas. Ver figura 58.



**Figura 58.** Relación entre el IC y el % de So, para un cultivo de raíces normales de *B. candida* (clon Arg3). Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.

En este caso la correlación obtenida está dada por la expresión:

$$IC_t = [-0,154 * (S_t/S_o) * 100] + 15,593 \quad \text{Ecuación 8}$$

IC<sub>t</sub>: Índice de crecimiento en un tiempo t.

So: Conductividad inicial.

St: Conductividad en el tiempo t.

Que presenta una correlación equivalente a 0,93.

Igual que para las raíces no transformadas, de las dos variables usadas para determinar de manera indirecta el incremento de la biomasa, es la conductividad, la que en este caso permite hacer una mejor aproximación.

El contenido de alcaloides en las raíces transformadas cultivadas en Erlenmeyers agitados durante 25 días, se presentan en la tabla 14.

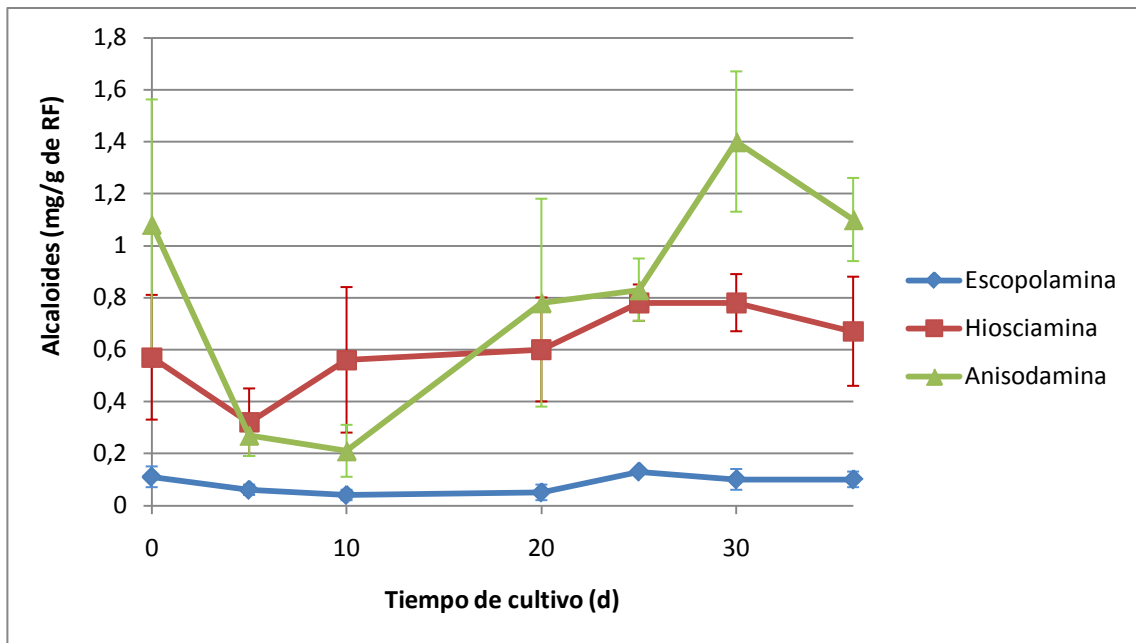
**Tabla 14.** Registro del contenido de escopolamina, anisodamina e hiosciamina en las raíces del clon Arg3 en Erlenmeyer durante 25 días de crecimiento. Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.

<b>Día de cultivo</b>	<b>Anisodamina (mg/g de RF)</b>	<b>Escopolamina (mg/g de RF)</b>	<b>Hiosciamina (mg/g de RF)</b>
0 <sup>+</sup>	1,082 ± 0,48	0,11 ± 0,04	0,57 ± 0,24
5	0,27 ± 0,08	0,06 ± 0,02	0,32 ± 0,13
10	0,21 ± 0,10	0,04 ± 0,02	0,56 ± 0,28
20	0,78 ± 0,40	0,05 ± 0,03	0,60 ± 0,2
25	0,83 ± 0,12	0,13 ± 0,01	0,78 ± 0,07
30	1,4 ± 0,27	0,10 ± 0,04	0,78 ± 0,11
36	1,1 ± 0,16	0,10 ± 0,03	0,67 ± 0,21

<sup>+</sup>Los datos correspondientes al día 0 de cultivo, provienen de una caracterización previa del material a los 20 días de cultivo, que es la edad de los inóculos.

Los datos contenidos en la tabla 14, están de acuerdo con la ruta metabólica que conduce a la producción de estos compuestos, presentada en la figura 5. De ese modo, el primer alcaloide que se produce es la hiosciamina, cuya generación se evidencia a partir del día 10, coincidiendo con el reporte realizado por Lee et al. (1998), para el cultivo de *Atropa belladonna*.

Seguido a la producción de hiosciamina aparece la anisodamina, entre los días 10 y 20, que se genera debido a la hidroxilación de la hiosciamina por acción de la enzima H6H. Por último, desde el momento en que exista anisodamina, ésta puede ser epoxidada para dar lugar a la escopolamina. Ver figura 59.



**Figura 59.** Perfil de alcaloides para el clon Arg3 a lo largo de 36 días de cultivo de las raíces en Erlenmeyer. Este clon se desarrolló en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.

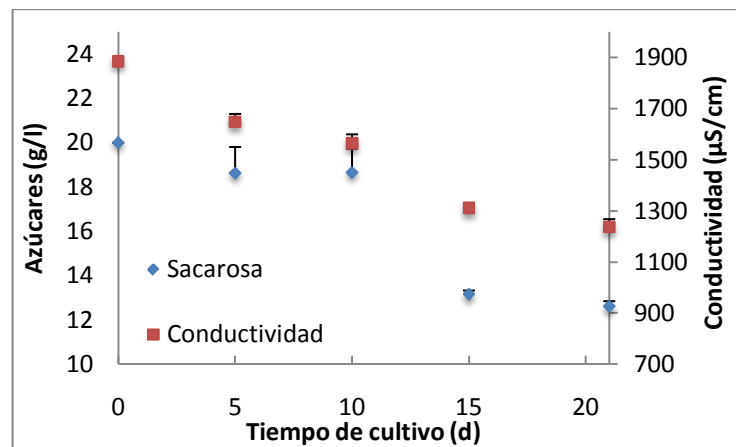
Además justifican que el cultivo no sea extendido más allá del día 25, pues transcurrido este tiempo, no se observa un incremento en la concentración de los alcaloides.

Como se ve en la tabla 15, la producción de anisodamina es mucho mayor que la de escopolamina, verificando que la velocidad con la que transcurre la hidroxilación es superior a aquella con la que toma lugar la epoxidación. Según lo reportado en la literatura, la actividad con que se desarrolla la hidroxilación es 40 veces mayor que la de la epoxidación. (117-119)

#### 4.2.4 Crecimiento en el Biorreactor del clon Arg3 correspondiente a raíces transformadas de *B. candida*

##### 4.2.4.1 Caso I. Cultivo sumergido

En la figura 60, se muestran las curvas correspondientes al consumo de sacarosa, y la disminución de la conductividad durante los 21 días de cultivo en el biorreactor.



**Figura 60.** Disminución en la conductividad y en la concentración de sacarosa para los 21 días de cultivo en el biorreactor del clon Arg3 correspondiente a raíces transformadas de *B. candida*. Caso I. Cultivo sumergido.

En la figura 60, se observa un comportamiento similar para las dos variables y una tendencia a estabilizarse.

Los análisis realizados sobre el medio de cultivo respecto a la presencia de alcaloides se presentan en la tabla 15, observándose que las cantidades liberadas al medio son muy bajas comparadas con las que más adelante se reportan para los alcaloides presentes en las raíces.

**Tabla 15.** Alcaloides liberados al medio de cultivo durante los 21 días de crecimiento en el biorreactor del clon Arg3 correspondiente a raíces transformadas de *B. candida*.

Tiempo de Cultivo (días)	Escopolamina (mg/g de RF)	Hiosciamina (mg/g de RF)	Anisodamina (mg/g de RF)
21	0,011	0,006	0,032

La figura 61, presenta imágenes correspondientes al día de la recolección de las raíces, en ellas se puede apreciar la forma en que las mismas se acomodaron sobre la malla dispuesta como soporte.



Raíces parte central exterior de la Malla



Raíces parte superior de la Malla



Raíces parte central interior de la Malla



Raíces parte inferior central de la Malla

**Figura 61.** Raíces de *Brugmansia candida* transformadas (clon Arg3) obtenidas al interior y sobre la malla empleada como soporte en el reactor por el cultivo sumergido.

El análisis de los alcaloides presentes en las raíces para este ensayo, se realizó tomando muestras de raíces ubicadas en diferentes puntos dentro del biorreactor. Los resultados se consignan en la tabla 16.

**Tabla 16.** Contenido de alcaloides en las raíces transformadas de *B. candida* (clon Arg3) de acuerdo con su ubicación en el biorreactor al día final del cultivo.

Ubicación de las Raíces	Hiosciamina (mg/g RF)	Anisodamina (mg/g RF)	Escopolamina (mg/g RF)
Parte Inferior	0,514	0,899	0,066
Parte central interna	0,688	1,058	0,108
Parte central externa	0,805	1,062	0,121
Parte superior	0,795	1,001	0,124

Y puesto que el peso fresco total reportado al finalizar el cultivo fue de 49,33 g de RF, y que se empleó un inóculo de 10 g de RF para los 1,2 l de medio, se calculó el IC, que tuvo un valor de 3,93. Lo que indica que en el biorreactor el índice de crecimiento es 6% inferior al obtenido para los cultivos realizados en los Erlenmeyer. En la tabla 17, se presentan los resultados correspondientes al cálculo indirecto de la biomasa en el reactor, de acuerdo con las correlaciones obtenidas usando la información de los cultivos realizados en Erlenmeyer, en donde se relacionó esta variable con la conductividad y la concentración de azúcar.

**Tabla 17.** Cálculo de la biomasa en el reactor al final de cultivo sumergido de las raíces transformadas de *B. candida* (clon Arg3) de acuerdo con la conductividad y la concentración de azúcar.

Relación usada	Valor inicial de la variable	Valor final de la variable	IC	Biomasa final según IC	% error*
Sacarosa – Biomasa	So = 20 g/L	S = 12, 62 g/L	5,87	68,6 g	39,3
Conductividad - Biomasa	Ko = 1885 $\mu$ S	K = 1238 $\mu$ S	5,75	67,5 g	36,8

\*El error se calculó respecto al valor real de biomasa al finalizar el cultivo (49,33 g).

Finalmente, el perfil promedio de alcaloides obtenido en el biorreactor, considerando las fracciones analizadas, es el siguiente:  $0,701 \pm 0,135$ ,  $1,005 \pm 0,076$  y  $0,105 \pm 0,027$  mg/g RF, para hiosciamina, anisodamina y escopolamina respectivamente (la desviación se calculó de acuerdo con los 4 datos analizados). De acuerdo con los perfiles de los alcaloides obtenidos para los cultivos en Erlenmeyer y biorreactor (cultivo sumergido), se confirma que las raíces transformadas de *B. candida*, son unas buenas productoras de anisodamina, si se comparan con otros cultivos como *Datura*, y raíces transformadas de *Atropa belladonna* (56, 117)

#### 4.2.4.2 Caso II. Cultivo en el sistema de biorreacción de dos unidades.

A continuación se presenta una descripción general del crecimiento del clon Arg3 en el sistema de dos unidades, parte de ello es el registro realizado de las variables involucradas en el cultivo, es decir, el pH, la conductividad, y la concentración de azúcares en el medio. Ver tabla 18.

**Tabla 18.** pH, conductividad y concentración de azúcares en el medio de cultivo, para los 21 días de cultivo en el biorreactor de raíces transformadas de *B. candida* (Arg3). Caso II.

Tiempo (d)	pH	K (mS/cm)	Azúcares (g/L)
0	6,79	3,69	20
5	6,64	3,34	19,83
10	6,27	3,23	19,8
15	6,16	3,21	19,53
20	6,62	3,15	14,37
21	6,81	3,09	13,49

Además de estos datos con el registro de la masa de inóculo que fue de 13 g para un volumen de 2 l, y el de la masa final, equivalente a 26 g, se estableció el IC, con un valor igual a 1.

La humedad de las raíces fue de 90,68%.

También se determinó el contenido de alcaloides en el medio de cultivo y en las raíces al día 21 de crecimiento, cuyos valores se presentan en la tabla 19.

**Tabla 19.** Alcaloides extraídos desde las raíces transformadas de *B. candida* (clon Arg3) obtenidas en el reactor al día 21 del cultivo.

<b>Escopolamina</b> <b>(mg/g de RF)</b>	<b>Anisodamina</b> <b>(mg/g de RF)</b>
0,07	0,51

Estos valores son inferiores a los obtenidos como promedio, para el caso en el cuál las raíces crecieron en medio sumergido. La disminución en la producción de los alcaloides es equivalente a un 33% para la escopolamina y un 49 % para la anisodamina.

Sin embargo, al comparar los datos de producción de alcaloides alcanzados por medio del cultivo de las raíces transformadas en el sistema de biorreacción compuesto por dos unidades con la producción obtenida para las raíces creciendo en Erlenmeyer al día 20 de cultivo, las diferencias son menores (35% para la anisodamina y 17 % para la escopolamina). Observándose en este caso un incremento en la producción de escopolamina.

A continuación se presenta una imagen del biorreactor y de las raíces obtenidas al finalizar el cultivo, ver figura 62.



**Figura 62.** Raíces de *Brugmansia candida* transformadas (clon Arg3) obtenidas al interior del reactor, sobre la malla empleada como soporte en el sistema de dos unidades.

En la tabla 20, se presentan los resultados correspondientes al cálculo indirecto de la biomasa en el reactor de acuerdo con las correlaciones obtenidas usando la información de los cultivos realizados en Erlenmeyer, en donde se relacionó esta variable con la conductividad y la concentración de azúcares.

**Tabla 20.** Cálculo de la biomasa en el reactor al final de cultivo de raíces transformadas de *B. candida* (Arg3) de acuerdo con la conductividad y la concentración de azúcares en el biorreactor de dos unidades.

Relación usada	Valor inicial de la variable	Valor final de la variable	IC	Biomasa final según IC	% error*
Azúcares – Biomasa	So = 20 g/L	S = 13, 49 g/L	5,2	67,6 g	160
Conductividad – Biomasa	Ko = 3.69 mS/cm	Ko = 3,09 mS/cm	2,3	42,9 g	65

\*El error se calcula respecto al valor real de biomasa al finalizar el cultivo (26 g).

En este caso, aunque ninguna de las dos relaciones establecidas permite hacer un buen acercamiento a la realidad, en cuanto a describir el incremento en la masa de las raíces, es posible apreciar nuevamente que la conductividad induce menos error. Comparando estos resultados con los presentados en la tabla 18, es notable que en este caso los errores son mayores, esto posiblemente se deba a que las relaciones establecidas se extrajeron a partir de ensayos realizados en Erlenmeyer y esa condición se asemeja más al ensayo realizado en el reactor cuando se uso un cultivo sumergido de raíces transformadas (Caso I).

#### 4.3 RESULTADOS OBTENIDOS EN LA INVESTIGACIÓN

Para finalizar este capítulo se presentará un resumen con los resultados obtenidos durante la experimentación, de modo que sea más clara su interpretación.

En primer lugar, en la tabla 21, se consignan los valores obtenidos para el IC alcanzado por las raíces al día 21 de cultivo.

**Tabla 21.** Comparación de los IC alcanzados por las raíces de *Brugmansia candida* al día 21 de cultivo, para cada uno de los ensayos.

<b>Material Vegetal</b>	<b>IC</b>	<b>Inóculo (g/l)</b>	<b>Biomasa producida a 21 días (g/L)</b>
Raíces normales cultivadas en Erlenmeyer de 125 ml.	1,4	6	14,49
Raíces normales cultivadas en biorreactor de dos unidades (aireación en la unidad de crecimiento).	1,58	3	7,68
Raíces normales cultivadas en biorreactor de dos unidades (aireación en el reservorio).	0,7	5,3	9,07
Raíces transformadas (clon Arg3) cultivadas en Erlenmeyer de 125 ml.	4,18	4	20,72
Raíces transformadas (clon Arg3) cultivadas en biorreactor de dos unidades (aireación en la unidad de crecimiento).	1	6,5	21,67
Raíces transformadas (clon Arg3) cultivadas en reactor de tanque agitado (cultivo sumergido).	3,93	8,3	24,65

Es de aclarar que el tamaño del inóculo no fue una variable controlada en el experimento y fue dependiente de la cantidad de material disponible al momento de realizar los cultivos.

Al comparar el IC de las raíces normales con el de las raíces transformadas, se observa que este último es casi 3 veces mayor que el primero, lo que comprueba el potencial que tienen las raíces transformadas para generar biomasa, como lo indican investigaciones anteriores.(31, 43, 84, 101, 120-128)

Comparando los IC obtenidos para el crecimiento de las raíces normales en el biorreactor de dos unidades, se estableció que el mayor se obtenía en el caso en el cuál el aire se suministraba en la unidad de crecimiento, pues para éste el IC era dos veces mayor que el obtenido cuando el aire se suministraba en el reservorio. Aunque pareciera contradictorio, en la tabla 21 se observa que la biomasa producida por unidad de volumen es mayor en el caso I que en el II, sin embargo esto puede explicarse debido a la diferencia en el tamaño del inóculo. Pues a mayor cantidad de inóculo, mayor producción de biomasa.

Esta observación condujo a seleccionar el sistema en el cual el aire se suministraba a la unidad de crecimiento directamente, como el más indicado para el cultivo de raíces de *B. candida*.

Observando el IC obtenido para las raíces normales y transformadas, creciendo en el sistema de biorreacción compuesto por dos unidades, para el caso en el cual el aire se suministró en el tanque de crecimiento, los valores obtenidos fueron 1,58 para raíces normales y 1 para raíces transformadas. Esto parecería contradecir lo dicho anteriormente sobre el potencial de las raíces transformadas para generar biomasa, pero no es así, pues lo que sucedió es que en el caso de las raíces normales, la biomasa generada no solo corresponde a raíces, sino que incluye

también algunos segmentos de tallo como se puede observar en las fotografías presentadas en las figuras 46 y 50.

Respecto a los sistemas de biorreacción evaluados, de acuerdo a lo reportado en la literatura, la configuración que ofrecía mayores ventajas para el cultivo de raíces correspondía a los sistemas de dos unidades, pues en estos se tenían: mayores concentraciones de O<sub>2</sub> disuelto sobre la superficie de las raíces que favorecerían la elongación de las mismas (96, 104), posibilidades para realizar una reposición continua de medio que evitara la necrosis por agotamiento de nutrientes (99, 102, 103), e inconvenientes inherentes a los sistemas de agitación convencionales como lo son las turbinas usadas en los reactores de tanque agitado (96). Sin embargo, con las raíces transformadas, se probó además de ésta configuración, un sistema de biorreacción por cultivo sumergido, adaptando un reactor de tanque agitado para tal fin, de modo que se pudiera describir su desarrollo en este tipo de sistemas también.

Los resultados obtenidos, demostraron que ésta última configuración fue la que permitió obtener el mayor IC, lo que se traduce en que es la mejor opción de las evaluadas para generar biomasa. Esto puede deberse al tipo de raíces empleadas (transformadas), al contacto de las raíces con los nutrientes (el contacto es más íntimo, favoreciendo los procesos de transferencia de nutrientes), al tipo de aireación (el burbujeo suministró a las raíces la cantidad de oxígeno que requerían para su adecuado desarrollo) y al soporte que las raíces tuvieron, que fue generado por la adecuación de una malla plástica al interior del biorreactor.

Como uno de los objetivos de este trabajo era evaluar la producción de escopolamina a partir de los cultivos de raíces de *Brugmansia candida*, la tabla 22 presenta un resumen de los resultados obtenidos a este respecto bajo las condiciones probadas.

**Tabla 22.** Comparación de la concentración de escopolamina intracelular alcanzada por las raíces de *Brugmansia candida* al día 21 de cultivo, para cada uno de los ensayos.

<b>Material Vegetal</b>	<b>mg de escopolamina / g RF (cultivos de 21 días)</b>	<b>mg de escopolamina / g RS (cultivos de 21 días)</b>
Raíces normales cultivadas en Erlenmeyer.	0,71	7,8
Raíces normales cultivadas en biorreactor de dos unidades (aireación en la unidad de crecimiento).	0,73	9,5
Raíces normales cultivadas en biorreactor de dos unidades (aireación en el reservorio).	0,42	6,0
Raíces transformadas (clon Arg3) cultivadas en Erlenmeyer.	0,05	0,55
Raíces transformadas (clon Arg3) cultivadas en biorreactor de dos unidades (aireación en la unidad de crecimiento).	0,07	0,78
Raíces transformadas (clon Arg3) cultivadas en reactor de tanque agitado.	0,11	1,22

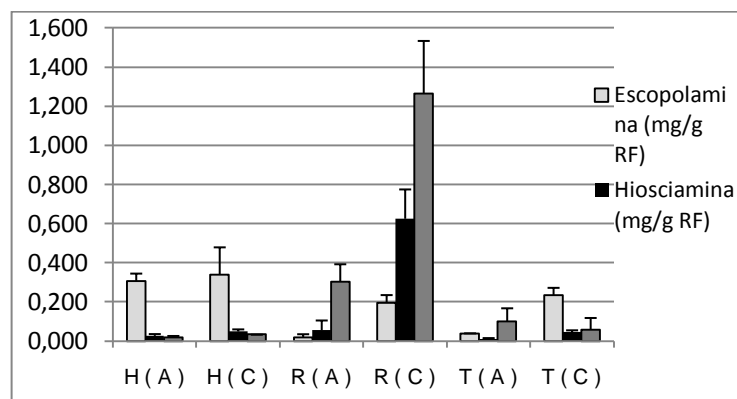
Estos resultados son concluyentes respecto a las raíces que se deben usar para producir mayores concentraciones de escopolamina, pues se observa que en el

clon transformado las concentraciones alcanzadas para este alcaloide en los cultivos son bajas respecto a las obtenidas para las raíces normales.

Las causas para esta situación pueden ser posiblemente dos:

- El clon transformado provenía de una planta de *B. candida* de origen argentino, y se ha demostrado que las características del ecotopo del que procede una especie influyen el desarrollo de la misma (78).
- Se ha establecido que existen diferencias en la generación de biomasa y en la producción de metabolitos secundarios, entre raíces normales y transformadas como consecuencia del proceso de transformación (122, 129-131).

Profundizando en las diferencias que existen entre especies procedentes de diferentes lugares geográficos: Colombia y Argentina, se realizó una comparación entre el contenido de alcaloides en diferentes explantes de plantas cultivadas *in vitro* de *B. candida*. Ver figura 63.



**Figura 63.** Perfil de alcaloides para diferentes explantes de plantas de *B. candida* de origen colombiano y argentino cultivadas *in vitro* en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, a una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.

En la figura los explantes se encuentran identificados de acuerdo a la siguiente nomenclatura:

H (A): Hojas de *B. candida* cultivadas *in vitro* de origen argentino.

H (C): Hojas de *B. candida* cultivadas *in vitro* de origen colombiano.

R (A): Raíces de *B. candida* cultivadas *in vitro* de origen argentino.

R (C): Raíces de *B. candida* cultivadas *in vitro* de origen colombiano.

T (A): Tallos de *B. candida* cultivadas *in vitro* de origen argentino.

T (C): Tallos de *B. candida* cultivadas *in vitro* de origen colombiano.

Comparando el perfil de los alcaloides obtenido para los diferentes explantes, se aprecia la influencia del origen sobre éste. Mientras a nivel de las hojas las diferencias en la concentración de los alcaloides evaluados fueron mínimas, en tallos y raíces dichos perfiles presentan variaciones significativas.

En este caso, también se comprueba que la mayor cantidad de alcaloides se concentra en las raíces de las plantas cultivadas *in vitro*.

Estos resultados están acordes a reportes previos en donde se mencionan los factores que marcan las diferencias en la producción de metabolitos, entre los cultivos de raíces y las raíces procedentes de plantas intactas (116).

Entre estos factores los más relevantes son:

- Los cultivos de raíces se asemejan anatómicamente a las raíces inmaduras de plantas intactas y esto puede verse reflejado en el desarrollo de su metabolismo secundario.
- En los cultivos de raíces se interrumpen los mecanismos de transporte que conducen los metabolitos entre los tallos y las raíces y viceversa, alterando procesos inherentes a estos.

- En los cultivos de raíces se observa una importante variación genética que se traduce en diferencias en cuanto a velocidades de crecimiento y producción de metabolitos.

Retomando la información presentada en la figura 46, para evaluar la concentración de escopolamina en cada uno de los clones transformados y observar el efecto del origen sobre ésta, se presenta la tabla 23:

**Tabla 23.** Perfil de alcaloides para las raíces normales y las líneas celulares de *Brugmansia candida* obtenidas de origen colombiano y argentino. Los clones se desarrollaron en medio B5 a la mitad de la concentración de sales, en un agitador orbital a 100 rpm, una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1.8 W/m<sup>2</sup>.

Tipo de Raíz	Concentración de escopolamina a los 20 días de cultivo (mg/g de RF)
Raíces normales colombianas	0,71
Col1	0,108
Col3	0,248
Col5	0,248
Col6	0,258
Arg1	0,107
Arg2	0,071
Arg3	0,117
Arg4	0,110

Estos valores permiten inferir que existe cierta homogeneidad en la producción de escopolamina entre los clones obtenidos que provienen de material biológico con un mismo origen geográfico. Además se establece que los clones colombianos presentan una mayor concentración de este alcaloide si son comparados con los clones argentinos.

De otro lado, al comparar la concentración de escopolamina obtenida en los clones transformados con la obtenida a partir de las raíces normales se observa que el proceso de transformación afecta negativamente la producción de este compuesto.

De la comparación entre los datos compilados en el numeral 2.5, y los resultados obtenidos en este trabajo se puede establecer que:

- Los estudios sobre cultivos realizados en Erlenmeyer con raíces transformadas de *Datura stramonium*, *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus muticus*, *Brugmansia candida*, *Atropa baetica*, permiten establecer que empleando las condiciones evaluadas en este trabajo, los cultivos de raíces normales de *B. candida* producen escopolamina en cantidades superiores a las alcanzadas anteriormente en tiempos de cultivo similares. Además los clones transformados obtenidos en el desarrollo de esta investigación, presentan concentraciones de escopolamina similares a las de los clones desarrollados en otras.
- La producción de escopolamina, alcanzada por los cultivos de raíces normales de *B. candida*, únicamente fue menor que la reportada para los cultivos de un híbrido de Duboisia (*Duboisia myoporoides* x *D. leichhardtii*).
- Es importante destacar que de los trabajos presentados solo dos incluyen biorreactores, en uno de ellos se empleó un biorreactor dual de 4 l (cultivo de *Datura metel*) y en el otro una columna de burbujeo de 0,3 l (cultivo de

*Scopolia parviflora*) alcanzando una producción de escopolamina de 4 mg/g de RS y 1,82 mg/g de RS, respectivamente. En ambos casos la producción del alcaloide fue menor a la obtenida para el cultivo de raíces normales de *B. candida*, en el sistema de biorreacción evaluado bajo las dos condiciones de proceso probadas. Respecto al cultivo del clon de *B. candida* transformado, la producción obtenida en este trabajo por medio del sistema de biorreacción de dos unidades y el cultivo sumergido, es inferior a la presentada en los estudios mencionados.

- En cuanto a la comparación con trabajos en donde se haya usado el mismo tipo de material biológico, es decir, raíces normales de *B. candida*, para la producción de escopolamina, los resultados son similares. Piñeros (2005) reportó un contenido de 6 mg/g de RS (luego de 21 días de cultivo) y encontró un máximo de este alcaloide equivalente a 12,3 mg/g de RS. Mientras que Niño (2003), obtuvo concentraciones aproximadas de 4 mg/g de RS.
- De acuerdo con estudios anteriores realizados sobre cultivos de *Atropa belladonna*, se estableció que en las raíces de cultivos intactos se sintetizaba la hiosciamina, que luego ésta era transportada hasta las hojas y otros órganos de la planta, en donde la actividad de la enzima H6H era más alta y la transformación de hiosciamina en escopolamina ocurría en una mayor proporción (132). Por esta razón, es posible que en los cultivos realizados con raíces normales en donde se observó el desarrollo de pequeños segmentos nodales, la concentración de escopolamina haya sido mayor.

## 5. CONCLUSIONES

- Para el establecimiento de cultivos de raíces normales de *B. candida* en biorreactor, se sugiere emplear inóculos que correspondan a radículas de 1,5 a 2 cm, obtenidas a partir de embriones cultivados sobre medio sólido durante 30 días. Éstas son las que presentaron un mayor potencial para generar biomasa y producir alcaloides.
- No se recomienda la aplicación de ANA al medio de cultivo sólido para la germinación los embriones, que dan lugar al inóculo. Lo cual se debe a que la adición de esta hormona a concentraciones de 1, 2 y 3 ppm, induce la dediferenciación de las raíces facilitando la producción de células no diferenciadas.
- Las raíces normales de *Brugmansia candida*, estudiadas a través de la cinética de crecimiento, presentaron entre ellas un comportamiento similar en cuanto a la producción de anisodamina y escopolamina, observándose un pico de concentración intracelular de estos alcaloides entre los días 10 y 20 de cultivo. Al final de la fase de crecimiento, se observa un detrimento en dichas concentraciones, razón por la cual se sugiere como tiempo de cultivo 20 días.
- Para las raíces transformadas de *Brugmansia candida* clon Arg3, el perfil de alcaloides obtenido es similar al que presentan las raíces normales, sólo que la máxima concentración de escopolamina y anisodamina se produce al día 25, luego del cual se inicia su detrimento.

- Para determinar de manera indirecta el crecimiento de las raíces de *B. candida* normales y transformadas, se pueden establecer relaciones con la concentración de azúcares en el medio de cultivo y con la conductividad del mismo, obteniéndose buenos índices de correlación.
- Para el cultivo de raíces normales de *B. candida* en un biorreactor dual, con aireación en la unidad de crecimiento, se alcanzó un IC de 1,58, y una concentración de escopolamina intracelular de 0,73 mg/g de RF. Valores comparables a los obtenidos por las raíces cuando fueron cultivadas en Erlenmeyer, que indica que el cambio de escala no afectó el potencial de las raíces para generar biomasa y producir los alcaloides estudiados.
- En el cultivo de raíces normales de *B. candida* en un biorreactor dual, con aireación en la unidad denominada reservorio, en donde se alcanzó un IC de 0,7, y una concentración de escopolamina intracelular de 0,42 mg/g de RF, se observó un rendimiento más bajo comparado con obtenido por medio de la otra configuración probada. Este fenómeno puede explicarse como consecuencia de la aspersión más fina del medio sobre las raíces que se logra cuando el aire se usa para impulsar el medio dentro de la unidad de crecimiento, pues este factor hace que las raíces mantengan un contacto más íntimo con él, mejorando los procesos de transferencia de masa y por ende el desarrollo de las raíces.
- De observar el consumo de azúcares, para el caso de las raíces normales de *Brugmansia candida* cultivadas en Erlenmeyer, en donde se realizó cromatografía líquida identificando sacarosa, glucosa y fructosa, se puede decir que en estos cultivos, la sacarosa es hidrolizada a glucosa y fructosa,

y que de estos dos azúcares la glucosa es consumida preferencialmente por las raíces sin que llegue a agotarse durante el tiempo de estudio.

- Otro factor que puede contribuir a las diferencias que se presentan en los dos tipos de sistemas evaluados para el cultivo de las raíces normales puede estar relacionado con el intercambio de gases dentro de la unidad de crecimiento, no solo de oxígeno, sino también de dióxido de carbono y etileno, que igualmente afectan el desarrollo de las raíces y la producción de metabolitos. Pues cuando el aire se alimenta directamente a la unidad de crecimiento, es posible que este desplace los demás gases presentes en la unidad a una velocidad mayor que cuando el aire se suministra en la unidad denominada reservorio.
- Se establece que existen diferencias en el perfil de los alcaloides para clones correspondientes a raíces transformadas de *B. candida*, que provienen de plantas de la misma especie con diferente origen geográfico.
- De los clones transformados obtenidos, se puede decir que aquellos que provienen de una planta cultivada en Argentina (Arg1, Arg2, Arg3 y Arg4), presentan un mayor contenido de anisodamina e hiosciamina que los clones obtenidos a partir de una planta cultivada en Colombia (Col1, Col3, Col5 y Col6). Sin embargo, los clones originados a partir de esta última, tienen una mayor capacidad para producir escopolamina.
- Se observó por primera vez en una investigación de este tipo, trabajando en paralelo con raíces normales y transformadas, que la transformación genética de la *Brugmansia candida* con *Agrobacterium rhizogenes*, afectó negativamente la producción de escopolamina en las raíces de origen colombiano.

- Cuando las raíces transformadas de *B. candida*, crecieron en cultivo sumergido en biorreactor, su IC fue muy similar al obtenido cuando las mismas se desarrollaron en Erlenmeyer de 125 ml, concluyendo para este caso que el cambio de escala no afecta de manera significativa la producción de biomasa.
- La situación observada para las raíces transformadas que crecieron en el biorreactor dual, permitió concluir que este sistema no era el más adecuado, puesto que las raíces no crecieron a la misma velocidad que crecían en Erlenmeyer, o, en el cultivo sumergido desarrollado en biorreactor.
- De otro lado, el cultivo de raíces transformadas de *B. candida*, permite alcanzar velocidades mayores de generación de biomasa comparado con el cultivo de raíces normales, que combinadas con las potencialidades de la especie para la producción de alcaloides pueden convertirse en una herramienta clave para una producción masiva de los alcaloides del tropano.
- Comparando con estudios previos, sobre la producción de anisodamina, se puede concluir que el cultivo de raíces normales y transformadas de *B. candida* en biorreactor, se presenta como una alternativa promisoriosa para el escalado de su producción al nivel industrial.



## 6. RECOMENDACIONES

- Para mejorar el diseño empleado en el cultivo de raíces, en el sistema de biorreacción de dos unidades, se sugiere evaluar nuevos sistemas de soporte para las raíces dentro del tanque de crecimiento, que permitan favorecer el desarrollo de las mismas. Ofreciendo mayores superficies de soporte y materiales más afines a las raíces.
- Así mismo se sugiere buscar técnicas alternativas para la inoculación de las raíces al biorreactor, pues esta etapa es determinante para evitar problemas asociados a la contaminación de los cultivos. Dentro de éstas, pueden incluirse sistemas en los cuales segmentos pequeños de raíces ingresen al reactor a través de un puerto localizado en la parte superior, con ayuda de una corriente de medio y una bomba que los impulse desde un recipiente de almacenamiento estéril hasta el interior del reactor.
- Con el fin de realizar la producción continua de alcaloides, en el sistema de biorreacción de dos unidades, se sugiere evaluar nuevas condiciones para la aplicación de elicitores, que permitan liberar los alcaloides al medio de cultivo, para facilitar su extracción. En el caso del sistema de dos unidades, una aproximación sería operar el reactor como los sistemas RITA desarrollados para cultivos *in vitro* en donde se realizan inmersiones temporales de los explantes en el medio de cultivo, pues esta tipo de operación permitiría mejorar el contacto entre el elicitador y la masa de raíces en un tiempo determinado, permitiendo obtener mejores resultados.
- Del mismo modo, respecto a la aplicación de elicitores se recomienda evaluar compuestos como el extracto de levadura, el chitosan, el ácido

jasmónico, entre otros, los cuales podrían incrementar la producción de alcaloides.

- Como alternativa para incrementar la producción de escopolamina, se sugiere evaluar la adición de precursores al medio que fomenten la producción de este alcaloide de acuerdo a la ruta metabólica que conduce a su síntesis.
- Trabajar en la obtención de clones de raíces transformadas de *B. candida* que permitan sobre-expresar las enzimas PMT y H6H de modo que se vea favorecida la producción de alcaloides del tropano a partir de ellas.
- Profundizar en la evaluación de la potencialidad de la especie como productora de anisodamina, un alcaloide con aplicaciones importantes a nivel médico, que puede ser obtenido por cultivo de raíces de *B. candida* como se comprobó en esta investigación.
- Se sugiere realizar el seguimiento del crecimiento de las raíces por medio del análisis de imágenes para complementar los resultados obtenidos.
- Se recomienda emplear estándares internos de los alcaloides estudiados con el fin de determinar las pérdidas que se puedan presentar en el proceso de extracción y cuantificación de los mismos.
- Sería importante evaluar el efecto de los cambio de temperatura sobre el crecimiento de las raíces y la producción de los alcaloides, pues en este caso es fue una variable no controlada que puede estar influenciando los resultados obtenidos.

De otro lado, para evitar que el vapor de agua se condense en los filtros de salida de aire, se recomienda alargar las mangueras que los unen a las unidades del sistema de biorreacción, de modo que el vapor de agua se condense antes de llegar al filtro y se evite la obstrucción del mismo.

## 7. REFERENCIAS

1. Hughes, J., Tregova, A., Tomsett, A. B., Jones, M. G., Cosstick, R., and Collin, H. A. (2005) Synthesis of the flavour precursor, alliin, in garlic tissue cultures, *Phytochemistry* 66, 187-194.
2. Han, J., Wang, H., Ye, H., Liu, Y., Li, Z., Zhang, Y., Yan, F., and Li, G. (2005) High efficiency of genetic transformation and regeneration of *Artemisia annua* L. via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated procedure, *Plant Science* 168, 73-80.
3. Liu, C. Z., Guo, C., Wang, Y. C., and Ouyang, F. (2003) Comparison of various bioreactors on growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. shoot cultures, *Process biochemistry*(1991) 39, 45-49.
4. Liu, C. Z., Zhou, H. Y., and Zhao, Y. (2007) An effective method for fast determination of artemisinin in *Artemisia annua* L. by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection, *Analytica Chimica Acta* 581, 298-302.
5. Giri, A., Dhingra, V., Giri, C. C., Singh, A., Ward, O. P., and Narasu, M. L. (2001) Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects, *Biotechnology advances* 19, 175-199.
6. Oksman-Caldentey, K. M., and Barz, W. (2002) *Plant biotechnology and transgenic plants*, CRC Press.
7. Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y., and Tan, R. X. (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures, *Nitric Oxide* 15, 351-358.
8. Quispe-Condori, S., Sanchez, D., Foglio, M. A., Rosa, P. T. V., Zetzl, C., Brunner, G., and Meireles, M. A. A. (2006) Global yield isotherms and

- kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide, *Journal of Supercritical Fluids* 36, 40-48.
9. Kreis, W., and Reinhard, E. (1992) 12 beta-Hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells: production of digoxin in 20-litre and 300-litre air-lift bioreactors, *Journal of biotechnology* 26, 257.
  10. Gutierrez Manero, F. J., Ramos, B., Garcia, J. A., Probanza, A., and Barrientos Casero, M. L. (2003) Systemic induction of the biosynthesis of terpenic compounds in *Digitalis lanata*, *Journal of plant physiology* 160, 105-113.
  11. Houpe, D., Peltier, M., Cohen-Solal, A., Béguin, M., Lévy, F., Slama, M., Chapelain, K., and Tribouilloy, C. (2005) Heart failure due to left ventricular systolic dysfunction: treatment at discharge from hospital and at one year, *International journal of cardiology* 103, 286-292.
  12. McCurdy, C. R., and Scully, S. S. (2005) Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals), *Life Sciences* 78, 476-484.
  13. Page, J. E. (2005) Silencing nature's narcotics: metabolic engineering of the opium poppy, *Trends in biotechnology* 23, 331-333.
  14. López-Muñoz, F., Alamo, C., and García-García, P. (2006) "The herbs that have the property of healing...": The phytotherapy in Don Quixote, *Journal of Ethnopharmacology* 106, 429-441.
  15. Abreu, P. M., Braham, H., Ben Jannet, H., Mighri, Z., and Matthew, S. (2007) Antioxidant compounds from *Ebenus pinnata*, *Fitoterapia* 78, 32-34.
  16. Ai-Li, J., and Chang-Hai, W. (2006) Antioxidant properties of natural components from *Salvia plebeia* on oxidative stability of ascidian oil, *Process Biochemistry* 41, 1111-1116.
  17. Arena, E., Campisi, S., Fallico, B., and Maccarone, E. (2007) Distribution of fatty acids and phytosterols as a criterion to discriminate geographic origin of pistachio seeds, *Food Chemistry* 104, 403-408.

18. Julsing, M. K., Koulman, A., Woerdenbag, H. J., Quax, W. J., and Kayser, O. (2006) Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites, *Biomolecular engineering* 23, 265-279.
19. Yamamoto, K., Nakai, M., Nohara, K., and Yamatodani, A. (2007) The anti-cancer drug-induced pica in rats is related to their clinical emetogenic potential, *European journal of pharmacology* 554, 34-39.
20. Ichim, D., Creanga, D., and Rapa, A. (2007) The influence of the electrostatic stress on cell proliferation in plants, *Journal of Electrostatics* 65, 408-413.
21. Thygesen, L., Thulin, J., Mortensen, A., Skibsted, L. H., and Molgaard, P. (2007) Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea*, alone and in combination, *Food Chemistry* 101, 74-81.
22. Yano, Y., Satomi, M., and Oikawa, H. (2006) Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*, *International journal of food microbiology* 111, 6-11.
23. Capraz, M., Dilek, M., and Akpolat, T. (2007) Garlic, hypertension and patient education, *International journal of cardiology* 121, 130-131.
24. Acikgoz, C., and Kockar, O. M. (2007) Flash pyrolysis of linseed (*Linum usitatissimum* L.) for production of liquid fuels, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 78, 406-412.
25. Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, P., and Gargova, S. (2007) Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*), *Food Chemistry* 102, 764-770.
26. Lantz, R. C., Chen, G. J., Sarihan, M., Solyom, A. M., Jolad, S. D., and Timmermann, B. N. (2007) The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production, *Phytomedicine* 14, 123-128.
27. Lian, X. Y., Zhang, Z., and Stringer, J. L. (2006) Anticonvulsant and neuroprotective effects of ginsenosides in rats, *Epilepsy research* 70, 244-256.

28. Poindexter, B. J., Allison, A. W., Bick, R. J., and Dasgupta, A. (2006) Ginseng: Cardiotoxic in adult rat cardiomyocytes, cardiotoxic in neonatal rat cardiomyocytes, *Life Sciences* 79, 2337-2344.
29. Wink, M. (1987) Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids.
30. García, L. A., Perea, M., and Reguero, M. T. (1993) Brugmansia: Una Especie Promisoria para la Producción de Alcaloides del Tropano, *Revista Colombiana de Ciencias Químico- Farmacéuticas* 21, 5.
31. Pitta-Alvarez, S. I. (1998) Producción in vitro de alcaloides del tropano empleando raíces transformadas de Brugmansia candida., in *Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología*, p 214, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
32. Niño, J., Gallego, C. M., Correa, Y. M., and Mosquera, O. M. (2003) Production of scopolamine by normal root cultures of Brugmansia candida, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74, 289-291.
33. Mahagamasekera, M. G. P., and Doran, P. M. (1998) Intergeneric co-culture of genetically transformed organs for the production of scopolamine, *Phytochemistry* 47, 17-25.
34. Gontier, E., Clément, A., Tran, T. L. M., Gravot, A., Lièvre, K., Guckert, A., and Bourgaud, F. (2002) Hydroponic combined with natural or forced root permeabilization: a promising technique for plant secondary metabolite production, *Plant science(Limerick)* 163, 723-732.
35. Walsh, G. (2003) *Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology*, John Wiley and Sons.
36. García. (1986) Estudio comparativo de la producción de alcaloides en tres especies del género Brugmansia, mediante el cultivo de tejidos vegetales in vitro, in *Facultad de Ciencias , Departamento de Farmacia*, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

37. Trujillo, M., and Berdugo, M. (1986) Contribución al estudio del género *Brugmansia* mediante el cultivo de tejidos vegetales in vitro I, in *Química Farmaceutica*, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
38. Griffin, W. J., and Lin, G. D. (2000) Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids, *Phytochemistry* 53, 623-637.
39. Piñeros, Y. (2005) Producción de escopolamina e hiosciamina mediante cultivo in vitro de raíces de *Brugmansia candida*, in *Departamento de Ingeniería Química*, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
40. Kite, G. C., and Leon, C. (1995) Volatile compounds emitted from flowers and leaves of *Brugmansia candida* (Solanaceae), *Phytochemistry* 40, 1093-1095.
41. Carrizo, C. N., Pitta-Alvarez, S. I., Kogan, M. J., Giuliatti, A. M., and Tomaro, M. L. (2001) Occurrence of cadaverine in hairy roots of *Brugmansia candida*, *Phytochemistry* 57, 759-763.
42. Hashimoto, T., and Yamada, Y. (1994) Alkaloid biogenesis: molecular aspects, *Annual Review of Plant Biology* 45, 257-285.
43. Palazon, J., Moyano, E., Cusido, R. M., Bonfill, M., Oksman-Caldentey, K. M., and Pinol, M. T. (2003) Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy roots and plants overexpressing the h 6 h gene, *Plant science(Limerick)* 165, 1289-1295.
44. Binotto, J., Chahal, S., Khan, S., Li, B., and Rispler, A. (2001) General Review of the Chemistry and Utility of Scopolamine.
45. Bruneton, J. (1991) *Elementos de Fitoquímica y farmacognosia*, Editorial Acribia, Zaragoza.
46. Hashimoto, T., and Yamada, Y. (1986) Hyoscyamine 6 $\beta$ -Hydroxylase, a 2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenase, in Alkaloid-Producing Root Cultures, *Plant Physiology* 81, 619-625.
47. Zhang, L., Ding, R., Chai, Y., Bonfill, M., Moyano, E., Oksman-Caldentey, K. M., Xu, T., Pi, Y., Wang, Z., and Zhang, H. (2004) Engineering tropane

- biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 6786-6791.
48. Poupko, J. M., Baskin, S. I., and Moore, E. (2006) The pharmacological properties of anisodamine, *J Appl Toxicology* 27, 116-121.
  49. Wang, T. N., Yang, H. J., Gu-Ling, Li, J. Y., and Zheng, X. X. (2005) Advanced Measurement and Quantitative Appraise of Anisodamine on Calcium Triggered in Cardiac Myocyte, in *Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference*, pp 7710 - 7713, Shanghai, China.
  50. Sheng, C. Y., Gao, W. Y., Guo, Z. R., and He, L. X. (1997) Anisodamine restores bowel circulation in burn shock, *Burns* 23, 142-146.
  51. Wu, Y. F., Lü, W., Lu, Q., and Zhang, W. S. (2005) Asymmetric Synthesis of Anisodine, *Chinese Chemical Letters* 16, 1287 - 1289.
  52. Wang, H., Lu, Y., and Chen, H. Z. (2003) Differentiating effects of anisodamine on cognitive amelioration and peripheral muscarinic side effects induced by pilocarpine in mice, *Neurosci Lett* 344, 173-176.
  53. Wang, P. Y., Chen, J. W., and Hwang, F. (1993) Anisodamine causes acyl chain interdigitation in phosphatidylglycerol, *FEBS Lett* 332, 193-196.
  54. Lee, K. T., Yamakawa, T., Kodama, T., and Shimomura, K. (1998) Effects of chemicals on alkaloid production by transformed roots of *Belladonna*, *Phytochemistry* 49, 2343 - 2347.
  55. Norby, F. L., and Ren, J. (2002) Anisodamine inhibits cardiac contraction and intracellular Ca(2+) transients in isolated adult rat ventricular myocytes, *Eur J Pharmacol* 439, 21-25.
  56. Li, J., Chun, Y., and Jua, H. (2007) Simultaneous electrochemiluminescence detection of anisodamine, atropine and scopolamine in *Flos daturae* by capillary electrophoresis using b-cyclodextrin as additive, *Electroanalysis* 19, 1569 - 1574.
  57. Yang, L. M., Xie, Y. F., Chen, H. Z., and Lu, Y. (2007) Diastereomeric and enantiomeric high-performance liquid chromatographic separation of synthetic anisodamine, *J Pharm Biomed Anal* 43, 905-909.

58. Wang, H., Ling Gu, J., Fang Hu, H., Ji Dai, R., Hui Ding, T., and Nong Fu, R. (1998) Study on the chiral separation of basic drugs by capillary zone electrophoresis using  $\beta$ -CD and derivatized  $\beta$ -CDs as chiral selectors, *Analytica Chimica Acta* 359, 39-46.
59. Roca, W. M., and Mroginski, L. A. (1991) Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones.
60. Hiraoka, N., and Tabata, M. (1974) Alkaloid production by plants regenerated from cultured cells of *Datura innoxia*, *Phytochemistry (UK)*.
61. Lindsey, K., and Yeoman, M. M. (1983) The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures, *Journal of Experimental Botany* 34, 1055-1065.
62. Yamada, Y., and Endo, T. (1984) Tropane alkaloid production in cultured cells of *Duboisia leichhardtii*, *Plant Cell Reports* 3, 186-188.
63. Hartmann, T., Witte, L., Oprach, F., and Toppel, G. (1986) Reinvestigation of the alkaloid composition of *Atropa belladonna* plants, root cultures, and cell suspension cultures, *Planta medica* 52, 390.
64. Kitamura, Y., Miura, H., and Sugii, M. (1985) Alkaloid Composition and Atropine Esterase Activity in Callus and Differentiated Tissues of *Duboisia myoporoides* R. BR, *Chemical & pharmaceutical bulletin* 33, 5445-5448.
65. Oksman-Caldentey, K. M., and Strauss, A. (1986) Somaclonal Variation of Scopolamine Content in Protoplast-Derived Cell Culture Clones of *Hyoscyamus muticus*, *Planta medica* 52, 6.
66. Oksman-Caldentey, K. M., Vuorela, H., Isenegger, M., Strauss, A., and Hiltunen, R. (1987) Selection for high tropane alkaloid content in *Hyoscyamus muticus* plants, *Plant Breeding* 99, 318-326.
67. Yamada, Y., and Hashimoto, T. (1988) Biosynthesis of tropane alkaloids, p 199, John Wiley & Sons.
68. Flores, H. E., and Filner, P. (1985) Metabolic relationships of putrescine, GABA and alkaloids in cell and root cultures of Solanaceae, *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures*, 174—185.

69. Hamill, J. D., Parr, A. J., Robins, R. J., and Rhodes, M. J. C. (1986) Secondary product formation by cultures of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*, *Plant Cell Reports* 5, 111-114.
70. Kamada, H., Okamura, N., Satake, M., Harada, H., and Shimomura, K. (1986) Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*, *Plant Cell Reports* 5, 239-242.
71. Chilton, M. D., Tepfer, D. A., Petit, A., David, C., Casse-Delbart, F., and Tempe, J. (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells, *Nature* 295, 432-434.
72. White, F. F., Ghidossi, G., Gordon, M. P., and Nester, E. W. (1982) Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79, 3193-3197.
73. Willmitzer, L., Sanchez-Serrano, J., Buschfeld, E., and Schell, J. (1982) DNA from *Agrobacterium rhizogenes* is transferred to and expressed in axenic hairy root plant tissues, *Molecular Genetics and Genomics* 186, 16-22.
74. Yoshikawa, T., and Furuya, T. (1987) Saponin production by cultures of *Panax ginseng* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*, *Plant Cell Reports* 6, 449-453.
75. Chan, W. N., and Staba, E. J. (1965) Alkaloid production by *Datura* callus and suspension tissue cultures, *Lloydia* 28, 55-62.
76. Staba, E. J., and Jindra, A. (1968) *Datura* tissue cultures: Production of minor alkaloids from chlorophyllous and nonchlorophyllous strains, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 57.
77. Romeike, A., and Koblitz, G. (1970) Geweb Kulturen aus Alkaloid Flazen II. Versuche an *Datura* Arten., *Kulturpflanze* 18, 8.
78. Ramírez, Y., and Suarez, W. (1993) Contribución al estudio del genero *Brugmansia* mediante el cultivo de tejidos vegetales in vitro II, in *Facultad*

de Ciencias, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

79. Miraldi, E., Masti, A., Ferri, S., and Barni Comparini, I. (2001) Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*, *Fitoterapia* 72, 644-648.
80. Pitta-Alvarez, S. I., and Giulietti, A. M. (2001) Hairy roots of *Brugmansia candida* that grow without agitation: Biotechnological implications, *Biotechnology progress* 17.
81. Mateus, L., Cherkaoui, S., Christen, P., and Oksman-Caldentey, K. M. (2000) Simultaneous determination of scopolamine, hyoscyamine and littorine in plants and different hairy root clones of *Hyoscyamus muticus* by micellar electrokinetic chromatography, *Phytochemistry* 54, 517-523.
82. Flores, H. E., Dai, Y. R., Cuello, J. L., Maldonado-Mendoza, I. E., and Loyola-Vargas, V. M. (1993) Green roots: photosynthesis and photoautotrophy in an underground plant organ, pp 363-371, Am Soc Plant Biol.
83. Roig Celma, C., Palazón, J., Cusidó, R. M., Piñol, M. T., and Keil, M. (2001) Decreased scopolamine yield in field-grown *Duboisia* plants regenerated from hairy roots, *Planta med* 67, 249-253.
84. Moyano, E., Fornalé, S., Palazón, J., Cusidó, R. M., Bagni, N., and Piñol, M. T. (2002) Alkaloid production in *Duboisia* hybrid hairy root cultures overexpressing the pmt gene, *Phytochemistry* 59, 697-702.
85. Hakkinen, S. T., Moyano, E., Cusido, R. M., Palazon, J., Pinol, M. T., and Oksman-Caldentey, K. M. (2005) Enhanced secretion of tropane alkaloids in *Nicotiana tabacum* hairy roots expressing heterologous hyoscyamine-6 $\beta$ -hydroxylase, *Journal of Experimental Botany* 56, 2611-2618.
86. Cusido, R. M., Palazón, J., Piñol, M. T., Bonfill, M., and Morales, C. (1999) *Datura metel*: In vitro production of tropane alkaloids, *Planta medica* 65, 144-148.

87. Min, J. Y., Jung, H. Y., Kang, S. M., Kim, Y. D., Kang, Y. M., Park, D. J., Prasad, D. T., and Choi, M. S. (2007) Production of tropane alkaloids by small-scale bubble column bioreactor cultures of *Scopolia parviflora* adventitious roots, *Bioresource technology* 98, 1748-1753.
88. Pitta-Alvarez, S. I., Spollansky, T. C., and Giulietti, A. M. (2000) The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*, *Enzyme and Microbial Technology* 26, 252-258.
89. Jung, H. Y., Kang, S. M., Kang, Y. M., Kang, M. J., Yun, D. J., Bahk, J. D., Yang, J. K., and Choi, M. S. (2003) Enhanced production of scopolamine by bacterial elicitors in adventitious hairy root cultures of *Scopolia parviflora*, *Enzyme and Microbial Technology* 33, 987-990.
90. Kang, S. M., Jung, H. Y., Kang, Y. M., Yun, D. J., Bahk, J. D., Yang, J., and Choi, M. S. (2004) Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and H6H in adventitious root cultures of *Scopolia parviflora*, *Plant Science* 166, 745-751.
91. Kursinszki, L., Hank, H., László, I., and Szoke, É. (2005) Simultaneous analysis of hyoscyamine, scopolamine, 6 $\beta$ -hydroxyhyoscyamine and apoatropine in Solanaceous hairy roots by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1091, 32-39.
92. Jaber-Vazdekis, N., Gutierrez-Nicolas, F., Ravelo, A. G., and Zarate, R. (2006) Studies on tropane alkaloid extraction by volatile organic solvents: dichloromethane vs. chloroform, *Phytochemical Analysis* 17.
93. Li, J., Chun, Y., and Ju, H. (2007) Simultaneous Electrochemiluminescence Detection of Anisodamine, Atropine, and Scopolamine in Flos daturae by Capillary Electrophoresis Using  $\eta$ -Cyclodextrin as Additive, *Electroanalysis* 19, 1569-1574.

94. Wyslouzil, B. E., Whipple, M., Chatterjee, C., Walcerz, D. B., Weathers, P. J., and Hart, D. P. (1997) Mist deposition onto hairy root cultures: Aerosol modeling and experiments, *Biotechnology Progress* 13, 185-194.
95. Kino-Oka, M., Hitaka, Y., Taya, M., and Tone, S. (1999) High-density culture of red beet hairy roots by considering medium flow condition in a bioreactor, *Chemical Engineering Science* 54, 3179-3186.
96. Martin, Y., and Vermette, P. (2005) Bioreactors for tissue mass culture: Design, characterization, and recent advances, *Biomaterials* 26, 7481-7503.
97. Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., and Gontier, E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Science* 161, 839-851.
98. Savitha, B. C., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., and Ravishankar, G. A. (2006) Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor, *Process Biochemistry* 41, 50-60.
99. Jung, K. H., Kwak, S. S., and Liu, J. R. (1998) Procedure for biomass estimation considering the change in biomass volume during high density culture of hairy roots, *Journal of Fermentation and Bioengineering* 85, 454-457.
100. Shiao, T., and Doran, P. M. (2000) Root hairiness: effect on fluid flow and oxygen transfer in hairy root cultures, *Journal of Biotechnology* 83, 199-210.
101. Blanco, M., Valverde, R., and Gomez, L. (2003) Optimization of genetic transformation with *Agrobacterium rhizogenes*, *Agronomia Costarricense* 27, 19-28.
102. Green, K. D., and Thomas, N. H. (1996) An integrated "Root tube" bioreactor/separator for transformed root cultures, *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81, 453-457.
103. Chatterjee, C., Correll, M. J., Weathers, P. J., Wyslouzil, B. E., and Walcerz, D. B. (1997) Simplified acoustic window mist bioreactor, *Biotechnology Techniques* 11, 155-158.

104. Hitaka, Y., Takahashi, Y., Kino-oka, M., Taya, M., and Tone, S. (2000) Culture of red beet hairy roots by considering variation in sensitivity of tip meristems to hydraulic stress, *Biochemical engineering journal* 6, 1-6.
105. Takahashi, Y., Hitaka, Y., Kino-oka, M., Taya, M., and Tone, S. (2001) Evaluation of growth property of red beet hairy roots depending on condition of inocula and its application to culture control with fuzzy logic theory, *Biochemical engineering journal* 8, 121-127.
106. Weathers, P. J., and Kim, Y. J. (2001) Transformed roots of *Artemisia annua* exhibit an unusual pattern of border cell release, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 37, 440-445.
107. Zobayed, S. M. A., and Saxena, P. K. (2003) In vitro-grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem') in a temporary immersion bioreactor, *Plant Sci* 165, 463-470.
108. Huang, S. Y., Hung, C. H., and Chou, S. N. (2004) Innovative strategies for operation of mist trickling reactors for enhanced hairy root proliferation and secondary metabolite productivity, *Enzyme and Microbial Technology* 35, 22-32.
109. Suresh, B., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., and Ravishankar, G. A. (2004) Polyamine and methyl jasmonate-influenced enhancement of betalaine production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* grown in a bubble column reactor and studies on efflux of pigments, *Process Biochemistry* 39, 2091-2096.
110. Zobayed, S., and Saxena, P. K. (2004) Production of St. John's wort plants under controlled environment for maximizing biomass and secondary metabolites, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 40, 108-114.
111. Suresh, B., Bais, H. P., Raghavarao, K., Ravishankar, G. A., and Ghildyal, N. P. (2005) Comparative evaluation of bioreactor design using *Tagetes patula* L. hairy roots as a model system, *Process Biochemistry* 40, 1509-1515.

112. Luczkiewicz, M., and Kokotkiewicz, A. (2005) Co-cultures of shoots and hairy roots of *Genista tinctoria* L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens, *Plant Science* 169, 862-871.
113. Guillon, S., Trémouillaux-Guiller, J., Pati, P. K., Rideau, M., and Gantet, P. (2006) Hairy root research: recent scenario and exciting prospects, *Current opinion in plant biology* 9, 341-346.
114. Sivakumar, G. (2006) Bioreactor technology: a novel industrial tool for high-tech production of bioactive molecules and biopharmaceuticals from plant roots, *Biotechnology Journal* 1.
115. (1995) Handbook of Vigour Test Methods, (ASSOCIATION, I. S. T., Ed.), p 117, Zurich.
116. Payne, G. F., Bringi, V., Prince, C. L., and Shuler, M. L. (1992) Plant cell and tissue culture in liquid systems, *Biotechnology Techniques* 6, 287-287.
117. Lee, K. T., Yamakawa, T., Kodama, T., and Shimomura, K. (1998) Effects of chemicals on alkaloid production by transformed roots of belladonna, *Phytochemistry* 49, 2343-2347.
118. Cardillo, A. B., Talou, J. R., and Giulietti, A. M. (2008) Expression of *Brugmansia candida* Hyoscyamine 6 $\beta$ -Hydroxylase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential use as biocatalyst, *Microbial Cell Factories* 7, 17.
119. Zárate, R., Jaber-Vazdekis, N., Medina, B., and Ravelo, Á. (2006) Tailoring tropane alkaloid accumulation in transgenic hairy roots of *Atropa baetica* by over-expressing the gene encoding hyoscyamine 6 $\beta$ -hydroxylase, *Biotechnology letters* 28, 1271-1277.
120. Santos, P. A. G., Figueiredo, A. C., Oliveira, M. M., Barroso, J. G., Pedro, L. G., Deans, S. G., and Scheffer, J. J. C. (2005) Growth and essential oil composition of hairy root cultures of *Levisticum officinale* WDJ Koch (lovage), *Plant Science* 168, 1089-1096.

121. Caro, L. A., Polci, P. A., Lindström, L. I., Echenique, C. V., and Hernández, L. F. (2002) Micropropagation of *Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz from young and mature plants, *Biocell* 26, 25-33.
122. Bonhomme, V., Laurain-Mattar, D., Lacoux, J., Fliniaux, M. A., and Jacquin-Dubreuil, A. (2000) Tropane alkaloid production by hairy roots of *Atropa belladonna* obtained after transformation with *Agrobacterium rhizogenes* 15834 and *Agrobacterium tumefaciens* containing rolA, B, C genes only, *Journal of biotechnology* 81, 151-158.
123. Shanks, J. V., and Morgan, J. (1999) Plant 'hairy root' culture, *Current opinion in biotechnology* 10, 151-155.
124. Veena, V., and Taylor, C. G. (2007) *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 43, 383-403.
125. Wang, Y. M., Wang, J. B., Luo, D., and Jia, J. F. (2001) Regeneration of plants from callus cultures of roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* on *Alhagi pseudoalhagi*, *CELL RESEARCH-ENGLISH EDITION-* 11, 279-284.
126. Luczkiewicz, M., Zarate, R., Dembinska-Migas, W., Migas, P., and Verpoorte, R. (2002) Production of pulchelin E in hairy roots, callus and suspension cultures of *Rudbeckia hirta* L, *Plant science(Limerick)* 163, 91-100.
127. Dhakulkar, S., Ganapathi, T. R., Bhargava, S., and Bapat, V. A. (2005) Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots, *Plant Science* 169, 812-818.
128. Jin, U. H., Chun, J. A., Han, M. O., Lee, J. W., Yi, Y. B., Lee, S. W., and Chung, C. H. (2005) Sesame hairy root cultures for extra-cellular production of a recombinant fungal phytase, *Process Biochemistry* 40, 3754-3762.
129. Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Khodakovskaya, M. V., Glazunov, V. P., Radchenko, S. V., Zvereva, E. V., Fedoreyev, S. A., and Zhuravlev, Y. N. (2002) Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia*

- callus cultures transformed with the rolB and rolC genes, *Journal of biotechnology* 97, 213-221.
130. Bulgakov, V. P. (2008) Functions of rol genes in plant secondary metabolism, *Biotechnology advances* 26, 318-324.
  131. Bulgakov, V. P., Tchernoded, G. K., Mischenko, N. P., Shkryl, Y. N., Fedoreyev, S. A., and Zhuravlev, Y. N. (2004) The rolB and rolC genes activate synthesis of anthraquinones in *Rubia cordifolia* cells by mechanism independent of octadecanoid signaling pathway, *Plant Science* 166, 1069-1075.
  132. Doran, P. M. (1997) *Hairy roots: culture and applications*, CRC Press.

## **TABLA DE ANEXOS**

**ANEXO A.** REGISTRO DE LA TEMPERATURA AMBIENTE DIURNA DURANTE UNO DE LOS ENSAYOS REALIZADO EN EL SISTEMA DE BIORREACCIÓN DE DOS UNIDADES, CASO 1.

**ANEXO B.** CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ESCOPOLAMINA POR CLAE (Método 1).

**ANEXO C.** CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES POR CLAE.

**ANEXO D.** NITRÓGENO PRESENTE EN EL MEDIO PARA EL CULTIVO DE RAÍCES NORMALES DE *B. candida*.

**ANEXO E.** TRANSFORMACIÓN CON *Agrobacterium rhizogenes*.

**ANEXO F.** CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ESCOPOLAMINA, HIOSCIAMINA Y ANISODAMINA POR CLAE (Método 2).

**ANEXO G.** CONSUMO DE SACAROSA, GLUCOSA Y FRUCTOSA DURANTE EL CRECIMIENTO DE RAÍCES NORMALES DE *B. Candida* NORMALES EN ERLLENMEYER.

**ANEXO H.** CALIBRACIÓN DE LAS BOMBAS USADAS PARA IMPULSAR EL MEDIO DE CULTIVO ENTRE LAS DOS UNIDADES DEL SISTEMA DE BIORREACCIÓN

**ANEXO I.** EVALUACIÓN DE MALLAS DE ACERO INOXIDABLE Y PLÁSTICO CUANDO SON USADA COMO SOPORTE PARA EL CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *Brugmansia candida* EN ERLLENMEYER

**ANEXO J.** COMPOSICIÓN DEL MEDIO GAMBORG (B5)

**ANEXO K.** RELACIÓN ENTRE LAS CORRELACIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA EN EL BIORREACTOR A PARTIR DE LOS DATOS DE CONDUCTIVIDAD Y CONCENTRACIÓN DE SACAROSA Y EL RENDIMIENTO  $Y_{x/s}$

## ANEXO A

REGISTRO DE LA TEMPERATURA AMBIENTE DIURNA DURANTE UNO DE  
LOS ENSAYOS REALIZADO EN EL SISTEMA DE BIORREACCIÓN DE DOS  
UNIDADES, CASO 1

Día de cultivo	Temperatura (°C)
0	25,6
1	24,4
2	24,8
3	26,5
4	24,1
5	22,9
6	23,6
7	25,8
8	23,7
9	24,7
11	29,0
12	29,2
13	28,6
14	26,6
15	25,2
18	25,7
19	26,6

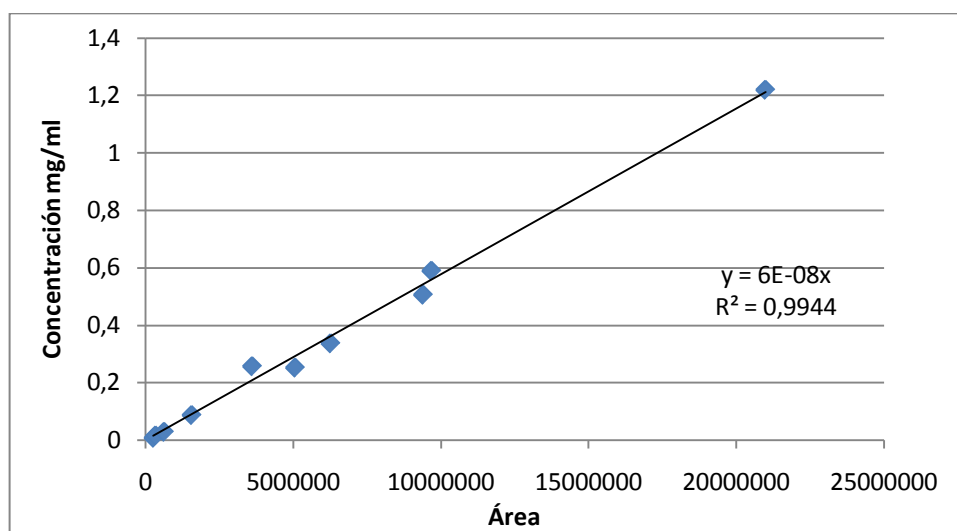
20	26,2
21	23,4

El registro de la temperatura se realizó cada día a las 10:00 AM.

## ANEXO B

### CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ESCOPOLAMINA POR CLAE (Método 1)

Con el fin de disminuir el error al momento de determinar la concentración de este alcaloide por CLAE, usando la técnica descrita en la metodología en el numeral 3.1.12.6, al momento de realizar cada una de las determinaciones se verificó la curva de calibración por medio de la inyección del patrón a una concentración determinada.



**Figura B1.** Curva de calibración para la escopolamina.

De acuerdo a estos datos, la expresión para determinar la concentración de escopolamina está dada por:

$$\text{Escopolamina (mg/ml)} = 6 \text{ e}^{-8} * \text{Área}$$

**Ecuación B1**

La correlación entre los datos experimentales y la regresión realizada es de 0,99. Y el tiempo de retención establecido para este alcaloides es:  $4,8 \pm 0,5$  min.

Para determinar cuál era la variación que se podía presentar en el resultado debido a la inyección repetida de las muestras, se uso un patrón y se registraron las áreas obtenidas luego de realizarle el análisis cromatográfico en diferentes momentos, los resultados se presentan en la tabla B1.

**Tabla B1.** Áreas obtenidas para la inyección repetida de un patrón de escopolamina.

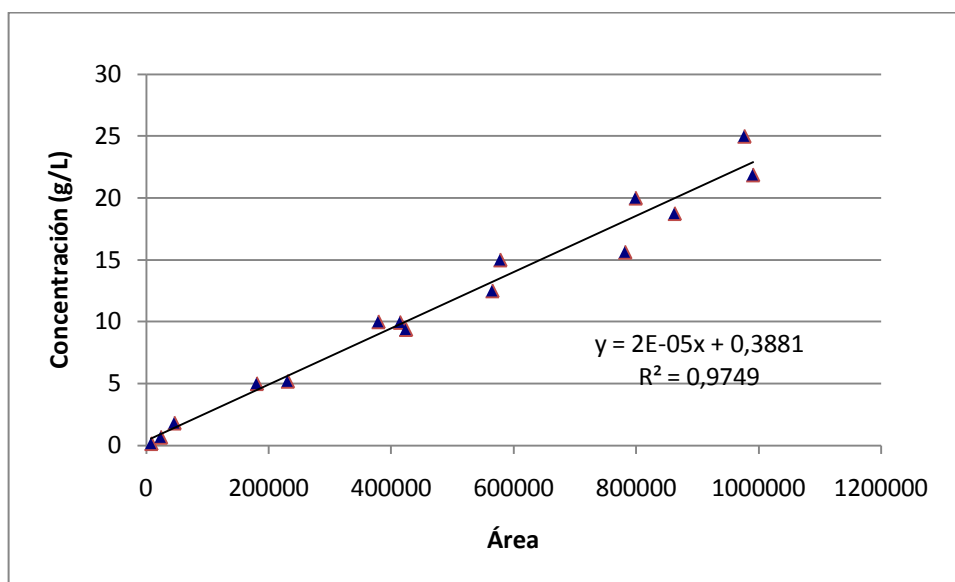
Concentración de Escopolamina (mg/ml)	Área
0,507	9392856
0,507	9249674
0,507	9342390
0,507	9348043

De acuerdo a estos resultados se tuvo un área promedio de 933324, con una desviación estándar de 60111. En términos de la concentración de escopolamina, usando la expresión B1, podemos calcular el equivalente a la desviación, que en este caso corresponde a 0,004 mg/ml (diferencias inferiores al 1%). Por tanto, no se justificaba la inyección repetida de las muestras.

## ANEXO C

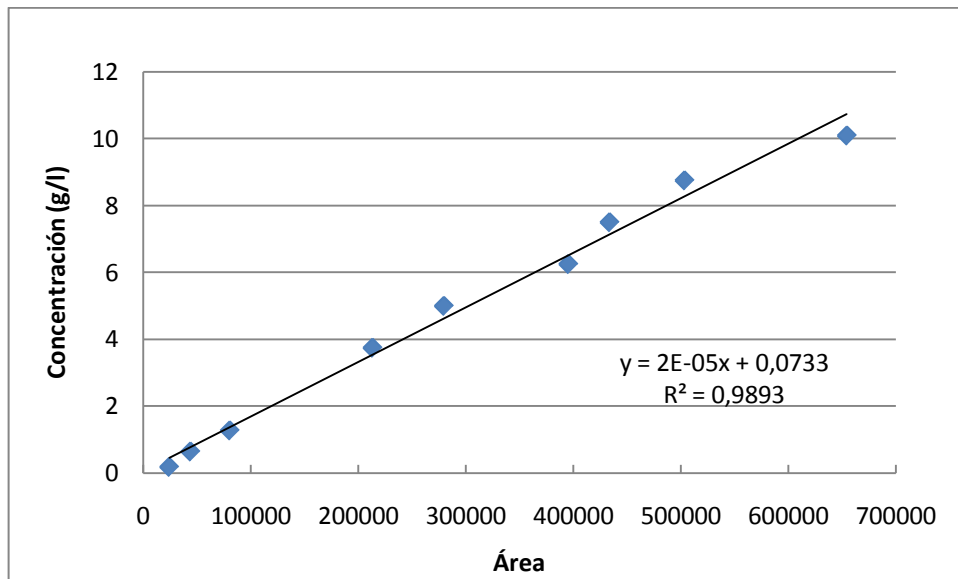
### CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES POR CLAE

Con el fin de disminuir el error al momento de determinar la concentración de este alcaloide por CLAE, usando la técnica descrita en la metodología en el numeral 3.1.12.8, al momento de realizar cada una de las determinaciones se verificó la curva de calibración por medio de la inyección del patrón a una concentración determinada. En el caso de los azúcares, se establecieron curvas de calibración para sacarosa, glucosa y fructosa.



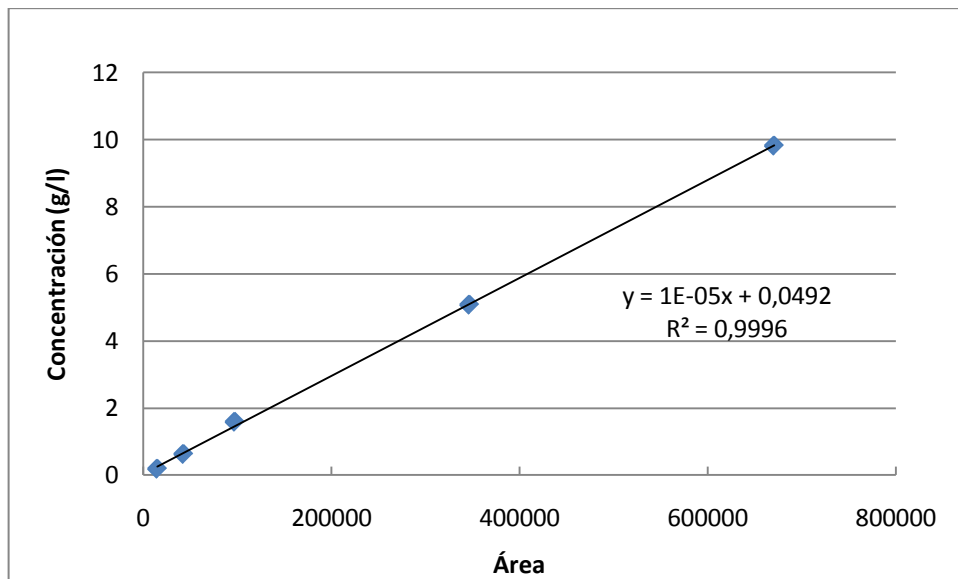
**Figura C1.** Curva de calibración para la sacarosa.

Para la sacarosa el tiempo de retención fue de  $7,49 \pm 0,2$  minutos. La correlación entre los datos y la línea de tendencia es de 0,99.



**Figura C2.** Curva de calibración para la glucosa.

Para la glucosa el tiempo de retención fue de  $9,46 \pm 0,9$  minutos. Y la correlación entre los datos experimentales y la línea de tendencia es de 0,99.



**Figura C3.** Curva de calibración para la fructosa.

Para la fructosa el tiempo de retención fue de  $11,8 \pm 0,04$  minutos. Y la correlación entre los datos experimentales y la línea de tendencia es de 0,99.

De acuerdo a estos datos, la expresiones para determinar la concentración de estos azúcares están dadas por:

$$\text{Sacarosa (g/l)} = 2 e^{-5} * \text{Área} + 0,39 \quad \text{Ecuación C1}$$

$$\text{Glucosa (g/l)} = 2 e^{-5} * \text{Área} + 0,07 \quad \text{Ecuación C2}$$

$$\text{Fructosa (g/l)} = 1 e^{-5} * \text{Área} + 0,05 \quad \text{Ecuación C3}$$

Para determinar cuál era la variación que se podía presentar en el resultado debido a la inyección repetida de las muestras, se uso un patrón y se registraron las áreas obtenidas luego de realizarle el análisis cromatográfico en diferentes momentos, los resultados se presentan en la tablas C1, C2 y C3.

**Tabla C1.** Áreas obtenidas para la inyección repetida de un patrón de sacarosa.

Concentración de Sacarosa (g/l)	Área
5	222407
5	180294
5	226082

De acuerdo a estos resultados se tuvo un área promedio de 209594, con una desviación estándar de 25441. En términos de la concentración de sacarosa, usando la expresión C1, podemos calcular el equivalente a la desviación, que en este caso corresponde a 0,89 g/l (diferencias inferiores al 20%).

**Tabla C2.** Áreas obtenidas para la inyección repetida de un patrón de glucosa.

<b>Concentración de Glucosa (g/l)</b>	<b>Área</b>
5	313644
5	279449
5	324168

De acuerdo a estos resultados se tuvo un área promedio de 305754, con una desviación estándar de 23380. En términos de la concentración de glucosa, usando la expresión C2, podemos calcular el equivalente a la desviación, que en este caso corresponde a 0,54 g/l (diferencias inferiores al 11%).

**Tabla C3.** Áreas obtenidas para la inyección repetida de un patrón de fructosa.

<b>Concentración de Fructosa (g/l)</b>	<b>Área</b>
5	340822
5	341301
5	304528

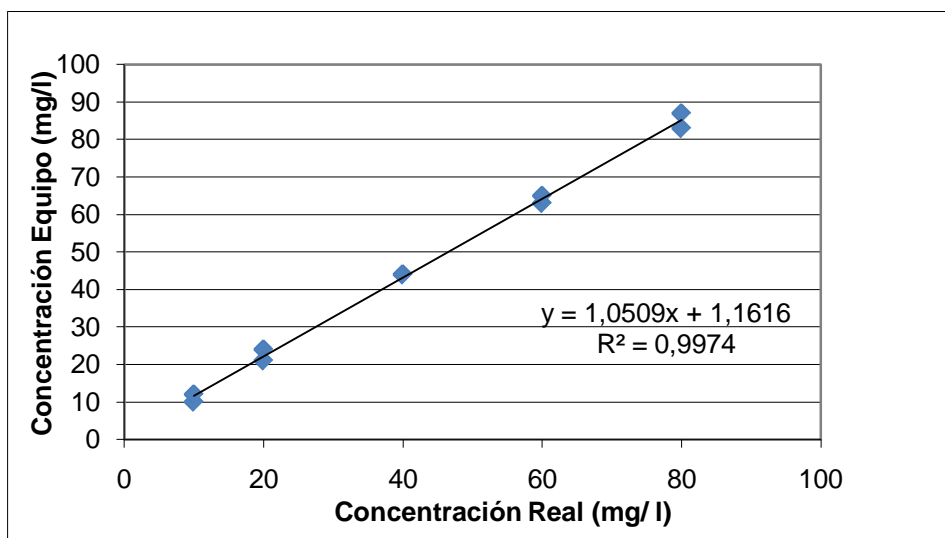
De acuerdo a estos resultados se tuvo un área promedio de 328884, con una desviación estándar de 21094. En términos de la concentración de fructosa, usando la expresión C3, podemos calcular el equivalente a la desviación, que en este caso corresponde a 0,26 g/l (diferencias inferiores al 6 %).

## ANEXO D

### NITRÓGENO PRESENTE EN EL MEDIO PARA EL CULTIVO DE RAÍCES NORMALES DE *B. candida*

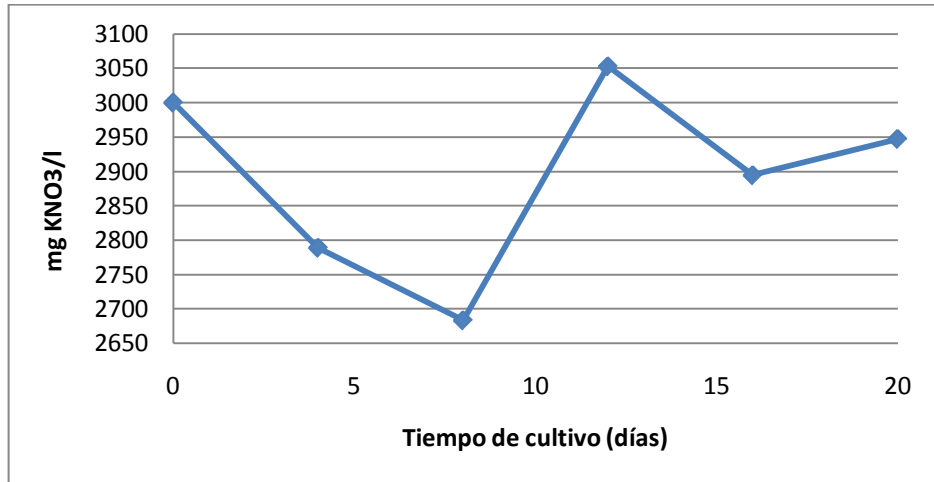
Este Anexo hace referencia a la determinación de nitrógeno en el medio, que se realizó para uno de los cultivos de raíces normales de *B. candida* que se desarrolló en el sistema de biorreacción de dos unidades, operado de modo que la corriente de aire ingresara directamente en la unidad de crecimiento.

Para empezar se presenta la curva de calibración correspondiente a la determinación desarrollada de acuerdo a la metodología descrita en el numeral 3.1.12.8. En este caso, como el equipo está programado para hacer la determinación los resultados que entrega no corresponden a absorbancias, sino a medidas directas de la concentración de nitrógeno, por tanto la calibración consiste en encontrar la relación entre la concentración reportada y la real.



**Figura D1.** Curva de calibración para el nitrógeno.

Luego, se procedió a calcular los valores para la concentración de nitrógeno a lo largo del cultivo. Los resultados se presentan a continuación en la figura D2.



**Figura D2.** Concentración de nitrógeno para el cultivo de raíces normales de *B. candida* en el sistema de biorreacción de dos unidades.

El objetivo de realizar el seguimiento a la concentración de nitrógeno estaba relacionado con la posibilidad de correlacionar esta variable con el crecimiento de la biomasa, pero dados los resultados obtenidos se descartó esa alternativa.

## ANEXO E

### TRANSFORMACIÓN CON *Agrobacterium rhizogenes*

El estudio de las raíces transformadas, caracterizadas por ser raíces muy finas de carácter piloso, conocidas como hairy roots, se inició cuando se observaron este tipo de características en raíces infectadas con bacterias del suelo.

Dentro de las bacterias que causaban esta infección, se encuentra el *Agrobacterium rhizogenes*, una bacteria gram negativa perteneciente a la familia *Rhizobiaceae*, que se caracteriza por infectar los tejidos de las raíces, induciendo como respuesta de las células la producción de opinas, sustancias que luego usa como fuente de nutrientes.

Las opinas sintetizadas por las células, pueden ser del tipo agropina, manopina o cucomopina, dependiendo del tipo de cepa de la bacteria con que se de la infección. Sin embargo, sin importar de qué tipo de cepa se trate, un mapeo comparativo de las diferentes especies e hibridaciones DNA:DNA indican que todas las cepas conservan el “**core**” DNA el cual es esencial para la formación de las raíces transformadas.

Hacia la década de los 80, se iniciaron los primeros cultivos controlados de raíces infectadas con *Agrobacterium rhizogenes*, observando que éstos eran capaces de crecer más rápido sin la necesidad de usar fitohormonas y permaneciendo estables en el tiempo. Ventajas del uso de las raíces transformadas a nivel industrial: estabilidad en la síntesis, reproducibilidad en los ensayos de producción. Además estas raíces presentaron un alto grado de estabilidad

cromosomal, como corresponde a tejidos en los cuales se mantiene el meristemo funcional.

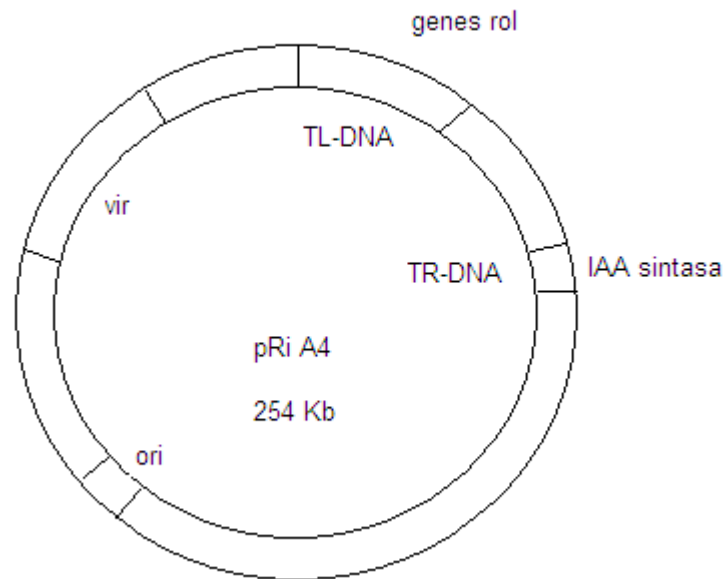
Dentro de las cepas usada recientemente en diferentes investigaciones se encuentran las que pertenecen al tipo **Agropina**, específicamente las cepas A4, HRI y **LBA9402** (la última contiene el Ri plasmidico de la cepa 1855)

En éstas los plásmidos Ri contienen dos secciones discretas de T- DNA: TR y TL. En la sección correspondiente al TR T-DNA se localizan los genes encargados de la biosíntesis de auxinas y opinas (presente en *A. rhizogenes* y *A. tumefaciens*).

En la sección correspondiente al TL T-DNA se encuentran secuencias únicas correspondientes al *A. rhizogenes*.

El TL T-DNA contiene 4 genes importantes para la generación de raíces transformadas el **rol A**, **rol B**, **rol C** y **rol D** (rol: root locus). Otros genes presentes en el TL T-DNA son el **ORF13** y **ORF 14**, que al parecer juegan un papel importante como soporte para la formación y mantenimiento de las raíces transformadas y para el ajuste hormonal a valores óptimos.

El tipo A4 fue inicialmente aislado desde cultivos de rosas en California. El T-DNA contiene genes para la síntesis del ácido 3 indol acético (AIA), que juegan un papel importante como auxina en la formación de las raíces (116).

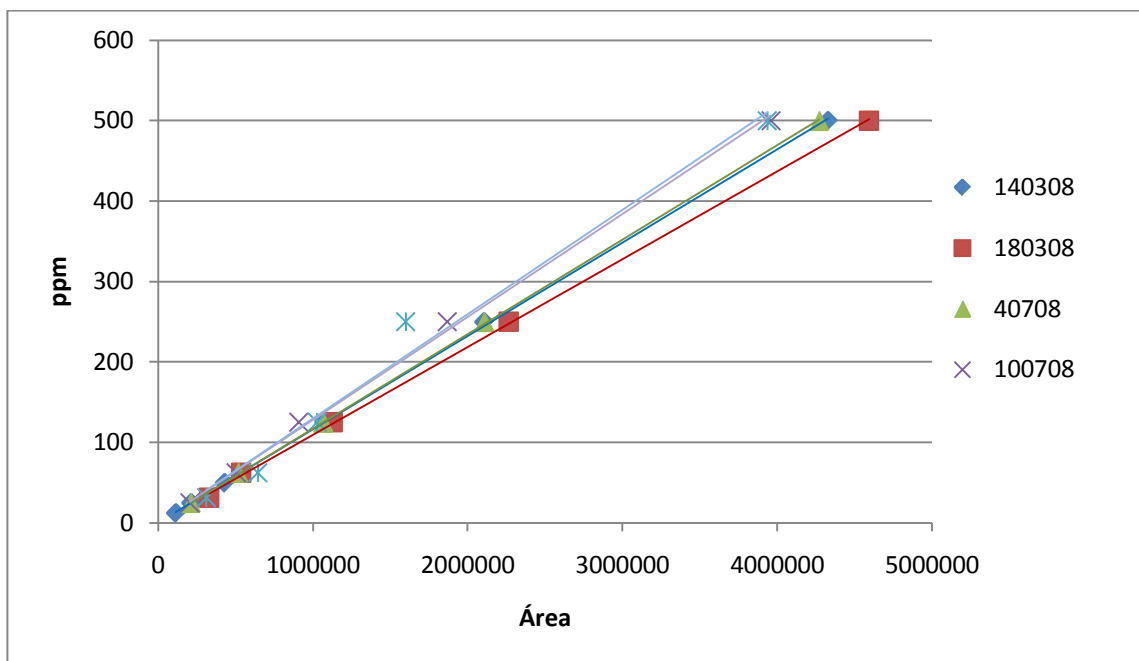


**Figura G1.** Esquema simplificado del plásmido pRi A4.

Para identificar si una transformación ha sido exitosa y el ADN de la bacteria a pasado a la célula de la planta, existen diferentes métodos, dentro de los cuales se encuentran, la determinación de opinas, la reacción en cada de la polimerasa (PCR), o la verificación de la presencia del gen de GUS.

**ANEXO F**  
**CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE**  
**ESCOPOLAMINA, HIOSCIAMINA Y ANISODAMINA POR CLAE (Método 2)**

Con el fin de disminuir el error al momento de determinar la concentración de este alcaloide por CLAE, usando la técnica descrita en la metodología en el numeral 3.2.3, al momento de realizar cada una de las determinaciones se realizó la correspondiente curva de calibración. De ese modo se tienen los resultados correspondientes a diferentes calibraciones que permiten observar la variación de la misma en el tiempo.



**Figura F1.** Curvas de calibración realizadas para la escopolamina en diferentes fechas.

De acuerdo a estos datos, se establecieron diferentes expresiones del tipo:

$$\text{Escopolamina (ppm)} = e * \text{Área} \quad \text{Ecuación F1}$$

Donde “e”, es el valor de la pendiente para las diferentes líneas de tendencia obtenidas.

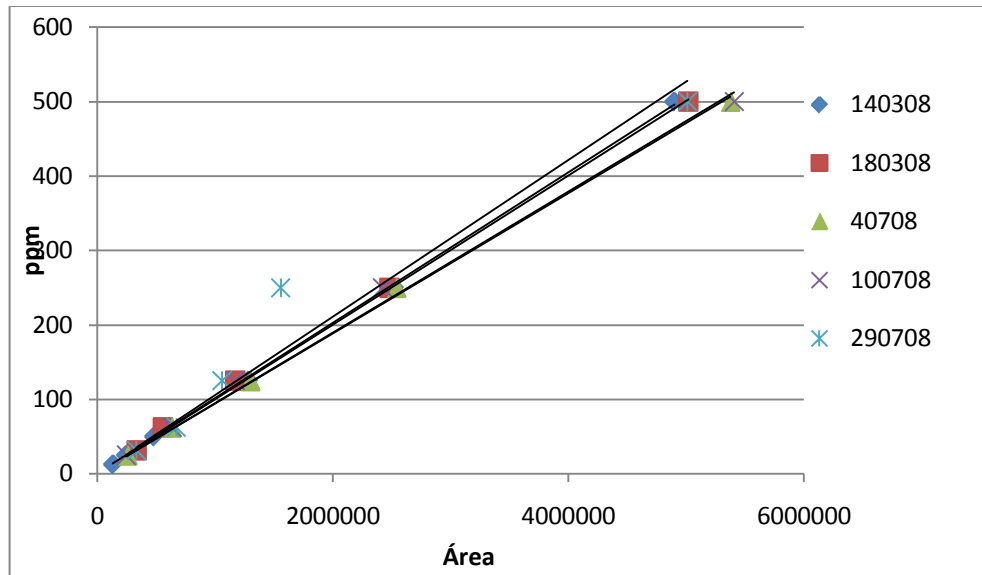
A continuación en la tabla F1, se presentan los valores de “e”, y el de la correlación obtenida en cada una de las regresiones realizadas. Observándose que las variaciones son muy pequeñas, por lo tanto el método tiene buena reproducibilidad.

**Tabla F1.** Información relativa a las líneas de tendencia obtenidas a partir de los datos de las calibraciones realizadas para la escopolamina.

<b>Fechas</b>	<b>Tiempo Retención (min)</b>	<b>e</b>	<b>Correlación</b>
140308	8,42	0,000116	0,99
180308	8,37	0,000109	0,99
40708	8,61	0,000117	0,99
100708	8,53	0,000128	0,99
290708	8,65	0,00013	0,98
<b>Promedios</b>	8,51	0,00012	0,99
<b>Desviación</b>	0,12	8,80341E-06	0,01

Por tanto el tiempo de retención promedio establecido para este alcaloides es:  $8,51 \pm 0,12$  min.

Para la anisodamina, se tienen los resultados expuestos en la figura F2.



**Figura F2.** Curvas de calibración realizadas para la anisodamina en diferentes fechas.

De acuerdo a estos datos, se establecieron diferentes expresiones del tipo:

$$\text{Anisodamina (ppm)} = a * \text{Área} \quad \text{Ecuación F2}$$

Donde “a”, es el valor de la pendiente para las diferentes líneas de tendencia obtenidas.

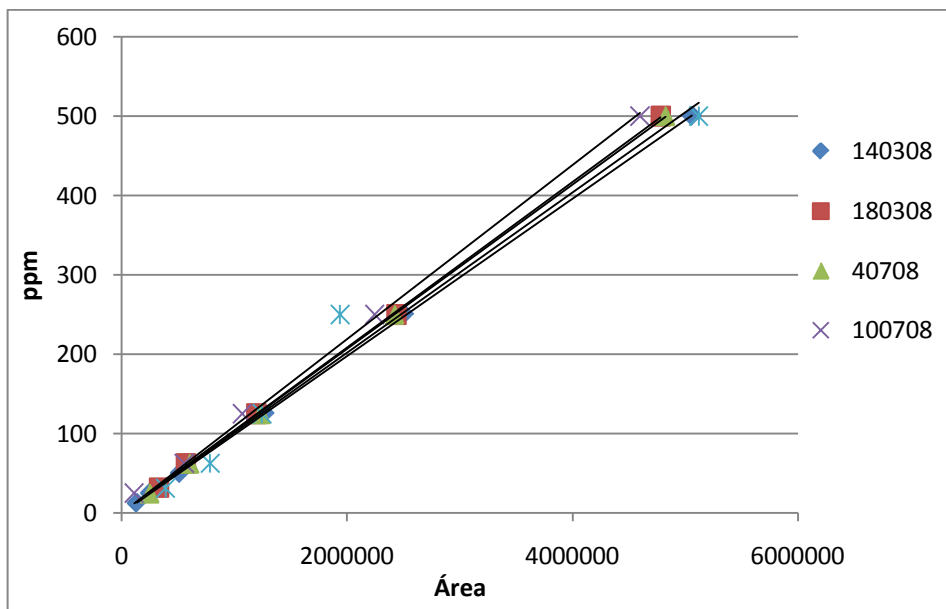
A continuación en la tabla F2, se presentan los valores de “a”, y el de la correlación obtenida en cada una de las regresiones realizadas. Observándose que las variaciones son muy pequeñas, por lo tanto el método tiene buena reproducibilidad.

**Tabla F2.** Información relativa a las líneas de tendencia obtenidas a partir de los datos de las calibraciones realizadas para la anisodamina.

<b>Fechas</b>	<b>Tiempo Retención (min)</b>	<b>a</b>	<b>Correlación</b>
140308	9,31	0,000101	0,99
180308	9,25	0,0001	0,99
40708	9,54	0,000094	0,99
100708	9,43	0,000095	0,99
290708	9,58	0,000105	0,94
<b>Promedios</b>	9,42	0,000099	0,98
<b>Desviación</b>	0,14	4,52769E-06	0,03

Por tanto el tiempo de retención promedio establecido para este alcaloides es:  $9,42 \pm 0,14$  min.

Para la hiosciamina, se tienen los resultados expuestos en la figura F3.



**Figura F3.** Curvas de calibración realizadas para la hiosciamina en diferentes fechas.

De acuerdo a estos datos, se establecieron diferentes expresiones del tipo:

$$\text{Hiosciamina (ppm)} = h * \text{Área} \quad \text{Ecuación F3}$$

Donde “a”, es el valor de la pendiente para las diferentes líneas de tendencia obtenidas.

A continuación en la tabla F3, se presentan los valores de “h”, y el de la correlación obtenida en cada una de las regresiones realizadas. Observándose que las variaciones son muy pequeñas, por lo tanto el método tiene buena reproducibilidad.

**Tabla F3.** Información relativa a las líneas de tendencia obtenidas a partir de los datos de las calibraciones realizadas para la hiosciamina.

<b>Fechas</b>	<b>Tiempo Retención (min)</b>	<b>a</b>	<b>Correlación</b>
140308	13,47	0,000099	0,99
180308	13,38	0,000104	0,99
40708	13,84	0,000103	0,99
100708	13,67	0,00011	0,99
290708	13,89	0,000101	0,98
<b>Promedios</b>	13,65	0,0001034	0,99
<b>Desviación</b>	0,23	4,15933E-06	0,01

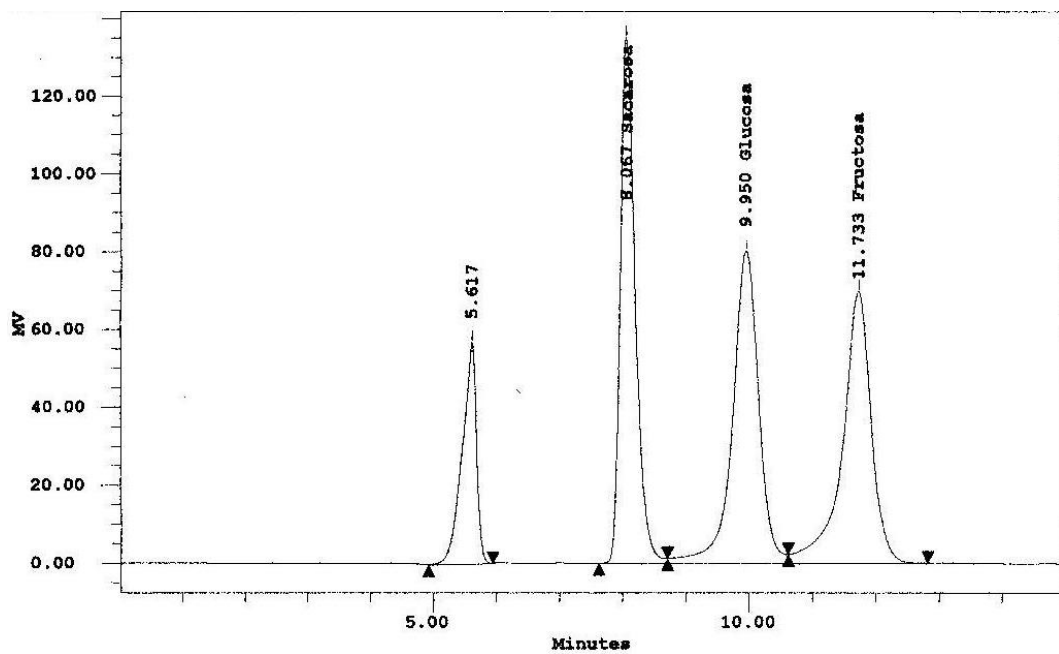
Por tanto el tiempo de retención promedio establecido para este alcaloides es:  
 $13,65 \pm 0,23$  min.

## ANEXO G

### CONSUMO DE SACAROSA, GLUCOSA Y FRUCTOSA DURANTE EL CRECIMIENTO DE RAÍCES NORMALES DE *B. Candida* NORMALES EN ERLLENMEYER

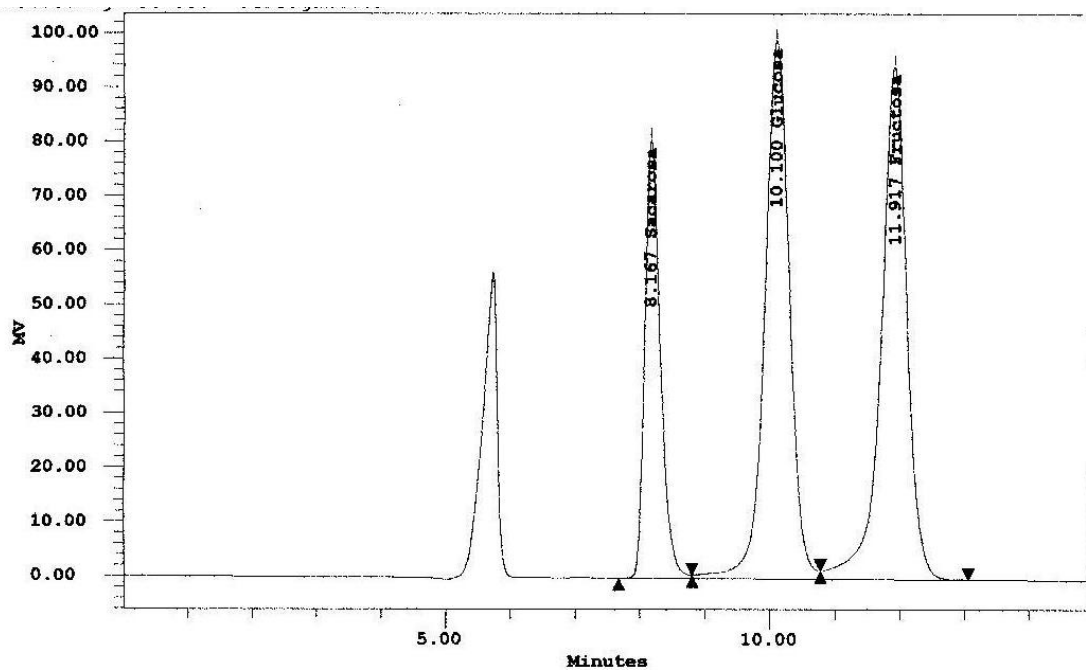
Esta información se presenta con el fin de ilustrar como es el consumo individual de los azúcares, sacarosa, glucosa y fructosa, durante el desarrollo de la curva de crecimiento de raíces normales de *Brugmansia candida* en Erlenmeyer.

En la figura G1, se observa como desde el inicio del cultivo la sacarosa no se presenta pura sino que viene acompañada de glucosa y fructosa.



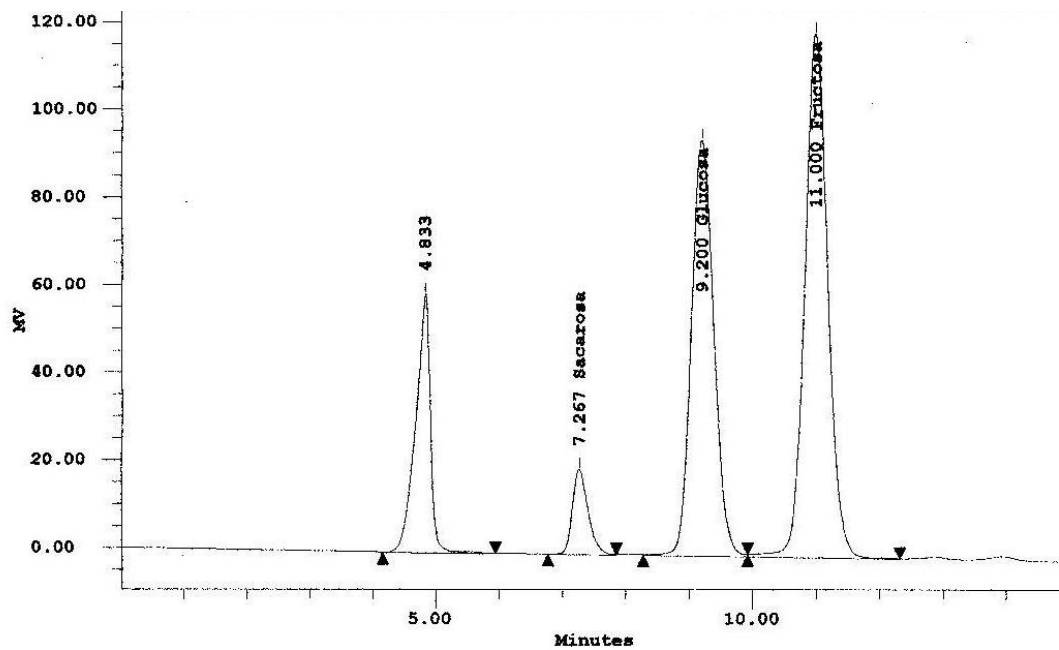
**Figura G1.** Cromatograma obtenido del medio al tiempo 0, para el cultivo de raíces normales de *Brugmansia candida* en Erlenmeyer.

En la figura G2, se muestra como avanza la hidrólisis de la sacarosa a glucosa y fructosa, y como estos azúcares empiezan a ser asimilados por el cultivo.



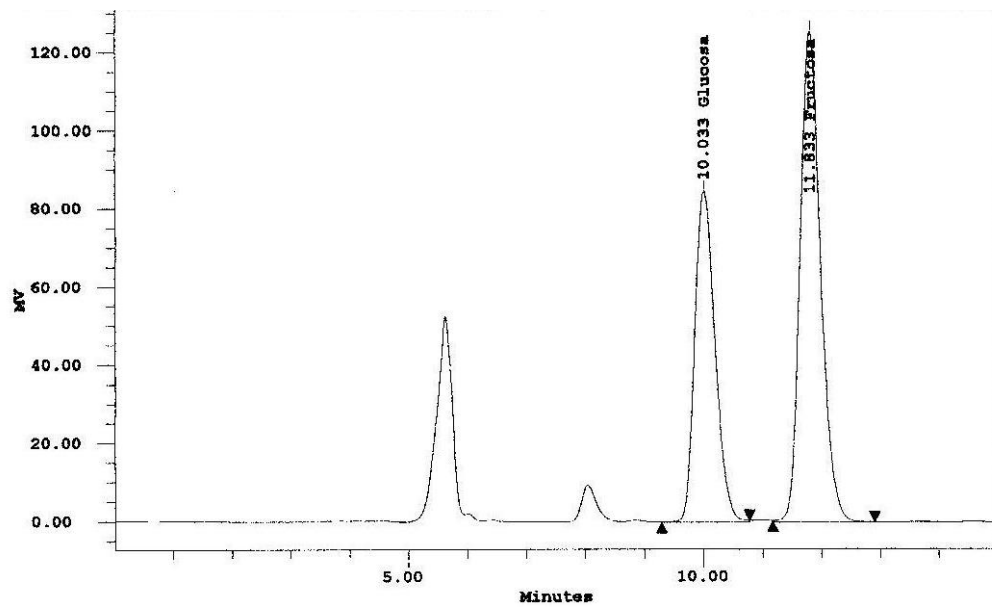
**Figura G2.** Cromatograma obtenido del medio a 15 días de iniciado el cultivo de raíces normales de *Brugmansia candida* en Erlenmeyer.

La figura G3, verifica la continuación de la hidrólisis de la sacarosa presente en el medio y el consumo de glucosa y fructosa como fuente de carbono por parte de las raíces.



**Figura G3.** Cromatograma obtenido del medio a 25 días de iniciado el cultivo de raíces normales de *Brugmansia candida* en Erlenmeyer.

En la figura G4, se puede observar como al finalizar el cultivo, casi toda la sacarosa ha sido transformada en glucosa y fructosa y de este modo ha sido asimilada por las raíces.



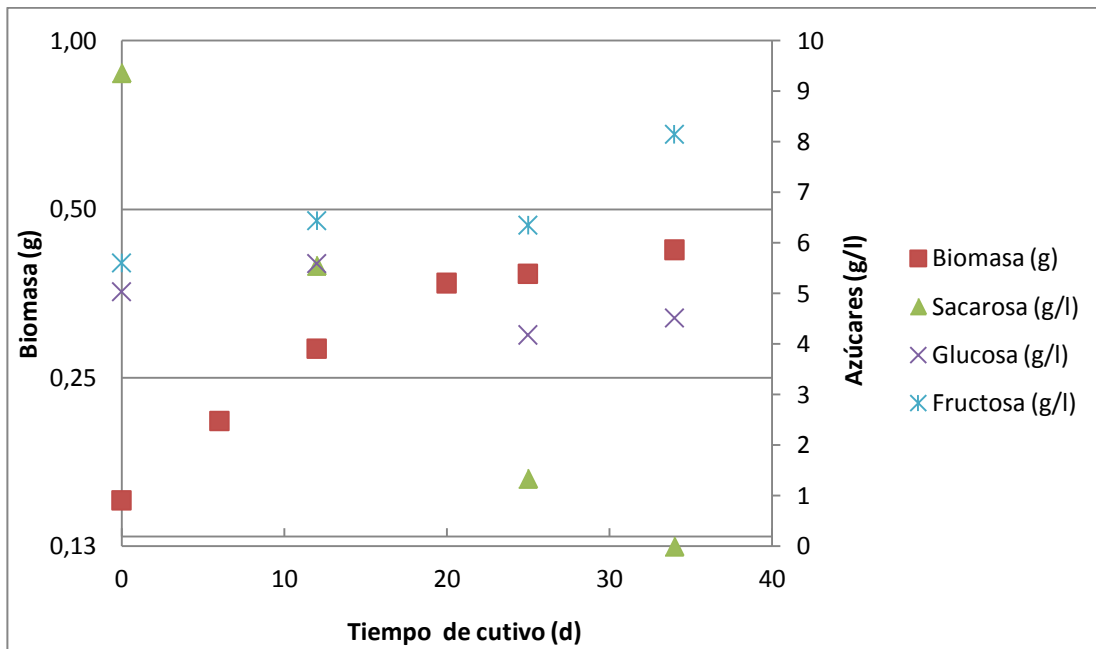
**Figura G4.** Cromatograma obtenido del medio a 34 días de iniciado el cultivo de raíces normales de *Brugmansia candida* en Erlenmeyer.

**Tabla G1.** Concentración en el medio de cultivo de sacarosa, glucosa y fructosa, para raíces de *Brugmansia candida* cultivadas en Erlenmeyer.

Tiempo de Cultivo (días)	Sacarosa* (g/l)	Glucosa* (g/l)	Fructosa* (g/l)
0	9,36	5,04	5,60
12	5,55	5,59	6,44
25	1,34	4,18	6,35
34	-	4,52	8,15

\*Los datos corresponden a los promedios obtenidos de analizar las muestras de las 3 replicas evaluadas.

Para complementar este análisis se presenta a continuación un grafico en donde se muestra el crecimiento de la biomasa en escala logarítmica frente a la concentración de cada uno de los azúcares evaluados en el medio de cultivo. Ver figura G4.



**Figura H4.** Crecimiento de la biomasa en contraste con la concentración de sacarosa, glucosa, y fructosa en el medio de cultivo, durante los 34 días correspondientes a la curva de crecimiento para raíces normales de *B. candida*.

## ANEXO H

### CALIBRACIÓN DE LAS BOMBAS USADAS PARA IMPULSAR EL MEDIO DE CULTIVO ENTRE LAS DOS UNIDADES DEL SISTEMA DE BIORREACCIÓN

La calibración de la bomba usada para conducir el medio desde la unidad reservorio hacia la unidad de crecimiento, se presenta en la tabla H1.

**Tabla H1.** Calibración correspondiente a la bomba usada para transportar el medio desde la unidad reservorio hacia la unidad de crecimiento.

Volumen	Tiempo	Flujo
30 ml	1'46"	0,28 ml/s
30 ml	1'27"	0,34 ml/s
20 ml	1'10"	0,29 ml/s
20 ml	1'08"	0,29 ml/s
20 ml	1'04"	0,31 ml/s
10 ml	33"	0,30 ml/s
	Promedio:	0,30 ml/s

**Flujo promedio a la entrada al tanque de crecimiento:** 0,30 ml/s.

Para la salida del medio desde la unidad de crecimiento hacia el reservorio se presenta la calibración en la tabla H2.

**Tabla H2.** Calibración correspondiente a la bomba usada para transportar el medio desde la unidad reservorio hacia la unidad de crecimiento.

<b>Volumen</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Flujo</b>
30 ml	1'11"	0,42 ml/s
30 ml	1'17"	0,39 ml/s
30 ml	1'19"	0,38 ml/s
30 ml	1'22"	0,37 ml/s
	Promedio:	0,39 ml/s

**Flujo promedio a la salida del tanque de crecimiento:** 0,39 ml/s.

El flujo entre las dos unidades se ajustó de este modo para evitar que el medio se acumulara en la unidad de crecimiento, y garantizar así su continuo movimiento entre las dos unidades. Aunque el flujo de salida es superior al de entrada y por tanto, en algunos momentos la bomba de salida succionaba aire, era necesario que la operación se mantuviera de este modo, para evitar como ya se había mencionado la acumulación de medio en la unidad de crecimiento.

## ANEXO I

### EVALUACIÓN DE MALLAS DE ACERO INOXIDABLE Y PLÁSTICO CUANDO SON USADA COMO SOPORTE PARA EL CULTIVO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *Brugmansia candida* EN ERLLENMEYER

Los resultados presentados a continuación corresponden a un ensayo único que se realizó cultivando raíces transformadas de *Brugmansia candida* (clon Arg3) en Erlenmeyers de 125 ml, a los que se adicionaron 25 ml de medio de cultivo B5 a la mitad de la concentración de nutrientes, adicionado con 20 g/l de sacarosa y 1 g/l de ampicilina. Los cultivos se desarrollaron sobre un agitador orbital a 100 rpm, y se mantuvieron a 25°C con fotoperiodo de 16 horas usando lámparas fluorescentes de 1,8W/m<sup>2</sup>. En cada uno de los Erlenmeyer usado se evaluó la interacción entre una malla de un material específico sumergida dentro del medio y las raíces transformadas que allí se desarrollaban.

**Tabla I1.** Alcaloides extraídos de las raíces transformadas de *Brugmansia candida* (clon Arg3) que crecieron en Erlenmeyer y que se mantuvieron en contacto con segmentos de mallas de acero inoxidable y plástico.

<b>Alcaloides extraídos desde las raíces transformadas de <i>B. candida</i> (clon Arg3)</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Escopolamina mg /g raíz PF</b>	<b>Anisodamina mg /g raíz PF</b>	<b>Hiosciamina mg H /g raíz PF</b>
<b>BC3NM</b>	0,1259	0,8341	0,7755
<b>BC3AI</b>	0,1272	0,3879	0,3474
<b>BC3MP</b>	0,1236	0,9453	0,6289
<b>Alcaloides extraídos desde el medio en el que se cultivaron las raíces transformadas de <i>B. candida</i> (clon Arg3)</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Escopolamina mg /g raíz PF</b>	<b>Anisodamina mg /g raíz PF</b>	<b>Hiosciamina mg H /g raíz PF</b>
<b>MBC3NM</b>	0,0009	0,0021	0,0016
<b>MBC3AI</b>	0,0008	0,0012	0,0015
<b>MBC3MP</b>	0,0009	0,0012	0,0013

BC3NM: Corresponde a los resultados obtenidos en el Erlenmeyer en donde el clon se cultivo sin la presencia de una malla.

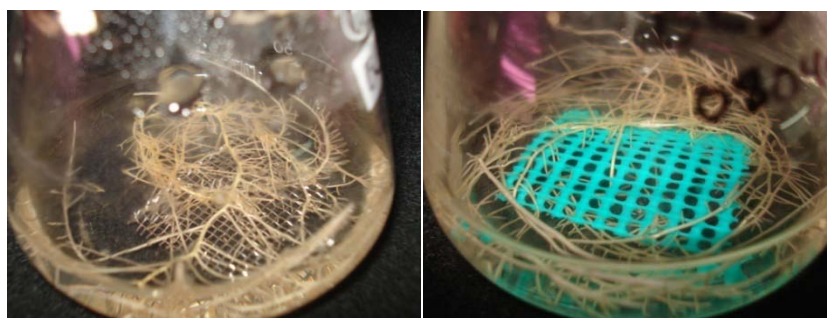
BC3AI: Corresponde a los resultados obtenidos en el Erlenmeyer en donde el clon se cultivo en contacto con un segmento de 2x2 cm de una malla de acero inoxidable 316 con un tamaño de poro de 2x2 mm.

BC3MP: Corresponde a los resultados obtenidos en el Erlenmeyer en donde el clon se cultivo en contacto con un segmento de 2x2 cm de una malla de plástico con un tamaño de poro de 2x2 mm.

De analizar estos resultados se infiere que es mejor emplear para los sistemas de soporte usados en los cultivos, mallas de plástico, pues al parecer las mallas de acero inoxidable alteran la producción de los alcaloides estudiados, observándose

específicamente una disminución en la concentración de anisodamina e hiosciamina.

Sin embargo como se realizó solo un ensayo a este respecto, se recomienda para investigaciones futuras evaluara con mayor detalle este aspecto, para determinar con precisión cuál es el efecto del material del soporte sobre el crecimiento de las raíces y la producción de metabolitos secundarios.



**Figura I1.** Evaluación del cultivo de raíces transformadas de *Brugmansia candida* (clon Arg3) en Erlenmeyer en contacto con segmentos de malla de acero inoxidable y plástico.

**ANEXO J**  
**COMPOSICIÓN DEL MEDIO GAMBORB (B5)**

Este medio se prepara partiendo de soluciones Stock que son almacenadas en nevera para garantizar su conservación. Los volúmenes adicionados de cada uno de los Stocks dependen de la concentración a la que ha sido preparado cada uno de ellos.

**Tabla J1.** Medio de cultivo Gamborg (B5).

Stock	Compuesto	Concentración final mg/l
A	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134
B	KNO <sub>3</sub>	2500
C	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	150
D	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	150
E	Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
	KI	0.75
F	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	13.2
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
G	Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
	FeSO <sub>4</sub>	27.8
H	Tiamina	10
	Ácido Nicotínico	1
	Piridoxina	1
I	Mio-inositol	100

## ANEXO K

### RELACIÓN ENTRE LAS CORRELACIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA EN EL BIORREACTOR A PARTIR DE LOS DATOS DE CONDUCTIVIDAD Y COCENTRACIÓN DE SACAROSA Y EL RENDIMIENTO $Y_{x/s}$

Haciendo una demostración simple, es claro que el rendimiento biomasa- sustrato ( $Y_{x/s}$ ), es el punto de partida para las correlaciones que se usaron entre la biomasa y la concentración de sacarosa y entre la biomasa y la conductividad (que no es otra cosa que una medida de la concentración de sales en el medio de cultivo, también son un sustrato para las raíces generadas).

Para el caso de los azúcares por ejemplo, la definición de  $Y_{x/s}$  es:

$$Y_{x/s} = \frac{x-x_0}{s_0-s} \quad \text{Ecuación F1}$$

Donde:

X: biomasa

S: Concentración de azúcar

E integrando en esta ecuación la definición de IC:

$$IC = \frac{x-x_0}{x_0} \quad \text{Ecuación F2.}$$

Se tiene que:

$$IC = aY_{x/s} - aY_{\frac{x}{s}}\left(\frac{s}{s_0}\right) \quad \text{Ecuación F3.}$$

Donde “a” es una constante dada por la relación entre las cantidades iniciales de biomasa y sustrato ( $a = S_0/X_0$ ).

Por este motivo en las ecuaciones 5 y 7, se observa una similitud entre el valor del intercepto y el valor de la pendiente obtenidos. Y la razón para que no sean iguales como indica la ecuación E3, es que en nuestro caso la variable de respuesta no fue  $(S/S_0)$ , sino el porcentaje de conductividad inicial, es decir  $(S/S_0)$  multiplicado por 100.

Lo mismo sucede para el caso en el cual se analizan los datos correspondientes a la relación entre la conductividad y la biomasa.

Es de aclarar que estas correlaciones parten de considerar el  $Y_{x/S}$ , constante durante el periodo de cultivo.