



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

Efecto de la velocidad de agitación de un biorreactor sobre el
establecimiento de cultivos celulares de *Buddleja cordata*:
Desarrollando una alternativa biotecnológica para el manejo sustentable
del recurso natural.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

P R E S E N T A :

Alicia Monserrat Vazquez Marquez

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, abril de 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

Efecto de la velocidad de agitación de un biorreactor sobre el
establecimiento de cultivos celulares de *Buddleja cordata*:
desarrollando una alternativa biotecnológica para el manejo sustentable
del recurso natural

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

P R E S E N T A :

Alicia Monserrat Vazquez Marquez

Comité de tutores

Dra. María Elena Estrada Zúñiga. Tutor Académico

Dr. Mario Rodríguez Monroy. Tutor Adjunto

Dra. Carla García Morales. Tutor Adjunto

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, abril de 2019.

Resumen

Los recursos vegetales son utilizados día a día por la población. Los usos son variados desde la alimentación, hasta la obtención de productos, como insecticidas, cosméticos, pigmentos y productos de importancia y uso medicinal. En México, el uso de plantas en la medicina tradicional está arraigado entre la población; dicho conocimiento recibe el nombre de herbolaria. Las plantas medicinales generalmente son recolectadas de su hábitat natural, lo que puede generar sobreexplotación. Además, las actividades antropogénicas contribuyen al deterioro de los recursos vegetales. Por lo tanto, es necesario encontrar alternativas sustentables que permitan la conservación de especies medicinales. El cultivo de tejidos vegetales (CTV) en biorreactor representa una alternativa eco sustentable para la obtención de metabolitos secundarios (MS) bioactivos, ya que es una herramienta biotecnológica que permite obtener los compuestos activos de las plantas sin socavar los recursos naturales. Un cultivo en biorreactor representa un paso importante hacia la producción comercial de compuestos de importancia industrial. *Buddleja cordata* es una planta utilizada en la medicina tradicional mexicana, la cual produce metabolitos secundarios del tipo fenólico (MSTF) a los cuales se les atribuye su propiedad curativa. Los cultivos de células en suspensión de *B. cordata* en matraces fueron capaces de producir verbascósido en alta concentración (116 mg/g~1.44 g/L), además de tener un tiempo de duplicación de 3.56 días, biomasa máxima de 12.9 g/L demostrado ser viable para su establecimiento en biorreactor. El objetivo del presente trabajo fue establecer un cultivo de células en suspensión (CCS) de *B. cordata* en biorreactor, como estrategia al manejo sustentable del recurso natural. Una línea celular de *B. cordata* fue cultivada en dos biorreactores agitados mecánicamente operados a 120 y 400 rpm; uno equipado con un difusor en anillo (codificado como B2-DA), mientras que el otro con difusor sinterizado (codificado como B3-DS). El biorreactor B2-DA operado a 400 rpm fue en el que se obtuvo la mayor producción de biomasa (13.62 g PS/L), así como de metabolitos secundarios tipo fenólico (MSTF: fenoles, flavonoides y feniletanoides glicosilados totales, 63.63 mg Equivalentes de Ácido Gálico/g, 5.02 mg Equivalentes de Quercetina/g y 119.24 mg Equivalentes de Verbascósido/g, respectivamente). Este sistema potenció tanto la producción de biomasa como la de MSTP, al compararse con el cultivo de CCS de *B. cordata* en matraz.

Abstract

The plant resources are used day by day by the population. The uses are varied from the feeding, until the obtaining of products, like insecticides, cosmetics, pigments and products of importance and medicinal use. In Mexico, the use of plants in traditional medicine is ingrained among the population; This knowledge is called herbolaria. Medicinal plants are generally harvested from their natural habitat, which can generate overexploitation. In addition, anthropogenic activities contribute to the deterioration of plant resources. Therefore, it is necessary to find sustainable alternatives that allow the conservation of medicinal species. Plant Tissue Culture (PTC) in bioreactor represents an eco-sustainable alternative for obtaining bioactive Secondary Metabolites (SM), since it is a biotechnological tool that allows to obtain the active compounds of plants without undermine natural resources. A bioreactor culture represents an important step towards the commercial production of compounds of industrial importance. *Buddleja cordata* is a plant used in traditional Mexican medicine, which produces secondary metabolites of the phenolic type (MSTF) to which its curative property is attributed. Cell cultures in suspension of *B. cordata* in flasks were able to produce verbascoside in high concentration (116 mg / g ~ 1.44 g / L), in addition to having a doubling time of 3.56 days, maximum biomass of 12.9 g / L proved to be viable for its establishment in bioreactor. The objective of the present work was to establish a Cell Culture in suspension (CCS) of *B. cordata* in bioreactor, as a strategy to the sustainable management of the natural resource. A cell line from *B. cordata* was cultured in two mechanically agitated bioreactors operated at 120 and 400 rpm; one equipped with a ring diffuser (coded as B2-RD), while the other with a sintered diffuser (coded as B3-SD). The B2-DA bioreactor operated at 400 rpm was the one with the highest biomass production (13.62 g DW / L), as well as phenolic kind secondary metabolites (MSTP: phenols, flavonoids and total phenylethanol glycosides, 63.63 mg gallic acid equivalents / g, 5.02 mg Quercetin equivalents / g and 119.24 mg Verbascoside equivalents / g, respectively). This system maximize the biomass production and the MSTP, when compared to the CCS culture of *B. cordata* in flask.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con número de registro becario 620491, para cursar los estudios de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

Al Proyecto de Investigación: Desarrollando avances biotecnológicos sobre la producción de verbacósido por cultivo de células de *Buddleja cordata* (UAEM:3742/2014/CIB, SIyEA, UAEMex.)

Al Centro de Investigación en Recursos Bióticos de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de México, por las facilidades otorgadas en la realización del presente trabajo.

Al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional, por las facilidades otorgadas en la realización del presente trabajo.

A mis asesores de tesis Dra. Ma. Elena, Dr. Mario y Dra. Carla por el apoyo, tiempo y paciencia que me brindaron para la realización del presente trabajo

Indice de contenido

Abstract	II
Agradecimientos	III
Índice de figuras	VI
Índice de tablas	VII
Índice de anexos	VIII
Abreviaturas	IX
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1 Metabolitos Secundarios (MS).....	4
2.1.1 Compuestos fenólicos.....	6
2.2 Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV).....	9
2.2.1 Producción de metabolitos secundarios en biorreactor	11
2.2.2 La importancia de la agitación y la aireación en biorreactores.....	14
2.2.3 Producción de MS por CTV a escala industrial.	15
2.3 <i>Buddleja cordata</i> , descripción botánica y geográfica	18
2.3.1 Usos de <i>B. cordata</i>	19
2.3.2 Metabolitos secundarios asociados a <i>B. cordata</i>	19
2.3.3 Cultivo <i>in vitro</i> en <i>B. cordata</i>	24
3. Justificación	25
4. Hipótesis	26
5. Objetivos.....	27
5.1 Objetivo general	27
5.1.1 Objetivos específicos.....	27
6. Material y Método.....	28
6.1 Proliferación de Cultivos de Células en Suspensión (CCS)	28
6.2 Cultivo de células en matraz y biorreactor	28
6.3 Cinéticas de crecimiento en matraz y biorreactor	30
6.4 Extracción y cuantificación de metabolitos secundarios tipo fenólico (MSTF).....	31
6.4.1 Preparación de extractos	31
6.4.2 Contenido de Feniletanoides glicosilados totales (CFEGT).....	32
6.4.3 Contenido de Fenoles totales (CFT).....	32
6.4.4 Contenido de Flavonoides totales (CFVT).	32

7. Análisis estadístico.....	33
8. Resultados y discusión	34
8.1 Crecimiento en los CCS de <i>B. cordata</i> cultivados en matraz y biorreactores	34
8.2 Producción de MSTF (flavonoides, fenoles y feniletanoides glicosilados totales) en matraz y biorreactor	45
9. Conclusiones.....	51
10. Referencias bibliográficas	52
11. Anexos.....	65

Índice de figuras

Fig. 1 Clasificación de los MS en tres grupos de acuerdo a su ruta de biosíntesis.

Fig. 2 Ruta del ácido shikímico.

Fig. 3 Subclases de flavonoides.

Fig. 4 Tipos de biorreactores más utilizados en cultivo de células vegetales

Fig. 5 Distribución geográfica y descripción taxonómica de *B. cordata*

Fig. 6 Difusores empleados en los biorreactores, para el establecimiento de los cultivos de células de *B. cordata*.

Fig. 7 Cinética de crecimiento celular y producción de MS en CCS de *Buddleja cordata* en matraz y biorreactor.

Fig. 8 Efecto de la velocidad de agitación sobre los valores del OD a través del tiempo de cultivo del CCS de *B. cordata* en biorreactores

Fig. 9 Viabilidad celular de células de *B. cordata* cultivadas en biorreactores a diferentes velocidades de agitación

Fig. 10 Efecto de la velocidad de agitación en la morfología celular de *B. cordata* cultivada en biorreactores (fotografías de células obtenidas con aumento 40x).

Fig. 11 Efecto de la velocidad de agitación sobre el establecimiento del cultivo de células de *B. cordata* en biorreactor

Fig. 12 Cinética de producción de MS en CCS de *Buddleja cordata* en matraz.

Fig. 13 Efecto de la velocidad de agitación en el biorreactor B2-DA sobre la producción de CFT, CFVT y CFEGT en CCS de *B. cordata*

Índice de tablas

Tabla 1. Perspectivas de las plantas medicinales en México.

Tabla 2. Producción de MS con utilización farmacéutica a partir de cultivos celulares de plantas a escala industrial

Tabla 3. Metabolitos producidos por *B. cordata* y sus principales actividades

Tabla 4. Variables del diseño experimental: velocidad de agitación y tipo de difusor en el establecimiento de cultivos de *B. cordata* en biorreactor.

Tabla 5. Comparación de los parámetros cinéticos obtenidos del crecimiento exponencial del matraz y biorreactor de los CCS de *B. cordata*.

Tabla 6. Duración de las fases de crecimiento de los CCS de *B. cordata* cultivados en matraz y biorreactor

Tabla 7. Efecto de la velocidad de agitación sobre la velocidad de producción de MSTF en CCS de *B. cordata* en biorreactor y matraz.

Tabla 8. Comparación del cultivo de células vegetales del orden Scrophulariales cultivadas en biorreactor y matraz.

Índice de anexos

Anexo 1 Determinación del Volumen Celular Empacado (VCE)

Anexo 2 Evaluación del pH en cultivos en biorreactor.

Anexo 3 Evidencia de artículo

Abreviaturas

μ	velocidad específica de crecimiento
5-LOX	5-lipooxigenasa
ANOVA	análisis de varianza
B2-DA	biorreactor de 2 L con difusor de anillo
B3-DS	biorreactor de 3 L con difusor sinterizado
BM	biomasa máxima producida
CCS	células en suspensión
CFEGT	Contenido de Feniletanoides glicosilados totales
CFT	Contenido de fenoles totales
CFVT	Contenido de Flavonoides totales
CHS	Chalcona Sintasa
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
COX	COX ciclooxigenasa
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
DO	oxígeno disuelto
DPPH	radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EA	equivalentes de ácido gálico
EC50	Concentración Efectiva Máxima 50%
EQ	equivalentes de quercetina
EVB	equivalentes de verbascósido
FEGT	Feniletanoides glicosilados totales
GMP	Buenas Prácticas de Manufactura
IC	índice de crecimiento
IC50	Concentración Máxima Inhibitoria 50%

MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
MS	Metabolitos Secundarios
MSTF	MS tipo fenólico
NH₄	Amonio
NO₃	Nitrato
OMS	Organización Mundial de la Salud
p/v	Concentración en g soluto/100 mL disolución
PAL	Fenilalanina Amoniacio Liasa
PEP	fosfoenolpiruvato carboxilasa
PS	peso seco
SEMARNAT	Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales
SPF	Factor de Protección solar
Td	tiempo de duplicación
UV	luz ultravioleta
v/v	Porcentaje volumen a volumen
VB	Verbascósido
VC	viabilidad celular
VCE	Volumen Celular Empacado
Y_{x/s}	rendimiento de biomasa con respecto al sustrato

1. Introducción

Las plantas tienen un papel muy importante para los seres humanos ya que los usos son variados y pueden ir desde la alimentación, cosméticos, ropa, saborizantes, pigmentos y el uso medicinal. Las plantas constituyen una valiosa fuente de compuestos los cuales se han utilizado para satisfacer necesidades de salud, debido a la ineficacia y desconfianza generada por los fármacos hechos por el hombre (OMS, 2002 y 2012)

Se estima que en el mundo hay alrededor de 80,000 especies de plantas utilizadas con fines medicinales o productos de salud y aproximadamente 15,000 se encuentran en peligro de extinción debido a la destrucción de su hábitat (Chen *et al.*, 2016). En cuanto a México, hay alrededor de 5,000 especies utilizadas con fines curativos, dado que existe un gran arraigo al empleo de plantas medicinales ya que forma parte del acervo cultural de México (Caballero, J. y Cortés L., 2001 y White-Olascoaga, L. *et al.*, 2013), producto del conocimiento de la herbolaria; por lo tanto existe una gran demanda en el uso de plantas medicinales, ya que el 80% de la población mexicana depende de la medicina herbolaria (OMS, 2002).

La herbolaria es la práctica terapéutica donde se hace uso de las plantas medicinales, que aun en nuestros días sigue vigente. Dado el arraigo que todavía existe entre la población mexicana este conocimiento se hereda de generación en generación (Huerta 1997; Muñetón 2009). Las plantas medicinales son utilizadas principalmente en el tratamiento de enfermedades y padecimientos inflamatorios (colitis ulcerosa, artritis etc.); gastrointestinales (infecciones, gastritis, etc.); respiratorios (alergias, Enfermedad Pulmonar Obstructivo Crónica); cáncer, cólicos y de índole menstrual, entre otras (Robles-Zepeda *et al.*, 2011).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce la importancia en el uso de plantas con fines medicinales, debido a la desconfianza generada por los efectos adversos generados por los fármacos sintetizados por el hombre, además existe la facilidad de conseguir las plantas medicinales desde su hábitat, en mercados o establecimientos de manera informal, haciendo que el uso de plantas medicinales sea indispensable como medicina complementaria y alternativa (MCA) además del uso en la medicina tradicional (MT) (OMS, 2002).