

**Instituto Tecnológico de Costa Rica
Vicerrectoría de Investigación y Extensión
Dirección de Proyectos**

**Determinación del efecto de diferentes nanopartículas sobre la
producción de brotes en células de hoja y callo de *Uncaria
tomentosa***

Informe Final

Documento II

Investigadores participantes:

M.Sc. Silvana Alvarenga Venutolo
MGA. Ricardo Coy
MBA. Karla Valerín Berrocal

salvarenga@itcr.ac.cr
rcoy@itcr.ac.cr
kvalerin@itcr.ac.cr

Coordinadora

Estudiantes participantes:

Naizmi Valverde

**Escuela de Biología
Centro de Investigación en Biotecnología**

Enero 2012 a Diciembre 2012

CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS.

Objetivo general

- Determinar el efecto de nanopartículas de plata, oro y cobre sobre la producción de brotes en callo y segmentos de hoja de *Uncaria tomentosa*

Objetivo específico	Actividades	Productos obtenidos	% Cumplimiento	Comentarios
1. Definir el tamaño adecuado que debe tener la nanopartícula utilizada para que se produzca efecto sobre el tejido e induzca a la regeneración o producción de brotes	1. Síntesis de nanopartículas. 2. Caracterización de nanopartículas 3. Probar los diferentes tamaños de las nanopartículas en los callos de <i>U. tomentosa</i>	Se probó el protocolo de Creighton para la síntesis de nanopartículas, por lo que para investigaciones futuras se puede utilizar este método teniendo certeza de que funciona adecuadamente y que se pueden obtener nanopartículas de plata. Conocimiento base para plantear trabajos futuros de investigación con el empleo de nanopartículas en cultivo <i>in vitro</i> de otras especie.	90%	Se logró caracterizar las nanopartículas identificando que poseían una forma esférica y un tamaño entre 7 y 8 nm, por lo que se considera que el objetivo se cumplió mayoritariamente, ya que se pretendía identificar estas características en la solución de nanopartículas utilizadas, sin embargo, no se considera un cumplimiento del 100% ya que estas no dieron resultados positivos a la hora de producir brotes en segmentos de hoja y callo.
2. Probar diferentes concentraciones de nanopartículas en el medio, para determinar la más adecuada para la producción de brotes	4. Cultivar los callos y segmentos de hoja en medios de cultivo que favorezcan brotación y sirvan como control. 5. Cultivar callos en medios con diferentes concentraciones de nanopartículas. 6. Medir y cuantificar los resultados	Conocimiento base de que concentraciones de 4,3 mg/L en adelante de nanopartículas de plata en el medio tienden a oxidar los explantes de <i>U. tomentosa</i> . Conocimiento de que las nanopartículas podrían influir en la elongación de las raíces generadas en callos de <i>U. tomentosa</i> .	100%	Se probaron diferentes concentraciones de nanopartículas en el medio, a pesar de esto, con ninguna de las concentraciones utilizadas se logró obtener brotación en segmentos de hoja y callo, pero al usar hipocótilo como explante y combinar las nanopartículas con AIA y BA, se logró obtener lo que parecían embriones somáticos. Por esto se considera que se cumplió al 100% el objetivo.
3. Determinar si hay diferencia significativa entre el uso de	7. Síntesis de nanopartículas de plata, oro y cobre. 8. Probar cada	Conocimiento sobre el tipo de nanopartícula adecuada para inducir a	100%	Al trabajar con nanopartículas de oro y cobre no se obtuvo ningún resultado positivo, los explantes se oxidaban muy

nanopartículas de plata, oro o cobre	tipo de nanopartícula en los cultivos de callo.	brotación		rápidamente y no producían brotes de raíz, como sí lo hacían los explantes expuestos a nanopartículas de plata, por lo que se determinó trabajar solamente con nanopartículas de plata.
4. Evaluar la viabilidad de los brotes generados, mediante subcultivos de los mismos	9. Subcultivar <i>in vitro</i> los brotes obtenidos. 10. Mantenimiento de los subcultivos por un período de 3 meses	No se obtuvieron brotes. Se obtuvieron embriones somáticos. Se obtuvo una plántula a partir de hipocótilo cultivado en medio con nanopartículas la cual se ha mantenido en medio de crecimiento durante 1 mes y presenta un desarrollo normal.	60%	Al no obtener brotación no se pudo evaluar la viabilidad de los individuos. Los embriones obtenidos se oxidaron poco después. Debido a que se obtuvieron cuando el proyecto había finalizado no hubo oportunidad de repetir la prueba. La única plántula generada se obtuvo ya cuando el proyecto había finalizado, se ha evaluado su crecimiento mediante observación de características externas y se ve normal.
5. Realizar pruebas preliminares para verificar la influencia de nanopartículas en la producción de metabolitos secundarios de <i>U. tomentosa</i>	11. Utilizar los mismos tipos de nanopartículas en medio para suspensión celular de <i>U. tomentosa</i> 12. Realizar pruebas con HPLC para identificar la presencia de metabolitos secundarios en las suspensiones celulares expuestas a AgNP's	Conocimiento base sobre el efecto elicitor que puedan tener las nanopartículas de plata en suspensiones celular para incrementar la producción de metabolitos secundarios.	50%	Los análisis se realizaron mediante cromatografía de capa Fina (TLC) ya que al hacer las pruebas mediante HPLC no se obtenían resultados, se cree que pudo fallar el protocolo de extracción de alcaloides, sin embargo, también es necesario estandarizar el protocolo de análisis mediante HPLC

CUMPLIMIENTO DEL PLAN DE DIFUSIÓN

Se está trabajando en una revisión bibliográfica sobre bionanotecnología vegetal, la cual será presentada a la revista Tecnología en Marcha.

Además de que los conocimientos adquiridos serán transmitidos por los profesores investigadores de esta actividad de fortalecimiento a los estudiantes del ITCR y a otros investigadores del TEC que estén trabajando en este campo

LIMITACIONES Y PROBLEMAS ENCONTRADOS.

El principal problema se presentó con la obtención de material vegetal apto para hacer las pruebas ya que al hacer los cultivos para inducir a callogénesis se contaminaban con una bacteria endógena además, no se obtenían callos friables ni de buena apariencia que pudieran ser usados para las pruebas y algunos explantes ni siquiera formaban el callo. Era necesario contar con callos en buen estado para garantizar en la medida de lo posible que este tipo de factores no influyera en forma negativa a la hora de realizar los ensayos.

De igual forma, las primeras pruebas hechas utilizando solo explantes de hoja en medio con nanopartículas, presentaban contaminación por bacteria y oxidación de la hoja, lo que hacía imposible determinar si la oxidación y muerte del explante se debía a la bacteria o a las nanopartículas.

Por esta razón no se podía iniciar con los ensayos hasta tener explantes libres de bacteria y callos friables, lo que ocasionó un atraso considerable.

Se tuvo problemas para cumplir el último objetivo las suspensiones de células vegetales presentan mucho riesgo de contaminación y oxidación por lo que se dificultó su cultivo, el cual era necesario para realizar las pruebas.

Una vez se lograron obtener suficientes suspensiones celulares, se requería cuantificar la concentración de alcaloides para analizar la capacidad elicitación de las nanopartículas de plata en las suspensiones de *U. tomentosa*, pero los reactivos e insumos necesarios fueron comprados hasta finales del año pasado, por lo que el protocolo de cuantificación de alcaloides mediante HPLC se pudo empezar a probar hasta inicios de este año, y de todas las pruebas realizadas ninguna dio resultado, hasta que se cambió el protocolo de extracción por el que se usa para TLC, además, se utilizó muestra de hojas frescas en lugar de suspensiones celulares. Sin embargo, esto se logró días antes de entregar el informe final, por lo que fue imposible hacer más pruebas, en las que se usaran suspensiones en lugar de hojas para verificar si el resultado se repetía.

Todas estas condiciones se sumaron al hecho de que hay otros proyectos que tiene pendiente este tipo de análisis, por lo que hubo que esperar a que el equipo estuviera disponible.

Además de que se cuenta con solo un día a la semana para que los diferentes proyectos de la Escuela usen el HPLC. A pesar de que ambos proyectos trabajaron en conjunto para el uso del equipo, este tiempo no fue suficiente para estandarizar los protocolos.

Todas estas razones provocaron atraso en la entrega del informe final, ya que, se trató hasta el último momento de obtener las mediciones de alcaloides en suspensiones celulares para verificar la elicitación con nanopartículas y cumplir el último objetivo, sin embargo, esto no fue posible.

Otra limitante fue la falta de dinero, ya que, al ser una actividad de fortalecimiento, se contaba con bajo presupuesto por lo que solo se pudo pagar el análisis de dos muestras de nanopartículas y 6 muestras vegetales mediante microscopía electrónica. Sin embargo, agradecemos al laboratorio de Nanotecnología y a Juan Scott que nos ayudaron a hacer algunos análisis extra a pesar de que no teníamos ya presupuesto para pagarlos.

OBSERVACIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

Es recomendable hacer más análisis por microscopía electrónica para respaldar de forma estadística las diferencias entre los tejidos que crecieron en medio con nanopartículas y los que crecieron en medio sin nanopartículas.

Se debe continuar las pruebas con el HPLC para lograr estandarizar el protocolo y poder usarlo en proyectos futuros. Pero lo cual sería recomendable contar con más tiempo para poder usar el equipo.

Es necesario agilizar los procesos de compras, además de no entorpecerlos todavía más con fechas límites que son muy tempranas en el semestre, lo que ocasiona que aun faltando mucho para que finalice el semestre o el año, se cierra el periodo para hacer compras por aprovisionamiento, por lo que si la compra excede el monto de caja chica, el investigador debe esperar meses antes de poder hacer solicitud de compra.