

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Escalamiento de cultivos celulares de *Morinda citrifolia* a un biorreactor tipo tanque agitado de 7 litros, para la producción de antraquinona roja como alternativa para tinte de origen natural.

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar para el título de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología

Jorge Madrigal Rueda

Cartago, Junio, 2017

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Escalamiento de cultivos celulares de *Morinda citrifolia* a un biorreactor tipo tanque agitado de 7 litros, para la producción de antraquinona roja como alternativa para tinte de origen natural.

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar para el título de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología

Jorge Madrigal Rueda

Cartago, Junio, 2017

Resumen

Los colorantes sintéticos representan riesgos para el medio ambiente y la salud humana, por lo que se plantea producir pigmentos naturales empleando técnicas biotecnológicas. *M. citrifolia* es una planta conocida por su capacidad para sintetizar antraquinonas, empleadas como colorante rojo natural. El objetivo de este proyecto fue evaluar el proceso de escalamiento de suspensiones celulares de *Morinda citrifolia* en biorreactor tipo tanque agitado de 7 litros para la producción de antraquinonas.

Además, se evaluó el efecto de hidróxido de sodio como elicitor, tanto a nivel de matraz como en biorreactor.

Se logró obtener un crecimiento de biomasa máximo de 10,51 g/L en 20 días de cultivo, con 9,89 mg EAG/g de extracto liofilizado.

En las suspensiones celulares se determinó que con el pH 11 se obtenía la mayor acumulación de compuestos fenólicos (4,38 mg EAG/g de extracto liofilizado), con un crecimiento en la producción del 92,02%, en los biorreactores se logró aumentar la producción fenoles de 2,0 mg EAG/g de extracto liofilizado a 3,52 mg EAG/g de extracto liofilizado, después de 6 hora de elicitar.

Por medio de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) se determinó que 6 horas después a la elicitación, se presentó la mayor concentración e intensidad de compuestos. Esto también se percibió al realizar la espectrometría de masas, donde se determinó la presencia de antraquinonas como: alizarina, antragalol, purpurina, rubiadina, sorajidiol y munjistin.

Las diferencias entre los tratamientos de pre y post elicitación, sugieren que el hidróxido de sodio tuvo un efecto inductor en la síntesis de antraquinonas.

Palabras clave: Antraquinonas, HPLC, MS/MS, biorreactor, tanque agitado, elicitación, hidróxido de sodio, *Morinda citrifolia*.

Abstract

Synthetic dyes pose risks to the environment and human health, which is why natural pigments are raised using biotechnological techniques. *M. citrifolia* is a plant known for its ability to synthesize anthraquinones, used as a natural red dye. The objective of this project was to evaluate the scaling process of *Morinda citrifolia* cell suspensions in 7 liters agitated tank type bioreactor for the production of anthraquinones.

In addition, the effect of sodium hydroxide as elicitor, both a flask level and a bioreactor, has been evaluated.

A maximum biomass growth of 10,51 g / L was obtained in 20 days of culture, with 9,89 mg EAG / g of lyophilized extract.

In cell suspensions, the highest accumulation of phenolic compounds (4,38 mg EAG / g of lyophilized extract) was obtained with pH 11, with a production increase of 92,02%, in bioreactors it was possible to increase The production of 2,0 mg EAG / g of lyophilized extract at 3,52 mg EAG / g of lyophilized extract, after 6 hours of eliciting.

By means of High Performance Liquid Chromatography (HPLC), it was determined that 6 hours after elicitation, the highest concentration and intensity of compounds were presented. Mass were also performed, where the presence of anthraquinones such as alizarin, antragalol, purpurin, rubiadine, sorajidiol and munjistin, were determined.

Differences between pre and post elicitation treatments suggest that sodium hydroxide had an inducing

Key words: Anthraquinones, HPLC, MS / MS, bioreactor, stirred tank, elicitation, sodium hydroxide, *Morinda citrifolia*.

Acreditación

"Escalamiento de cultivos celulares de *Morinda citrifolia* a un biorreactor tipo tanque agitado de 7 litros, para la producción de antraquinona roja como alternativa para tinte de origen natural."

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar para el título de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología

Miembros del tribunal

Ma. Catalina Rosales L.

Catalina Rosales López, MSc.

Profesor asesora-ITCR

Gina Porras B.

Gina Porras Brenes, PhD.

Asesora-CENIBiot

Laura Sánchez Calvo

Laura Sánchez Calvo, Lic

Lectora

Dedicatoria

A mis padres y familiares por su apoyo durante mis estudios.

Jorge Madrigal Rueda

Agradecimientos

Al Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot-CeNAT), por abrir las puertas a esta investigación.

A mis tutoras, Laura Calvo, Gina Porras y Catalina Rosales, por todos sus valiosos aportes y acompañamiento en este proceso.

Al Lic. Rodrigo Muñoz, por el apoyo y asesoramiento de la cuantificación y determinación de antraquinonas.

Al personal de la Unidad de Organismos Fototróficos, por la ayuda brindada siempre, en cada detalle, en especial a Cristófer Orozco.

A mi familia por el apoyo en todo momento, mis padres y tíos, que siempre han estado presentes.

Índice General

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
INDICA DE ANEXOS	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
1. Colorantes.	3
2. <i>Morinda citrifolia.</i>	4
3. Metabolitos Secundarios.	6
4. Antraquinonas.	8
5. Técnicas biotecnológicas para la producción de biomasa y compuestos.	13
5.1. Suspensiones celulares	13
5.2. Biorreactores	15
5.3. Elicitación	18
III. OBJETIVOS	20
OBJETIVO GENERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Preparación de inóculo	21
• Multiplicación de las suspensiones celulares	22
2. Cultivo de células de <i>M. citrifolia</i> en biorreactor de tanque agitado.	22
• Preparación de los biorreactores e inoculación.	22
• Análisis químico de fenoles totales	27
3. Elicitación de células en suspensión de <i>M. citrifolia</i>	28
3.1. Elicitación de suspensiones celulares en matraz	28
• Análisis químico de fenoles totales	29
• Análisis estadístico de la elicitación de las suspensiones	29
3.2. Elicitación de suspensiones celulares en biorreactor de 7 litros	29
• Análisis químico de fenoles totales	30
• Análisis estadístico de la elicitación de los biorreactores	33
V. RESULTADOS	34
1. Preparación de inóculo	34
2. Cultivo de células de <i>M. citrifolia</i> en biorreactor de tanque agitado	35
• Análisis químico de fenoles totales	39
3. Elicitación de células en suspensión de <i>M. citrifolia</i>	40
3.1. Elicitación de suspensiones celulares en matraz	40
3.2. Elicitación de suspensiones celulares en biorreactor de 7 litros	42
• Análisis químico de fenoles totales, antes de elicitar	45
• Análisis químico de fenoles totales, después de elicitar	47
VI. DISCUSIÓN	52
1. Preparación de inóculo	52
2. Cultivo de células de <i>M. citrifolia</i> en biorreactor de tanque agitado	52
3. Elicitación de células en suspensión de <i>M. citrifolia</i>	54
3.1. Elicitación de suspensiones celulares en matraz	54
• Análisis químico de fenoles totales	56
3.2. Elicitación de suspensiones celulares en biorreactor de 7 litros	58
• Análisis químico de fenoles totales, antes de elicitar	59
• Análisis químico de fenoles totales, después de elicitar	59
4. CONCLUSIONES	64
5. RECOMENDACIONES	65

6. BIBLIOGRAFÍA	66
7. ANEXOS	75

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>M. citrifolia</i> .	5
Cuadro 2. Antraquinonas reportadas en las estructuras, órganos y cultivo celular de <i>M. citrifolia</i> .	10
Cuadro 3. Volúmenes de trabajo utilizados para el escalamiento de las suspensiones y proporción de medio.	22
Cuadro 4. Condiciones de operación para el escalamiento de suspensiones celulares de <i>M. citrifolia</i> en biorreactor.	25
Cuadro 5. Alícuotas de NaOH 0,5 M y HCl 0,1 M, para el cambio del pH.	28
Cuadro 6. Condiciones Cromatográficas	31
Cuadro 7. Sistema de solventes, utilizado para la corrida de espectrometría de masas.	32
Cuadro 8. Características de los patrones utilizados.	32
Cuadro 9. Parámetros de crecimientos para los biorreactores 1 y 2.	36
Cuadro 10. Cambios en el volumen celular empacado, pH y peso seco, de los distintos tratamientos de elicitación.	40
Cuadro 11. Índices de crecimientos de las células de <i>Morinda citrifolia</i> en biorreactor tipo tanque agitado.	45
Cuadro 12. Comparación de medias de los diferentes tratamientos por las pruebas de Fisher y Tukey.	48

Índice de Figuras

Figura 1. Frutos: maduro (blanco) e inmaduro (verde) y hojas.	4
Figura 2. Estructura y numeración de los carbonos de las antraquinonas.	8
Figura 3. Principales antraquinonas presentes en el género <i>M. citrifolia</i> .	9
Figura 4. Biogénesis de compuestos antracénicos vía ácido shikímico y 3,3-dimetilalil difosfato.	12
Figura 5. Modelo básico de un biorreactor.	16
Figura 6. Distribución de los componentes de la tapa de un biorreactor de tanque agitado de 7 L.	23
Figura 7. Biorreactores en operación (controlador y frasco de cultivo).	24
Figura 8. Distribución de los componentes de la tapa, para la etapa de elicitación.	29
Figura 9. Callo de <i>M. citrifolia</i> .	34
Figura 10. Suspensiones celulares de <i>M. citrifolia</i> . A) Medio Hagendoorn (1994). B) Medio Gamborg (1968).	34
Figura 11. Cinéticas de crecimiento de células de <i>M. citrifolia</i> en biorreactor tipo tanque agitado. A) Biorreactor 1. B) Biorreactor 2.	35
Figura 12. Parámetros de corrida del biorreactor 1.	36
Figura 13. Parámetros de corrida del biorreactor 2.	37
Figura 14. Comportamiento del flujo del medio de cultivo en biorreactores tipo tanque agitado con <i>Morinda citrifolia</i> , A) presencia de agrupamientos celulares, y B) movimiento del medio homogéneo.	37
Figura 15. Formación de espuma, A) espuma y agrupamientos celulares, y B) cambio de color de los agrupamientos (B).	38
Figura 16. Células de <i>Morinda citrifolia</i> , de 20 días de cultivo vistas al microscopio 40X.	38
Figura 17. Consumo de sacarosa con respecto al tiempo para los biorreactores 1 y 2.	39
Figura 18. Producción de fenoles totales con respecto al tiempo para los biorreactores 1 y 2.	39
Figura 19. Cambio de coloración en los tratamientos, A) suspensiones celulares, B) células liofilizadas y C) extractos	40
Figura 20. Visualización al microscopio de células de <i>Morinda citrifolia</i> en el ensayo de elicitación. A) Tratamiento control (sin elicitar). B) Elicitación con pH 9. C) Elicitación con pH 11. Aumento 40X.	41
Figura 21. Concentración de compuestos fenólicos equivalentes de ácido gálico, presentes en los extractos de los diferentes tratamientos.	42
Figura 22. Parámetros de corrida del biorreactor 1.	43
Figura 23. Parámetros de corrida del biorreactor 2.	43
Figura 24. Comportamiento del flujo del medio y nivel de espuma en el biorreactor 1.	44
Figura 25. Cinéticas de crecimiento de células de <i>Morinda citrifolia</i> en biorreactor tipo tanque agitado.	44
Figura 26. Consumo de sacarosa con respecto al tiempo para el biorreactor 1.	45
Figura 27. Producción de fenoles totales con respecto al tiempo para el biorreactor 1.	46
Figura 28. Cinética de crecimiento de peso seco (PS) y volumen celular empacado (VCE), del cultivo en biorreactor tipo tanque agitado de <i>M. citrifolia</i> durante la elicitación por cambio de pH.	46
Figura 29. Cambio de coloración del medio al momento de elicitar con el aumento del pH, A) corresponde a la pre-elicitación (-0.5h) y B) a las 0 horas.	47
Figura 30. Concentraciones de EAG por gramos de extracto liofilizado, presentes en sobrenadante, células y en total, para los diferentes tiempos de elicitación.	47
Figura 31. Cromatogramas de los tiempos: antes (A), 6 horas (B) y 24 horas (C), del biorreactor 2, la presencia de alizarina se denota con el cuadro rojo.	49
Figura 32. Cromatograma de masas de la muestra EB0, en base al patrón de alizarina.	50
Figura 33. Cromatograma de masas de la muestra EB4, en base al patrón de alizarina.	51

Indica de Anexos

Anexo 1. <i>Composición del medio de cultivo Hagendoorn (1994).</i>	75
Anexo 2. <i>Composición del medio de cultivo Gamborg (1968).</i>	75
Anexo 3. <i>Estimación de la concentración de miligramos de ácido gálico por miligramos material liofilizado.</i>	76
Anexo 4. <i>Supuestos estadístico de las variables del tratamiento de elicitación.</i>	77
Anexo 5. <i>Tiempo de retención del patrón de alizarina, con un tiempo de retención de 21,5 minutos.</i>	78
Anexo 6. <i>Cromatograma de masas de las muestras -0,5H (izquierda) y 6 horas (derecha).</i>	79
Anexo 7. <i>Cromatogramas del biorreactor 1.</i>	81

I. Introducción

El “color” es un componente importante en la comunicación y de la vida cotidiana de las personas. Desde la era del Paleolítico, se conoce del uso de tintes para plasmar los mensajes y el arte, así como para modificar la estética de los objetos como la ropa. En la actualidad los pigmentos no solo tienen la función de dar el color a los objetos, sino que también son utilizados para el aspecto estético y psicológico del producto, ya que juegan un rol primordial en su aceptación y rentabilidad del producto, marca o idea en el mercado (Herrera, 2008).

Para suplir la creciente demanda de colorantes y poder abastecer el mercado de tintes se ha utilizado la síntesis química, sin embargo, los pigmentos sintéticos obtenidos pueden representar un peligro en el entorno laboral y para la salud de los consumidores por sus propiedades fisicoquímicas, químicas o toxicológicas, como es el caso del amaranto o rojo N°2 y el rojo allura conocido como rojo N°40, estos dos colorantes son genotóxicos, atacando principalmente el epitelio del colon y de pulmón (Tsuda *et al.*, 2001). Además se ha determinado que los colorantes azules como el azul astrazon y remazol azul turquesa poseen un efecto teratogénico mayor a los colorantes rojos (Birhanli & Ozmen, 2005).

Debido a esta problemática se volvió necesario utilizar pigmentos con propiedades menos riesgosas para las personas, como son los pigmentos naturales. Entre estos se encuentran las antraquinonas, las cuales son compuestos aromáticos con dos grupos cetona: las geninas antraquinónicas que son sólidos que pueden tener coloración amarilla, anaranjada o roja, solubles en agua caliente y; las mezclas hidroalcohólicas que son solubles con disolventes orgánicos y alcoholes que reaccionan dando un color amarillo o con disolventes alcalinos que toma un color rojo (Sánchez & Santa, 2009).

Las antraquinonas rojas son pigmentos que se producen naturalmente en *Morinda citrifolia*. Este árbol pertenece a la familia de las Rubiáceas, se cultiva en países del sureste asiático, el Caribe, América Central y Sur y llega a medir hasta 10 metros de altura (Ulloa *et al.*, 2012). A nivel nacional esta planta se introdujo en la zona de Siquirres, Limón y se ha reportado que se adapta a las zonas costeras muy húmedas del país. (Arguedas *et al.*, 2004).

De *M. citrifolia* se ha logrado extraer cerca de 13 tipos diferentes de antraquinonas, como la alizarina, la purpurina, la lucidina y la rubiadina. Estos compuestos tienen efectos como colorantes (para cosméticos y alimentos), antioxidantes, laxantes, controladores fúngicos, agentes adelgazantes, anticancerígenos, antimicrobianos, analgésicos, anticongestivos, hipotensos y sedantes (EFSA, 2012, Dave & Ledwani, 2012).

No obstante, para que los productos naturales puedan competir con la síntesis química, es necesario tener un método de producción a gran escala y corto tiempo, ya que el cultivo tradicional de esta planta requiere amplios terrenos, cuidados periódicos y presenta plazos largos entre cosechas.

Una opción para aumentar el rendimiento de producción de metabolitos secundarios en *Morinda citrifolia* es utilizar técnicas biotecnológicas, como el escalamiento de cultivos celulares en biorreactores. Mediante esta técnica es posible controlar condiciones bióticas y abióticas para estimular la producción de antraquinonas en periodos cortos, en los cuales se puede obtener altas concentraciones de biomasa. Esta técnica permite, además, aumentar el rendimiento y obtener una producción constante durante el año que no se ve afectada por las condiciones ambientales. Además, se puede aumentar la acumulación de biomasa y de metabolitos secundarios como las antraquinonas, mediante la manipulación de las variables como: la agitación, aireación y la utilización de elicitores (Shohael *et al.*, 2005; Chong *et al.*, 2005).

El objetivo de la presente investigación es establecer un protocolo de escalamiento de suspensiones celulares de la planta *Morinda citrifolia* en biorreactor tipo tanque agitado para aumentar la producción de antraquinonas totales.

II. Revisión de literatura

1. Colorantes.

Desde la era paleolítica se cuenta con obras como el Techo de las Manos en la cueva de El Castillo en Puente Viesgo y el triángulo rojo en la cueva de Altamira, que datan de cuarenta mil ochocientos años y treinta y cinco mil seiscientos años, respectivamente. Estas obras son un registro del uso de pigmentos naturales utilizados para la estética e identificación de objetos, alimentos y mensajes, estos colorantes provenían de minerales, restos de caza como la sangre y mayoritariamente de plantas (BBC Mundo, 2012).

Sin embargo, debido a la reducida gama de colores y mordientes, se implementó la síntesis química para obtener una amplia colección de colores y mayor rendimiento, tomando en cuenta que los mordientes son compuestos utilizados para fijar o adherir los pigmentos a las fibras y superficies (Bechtold & Mussak, 2009). En 1856 William Henry Perkin logró sintetizar la Mauvine, el primer colorante sintetizado y en 1868 Groebe y Lieberman lograron sintetizar la Alizarina, el primer colorante azul natural (Mondragón, 2006).

Además de la clasificación por origen, los colorantes se dividen, desde el punto de vista químico, en grupos, siendo los más importantes los grupos azoicos y antraquinonas. Los azoicos o azoderivados presentan al menos un grupo azo ligado a anillos aromáticos y representan alrededor del 66% de colorantes sintéticos utilizados en las industrias de alimentos, papel, plásticos, tintas, pinturas, cosméticos y textiles (Patnaik, 2007). Las antraquinonas se basan en la estructura de la quinona y, dependiendo de los grupos funcionales, su color varía de amarillos, naranja, rojo e incluso negro (Martínez, 2012).

Estudios del impacto en la salud humana de estos compuestos mostraron que los pigmentos pertenecientes al grupo azoico, tales como el rojo número 20 y 40, poseen efectos genotóxicos, atacando principalmente al epitelio del colon y de pulmón (Tsuda *et al.*, 2001). Otros estudios demostraron que los colorantes azules como el azul astrazón y remazol azul turquesa poseen un efecto teratogénico mayor a los colorantes rojo astrazón y cibacrón (Birhanli & Ozmen, 2005).

Por otro lado, se ha demostrado que las antraquinonas pueden causar apoptosis, lo cual probablemente se debe a la similitud con compuestos utilizados en quimioterapia por su

capacidad citotóxica contra células cancerígenas, pero poseen poca selectividad hacia éstas (Kagedal *et al.*, 1999., Sadegui *et al.*, 2004). Adicionalmente se ha encontrado que la eritrosina o rojo N°3 causa anomalías en la morfología de los espermatozoides (Abdel *et al.*, 1997).

2. *Morinda citrifolia*.

M. citrifolia pertenece a la familia de las Rubiáceas, esta especie es perenne y puede alcanzar los diez metros de altura, presenta hojas opuestas, largas, anchas y elípticas, que pueden medir desde 15 cm hasta 25 cm de longitud. Las hojas son de color verde oscuro con nervaduras verde claro hundidas en el limbo y poseen tricomas en las axilas de las nervaduras secundarias de su cara abaxial (Ulloa *et al.*, 2012, Carrillo, 2011).

El árbol florece durante todo el año, sus flores son blancas y se agrupan en inflorescencias compactas y firmes.

El fruto es una baya verde claro o amarillenta moteada con marrón, y blanca al momento de recolección, presenta una forma irregular, al madurar, desprende un olor penetrante y desagradable, puede llegar a medir 12 cm, la pulpa es jugosa y amarga, de color amarillo opaco o blanco y aspecto gelatinoso, en una misma planta se pueden encontrar frutos en estados de maduración diferentes (en la figura 1 se presenta el fruto de *M. citrifolia*, sus hojas y en el cuadro 1 su clasificación taxonómica). Además, se puede propagar mediante las semillas o vegetativamente (Ulloa *et al.*, 2012, Carrillo, 2011, Chan *et al.*, 2006).



Figura 1. Frutos: maduro (blanco) e inmaduro (verde) y hojas.

Fuente: Carrillo, 2011.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *M. citrifolia*.

Nivel	Clasificación
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Rubiales
Familia	<i>Rubiaceae</i>
Género	<i>Morinda</i>
Especie	<i>citrifolia</i>

Fuente: Carrillo, 2011.

M. citrifolia es nativa del suroeste asiático y de las islas del Pacífico, pero se ha distribuido a las Antillas, Asia, América Central y la zona sur de América del Sur, donde las condiciones de cultivo presentan una temperatura anual de 20 a 35 °C. Crece desde la costa hasta 400 m de altitud, en condiciones de mucha humedad y sol. Esta planta posee varios nombres comunes, entre los cuales están: noni, morinda, indian mulberry, hog apple, bága, fruta del diablo, manzana de Puerto Rico y piña de puerco (Ulloa *et al.*, 2012, Carrillo, 2011).

M. citrifolia ha sido utilizada en remedios tradicionales en el sureste asiático y Oceanía, posee efecto antimicrobiano debido a la presencia de compuestos fenólicos como la acubina, alizarina, escopoletina y otras antraquinonas del jugo y las raíces (Ulloa *et al.*, 2012). Se ha demostrado que combaten las infecciones de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgani*, *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*. La actividad antiviral se debe a la 1-metoxi-2-formil-3-hidroxi antraquinona presente en las raíces, que suprime los efectos de citopáticos de VIH (Ulloa *et al.*, 2012).

El jugo de noni posee propiedades inmunomoduladoras, tiene la capacidad para mejorar el sistema inmune, las cuales se ha demostrado que se deben a compuestos de ácido glucurónico, galactosa, arabinosa y ramnosa y compuestos como las citosinas (Ulloa *et al.*, 2012). También, tiene propiedades antitumorales y anticancerígenas, como la capacidad de modificar la morfología de células o inhibir enzimas para que las células sean más susceptibles a apoptosis, como es el caso de la antraquinona damnacantal (Ulloa *et al.*, 2012, Carrillo, 2011).

Otros efectos que se han estudiado son el antioxidante, estabilizador del pH, lo cual ayuda a disminuir los síntomas de diabetes, colesterol, calambres menstruales, es analgésico, sedativo

y anti-inflamatorio, este último por la inhibición selectiva de enzimas ciclo oxigenasas (Ulloa *et al.*, 2012, Carrillo, 2011).

De las distintas especies del género *Morinda* se ha logrado extraer aproximadamente 13 tipos de antraquinonas, entre ellas se encuentran la alizarina, la purpurina, la rubiadina y la lucidina (Jiménez, 2003).

Aparte de las antraquinonas, se han extraído metabolitos con propiedades anti-inflamatorias, antimicrobianas, hepatoprotectoras y antioxidantes como el ácido octanóico, con propiedades anti fúngicas; la escopoletina,; la vitamina C, terpenoides, alcaloides, sitosteroles, β -caroteno, vitamina A, glicósidos de flavona y ácido linoleico (Pandurang *et al.*, 2008, Chan *et al.*, 2006).

Potterat y Hamburger (2007), revelaron que las ventas anuales de productos de noni ascienden a 1,3 billones de dólares. Esto ha causado que la demanda y, por ende, el cultivo aumente, como es el caso de Costa Rica, donde se incrementaron los campos de cultivo. A nivel nacional, se ha reportado el cultivo de *M. citrifolia* en la provincia de Limón, específicamente en el cantón de Siquirres, y se conoce que se adapta a las zonas costeras muy húmedas del país. Además se ha encontrado la especie *M. panamensis* conocido como falso noni, en territorio nacional (Arguedas *et al.*, 2004).

Empleando apropiadas prácticas agrícolas, se puede cosechar el fruto hasta 3 veces por mes, durante todo el año; y se recomienda cosechar a partir del segundo año cuando la planta produce frutos de gran tamaño (Arguedas *et al.*, 2004, Chan *et al.*, 2006).

3. Metabolitos Secundarios.

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos cuya acción no es fundamental en las rutas fisiológicas primarias de crecimiento y desarrollo, sino que influyen en aspectos como la de respiración, asimilación, transporte, protección y sobrevivencia de las plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades a partir del metabolismo primario y no de forma generalizada (Robles *et al.*, 2016).

Estos compuestos pueden actuar de diferentes formas, por ejemplo, como agentes atrayentes o repelentes de animales e insectos, proporcionando a la planta sabores amargos o lechosos, haciéndolas indigestas o venenosas. También pueden actuar como pigmentos en las flores

para atraer insectos que ayudan en la polinización y en los frutos para atraer animales para la dispersión de semillas. Debido a su amplia gama de funciones, estos compuestos son específicos para los distintos grupos taxonómicos existentes, incluso pueden ser específicos a nivel de especies para cumplir una determinada función (Mohan & Saxena, 2009, Robles *et al.*, 2016).

En *Morinda citrifolia* se encuentran diversos metabolitos secundarios como: polifenoles que son un grupo heterogéneo que sirve como protector frente a patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa a condiciones de estrés, tales como infecciones, rayos ultravioleta, entre otros. Por otro lado, los polifenoles juegan un rol vital en la regulación del metabolismo y síntesis de la lignina, por lo cual, las plantas presentan un gran número de componentes fenólicos (Muñoz *et al.*, 2007, Ruíz *et al.*, 2010).

Otro grupo de metabolitos secundarios presentes en *Morinda citrifolia* son los flavonoides, los cuales son los constituyentes naturales más numerosos y ampliamente distribuidos, formados por quince átomos de carbono en su núcleo básico y arreglados bajo un sistema C6-C3-C6. Presentan dos anillos aromáticos llamados A y B y en algunos casos pueden tener un tercero llamado C, los flavonoides también se puede encontrar unidos a azúcares, en estos casos se les conoce como glicósidos con una o tres unidades de azúcar. Los flavonoides más comunes son: flavonas y flavonoles (Ruíz *et al.*, 2010).

El grupo de leucoantocianina, es otro tipo de metabolitos secundarios presentes en *Morinda*. Éstos son compuestos incoloros y tienen la capacidad de convertirse en antocianinas por calentamiento con un ácido mineral; pueden ser monoméricas, como las leucoantocianinas, o también poliméricas (Miranda & Cuéllar, 2001, Ruíz *et al.*, 2010).

El quinto grupo es el de las quinonas, las cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y por lo general, son pigmentos, teniendo tonalidades que según la conjugación de la estructura pueden ser amarillas a rojizas si son antraquinonas, amarillas cuando son naftoquinonas, y púrpura, azul o verde cuando están asociadas a sales o con sustituciones hidroxílicas. Las antraquinonas son el conjunto más numeroso perteneciente al grupo de quinonas y son utilizados como fármacos y colorantes (Mohan & Saxena, 2009, Ulloa *et al.*, 2012, Ruíz *et al.*, 2010).

4. Antraquinonas.

Las antraquinonas son compuestos aromáticos polihidróxidos que derivan del antraceno. Están formadas por dos dicetonas insaturadas que, por reducción, se convierten en fenoles y cuentan con dos grupos cetona, como se puede ver en la figura 2 (Martínez, 2012).

Se encuentran en la naturaleza principalmente en forma de glicósidos como la barbaloina y, en menor proporción, en forma libre o agliconas como la alizarina. Pueden presentar diferentes grupos sustituyentes donadores de electrones, la cantidad y tipo de sustituyentes modifica el color, causando que a medida que aumenta el número de éstos, el color pase de amarillo claro a rojo, hasta llegar al negro, por lo cual pueden ser utilizadas como colorantes (Sánchez & Santa, 2009, Martínez, 2012,).

Otros usos de las antraquinonas incluyen su efecto laxante, el cual se debe a la presencia de antraquinonas α - hidroxiladas (ya sea en la posición C-1 o C-8) y con sustituyentes en el C-3, que puede ser CH_3 , CH_3O y COOCH_3 (Martínez, 2012).

Además, se han reportado efectos antiinflamatorios, antimicrobianos, antifúngicos, hipotensivos, analgésicos, antimaláricos, antioxidantes, antileucémicos, anticancerígeno, separador de la celulosa de la lignina y repelente contra insectos (EFSA, 2012; Singh, 2012; Dave & Ledwani, 2012).

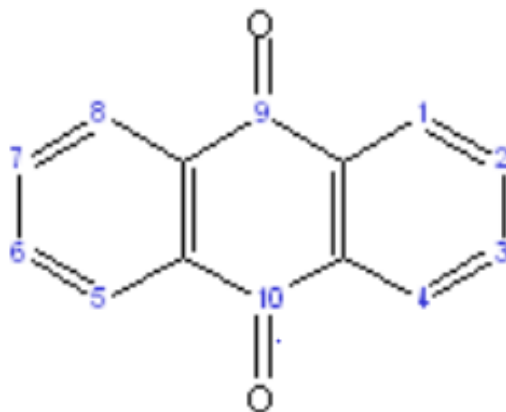


Figura 2. Estructura y numeración de los carbonos de las antraquinonas.

Fuente: Sánchez y Santa, 2009.

Se ha reportado la presencia de las siguientes formas: alizarina, morindona, rubiadiana, damnacantal y lucidiana, entre otras, en *Morinda citrifolia* (Chan *et al.*, 2006). En la figura 3 se puede apreciar la estructura de estas moléculas, así como otras antraquinonas existentes, mientras que en cuadro 2 se presentan los diferentes tipos de antraquinonas reportadas en las estructuras, órganos y cultivo celular de *M. citrifolia*.

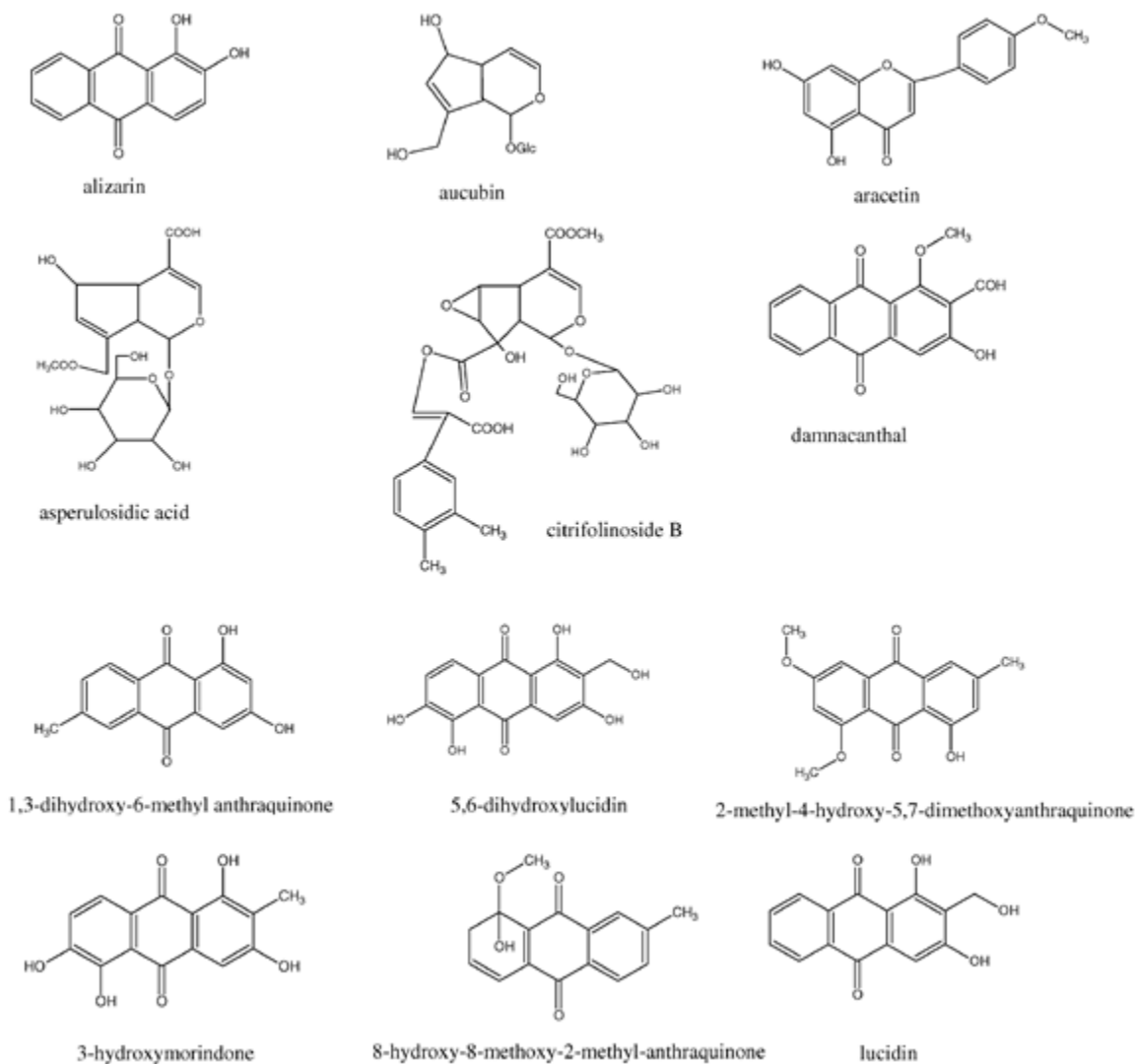


Figura 3. Principales antraquinonas presentes en el género *M. citrifolia*.

Fuente: Chan *et al.*, 2006.

Cuadro 2. Antraquinonas reportadas en las estructuras, órganos y cultivo celular de *M. citrifolia*.

Estructura	Compuesto	Estructura	Compuesto
<u>General</u>		<u>Durmen</u>	
	Antragalol 1,3-di-O-metil éter		Alizarina
	Antragalol 2-O-metil éter		Antragalol 2,3-di-O-metil éter
	Austrocortinina		Damnacantol
	5, 15-Dimetilmorindola		Morindona
	6-Hidroxiantragalol-1,3-di-O-metil éter		Fisciona
	2-Metoxi-1,3,6-trihidroxiantraquinona		Rubiadina-1-O-metil éter
	Morindona-5-O-metil éter	<u>Tallo</u>	
<u>Hojas</u>			2-hidroxiantraquinona
	5, 15-Dimetilmorindola		2-metoxiantraquinona
	1,5, 15-trimetilmorindola		Morindicinina
<u>Raíces</u>		<u>Flores</u>	
	Alizarina 1-O-metil éter	<u>Antraquinona glicosida</u>	6-8-Dimetoxi-3-metil-antraquinona-a-L-O-β-ramnosilglucopirnosida
	Antragalol 1,2-di-O-metil éter	<u>Cultivo celular</u>	
	Damnacantal	<u>Antraquinona</u>	Alizarina
	Damnacantol		5,6-Dihidroilucidina
	2-Formilantraquinona		2-Etoximetil-3-metoxi-1,5,6-trihidroxiantraquinona
	1-Hidroxi-2-metil-antraquinona		3-Hidroximorindona
	2-Hidroxi-1-metoxi-7-metil-antraquinona		Ibericin
	Ibericin		Lucidina
	1-Metoxi-3-hidroxiantraquinona		Lucidina ω-metil éter
	Morenona-1		6-Metil-ntrapurpurina
	Morenona-2		Morindona
	Nordamnacantal		Nordamnacantal
	Rubiadina		Rubiadian
	Rubiadina -1-O-metil éter	<u>Antraquinona glicosida</u>	5,6-Dihidroilucidina-3-β-primeverosida
	Soranjidiol		Lucidina-3-β-primeverosida
	Tectoquinona		Morindina

Fuente: Singh, 2012

La biosíntesis de las antraquinonas en las plantas de la familia Rubiáceas, se basa en la construcción de dos anillos o biciclo por medio de la ruta del ácido shikímico; esto ocurre cuando el anillo del ácido shikímico se deshidrata y es aromatizado, para lo cual primero se forma el corismato, el cual es transformado en isocorismato por acción de la enzima isocorismato sintasa (Han *et al*, 2003, Martínez, 2012).

Posteriormente, ocurre una condensación intramolecular entre el carbonilo del ácido shikímico y el metileno- α del grupo carbonilo del ácido α -cetoglutarico, que a su vez se deriva ciclo de los ácidos cítricos. Esta condensación se da gracias a la acción de ácido o-succinil benzoico sintasa en presencia de tiamina difosfato, formando ácido o-succinil benzoico (OSB), el cual por la acción de una OSB:CoA ligasa forma CoA éster de OSB, el cual pasa a ácido dihidroxi-2-naftoico (DHNA) (Han *et al*, 2003, Martínez, 2012).

El tercer anillo se forma cuando el biciclo se une a una cadena de 5 carbonos denominada isopentenilo o isopentenil difosfato, el cual proviene de la vía ácido mevalónico o de la ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), sin embargo estudios hechos por Eichinger *et al*. (1999) demostraron que al inhibir la ruta del ácido mevalónico, la producción de antraquinonas no se ve afectada, esto implica que la fuente mayoritaria de isopentenil difosfato (IPP) es la vía MEP (Han *et al*, 2003, Martínez, 2012).

La biosíntesis del IPP inicia por la piruvato y gliceraldehído 3-fosfato que da origen a 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato, por la acción de la 1-desoxi-D-xilosa 5-fosfato sintasa, posteriormente el 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato (DOXP) se convierte a 4-citidil difosfo-2C-metil-D-eritritol (CDP-ME) por medio de DOXP reductoisomerasa y CDP-ME sintasa. El CDP-ME sufre procesos de reducción y deshidrogenación y es transformado en IPP, el cual es modificado por la IPP isomerasa para originar el 3,3-dimetilalil difosfato (DMAPP) o isopentenilo (Han *et al*, 2003, Martínez, 2012).

Este se une al DHNA, para formar el tercer ciclo, dando origen a un compuesto antracénico (figura 4). Luego de procesos de oxidación, metilación y aromatización se agregan los grupos metil, metoxi o hidroxil, que dan origen a las distintas antraquinonas y sus respectivas tonalidades (Han *et al*, 2003, Martínez, 2012).

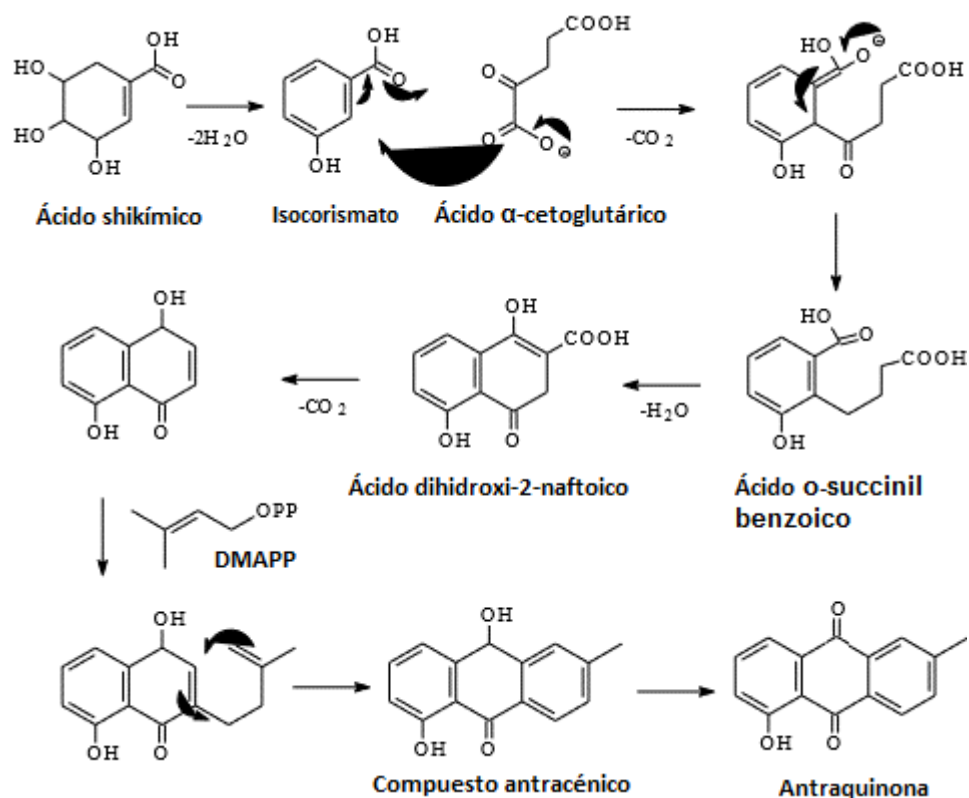


Figura 4. Biogénesis de compuestos antracénicos vía ácido shikímico y 3,3-dimetilalil difosfato.

Fuente: Martínez, 2012.

Debido a la amplia gama de usos, la obtención de las distintas antraquinonas se da por síntesis química, la cual ocurre mediante la oxidación de antraceno con ácido nítrico, la cual produce 9-nitroantraceno como impureza. La reacción de acilación Friedel-Crafts y la reacción de Diels-Alder dan distintos tipos de antraquinonas a nivel industrial (Federal Institute for Risk Assessment, 2013).

No obstante, debido a los efectos y consecuencias adversas de la producción y utilización de los colorantes artificiales, así como al creciente mercado de productos saludables y amigables con el ambiente, es necesario implementar alternativas que cumplan con estas demandas y aprovechar un mercado que para el 2011 logró tener un valor estimado de 600 millones de dólares, representando un crecimiento del 29 % con respecto al 2007, este crecimiento fue mayor al obtenido por el mercado de colorantes artificiales, el cual fue de apenas 4 % (Mintel, 2014).

Actualmente en el Mercado Europeo se regula la utilización de antraquinonas para la elaboración de papel destinado a entrar en contacto con productos alimenticios, ya que estas se utilizan para separar la celulosa de la lignina durante el proceso de separación de fibras. Según estudios de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, las antraquinonas pueden ser consideradas como posibles carcinogénicos para humanos. Sin embargo, se permite su uso en la industria cosmética; para antraquinonas como la alizarina (Federal Institute for Risk Assessment, 2013).

5. Técnicas biotecnológicas para la producción de biomasa y compuestos.

A pesar de que la producción de colorantes naturales es posible mediante diferentes métodos, las estrategias biotecnológicas permiten suplir la demanda del pigmento, ya que se puede manipular las condiciones de crecimiento para inducir una elevada producción de metabolitos secundarios como son las antraquinonas, se elimina la variación en la producción y la calidad propia de los cultivos en campo por cambios climáticos y estacionales, plagas, enfermedades, tiempos de preparación, entre otros. Entre las herramientas biotecnológicas más empleadas para la producción de compuestos se encuentra el cultivo en suspensión y escalamiento en biorreactores, siendo ésta última la de mayor importancia, ya que permite pasar de cultivos en bajos volúmenes a biorreactores de escala industrial para obtener cantidades apropiadas de estos metabolitos (Bedoya & Hoyos, 2010, Bedoya & Sánchez, 2010).

5.1. Suspensiones celulares

Las suspensiones celulares son sistemas cerrados, donde las células vegetales que se encuentran inmersas en un medio líquido con los nutrientes necesarios para su desarrollo, este proceso inicia con la disgregación celular a partir de callos friables, disminuyendo el tamaño de los agregados, en el medio líquido con agitación constante (Mustafa *et al.*, 2011, George, Hall & De Klerk, 2008). Este tipo de callo favorece la viabilidad en las suspensiones y que las mismas sean aptas para su análisis o posterior escalamiento empleando biorreactores u otros equipos que requieren células disgregadas (Su, 2006).

El cultivo de células vegetales en suspensión es una alternativa atractiva ya que permite sobrepasar las limitantes de las variaciones climáticas y el área de cultivo necesarias para la

producción de metabolitos secundarios de interés comercial. Además, esta técnica permite elicitar o manipular las células para que produzcan grandes cantidades de metabolitos bajo condiciones específicas, debido a que las células son más fáciles de estimular para incrementar la producción o para inducir la producción de compuestos nuevos, que plantas completas (Taticek *et al.*, 1991). Por ejemplo se ha cultivado células de *Lithospermum erythrorhizon*, para la producción de shikonina, donde se ha demostrado su rentabilidad en comparación con la síntesis químicas o siembra de las plantas para su extracción. Borroto y colaboradores (2005), reportaron que el cultivo biotecnológico de 2 semanas podría ser equivalente al cultivo de 17,64 ha de la planta.

En el caso específico de la especie *M. citrifolia*, Zenk *et al.* (1975), fueron pioneros en estudiar las condiciones de cultivo y algunos de los factores que más influían en la producción de antraquinonas, obteniendo rendimientos de producción hasta el 10% del peso seco celular. Por otro lado, Hagendoorn *et al* (1994) determinaron que la síntesis de estos compuestos en *Morinda citrifolia* no obedece el comportamiento de los metabolitos secundarios, ya que se produce durante la fase de crecimiento y se prolonga su producción hasta la fase estacionaria de crecimiento, mientras que generalmente, los metabolitos secundarios se producen una vez que la planta haya detenido su crecimiento exponencial, es decir en la fase estacionaria y hasta su muerte.

Zenk y colaboradores (1975), determinaron que el cultivo de *M. citrifolia* presenta una fase lag menor de 4 días, la etapa de crecimiento exponencial se mantiene hasta el día 10 del cultivo, entrando en una fase estacionaria aproximadamente hasta el día 18, antes de entrar en la etapa de muerte celular.

Los principales factores que modifican el comportamiento del cultivo celular y con ello la producción de metabolitos de interés, son: luz, agitación, reguladores de crecimiento y pH. En cultivos de *M. elliptica* se determinó que la exposición a la luz generaba una biomasa mayor, sin embargo los cultivos en oscuridad producían una mayor cantidad de antraquinonas (Abdullah *et al.*, 1998). No obstante, en *M. citrifolia*, no se observó un cambio en cultivos que se mantuvieron a la oscuridad en comparación a aquellos que fueron influenciados por luz, además, se ha determinado que el mejor pH para el proliferación celular es de 5,5 (Zenk *et al.*, 1975).

Los reguladores 2,4-D y ANA, han sido estudiado en medios para el cultivo de *M. citrifolia*, el primero favorece la división celular, pero inhibe la producción de antraquinonas en células cultivadas, al interferir la acción de la enzima ICS, mientras que el segundo, no afecta la síntesis de antraquinonas, por lo que se obtienen suspensiones con una coloración más anaranjada-rojiza (Zenk *et al.*, 1975, Hagendoorn *et al.*, 1994, Han, 2002).

5.2. Biorreactores

A partir de las condiciones estudiadas en matraz, se puede escalar la producción de biomasa y compuestos a biorreactores de diferentes volúmenes, estos son recipientes en los cuales se lleva a cabo un incremento de biomasa celular, para la producción de metabolitos secundarios bajo condiciones controladas (Hvoslef & Preil, 2005).

Los biorreactores de tipo tanque agitado, son sistemas de agitación mecánica que permite una mayor homogeneidad en la distribución de las células y del medio de cultivo, el cual aunado al sistema de aireación, hace posible el control del oxígeno disuelto en el medio (Arias *et al.*, 2009). Este tipo de reactor se ha utilizado para el crecimiento de células vegetales, desde 1990, cuando se comprobó que dichas células no son extremadamente sensibles al estrés hidrodinámico y pueden crecer fácilmente en este tipo de recipientes, lo cual ha sido respaldado con gran cantidad de reportes de escalamiento de células en biorreactores de tanque agitado (Westphal, 1990 citado por Verporte *et al.*, 1999).

Existen diferentes tipos de biorreactores, adaptados a los requerimientos y condiciones del cultivo vegetal y del proceso de síntesis, tales como procesos de régimen laminar o altamente turbulentos, de una sola fase líquida, con líquido suspendido, inclusive para reacciones del tipo isotérmica, endotérmicas y hasta exotérmicas, sin embargo, el más utilizado es el de tipo tanque agitado o STR, debido a su facilidad de control y flexibilidad, fácil adaptación o modificación en cuanto al tipo de aireación o impulsor a utilizar, pero se encuentra limitado por los altos consumos de energía y altos esfuerzos de corte (Huang & McDonald, 2009, Weathers, Towler & Xu., 2010, Arrieta, 2012).

El cultivo en biorreactores permite controlar variables como: temperatura, agitación, oxígeno disuelto, pH, tipo y cantidad de nutrientes y otros compuestos, entre otros, con el fin

de obtener biomasa y compuestos de interés. También, permite la adición de compuestos al medio, como elicitores (Arias, 2013, Arrieta, 2012).

El fermentador convencional consta de un recipiente cerrado que generalmente es un tanque cilíndrico vertical con una base que puede ser elípticas, cónicas, esféricas o toriesféricas decimales, con el fin de evitar zonas con problemas de agitación y de acumulación de biomasa, estos tanques están equipados con un impulsor giratorio, sensores y otros instrumentos. El impulsor giratorio está conformado por un impulsor, eje, sello del eje, caja de cambios, y un motor de accionamiento, está encargado de la velocidad de agitación, como se puede ver en la figura 6. Los deflectores son láminas verticales colocadas en el perímetro del tanque, convencionalmente se utilizan 3 o 4 por tanque, su función es impedir que se generen vórtices y generar turbulencias las cuales favorecen a la agitación y mezcla; sin embargo aumentan la fricción y el consumo de potencia del impulsor (Arrieta, 2012).

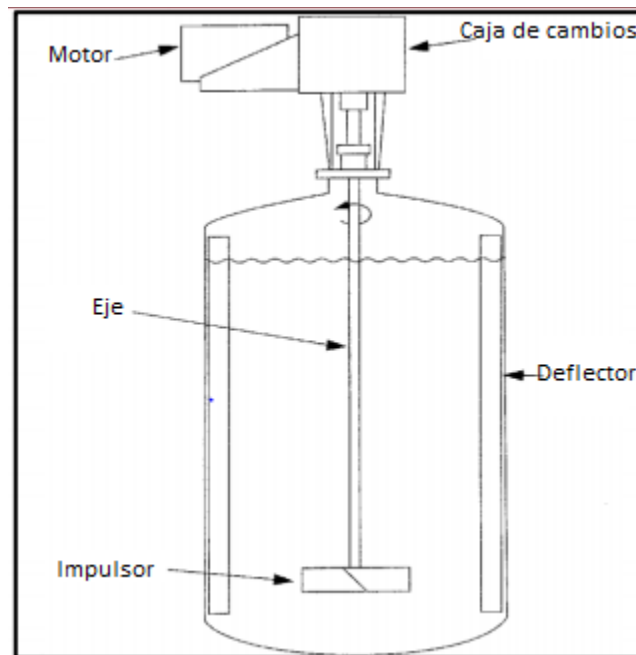


Figura 5. Modelo básico de un biorreactor.

Fuente: Arrieta, 2012.

Antes de implementar una producción a escala industrial, es necesario una fase de prueba y optimización en la cual se determinen las condiciones óptimas para el crecimiento celular y síntesis del compuesto de interés (Bedoya & Hoyos, 2010; Arias, 2013). Además, es necesario caracterizar las siguientes etapas (George *et al.*, 2008):

- Fase inicial (lag): donde las células se adaptan al medio de cultivo nuevo en el que se encuentran.
- Fase exponencial: Se caracteriza por la división celular activa y crecimiento del cultivo.
- Fase estacionaria, que es cuando el cultivo deja de crecer, debido a que la tasa de multiplicación de las células disminuye o, bien, el cultivo se mantiene estable ya que la cantidad de células que se dividen se compensa con las células que mueren, por lo cual el cultivo se mantiene constante.
- Fase de muerte, que representa la disminución de la viabilidad celular el número de células viables disminuye. Se presenta cuando los nutrientes del medio de cultivo empiezan a agotarse.

Durante el cultivo en biorreactor, la agitación influye sobre el oxígeno disuelto y estrés hidrodinámico, por lo que repercute en la producción de biomasa y acumulación de compuestos. La agitación es parte fundamental del sistema para mantener la homogeneidad del medio y adecuada oxigenación de las células, causando fuerzas hidrodinámicas sobre las células vegetales en los medios de cultivo líquido, en pequeña escala estas fuerzas son insignificantes, pero conforme se aumenta el volumen y la densidad de las suspensiones, se incrementan los requerimientos de transferencia de masa en el sistema, lo que implica aumentar la agitación y aireación, causando que las fuerzas hidrodinámicas y los fenómenos de turbulencia se tornen significantes e influyen en la producción de biomasa y compuestos (Arias, 2013).

La respuesta celular depende de la especie y de la magnitud de las fuerzas hidrodinámicas, por lo que se puede obtener desde el incremento en la producción de biomasa o de un metabolito secundario, hasta daños irreparables de la célula que ocasionan su muerte. Por ejemplo en cultivos en suspensión de *Lavandula angustifolia* en biorreactor de 3 litros, se observó que la velocidad de agitación y el oxígeno disuelto aumentan el crecimiento celular y la producción de ácido rosmarínico, obteniendo un máximo crecimiento de 34,8 g/l a 100 rpm y 50% de densidad óptica (OD) y producción de ácido rosmarínico de 1870,6 mg/l a 300 rpm y 30% OD (Arias, 2013).

En estudios con *A. indica*, se ha reportado que los contenidos de oxígeno, la $k_L a$, OTR y SOUR incrementaron con el aumento de la velocidad de agitación y aireación, sin embargo, a 240 rpm la razón específica de toma de oxígeno (SOUR) durante la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria disminuyó con respecto a las velocidades de agitación de 120 y 180 rpm, lo cual indica la pérdida de viabilidad celular bajo esta condición de operación (Bedoya y Sánchez, 2010).

Estudios con *M. citrifolia* han revelado que, utilizando un volumen de aireación de 0,3 vvm, se obtiene el mayor crecimiento de biomasa y de síntesis de metabolitos secundarios, pero que en condiciones de oscuridad se obtuvo una respuesta contraria (Ahmed, Hahn y Paek, 2008). Resultados similares fueron obtenidos por Baque *et al.* (2013), al trabajar con biorreactores tipo globo, donde con volumen de aireación de 0,3 vvm y con una densidad de inoculo de 5 o 10 g/l, se obtiene la mayor síntesis de metabolitos secundarios.

5.3. Elicitación

Otra forma de incrementar la producción de metabolitos secundarios *in vitro*, a parte de la optimización del medio y de las condiciones de cultivo, es mediante el uso de elicitors. Estos son compuestos o cambios físico-químico, que promueven la producción de metabolitos, es debido a que generan estrés en el metabolismo de la planta que activa una cascada de reacciones (Namdeo, 2007).

Según su naturaleza, se pueden clasificar en químicos, bióticos y abióticos. Los elicitors bióticos, son aquellos componentes o productos derivados de plantas o microorganismos, y los abióticos se clasifican en compuestos químicos como: ácido salicílico, ácido jasmónico, sacarosa, precursores de ruta metabólica, entre otros; y factores físicos como: pH, iluminación, sonicación, entre otros (Bhowmik, Basu, & Goyal, 2009).

En suspensiones de *M. citrifolia*, se ha estudiado el efecto de la sacarosa, notando que la concentración de AQ aumentaba al aumentar la concentración de sacarosa hasta un 7,5%. También se ha analizado el efecto de precursores de la ruta metabólica de las AQ, como el ácido σ -succinil benzoico (OSB), ácido shikímico o el ácido quínico, estos dos últimos no influyeron en la acumulación de antraquinonas, mientras que el OSB, mejoró la producción de AQ hasta en un 50% (Zenk *et al.*, 1975).

Otros elicitores estudiados son: polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados, ácido jasmónico, óxido nítrico, silicona, metales pesados, los cuales han demostrado aumentar la producción de antraquinonas (Dornenburg & Knorr, 1994, Komaraiah *et al.*, 2005, Bassetti, Pinjnenbur & Tramper, 1996). En el caso de los metales pesados, Moreira (2015), al trabajar con suspensiones de *M. citrifolia* logró obtener rendimientos de hasta 16 mg/L, utilizando cloruro de aluminio a 50 μ M y extracción con liofilizador y acetona al 70%.

III. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el proceso de escalamiento de suspensiones celulares de *Morinda citrifolia* en biorreactor tipo tanque agitado de 7 litros para la producción de antraquinonas.

Objetivos específicos

-Establecer una metodología para el crecimiento de células de *Morinda citrifolia* en biorreactor de tipo tanque agitado de 7 litros.

-Evaluar el efecto de la adición de hidróxido de sodio como elicitador en la producción de antraquinonas totales de *Morinda citrifolia* en biorreactor tipo tanque agitado de 7 litros.

-Analizar cuantitativamente y cualitativamente las antraquinonas obtenidas del crecimiento en biorreactor de *Morinda citrifolia* en presencia y ausencia de un elicitador.

IV. Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Organismos Fototróficos del Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), del Centro Nacional de Alta Tecnología (CENAT), Pavas, San José, Costa Rica.

1. Preparación de inóculo

- Mantenimiento de callos

El mantenimiento de los callos de línea celular *Morinda citrifolia* L, PC-719, se realizó cada cuatro semanas en placas petri con 10mL de medio Hagendoorn (1994) (anexo 1), 2% de sacarosa, 2g/L de peptona de caseína, 1,86 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) y 9 g de agar, con un pH de 5,5 (Moreira, 2015). El material fue incubado en condiciones de oscuridad, a una temperatura de $26,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

- Establecimiento de suspensiones celulares

Previo al establecimiento de las suspensiones celulares se indexaron los callos en medio líquido de Tripticasa soya (TS). Para ello, se colocó un fragmento de callo en el medio en tubos de ensayo con 10ml de medio TS y se incubaron durante dos días en un agitador orbital a 150 rpm y 30°C . Cada callo se indexó por triplicado y se incluyó un control negativo. Transcurrido el período de incubación, se evaluó visualmente la turbidez en cada tubo, clasificando los tubos con caldo traslúcido como negativos (libres de contaminación) y los tubos turbios como positivos (contaminados).

Para el establecimiento de las suspensiones se pesaron aproximadamente tres gramos de callo, cada uno se fragmentó con pinzas, en cuatro partes que se depositaron en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo Hagendoorn (1994), 2% de sacarosa, 1mg/L de 2,4-D y 0,2 mg/L de Kinetina, con un pH de 5,5 (Moreira, 2015). Se colocaron en la oscuridad, a una temperatura de $26,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y con una agitación orbital a 100 rpm. Después de 15 días se tamizaron las suspensiones celulares con un tamiz de 500 μm para retener y eliminar los agregados de mayor tamaño.

- Multiplicación de las suspensiones celulares

Posteriormente, se escaló a matraces de mayor tamaño, hasta erlenmeyer de 1000mL, manteniendo la proporción de volumen de trabajo del 20% del volumen del Erlenmeyer, el cual a su vez, se componía de 70% de medio Hagendoorn (1994) y 30% de suspensión celular (cuadro 3). Se mantuvieron durante 15 días en oscuridad, a una temperatura de $26,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con una agitación orbital de 100 rpm.

Cuadro 3. Volúmenes de trabajo utilizados para el escalamiento de las suspensiones y proporción de medio.

Volumen de Erlenmeyer (mL)	Volumen de trabajo (mL)	Proporción de medio Hagendoorn (1994) y suspensión celular
500	100	70/30
1000	200	70/30

Fuente: CENIBiot, 2017.

Una vez establecidas las suspensiones celulares, se mantuvieron dos lotes, uno en medio Hagendoorn (1994), para mantenimiento, y otro en medio Gamborg (1968) (anexo 2), para el inóculo del biorreactor.

2. Cultivo de células de *M. citrifolia* en biorreactor de tanque agitado.

Se escaló el cultivo celular de *M. citrifolia* en biorreactores tipo tanque agitado marca Applikon de 7L de volumen total, con 3,5 L de volumen de trabajo. Se realizó un sistema de cultivo batch, por duplicado.

- Preparación de los biorreactores e inoculación.

Para el ensamblaje del equipo, primero se armaron las tapas de los biorreactores como se presenta en la figura 6, además, se colocó una manta en alrededor del difusor, así como dos propelas marinas.

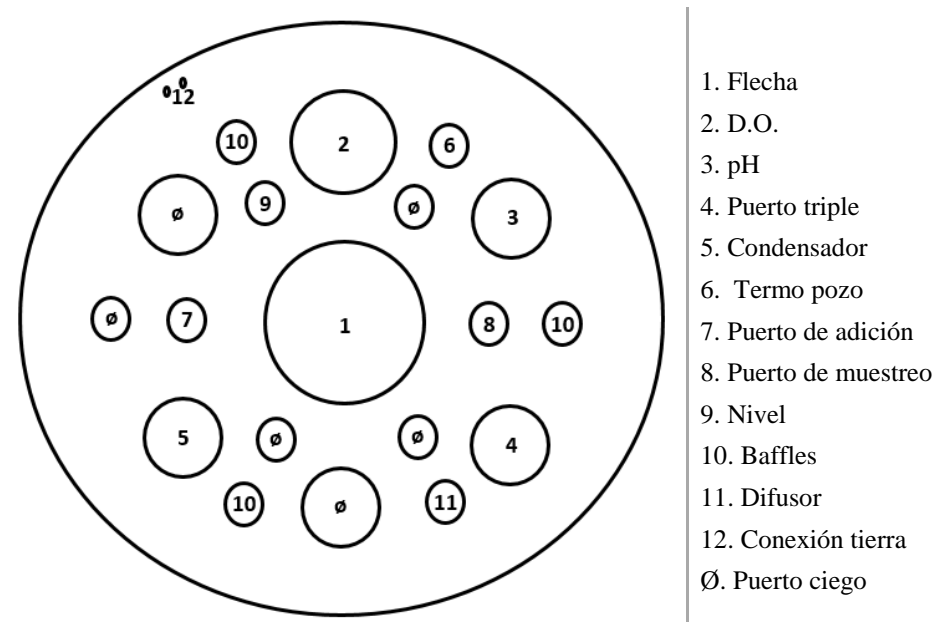


Figura 6. Distribución de los componentes de la tapa de un biorreactor de tanque agitado de 7 L.

Fuente: CENIBiot, 2017.

Posteriormente los biorreactores se esterilizaron dos veces, a una temperatura de 121°C durante 30 minutos. La primera esterilización se realizó sin colocar los sensores y con todas las mangueras y puertos abiertos, mientras que la segunda se realizó con la configuración completa para la corrida

Luego se incorporaron 2,5 L de medio Gamborg (1968), 20g/L de sacarosa, 2g/L de peptona de caseína, 1,86 mg/L de ANA y 0,7 mg/L de Kinetina.

Seguidamente los biorreactores se conectaron a sus respectivas consolas (figura 7), y se dejaron aireando y con agitación de 100 rpm, durante 12 horas. Posteriormente, se verificó la esterilidad de sistema mediante la ausencia de turbidez y el pH constante.

A cada biorreactor se le realizó la prueba de K_{La} , para lo cual se aumentó la agitación a 300 rpm, y se inyectó nitrógeno para disminuir el porcentaje de oxígeno disuelto, hasta 0%, posteriormente se sustituyó el nitrógeno por aire y se registraron los datos cada 10 segundos hasta que el nivel llegara a 95 %. Se calculó la constante de K_{La} para cada biorreactor y se analizaron estadísticamente mediante el programa Minitab 17, aplicando una prueba T pareada, previa verificación del cumplimiento de los supuestos estadístico para el análisis por métodos paramétricos. Esto se realizó por triplicado para cada biorreactor.

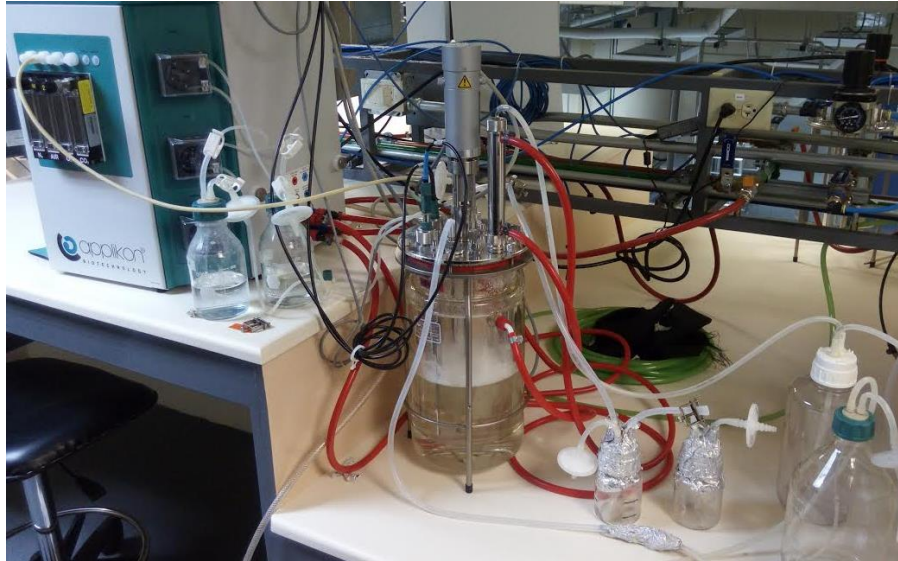


Figura 7. Biorreactores en operación (controlador y frasco de cultivo).

Fuente: CENIBiot, 2017.

A continuación se inoculó cada biorreactor a partir de suspensiones celulares en medio Gamborg (1968), estas se encontraban en etapa de crecimiento exponencial (al día 15 de cultivo). Las suspensiones se trasvasaron al recipiente de inoculación donde se mezclaron con 400 mL de medio Gamborg (1968), el inóculo para ambos biorreactores fue de $5.73 \pm 0,1$ g de células.

Las condiciones de operación de los biorreactores se muestran en el cuadro 4. Los biorreactores se mantuvieron en condiciones de oscuridad durante todo el cultivo, la agitación se ajustó de acuerdo al cambio de la viscosidad del medio, en el caso del biorreactor 2, se llegó hasta 200 rpm.

Cuadro 4. Condiciones de operación para el escalamiento de suspensiones celulares de *M. citrifolia* en biorreactor.

Variable	Valor
Volumen del biorreactor (L)	7
Volumen de trabajo (L)	3,5
Agitación (rpm)	100-300
Aireación (vvm)	0,3
DO2 (%)	30
Temperatura (°C)	27
pH	5,5
Agitador	Doble propela marina

Fuente: CENIBiot, 2017.

Se tomó 50 mL de muestra cada 3 días, para determinar la cinética de crecimiento mediante la medición de las siguientes variables: volumen celular empacado, el peso seco, consumo de azúcares y producción de fenoles totales, en el día 10 se observaron las células a 40X, de ambos biorreactores.

- Volumen celular empacado (VCE): Se tomó una muestra de 30 mL del cultivo. De ella, se tomaron 10 mL y se trasvasaron a un tubo falcon de 15 mL y se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 rpm. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra. Posteriormente, se calculó el porcentaje de volumen empacado, utilizando la siguiente fórmula:

$$VCE = \frac{\text{Volumen empacado (mL)}}{\text{Volumen total (mL)}} \times 100$$

- Consumo de azúcares: Se tomó 1,5 mL del sobrenadante de las muestras centrifugadas en el punto anterior para la determinación de azúcares. Las muestras se analizaron con el analizador bioquímico YSI SELECT modelo 2700, con membrana de sacarosa.
- Peso seco (PS): Las muestras contenidas en los tubos falcon de 15 mL se homogenizaron, se filtraron con bomba de vacío, utilizando filtros Watman de 0,20µm, previamente pesados, una vez filtradas las muestras, estas se colocaron en

una estufa a 60 °C durante dos días, posteriormente se calculó el peso seco de las muestras mediante la siguiente formula:

$$PS_{células} \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{PS \text{ del filtro con celular (mg)} - PS \text{ del filtro (mg)}}{Alicuota (mL)} \times \left(\frac{1000mL * 1g}{1L * 1000mg}\right)$$

- Fenoles totales: se tomaron los restantes 20 mL de medio y se trasvasaron a un tubo falcon de 50 mL, luego se centrifugaron por 10 minutos a 2000 rpm, y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua destilada, en los cuales se repitió la centrifugación por 10 minutos a 2000 rpm, y se descartó el sobrenadante, finalmente se congelaron las muestras para su análisis químico, el cual se describe más adelante.

Con base al peso seco se calculó el índice de crecimiento, tiempo de duplicación y la velocidad de crecimiento de las células en suspensión. El índice de crecimiento se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$IC = \frac{(X - X_0)}{X_0}$$

Dónde: IC= Índice de Crecimiento; X= Concentración celular en un tiempo t; X₀= Concentración celular inicial.

Por otra parte, la velocidad de crecimiento fue calculada aplicando la fórmula descrita a continuación:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X}{X_0}\right)}{(T_f - T_0)}$$

Dónde: μ = Velocidad de Crecimiento (día⁻¹); X= Biomasa (g de células secas/L) al final de la fase exponencial; X₀= Concentración inicial del cultivo (g de células secas/L); T_f - T₀= Tiempo de duración de la fase exponencial (día).

El tiempo de duplicación (T_d) se calculó utilizando la siguiente formula:

$$Td = \left(\frac{\ln 2}{\mu}\right)$$

Dónde: Td= tiempo de duplicación (día); μ = Velocidad de Crecimiento (día^{-1}).

Además, utilizando el consumo de azúcares se calculó el rendimiento celular con base a sustrato ($Y_{x/s}$), con la siguiente formula:

$$Y_{x/s} = \left(\frac{X - X_0}{S_0 - S}\right)$$

Dónde: $Y_{x/s}$ = Rendimiento celular con base a sustrato; X= Biomasa (g de células secas/L) al final de la fase exponencial; X_0 = Concentración inicial del cultivo (g de células secas/L); S_0 = Concentración inicial de fuente de carbono (g/L); S= Concentración del final de la fase exponencial (g/L).

- Análisis químico de fenoles totales

Las muestras congeladas se liofilizaron durante 48 horas en un liofilizador Christ, Gamma 1-16 LSC, posteriormente se pesó de cada muestra ($75 \pm 0,1$) mg, en tubos de ensayo con tapa rosca, luego se realizó la extracción utilizando etanol absoluto al 50% y agitación magnética a (45 ± 1) °C, durante 10 minutos; posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se trasvaso a un tubo falcon de 15 mL, este proceso se realizó un total de cinco veces. Luego, se centrifugaron los tubos falcon a 2500 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante de cada tubo se recuperó con pipetas pasteur, evitando llevar residuos, el sobrenadante se guardó en tubos falcon de 50 mL, los cuales se colocaron en el congelador a -80 °C, por 3 horas. Transcurrido este tiempo se colocaron en el liofilizador por 2 días.

El liofilizado se resuspendió en agua mili Q, los tubos se colocaron en baño ultrasónico por 10 minutos, luego se filtraron a través de filtros de 0,45 μm , el sobrenadante se guardó en viales.

A cada muestra se le realizó la prueba de Folin-Ciocalteu, para lo cual en cada pozo de la microplaca se mezcló: 200 μL de agua mili Q, 15 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu, 30 μL de muestra o de agua mili Q, para los blanco, y 50 μL de la disolución de carbonato de sodio al 20%, se utilizaron 4 pozos por muestra. Para la corrida, las muestras fueron agitadas

durante 30 segundos en el lector de microplacas Synergy HT de Biotek y luego inició la reacción que tardó aproximadamente 30 minutos a una temperatura de 40°C. Finalmente se realizó una lectura de absorbancia a una longitud de onda (λ) de 755nm, la estimación de la concentración de miligramos de ácido gálico por miligramos material liofilizado se muestra en el anexo ((.

3. Elicitación de células en suspensión de *M. citrifolia*

3.1. Elicitación de suspensiones celulares en matraz

Para la elicitación en suspensiones, primero se prepararon 20 matraces de 125 mL, a cada uno se le agregó 4 g de células, provenientes de suspensiones en medio Gamborg (1968). Posteriormente se agregó 25 mL de medio Gamborg (1968), suplementado con 2% de sacarosa, 2g/L de peptona de caseína, 1,86 mg/L de ANA y 0,7 mg/L de Kinetina, con un pH de 5,5. Los cultivos se mantuvieron por 12 días en oscuridad, agitación orbital a 100 rpm y a una temperatura de (26±1)°C.

Al día 12 de cultivo, se realizaron los siguientes tratamientos: ES1 (control), ES2 (pH 5,5), ES3 (pH 7), ES 4 (pH 9) y ES 5 (pH 11). Para modificar el pH se le agregó a una mezcla de NaOH 0,5 M y HCl 0,1 M, las combinaciones se presentan en el cuadro 5, en el caso del control no se agregó NaOH 0,5 M y HCl 0,1 M.

Cuadro 5. Alícuotas de NaOH 0,5 M y HCl 0,1 M, para el cambio del pH.

Tratamiento	NaOH 0,5 M (μ L)	HCl 0,1 M (μ L)
ES1	0	0
ES2	100	50
ES3	190	100
ES4	350	100
ES5	1450	100

Fuente: CENIBiot, 2017.

Se cultivaron en oscuridad por dos días, con agitación orbital a 100 rpm y a una temperatura de (26±1) °C. Transcurrido este lapso, se determinó el crecimiento final y concentración de antraquinonas, mediante la medición de las siguientes variables: volumen celular empacado, el peso seco y producción de antraquinonas, de acuerdo con los procedimientos descritos en el apartado 2, además, se midió el pH de final de cada tratamiento.

- Análisis químico de fenoles totales

Se procesaron las muestras siguiendo la metodología del apartado 2, pero se agregó 5 mL de sobrenadante al extracto, antes de liofilizar. También se analizaron por el método de Folin-Ciocalteu, los sobrenadantes de los 5 tratamientos.

- Análisis estadístico de la elicitación de las suspensiones

Se utilizó el software estadístico Minitab 17, para determinar la existencia de diferencias significativas entre los métodos de extracción. Para ello, se verificó el cumplimiento de los supuestos estadísticos (anexo 4), y se analizó la varianza entre tratamientos por medio de una prueba ANOVA de una vía utilizando comparaciones de Tukey.

3.2. Elicitación de suspensiones celulares en biorreactor de 7 litros

Para la elicitación se cultivó *M. citrifolia* en biorreactores tipo tanque agitado se realizó un cultivo batch por duplicado. Las condiciones de operación, esterilización, preparación de inóculo, se realizaron como se describe en el apartado 2. Se modificó la configuración de la tapa, para mejorar la distribución de los sensores, como se muestra en la figura 8, se calcula la *K_{la}* siguiendo el procedimiento del apartado 2.

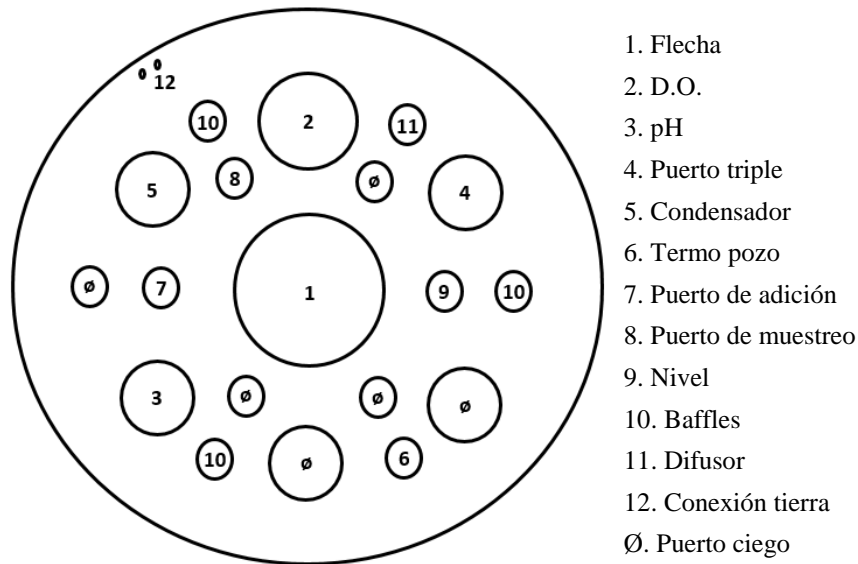


Figura 8. Distribución de los componentes de la tapa, para la etapa de elicitación.

Fuente: CENIBiot, 2017.

Se tomó 50 mL de muestra cada 3 días, para determinar la cinética de crecimiento empleando las siguientes variables: volumen celular empacado, peso seco, consumo de azúcares y producción de fenoles totales, según la metodología del apartado 3,1 y se utilizó las fórmulas del apartado 2, para calcular los parámetros de crecimiento.

Al día 20 se elicitaron los dos biorreactores, para esto se detuvo el control automático del pH, y manualmente se elevó el pH a 11 con una solución de NaOH 0,5 M, se dejó los biorreactores sin autocontrol de pH. Se muestreó antes de elicitar (EB0), al tiempo 0 horas (EB1), 2 horas (EB2), 4 horas (EB3), 6 horas (EB4) y 24 horas (EB5). Para determinar la cinética de crecimiento se midió del volumen celular empacado, el peso seco y consumo de azúcares, siguiendo los procedimientos descritos en la sección 2, para tres primeras variables de estudio, mientras que la cuantificación de fenoles totales se realizó como se denota en el apartado 3,1.

Además, se midió conductividad al tiempo 0 y a los 21 días, mediante el monitor de biomasa y conductividad Aber Instruments modelo 220. La medición se realizó tomando 100 ml de medio de cultivo en un beaker de 100 mL, el sensor se colocó en el punto central de altura y ancho del beaker y se recopiló el dato luego de 4min de lectura.

- Análisis químico de fenoles totales

Las muestras se analizaron por el método de Folin-Ciocalteu, como se describe en el apartado 3,1.

- Caracterización de los extractos fenólicos

Posteriormente se realizó una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), empleando un cromatógrafo de alto rendimiento Perkin Elmer Series 200, acoplado con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), desgasificador, bomba cuaternaria, automuestreador y horno para columna, utilizando las condiciones del cuadro 6. Para realizar la lectura, las muestras analizadas fueron las siguientes: antes de elicitar, 6 horas y 24 horas, de los biorreactores 1 y 2, posteriormente se compararon las lecturas para apreciar las diferencias que presentaron los tiempos 6 y 24 horas con respecto al de antes de elicitar, en un mismo biorreactor, y la comparación entre mismo tiempo pero diferente biorreactor.

Cuadro 6. Condiciones Cromatográficas

Parámetro	Caraterística
Columna:	C18 150mm x 4.6mm, 5um (Luna C18 de Phenomenex)
Fase móvil:	A: Buffer 35mM de acetato de trietilamina (Ac. Acético 0.2% +Trietilamina pH=6.90) B: Acetonitrilo
	Composición de gradiente (A:B): 0min (10% B) 3min (10% B) 10min (30% B) 17min (50% B) 20min(60% B) 28min (100% B) 30min (10% B)
Tiempo de corrida:	30 minutos
Flujo:	1mL/min
Horno:	25°C
Detector:	280 nm
Volumen de Inyección	90 µL

Fuente: CENIBiot, 2017.

Para comprobar el efecto de elicitación y determinar los posibles compuestos, se realizó un análisis de MS/MS con un espectrómetro de masas, MDS SCIEX Applied Biosystems, versión lineal 4000 Q TRAP LC/MS/MS, la ionización por electrospray (ESI) se llevó a cabo en modo polaridad negativo con un escaneo de MRM, tipo de escaneo Enhanced Product Ion (ion producto mejorado), utilizando diferentes intervalos de masas, energías de colisión y potenciales. Las condiciones cromatográficas se presenta en el cuadro 7, utilizando los siguientes solventes; agua con 0,1% de ácido trifluoroacético (A)y metanol con 0,1% de ácido trifluoroacético (B).

Cuadro 7. Sistema de solventes, utilizado para la corrida de espectrometría de masas.

	Tiempo (minutos)	Velocidad de flujo ($\mu\text{L}/\text{minuto}$)	A (%)	B (%)
1	1,0	375	90,0	10,0
2	9,0	375	70,0	30,0
3	13,0	375	50,0	50,0
4	20,0	375	0,0	100,0
5	27,0	375	0,0	100,0
6	29,0	375	95,0	5,0

Fuente: CENIBiot, 2017.

Además, se utilizó el horno a una temperatura 20 °C, con una columna Algident XDBC18 de 4,6mmx 50mm y un micraje 1,8 micras, el volumen de inyección fue de 5,0 μL , las energías de colisión variaron entre -25 y hasta -20 voltios, dependiendo del analito a caracterizar, la temperatura de ionización molecular fue de 550 °C, con un gas cortina de 21, un ion spray (IS) de 5500 y gas de ionización (GS1) de 21.

La corrida duro 29,01 minutos, en el cuadro 8 se presenta el escaneo por monitoreo de reacciones múltiples (MRM) de diferentes patrones de antraquinonas, donde se analizan los Q1 Y Q3, a diferentes voltajes. Se utilizó el software Analyst versión 1.6.2 para analizar los datos obtenidos.

Cuadro 8. Características de los patrones utilizados.

Tipo de compuesto	Masa Q1 (Da)	Masa Q2 (Da)	Tiempo (segundos)	DP (voltios)
Lizarinas	239,0	211,0	100,0	-60,0
3-meO-Histazarina	253,0	238,0	100,0	-60,0
3-meO-Histazarina	253,0	210,0	100,0	-60,0
Crisofanol	253,0	225,0	100,0	-60,0
Crisofanol	253,0	238,0	100,0	-60,0
Antragalol	255,0	227,0	100,0	-60,0
Antragalol	255,0	183,0	100,0	-60,0
Purpurina	255,0	171,0	100,0	-60,0
Purpurina	255,0	199,0	100,0	-60,0
Quinizarina	271,0	243,0	100,0	-60,0
Quinizarin	271,0	199,0	100,0	-60,0
Lucidina	269,0	151,0	100,0	-60,0
Munjistin	283,0	239,0	100,0	-60,0
Rubiadina	253,0	225,0	100,0	-60,0

Fuente: CENIBiot, 2017.

- Análisis estadístico de la elicitación de los biorreactores

Se utilizó el software estadístico Minitab 17, para determinar la existencia de diferencias significativas entre tiempos de elicitación. Para ello, se verificó el cumplimiento de los supuestos estadísticos (anexo 4), y se analizó la varianza entre tratamientos por medio de una prueba ANOVA de una vía utilizando comparaciones de Tukey y Fisher.

V. Resultados

1. Preparación de inóculo

En el cultivo de callo en medio Hagendoorn (1994) con ANA, se puede apreciar que es de color naranja (figura 9).



Figura 9. Callo de *M. citrifolia*.

Fuente: CENIBiot, 2017.

Mediante la técnica utilizada se logró escalar las suspensiones a matraces de 1000mL, en la figura 10, se observa en el lado izquierdo (A), la suspensión de medio Hagendoorn (1994), la cual presenta una coloración blanquizca, en comparación con la suspensión en medio Gamborg (1968) (B), que es de color café claro, utilizadas para el inóculo de los biorreactores.

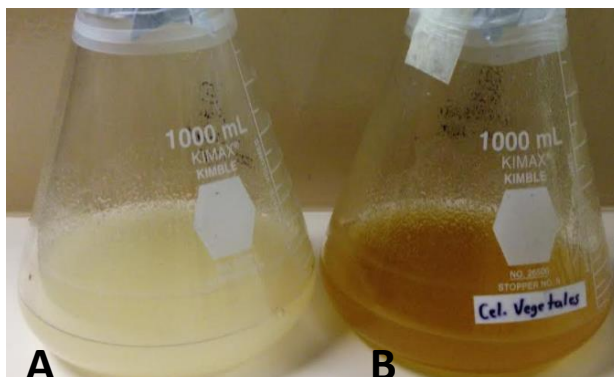


Figura 10. Suspensiones celulares de *M. citrifolia*. A) Medio Hagendoorn (1994). B) Medio Gamborg (1968).

Fuente: CENIBiot, 2017.

2. Cultivo de células de *M. citrifolia* en biorreactor de tanque agitado

Los biorreactores presentaron valores de $K_L a$ de $78,50 \text{ h}^{-1}$ y $90,62 \text{ h}^{-1}$, para los biorreactores 1 y 2 respectivamente. Al comparar los valores de $K_L a$ de los dos biorreactores, se determinó que existían diferencias significativas entre ambos.

- Cinética de crecimiento

En la figura 11, se muestra las cinéticas de crecimiento en los biorreactores 1 y 2, basadas en el peso seco y volumen celular empacado, donde se puede observar que el cultivo del biorreactor 1 mostró todas las fases de crecimiento esperadas, es decir, fase lag (L), exponencial (EX), estacionaria (ES) y de muerte (M), mientras que el 2 llegó hasta la fase estacionaria

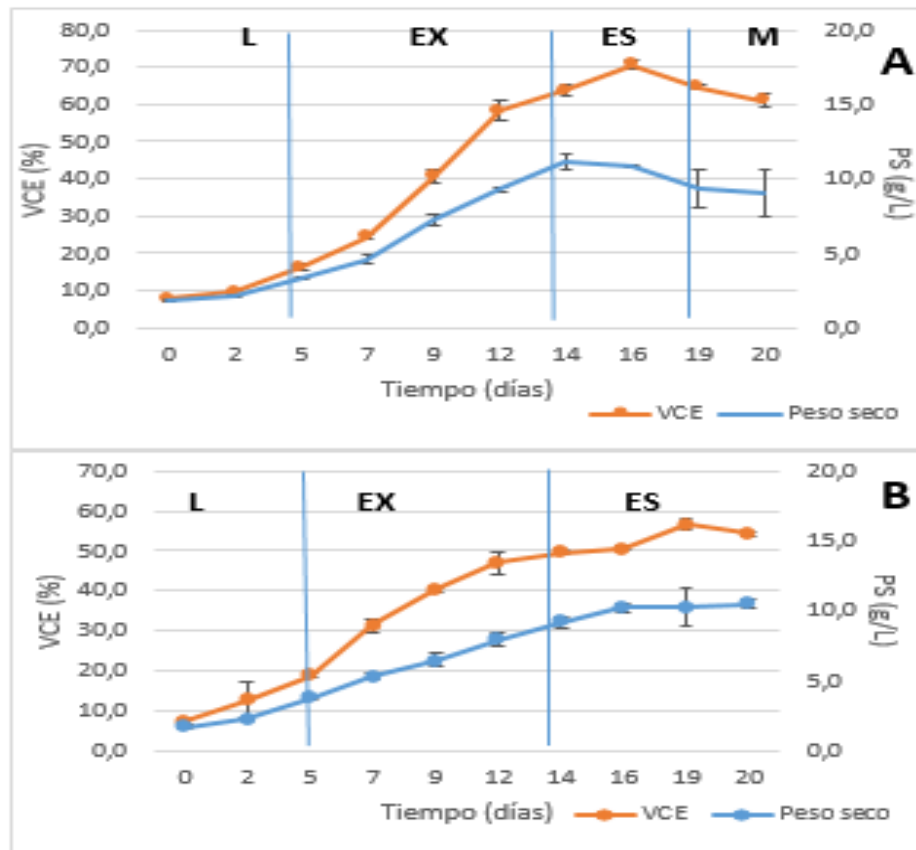


Figura 11. Cinéticas de crecimiento de células de *M. citrifolia* en biorreactor tipo tanque agitado. A) Biorreactor 1. B) Biorreactor 2.

Fuente: CENIBiot, 2017.

En ambas gráficas, se considera que la fase exponencial se extiende desde el día 2 hasta el 12. Basado en esto, se calculan los parámetros de crecimiento que se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Parámetros de crecimientos para los biorreactores 1 y 2.

Parámetros	Biorreactor 1	Biorreactor 2
Índice de crecimiento (IC)	3,30	2,49
Velocidad de crecimiento (μ)(h ⁻¹)	0,15	0,13
Tiempo de duplicación (Td) (h)	4,75	5,54
Rendimiento celular con base a sustrato ($Y_{x/s}$) (g/l de células por g/L de sacarosa)	0,49	0,37

Fuente: CENIBiot, 2017.

Los comportamientos de las variables fisicoquímicas como pH, oxígeno disuelto y temperatura, fueron lineales para ambos biorreactores, durante los veinte días, sin embargo, a partir de día 9 se aumentó la agitación en ambos biorreactores, debido al aumento de viscosidad del medio y el crecimiento celular, en el biorreactor 1 se llegó hasta 300 rpm (figura 12) y el en 2 hasta 200 rpm (figura 13).

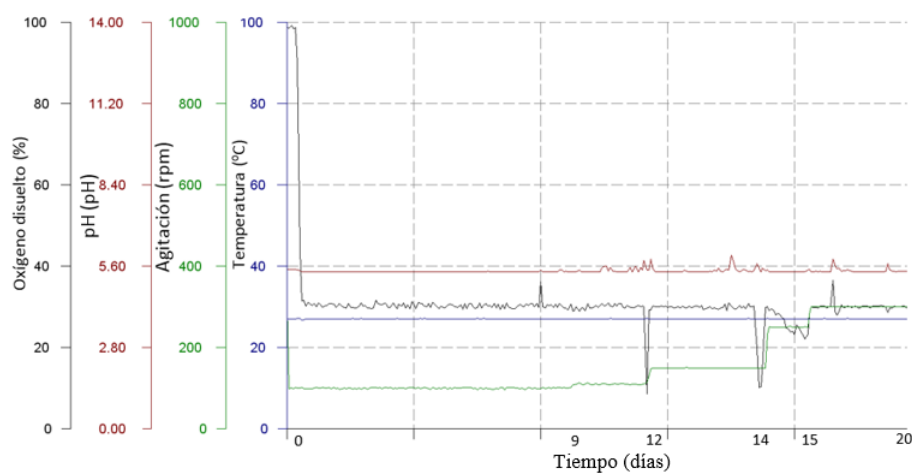


Figura 12. Parámetros de corrida del biorreactor 1.

Fuente: CENIBiot, 2017.

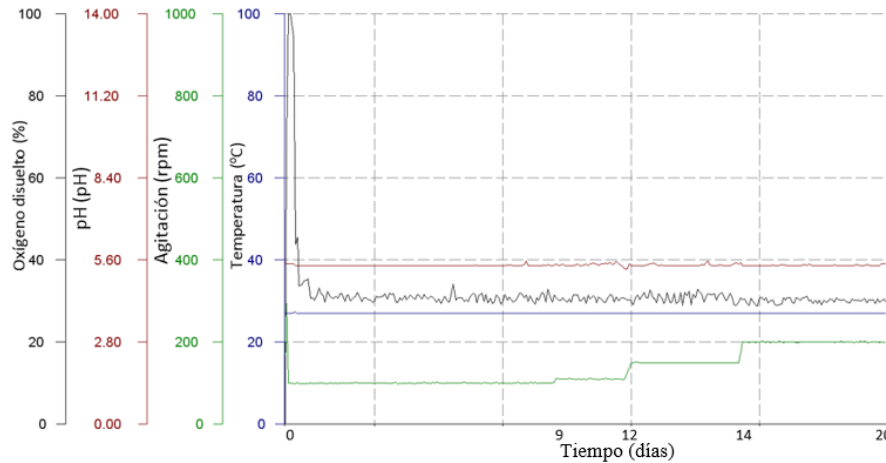


Figura 13. Parámetros de corrida del biorreactor 2.

Fuente: CENIBiot, 2017.

En la figura 14, se representa el comportamiento del flujo en los biorreactores. En la figura de la izquierda (figura A), se representa un movimiento lento por medio de las flechas rojas entre los sensores, que a su vez se muestran como líneas punteadas. En la figura de la derecha (B), se representa un movimiento rápido y homogéneo por medio de flechas amarillas.

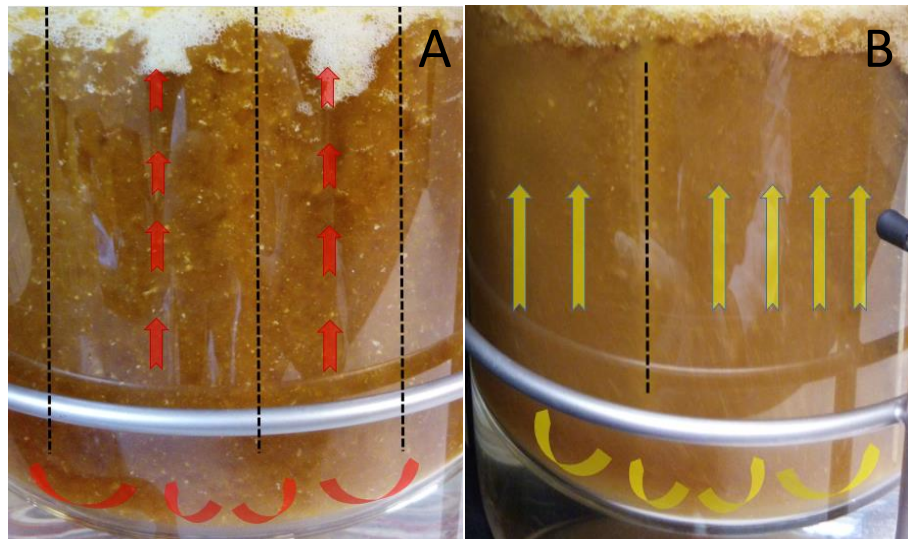


Figura 14. Comportamiento del flujo del medio de cultivo en biorreactores tipo tanque agitado con *Morinda citrifolia*, A) presencia de agrupamientos celulares, y B) movimiento del medio homogéneo.

Fuente: CENIBiot, 2017.

Además, se observó la formación de espuma y agregados celulares sobre la misma, así como, manchas púrpura en la pared y en la espuma, situadas justamente debajo del puerto triple, como se puede observar en la figura 15.

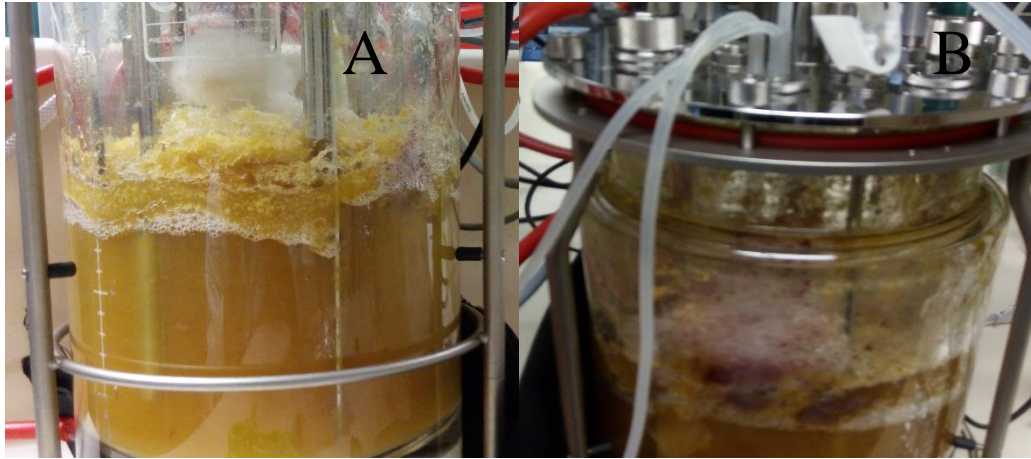


Figura 15. Formación de espuma, A) espuma y agrupamientos celulares, y B) cambio de color de los agrupamientos (B).

Fuente: CENIBiot, 2017.

Por otro lado, al observar al microscopio, las células en el día 20, se pudo apreciar que las células son en su mayoría alargadas (figura 16).



Figura 16. Células de *Morinda citrifolia*, de 20 días de cultivo vistas al microscopio 40X.

Fuente: CENIBiot, 2017.

El estudio de la concentración de sacarosa como fuente de carbono (figura 17), se logró determina que a los doce días descendió hasta 0,05 g/L, a los doce días, cuando la fase exponencial llega a su fin.

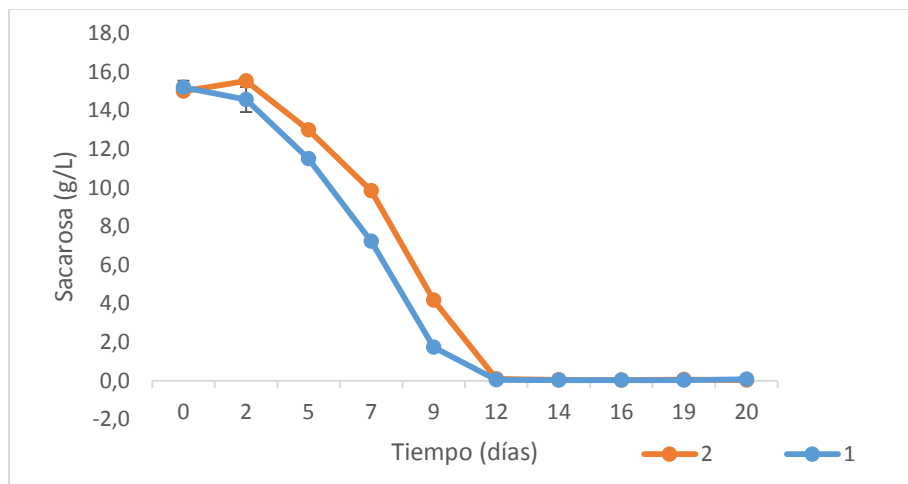


Figura 17. Consumo de sacarosa con respecto al tiempo para los biorreactores 1 y 2.

Fuente: CENIBiot, 2017.

- Análisis químico de fenoles totales

La disminución de la tendencia del contenido de compuestos fenólicos puede ser atribuida a factores de degradación, así como, errores en el proceso de extracción (figura 18).

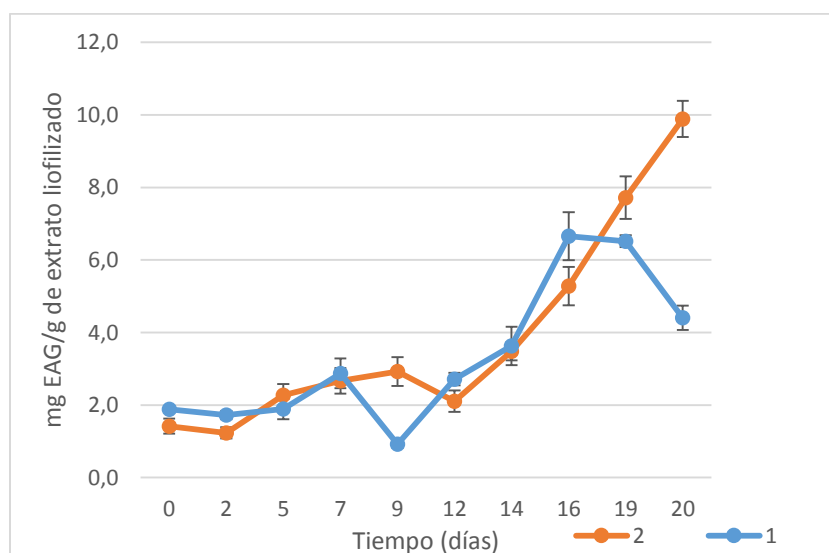


Figura 18. Producción de fenoles totales con respecto al tiempo para los biorreactores 1 y 2.

Fuente: CENIBiot, 2017.

3. Elicitación de células en suspensión de *M. citrifolia*

3.1. Elicitación de suspensiones celulares en matraz

En el cuadro 10, se observa el comportamiento de los cultivos ante la elicitación mediante variación de pH, donde cada aumento de este factor, provoca una disminución en el peso seco, dicho comportamiento se puede explicar por factores como lisis celular.

Cuadro 10. Cambios en el volumen celular empacado, pH y peso seco, de los distintos tratamientos de elicitación.

Tratamiento	Volumen celular empacado (%)	pH final(pH)	Peso seco (g/L) *
ES 1	4,7±2,1	3,8±0,4	7,3±3,5 (B)
ES 2	5,1±1,6	4,0±0,4	8,5±2,2 (A)
ES 3	4,5±2,2	4,5±0,5	7,4±2,8 (C)
ES 4	3,7±1,4	5,0±0,5	6,7±2,4 (C)
ES 5	4,0±1,6	9,1±0,0	4,3±1,9 (D)

Fuente: CENIBiot, 2017.

* Letras distintas representan diferencias significativas con valor de significancia de 95%, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Las suspensiones presentaron cambios de color con respecto al control, que se evidencio en los extractos y las células liofilizadas (figura 19), el tratamiento con el pH 11 presento el cambio de color más evidente, al tornarse rosa.

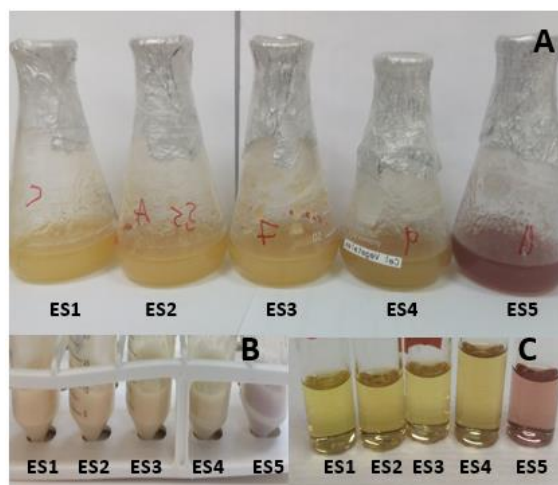


Figura 19. Cambio de coloración en los tratamientos, A) suspensiones celulares, B) células liofilizadas y C) extractos

Fuente: CENIBiot, 2017.

Al observar las suspensiones al microscopio de luz, se notó que en las presencia de inclusiones dentro de las células en las últimos tratamientos, en especial del tratamiento con pH 11 (señalados en la figura con recuadro rojo) (figura 20).



Figura 20. Visualización al microscopio de células de *Morinda citrifolia* en el ensayo de elicitaición. A) Tratamiento control (sin elicitar). B) Elicitación con pH 9. C) Elicitación con pH 11. Aumento 40X.

Fuente: CENIBiot, 2017.

Al analizar la concentración de compuestos fenólicos en los cultivos celulares elicitados, se encontró diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,000$). La mayor concentración de compuestos fenólicos se presentó en el tratamiento ES 5, mientras que el que presentó menor concentración fue el tratamiento elicitado con pH 5,5. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos 7 y 9 (figura 21).

Además, se logró determinar una relación directamente proporcional al aumentar la concentración de aniones hidróxidos en las muestras, con el aumento de compuestos fenólicos, con una correlación lineal estadística entre variables de 94,65%.

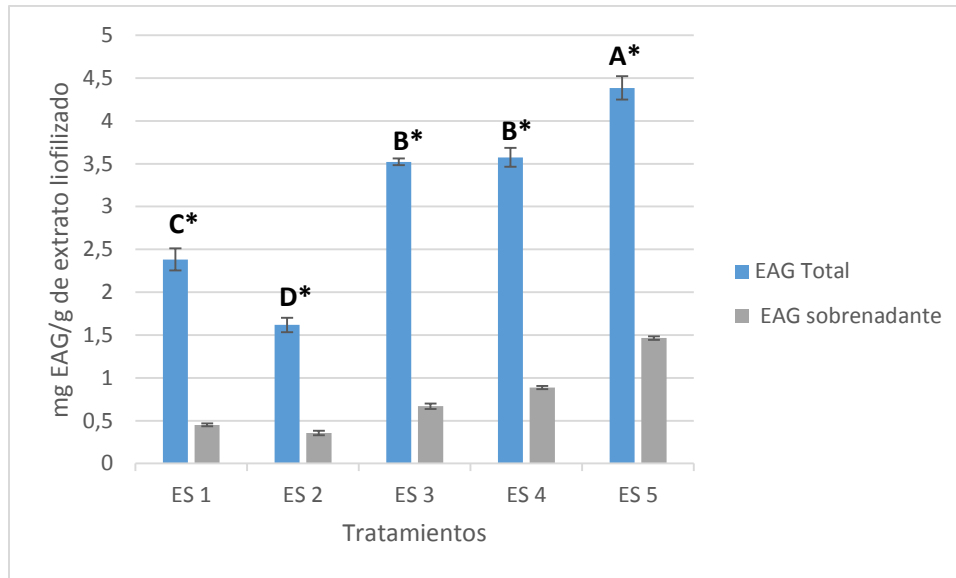


Figura 21. Concentración de compuestos fenólicos equivalentes de ácido gálico, presentes en los extractos de los diferentes tratamientos.

Fuente: CENIBiot, 2017.

* Letras distintas representan diferencias significativas con valor de significancia de 95%, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

3.2. Elicitación de suspensiones celulares en biorreactor de 7 litros

- Cinética de crecimiento

Se determinaron valores de KLa de $82,99 \text{ h}^{-1}$ y $95,75 \text{ h}^{-1}$, para los biorreactores 13 y 2 respectivamente y no se presentaron diferencias significativas entre ellos.

A continuación, se muestra el comportamiento de los parámetros oxígeno disuelto, pH, agitación y temperatura, durante los 20 días para el biorreactor 1 (figura 22) y el biorreactor 2 (figura 23). Como se observa, el pH y la temperatura se mantuvieron constantes durante todo el proceso, a partir del día 13 se aumentó la agitación en ambos biorreactores, hasta 200 rpm, debido al aumento de viscosidad del medio y el crecimiento celular. Después de la elicitación se puede apreciar que el pH disminuye conforme al tiempo.

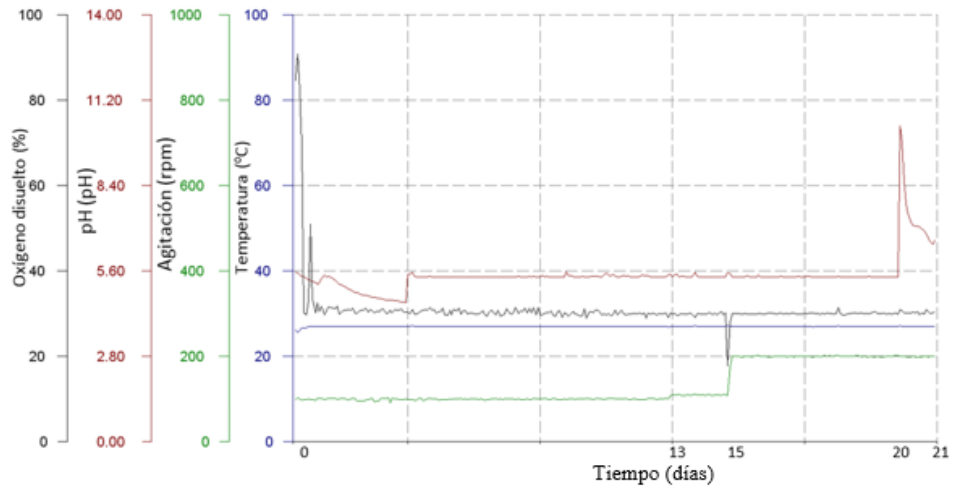


Figura 22. Parámetros de corrida del biorreactor 1.

Fuente: CENIBiot, 2017.

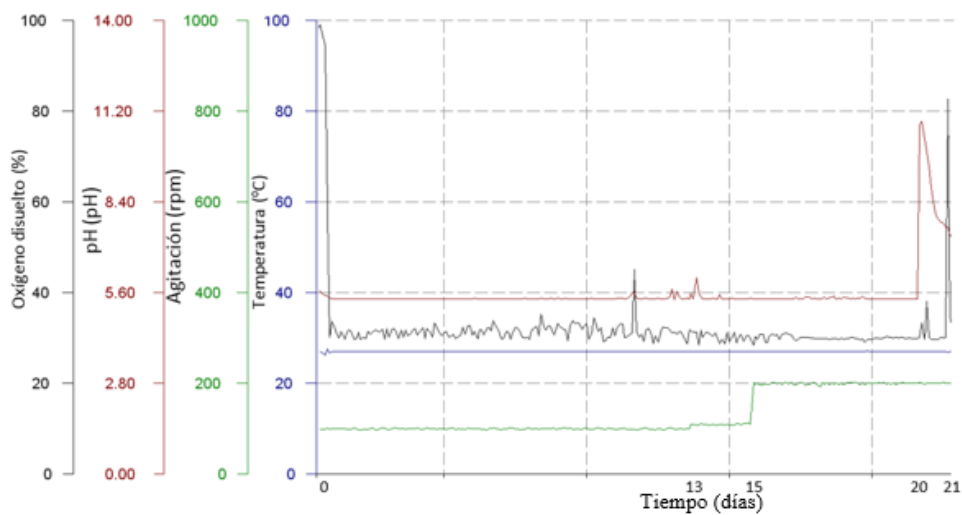


Figura 23. Parámetros de corrida del biorreactor 2.

Fuente: CENIBiot, 2017.

Se observó la formación de espuma y de agregados celulares sobre la misma, sin embargo, los niveles de espuma y de los agrupamientos fueron menores que los presentados en los biorreactores utilizados para determinar la cinética de crecimiento, por otro lado, la agitación del medio fue uniforme (figura 24).



Figura 24. Comportamiento del flujo del medio y nivel de espuma en el biorreactor 1.

Fuente: CENIBiot, 2017.

En la figura 25, se muestra la cinética de crecimiento, basada en el peso seco y volumen celular empacado. Donde se puede observar que el biorreactor 1, llego hasta la fase estacionaria.

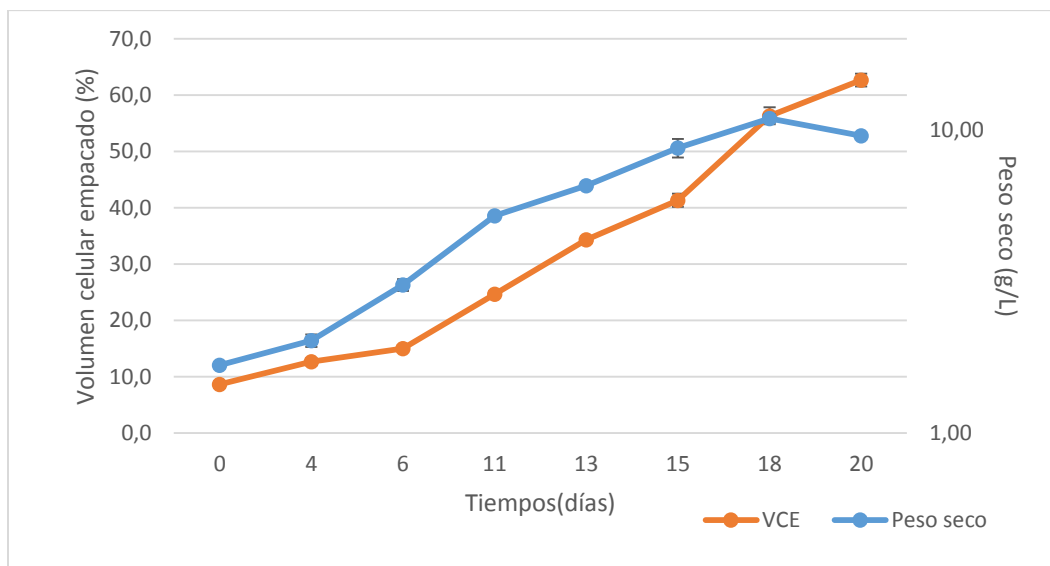


Figura 25. Cinéticas de crecimiento de células de *Morinda citrifolia* en biorreactor tipo tanque agitado.

Fuente: CENIBiot, 2017.

Como se observa la fase exponencial se extiende desde el día 4 hasta el 18. Basado en esto, se calculan los parámetros de crecimiento que se muestran en el cuadro 11.

Cuadro 11. Índices de crecimientos de las células de *Morinda citrifolia* en biorreactor tipo tanque agitado.

Parámetros	Biorreactor
Índice de crecimiento (IC)	4,17
Velocidad de crecimiento (μ)(h ⁻¹)	0,12
Tiempo de duplicación (Td) (h)	5,91
Rendimiento celular con base a sustrato ($Y_{x/s}$) (g/l de células por g/L de sacarosa)	1,10

Fuente: CENIBiot, 2017.

En cuanto al consumo de sacarosa (figura 26), se puede apreciar que la sacarosa desciende a 0,13 g/L, a los once días, a la mitad de la fase exponencial.

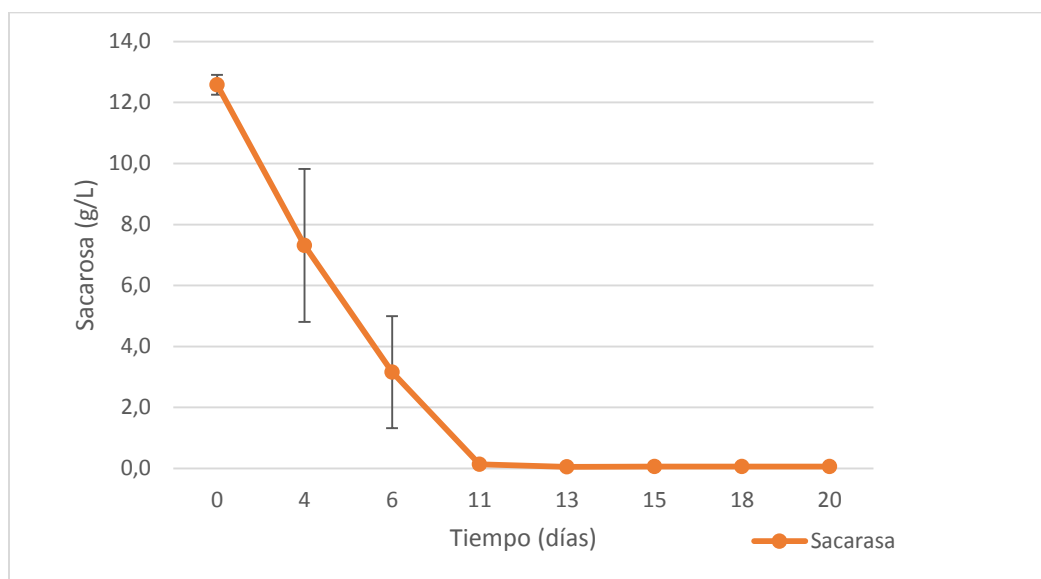


Figura 26. Consumo de sacarosa con respecto al tiempo para el biorreactor 1.

Fuente: CENIBiot, 2017.

- Análisis químico de fenoles totales, antes de elicitar

La figura 27 muestra el contenido de compuestos fenolicos antes del proceso de elicitation, donde se logra apreciar valores de cuantificación promedio de 2,67 mg EAG/g de extracto liofilizado.

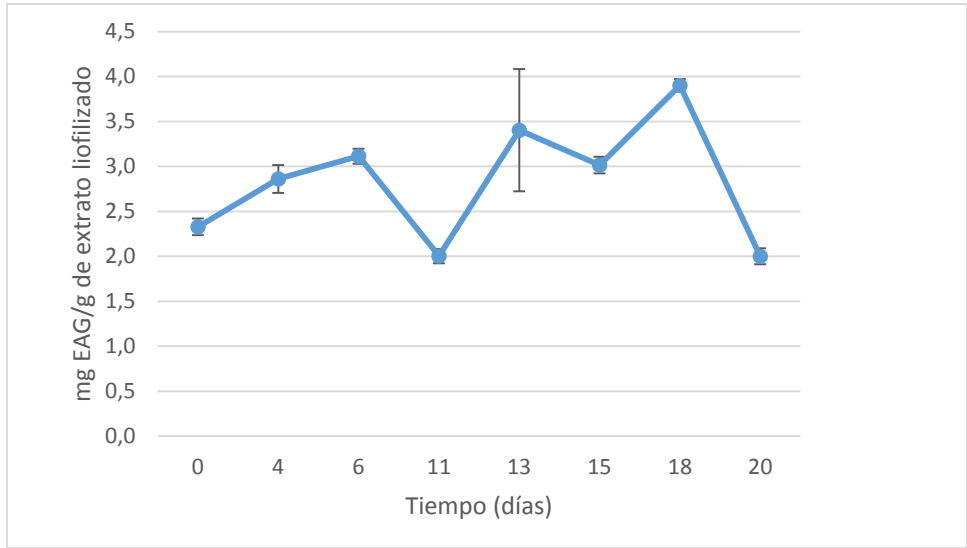


Figura 27. Producción de fenoles totales con respecto al tiempo para el biorreactor 1.

Fuente: CENIBiot, 2017.

- Variación del peso seco y volumen celular empacado después de la elicitación

El proceso de elicitación al modificar el pH, causó la disminución de peso seco, aunque no fueron significativamente diferentes, con respecto al EBO (figura 28). Sin embargo, la variación de pH provocó cambios en la coloración del medio (figura 29).

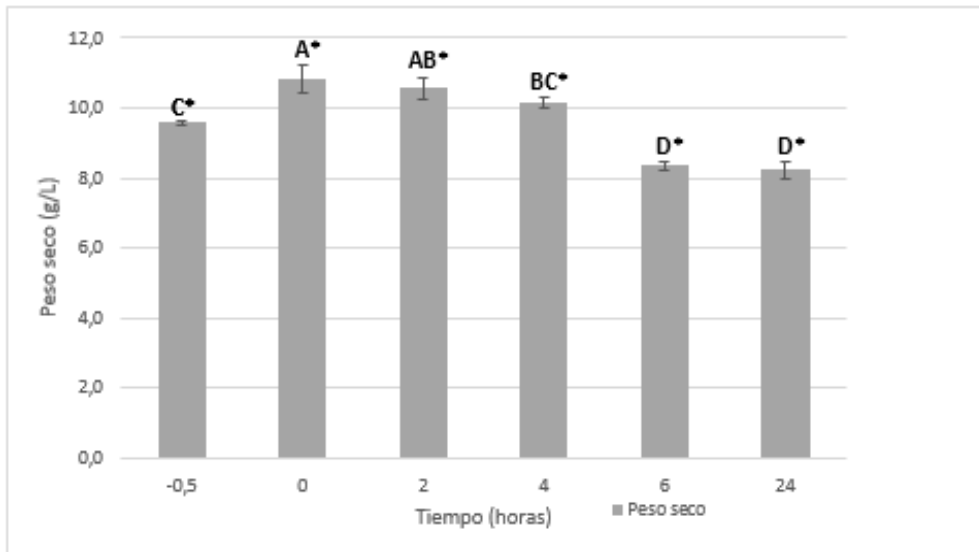


Figura 28. Cinética de crecimiento de peso seco (PS), del cultivo en biorreactor tipo tanque agitado de *M. citrifolia* durante la elicitación por cambio de pH.

Fuente: CENIBiot, 2017.

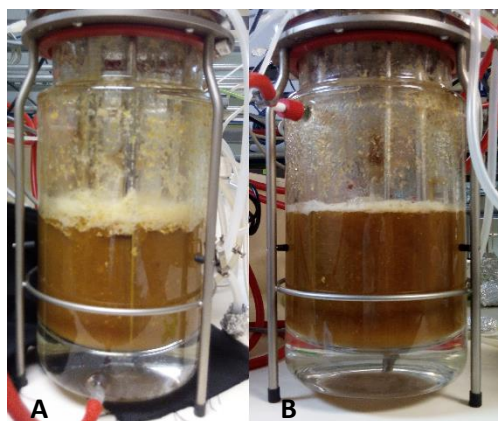


Figura 29. Cambio de coloración del medio al momento de elicitar con el aumento del pH, A) corresponde a la pre-elicitación (-0.5h) y B) a las 0 horas.

Fuente: CENIBiot, 2017.

- Análisis químico de fenoles totales, después de elicitar

En el estudio de los compuestos fenólicos, se logró determinar un aumento significativo de la concentración, a partir de EB1 hasta EB4 (figura 30). La disminución de los compuestos fenólicos durante la elicitación se puede explicar por procesos de degradación.

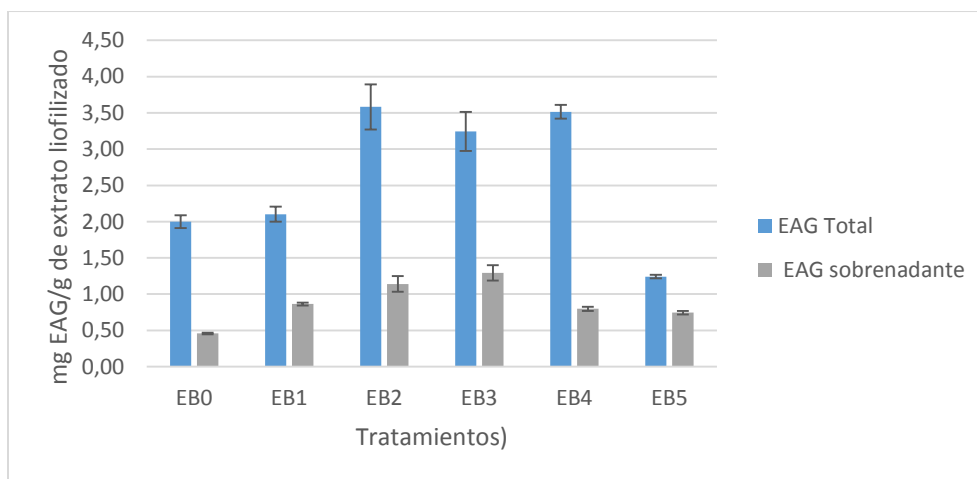


Figura 30. Concentraciones de EAG por gramos de extracto liofilizado, presentes en sobrenadante, células y en total, para los diferentes tiempos de elicitación.

Fuente: CENIBiot, 2017.

La concentración total de fenoles, se puede apreciar en el cuadro 12, que por la prueba de Dunnett, la elicitación a 2, 4 y 6 horas son significativamente diferentes al control (EB0). Por otro lado, las prueba de Fisher y Tukey, revelaron que los tratamientos a EB2y EB4 son significativamente diferentes al resto, con un valor de significancia del 95%, ya que presentan

una media mayor, sin embargo el que presento menor desviación fue el EB4, por lo cual es el tratamiento recomendado.

Cuadro 12. Comparación de medias de los diferentes tratamientos por las pruebas de Fisher y Tukey.

Tratamiento	Media (mg EAG/g de extrato liofilizado)	Prueba de Fisher	Prueba de Tukey
EB0	2,16	C*	B*
EB1	2,35	C	B
EB2	2,60	A	A
EB3	2,92	B	A
EB4	2,99	AB	A
EB5	2,07	C	B

Fuente: CENIBiot, 2017.

*Letras distintas representan diferencias significativas, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y Fisher..

- Caracterización de los extractos fenólicos

Se realizó una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), para cuantificar la presencia de compuestos fenólicos, como la alizarina, que posee un tiempo de retención de aproximadamente 21,5 minutos (anexo 5). Se evidencia la presencia de compuestos fenólicos para el biorreactor 2, antes de elicitar, 6 y 24 horas posteriores a la elicitación, donde se observa un aumento en la intensidad de señales de índole fenólico, así como, la disminución de otras respecto al tiempo (figura 31). Dichos resultados concuerdan con la tendencia obtenida en la determinación de compuesto fenólicos durante el proceso de elicitación, donde se mostró que al aumentar el tiempo, se produce un aumento en el contenido de compuestos fenólicos, y una disminución en el periodo de 24 horas. Este fenómeno se puede explicar por procesos de degradación, así como modificaciones estructurales en la molécula.

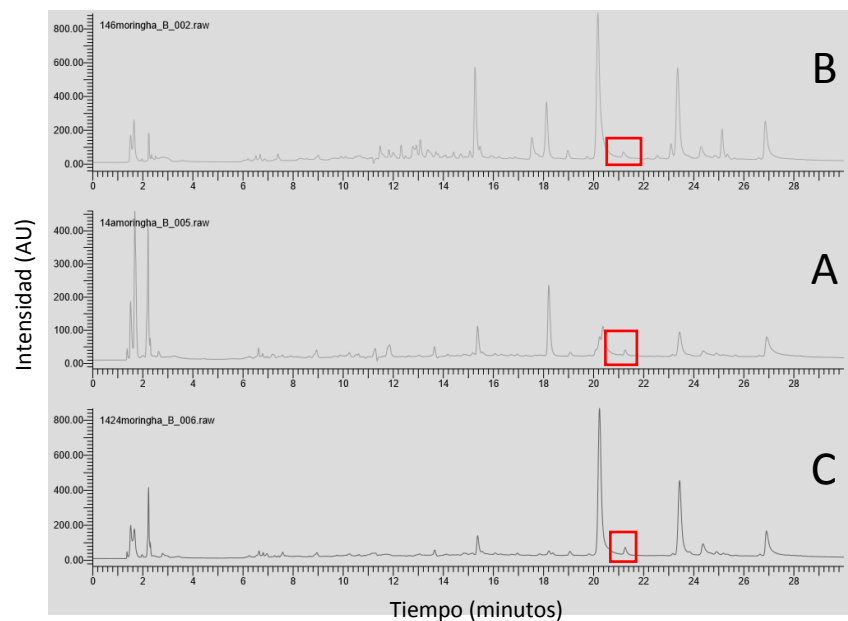


Figura 31. Cromatogramas de los tiempos: antes (A), 6 horas (B) y 24 horas (C), del biorreactor 2, la presencia de alizarina se denota con el cuadro rojo.

Fuente: CENIBiot, 2017.

Debido a la presencia de múltiples compuestos fenólicos, y para evidenciar la presencia de antraquinonas, se realizaron pruebas de identificación por espectrometría de masas, antes de elicitar, como después. Donde por desplazamiento de indolo MRM, se logró determinar la presencia de compuestos de núcleo antraquinónico, como por ejemplo alizarina y otros isómeros, los cuales aumentan la intensidad de concentración con respecto al tiempo. Esto se puede apreciar en las figuras 32 y 33, se observa mayor cantidad de señales m/z (239/211) y concentración, en el tratamiento EB4.

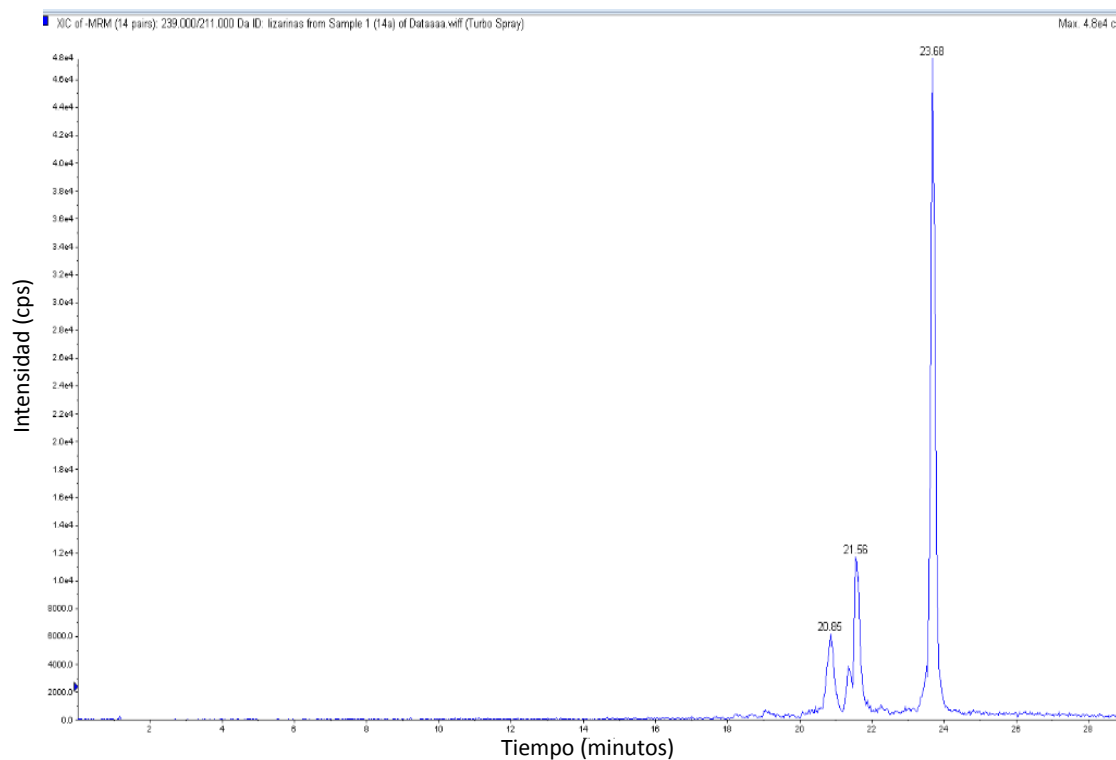


Figura 32. Cromatograma de masas de la muestra EB0, en base al patrón de alizarina.

Fuente: CENIBiot, 2017.

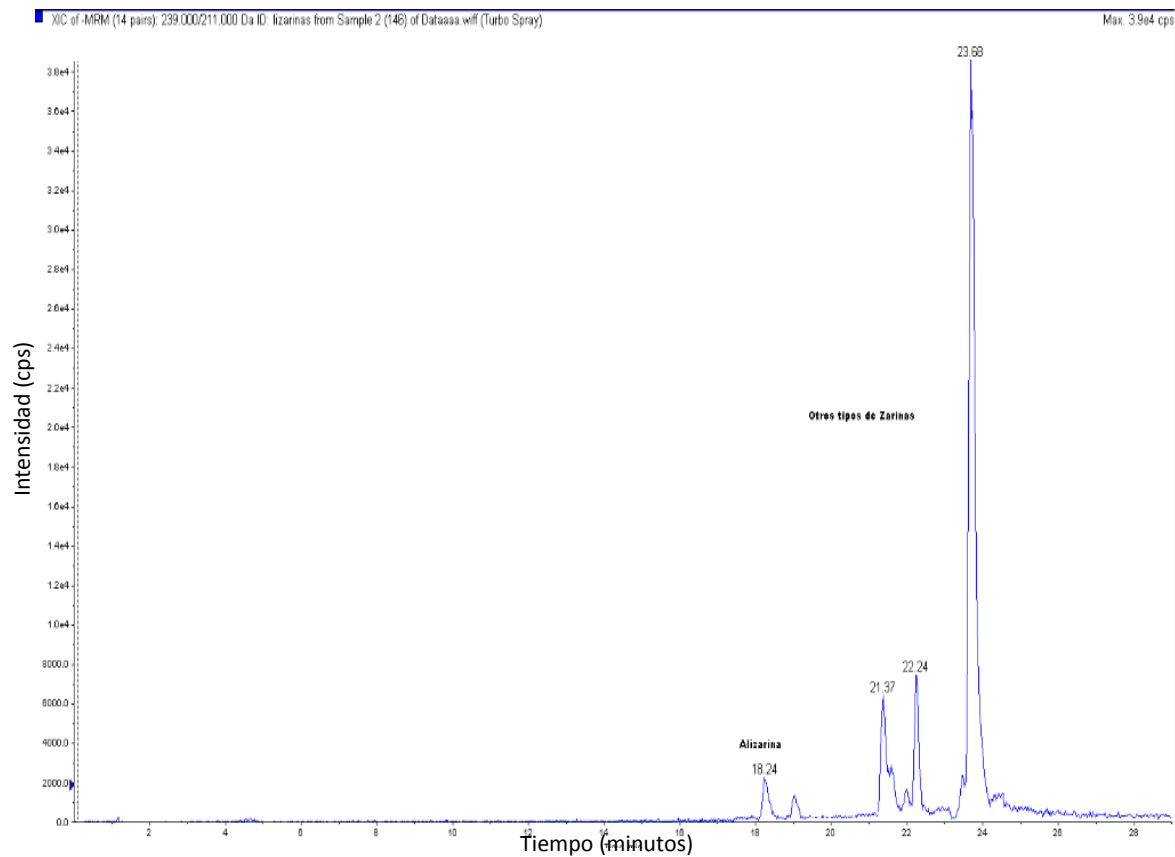


Figura 33. Cromatograma de masas de la muestra EB4, en base al patrón de alizarina.

Fuente: CENIBiot, 2017.

Por otro lado se evidenció la presencia, así como el aumento en la concentración de otros compuestos, tales como 3-meO-histazarina, mujistiin, trihidroxiquinonas, purpurina y antragalol, los cuales afirman el proceso exitoso de elicitación, al promover la producción de compuestos de núcleo antraquinónico. Dichos resultados se pueden apreciar en el anexo (6), donde se logra apreciar la evidencia analítica de compuestos de éste índole.

VI. Discusión

1. Preparación de inóculo

Como se puede observar en la figura 9, se manipularon callos friables y coloreados. Martínez y colaboradores (2007), obtuvieron callos friables pero sin coloración, esto se debe a que utilizaron 2,4-D, en el medio para inducir la multiplicación celular, pero inhibe la producción de antraquinonas. El medio para callo de la presente investigación, tenía el regulador ANA, el cual no interfiere con la síntesis de antraquinonas (Moreira, 2015).

Al establecer las suspensiones se observó un comportamiento similar al reportado por Moreira (2015), donde las suspensiones cultivadas en medio Hagendoorn (1994) con 2,4-D, son blancas y con alta densidad celular, mientras que las de medio Gamborg (1968) con ANA, son coloreadas y con una densidad menor, esto se debe a que el 2,4-D estimula la división celular pero inhibe la producción de antraquinonas, en el caso de ANA, esta no presenta esta limitación, pero la densidad fue menor (Moreira, 2015).

El cambio de color de las suspensiones celulares en medio Gamborg (1968), se evidenció después del segundo subcultivo, esto también fue observado por Hagendoorn y colaboradores (1994) en cultivos de *Morinda citrifolia*, ellos señalaron que no se obtiene un rendimiento adecuado de antraquinonas al cambiar el medio, pero que la producción posterior al segundo subcultivo en medios con ANA, es significativa, lo cual se debe conforme aumenta el número de subcultivos, disminuyen las trazas de 2,4-D en el medio y en el interior de las células; no obstante, advierten que los residuos de medio pueden contener antraquinonas, y si la concentración de estas llega a estar por encima de 0,3mmol por cada gramo de biomasa seca, se inhibe el crecimiento celular.

2. Cultivo de células de *M. citrifolia* en biorreactor de tanque agitado

En la determinación de la K_{La} , se demostró que existen diferencias significativas entre ambos biorreactores. Esto puede deberse a que las mantas ubicadas en los difusores de aire para disminuir el tamaño de las burbujas, no se colocaron de manera idéntica en ambos biorreactores, lo cual podría implicar un crecimiento celular variable. Esto se debe a que la K_{La} expresa la eficiencia con que el oxígeno pasa de fase gaseosa o burbujas, a la fase líquida y luego a las células, por lo que un mayor coeficiente de K_{La} , significa que las células pueden captar mejor el oxígeno, y por ende se mejora el desempeño de los procesos aerobios y el crecimiento (Peña, 2008).

- Cinética de crecimiento

En la cinética de crecimiento basada en el peso seco y volumen celular empacado de ambos biorreactores, se observó una fase lag de 2 días, con inóculos menores a 2 g/L. Baque *et al.* (2013), probaron que la mayor producción de antraquinonas se obtuvo con inóculos de 10g/L, sin embargo el que mostró mayor índice de crecimiento fue el de 5 g/L.

Así mismo, se puede observar que ambas fases exponenciales inician en el día 2 y terminan el día 12, sin embargo, debido a las diferencias de inóculo y K_{la} , el biorreactor 1 presentó un peso seco máximo de 9,29 g/L, mientras que el biorreactor 2 presentó un peso de 7,96 g/L. Esto causó que los parámetros de crecimiento del biorreactor 1 fueran superiores al 2, lo cual sugiere que el inóculo y K_{la} utilizados en el biorreactor 1, permitieron una utilización más eficiente de los recursos del medio.

A partir del día 12 inició la fase estacionaria, el peso máximo alcanzado en durante el presente experimento fue de 11,13g/L, este es inferior al obtenido por Ahmed *et al.* (2008), quienes al utilizar 0,3 vvm obtuvieron 15,6 g/L de peso seco, ellos determinaron que con este caudal de aire, se obtenía el mayor rendimiento en la producción de antraquinonas. Sin embargo, la longevidad de esta fase fue menor en el biorreactor 1, ya que en el día 16 inicia la etapa de muerte (figura 11), producto del aumento de la agitación a 300 rpm en el día 15. Por lo anterior, se deduce que esta velocidad de agitación tuvo un efecto negativo sobre la biomasa, esto se debe a que la agitación ejerce un estrés hidrodinámico que daña las células y afecta el crecimiento celular, como se ha reportado por Bedoya y Hoyos (2010), al trabajar con suspensiones de *Azadirachta indica*.

El aumento de la agitación se implementó como respuesta al incremento de la viscosidad del medio y la presencia de agregados, como se puede observar en la figura 14, donde en el extremo del biorreactor donde se ubicaban los sensores y baffles, se formaban mayores agregados y el movimiento del medio era menos fluido, en comparación con el otro extremo del tanque. El mezclado es indispensable en proceso de cultivo en biorreactor, ya que permite llegar a un grado de homogeneidad que evita la presencia de gradientes de las condiciones fundamentales del medio, que generen diferencias en el crecimiento celular y procesos fisiológicos de las células (Peña, 2008), por lo que para reducir los agregados y gradientes, se debe aumentar la agitación.

Por otro lado, la formación de agregados se debe a la presencia de áreas muertas, provocadas por el impedimento que ejercen los sensores y mamparas sobre el movimiento del medio, donde la

agitación es menos efectiva. Otro efecto que influyó fue el ángulo de las mamparas, a pesar que se utilizó el recomendado para fluidos de alta viscosidad, la cercanía entre el baffle y la pared del frasco, provocó que las células se adhieran entre la mampara y el frasco (Doran, 2013),

La espuma provocada por la respiración celular y la aeración, influyó en la formación de los agregados, ya que favorece la separación de las células del medio de cultivo y su adhesión al frasco, esto a su vez, afecta el suministro de nutrientes a las células y reduciendo las velocidades de crecimiento y los rendimientos del proceso (Bedoya & Hoyos, 2010). Además, se pudo observar que el cambio de coloración de las células adheridas al frasco en dirección al puerto de adición de ácido y base se debió a la exposición directa a hidróxido de sodio 0,5 M.

Al observar las células al microscopio, se apreciaron células con una apariencia filiforme o alargada, algunas con coloración amarillenta, posiblemente por la acumulación de antraquinonas en las vacuolas (Moreira, 2015).

También se observó que al finalizar la esta fase exponencial, la fuente de carbono llegó hasta 0,05 g/L, sin embargo, el crecimiento no se detiene, esto puede ser por el consumo de glucosa remanente en el medio, así como sacarosa acumulada dentro de las células (Bedoya & Hoyos, 2010, Orozco, 2016).

- Análisis químico de fenoles totales

Se observó que durante la fase estacionaria aumentó la acumulación de compuestos fenólicos, como las antraquinonas, sin embargo, el estrés hidrodinámico al cual fueron sometidas las células en el biorreactor, causó la degradación de estos compuestos, este mismo efecto ha sido reportado con *Azadirachta indica*, donde la agitación a 240 rpm, reduce tanto la biomasa como la concentración de azadiractina conforme pasa el tiempo (Bedoya & Hoyos, 2010). La concentración máxima que se logró obtener fue de 9,89 mg EAG/g de extracto liofilizado.

3. Elicitación de células en suspensión de *M. citrifolia*

3.1. Elicitación de suspensiones celulares en matraz

Como se puede apreciar en la figura 15, las células se tornan moradas al ser expuestas a hidróxido de sodio, por lo cual se realizó la prueba con diferentes pH, en el cuadro 10, se puede apreciar que el tratamiento control disminuyó su pH a 3,8, comportamiento que se ha reportado por Moreira

(2015) y Barz *et al.* (1977), donde el pH a los 10 días, desciende aproximadamente a 4, esto se debe principalmente a la absorción de amonio por las células, a partir de la peptona de caseína agregada al medio, una vez que el pH desciende hasta 3,8, el consumo de amonio se inhibe y se propicia la absorción de nitratos (George *et al.*, 2008). El comportamiento del tratamiento ES3, es similar al control, se ha reportado el cultivo de *Morinda citrifolia* en medios con pH de 7, sin diferencias significativas con el control (Barz *et al.*, 1977).

Los tratamientos ES4 y ES5, mostraron el comportamiento esperado, los promedios de peso seco fueron inferiores al control, debido a la apoptosis de las células por el estrés causado, así como, la restricción o imposibilidad de tomar elementos del medio como hierro, magnesio y calcio (Cruz *et al.*, 2007). Esto se vio reflejado en el volumen celular, y en la disminución del pH por la liberación de compuestos ácidos, como los fenoles y otros ácidos producidos por las células, como el ácido shikímico, como se puede ver en el cuadro 10, el pH final fue de 5,0 y 9,1, para los tratamientos ES4 y ES5, respectivamente (Han *et al.*, 2003, Namdeo, 2007). Un comportamiento similar se obtuvo por Moreira (2015), al utilizar metales pesados, el crecimiento en el día 16 disminuye en todos los tratamientos con metales en comparación al peso seco obtenido en el control.

El mayor crecimiento en la biomasa lo presentó el tratamiento ES2, debido a que el pH se reajustó al valor en el cual las células de *M. citrifolia* tiene una mayor tasa de crecimiento (Barz *et al.*, 1977), por otro lado, el pH disminuyó a 4,0, cercano al control, esto es debido a la producción y liberación en el medio, de compuestos ácidos, y a la absorción de amonio restante.

La coloración de las suspensiones también se vio afectada por el cambio de pH, del ES1 al ES4, las suspensiones se van tornando más oscuras y en el ES5 se tornan de color vino, esto se debe a que las antraquinonas presentaron un comportamiento como indicador o reactivo titulante, esto se comprobó cuando al agregar las alícuotas necesarias de hidróxido de sodio, las suspensiones de pH 11 cambiaban instantáneamente de color, la alizarina se ha utilizado en pruebas para la determinación de la presencia de compuestos como fosfato de calcio y carbonato de calcio, por medio de colorimetría (Green, 2001).

Las suspensiones en el tratamiento control concordaron con las reportadas por Zenk *et al.* (1975), quienes obtuvieron suspensiones celulares friables y homogéneas, al observar las células al microscopio, se apreciaron células que concuerdan con las características descritas por Zenk *et al.* (1975), Moreira (2015) y Neumann, Imani y Kumar (2009), ellos observaron que las células en una

suspensión se pueden dividir en tres fracciones: células libres, agregados de hasta más de 10 células y por último células con una apariencia filiforme o alargada. A partir del pH 7 se observó la presencia de inclusiones, que aumentaron con respecto al cambio de pH, los cuales pueden ser acumulaciones de compuestos, para soportar el estrés ocasionado. En las suspensiones a pH 11, también se manifestó una morfología celular diferente a la descrita por Zenk *et al.* (1975), Moreira (2015) y Neumann, Imani y Kumar (2009), ya que las células son de forma redondeada, ligeramente más grandes que las células cultivadas en pH inferiores.

- Análisis químico de fenoles totales

El cambio de la técnica de cuantificación se debió a la relación directamente proporcional entre el aumento de compuestos en total y en el sobrenadante, conforme aumentaba el pH. En el caso del sobrenadante, esto es producto del efecto ión común, donde al utilizar hidróxido de sodio para pH de 9 y 11, se aumenta la concentración de OH^- , lo cual causa que compuestos con grupos hidroxilo reaccionen con los aniones hidróxido, para equilibrar las cargas de los iones, esta interacción aumenta la solubilidad de los compuestos (Universidad de Antioquia, 2004). Aunado al contenido en el sobrenadante, las sales presentes en éste pueden ser cuantificadas por espectrofotometría (Pérez, 1983), por lo cual representa un error en la cuantificación de los compuestos deseados, además, como se detallará más adelante, es posible encontrar otras antraquinonas aparte de la alizarina, así como, la diferencia de color, que requiere cambiar la longitud de onda para el tratamiento ES5 y la utilización de una curva de cuantificación para dicha longitud.

Por otro lado se cambió el solvente, en el ensayo realizado por Moreira (2015), se determinó que el solvente acetona 70%v/v, era el más apropiado para la extracción de antraquinonas totales, no obstante, durante el análisis químico del presente experimento, se tuvieron problemas en la cuantificación por una sobre estimación de la concentración, debido a la evaporación de la solvente, que concentró la muestra. Debido a esto se utilizó etanol al 50v/v, ya que un mayor contenido acuoso en el solvente utilizado incrementa la recuperación de metabolitos debido a que se ejerce una mayor fuerza electrostática, que atrae más antraquinonas a ser liberadas a la matriz del solvente, y si el solvente posee moléculas similares al metabolito que se quiere extraer, el rendimiento de la extracción se ve mejorado (Hemwimon *et al.*, 2007).

Como alternativa para la cuantificación de antraquinonas, se utilizó la técnica de Folin-Ciocalteu, esta sirve para cuantificar fenoles totales, en la cual, los fenoles al oxidarse reaccionan con el

molibdato para formar óxido de molibdeno (II), este puede ser identificado y cuantificado por espectroscopía visible, debido a la absorbancia que posee este compuesto a una longitud de 755nm, por lo que es posible detectar y cuantificar antraquinonas que posean fenoles en sus anillos aromáticos como la alizarina, antragalol, purpurina, entre otras (Muñoz, 2014). Sin embargo, se recomienda para futuros ensayos, utilizar como patrón de extractos crudos de las muestras, ya que como menciona Muñoz (2014), al utilizar extractos de cas y guayaba, se obtuvo valores notablemente más altos y realistas, que con ácido gálico, ya que la curva era más representativa en la proporción de los compuestos.

Como se puede apreciar en la figura 21, el tratamiento con menor concentración de compuestos fenólicos fue el ES2, esto puede deberse a la poca solubilidad de los compuestos, siguiendo el efecto común, al a ver pocos aniones hidróxido en el medio, las moléculas como las antraquinonas no son arrastradas con tanta facilidad, por la falta de interacción entre el soluto y el disolvente, por otro lado, el reajuste del pH, no generó un nivel de estrés, que propiciara la síntesis de los compuestos.

En cuanto a los demás tratamientos, se puede observar que conforme se aumenta el pH, la concentración de fenoles totales aumenta, lo cual sugiere que las células compensaran el cambio, mediante la síntesis y liberación de compuestos de carácter ácido, como son los compuestos fenólicos, para regular el pH del medio, en el caso de las antraquinonas, esto significa aumentar la síntesis de ácido shikímico, ácido mevalónico y 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP) (Namdeo, 2007, Martínez, 2012), también, debido a la lisis celular, se libera ácido jasmónico al medio, el cual sirve de señal para inducir la síntesis de metabolitos secundarios, ante el daños mecánicos o por patógenos (Camarena, 2009, Vivanco *et al.*, 2005).

Los tratamientos ES 3 y ES4 no fueron significativamente diferentes entre ellos, mientras que, el ES5 fue significativamente diferente al resto de tratamientos, con el cual se obtuvo 4,38 mg de EAG/ g de extracto liofilizado, en comparación con los 2,38 mg de EAG/ g de extracto liofilizado del control, esto significó un crecimiento de la producción de un 92,02%.

En *M. citrifolia* y otras especies se han probado diferentes elicitors abióticos, como: estrés hidrodinámico, estrés osmótico por sales, densidades de inóculo, hormonas, precursores del compuesto y uso de metales pesados. En la investigación realizada por Moreira (2015), se determinó que al utilizar 1,86 mg/L de ANA y 0,7 mg/L de kinetina, se promueve la división celular y la producción de antraquinonas, además, al utilizar AlCl_3 a una concentración de 50 μM , se logró

duplicar la producción de antraquinonas. Otros investigadores han utilizado diferentes metales pesados, por ejemplo: en *Gymnema sylvestre* concentraciones de cobre y cobalto de 2mM aumentaron la acumulación de ácido gimnémico a los días 2 y 3 respectivamente (Bhuvanewari *et al*, 2011), con *D. carota*, el uso de cobre inhibió la producción de metabolitos secundarios, pero el cobalto (1nM) aumentó en 163% la producción (Suvarnalatha *et al*, 1994).

Baquec *et al*. (2012), utilizaron la sacarosa como regulador de la producción de antraquinonas en *M. citrifolia*, en este experimento ellos determinaron que al utilizar un 1% del azúcar se logró obtener mayor producción de compuestos, tanto antraquinonas como fenoles y flavonoides, mientras que al 5% se promueve el crecimiento celular. Otros investigadores han utilizado 1mL/L de silicona, para aumentar la producción y liberación de compuestos intracelulares (Bassetti *et al.*, 1996).

Borroto *et al*. (2010), demostró que al utilizar 25mg/L de ácido jasmónico, se logra aumentar la producción de antraquinonas hasta 6,07 mg/g, a los 15 días posteriores a la elicitación, esto se debe a que el ácido es utilizado como señal para la síntesis de metabolitos secundarios, para la defensa de la planta (Camarena, 2009, Morales, 2014), por lo que en las suspensiones, genera un estrés que desencadena las rutas de compuestos como las antraquinonas.

3.2. Elicitación de suspensiones celulares en biorreactor de 7 litros

No se obtuvo diferencias significativas entre las mediciones de K_{La} de los dos biorreactores, por lo que se espera que las células tengan la misma disponibilidad de oxígeno. Esto indica que ambos biorreactores se comportan como réplicas en el experimento.

- Cinética de crecimiento

El comportamiento de los parámetros de pH, temperatura, aireación y agitación, fue igual en ambos biorreactores. También se observó la formación de espuma y agregados, pero en menor magnitud que los observados durante la anterior prueba, esto confirma que los cambios en la distribución de los componentes de la tapa y emplear ángulos rectos de las mamparas, disminuyeron los impedimentos del movimiento del medio, que causaban los agregados (Doran, 2013).

La cinética de crecimiento fue similar a la del biorreactor 2 de la prueba anterior, logrando tener un peso seco máximo de 10,93 g/L, la principal diferencia es el aumento de la longevidad de las fases lag y exponencial, que se puede deber a las suspensiones utilizadas para el inóculo, ya que estas fueron sometidas a más subcultivos en el medio Hagendoorn (1994), por lo que eran más densas que

las utilizadas para el experimento anterior. Sin embargo, las magnitudes de los parámetros de crecimiento, estuvieron entre los valores de los biorreactores 1 y 2, del experimento anterior.

En este caso, se notó que la sacarosa se consumió el día 11, antes del final de la etapa estacionaria, pero no limitó el crecimiento, eso se puede deber a la presencia de glucosa derivada de la disociación de la sacarosa, quedo libre en el medio, y posteriormente fue consumida por las células (Bedoya & Hoyos, 2010, Orozco, 2016).

- Análisis químico de fenoles totales, antes de elicitar

La concentración de fenoles totales, presentó una tendencia creciente, al igual que en la prueba anterior, sin embargo, debido a errores durante la extracción y medición, la cuantificación de los días 11 y 15, fue menor a lo previsto, en el caso del día 20, la disminución de la concentración se debe la adición del sobrenadante, el cual aumentó el peso del extracto liofilizado. Además, las suspensiones utilizadas para el inóculo, repercutieron en la producción de fenoles, ya que como se mencionó anteriormente, es necesario más de un subcultivo en medio Gamborg (1968), para tener una producción significativa (Hagendoorn *et al.*, 1994).

- Variación del peso seco, después de la elicitación

Al igual que la elicitación en matraz, el peso seco disminuyó después del reajuste del pH, debido a la apoptosis de las células, el descenso del peso seco fue paulatino hasta el EB4. No se observó diferencias entre los tiempos de 6 y 24 horas, lo cual sugiere que a partir del EB5 las condiciones del medio ejercían menos estrés sobre las células, como se puede ver en las figuras 22 y 23, a las 6 horas el pH era inferior a 10 y a las 24 horas era cercano a 7, este descenso se debe a la liberación de fenoles y otros compuestos al medio, y como se pudo apreciar en la elicitación en erlenmeyer, el pH de 7 no afecta el crecimiento celular (Barz *et al.*, 1977, Zenk *et al.*, 1975).

Otro fenómeno que se observó, fue el cambio de color del medio al realizar el cambio de pH, como se ha mencionado, las antraquinonas tienen un efecto indicador, por lo cual viran de color (Green, 2001).

- Análisis químico de fenoles totales, después de elicitar

A partir de las 2 horas se puede apreciar un aumento en la concentración de compuestos fenólicos, tanto en el sobrenadante como en total de la muestra, esto puede deberse a la estimulación de la producción de antraquinonas para compensar el pH mediante la síntesis de compuestos de carácter

ácido, y a la liberación de señales como el ácido jasmónico, que induce la síntesis de compuestos secundario (Camarena, 2009, Vivanco *et al.*, 2005). En el tratamiento EB5 se notó la disminución de compuesto en el sobrenadante, pero no es significativamente diferente a los tratamientos EB 2, en cuanto a la concentración total.

La reducción de la cuantificación de fenoles a las 24 horas, se puede deber a la degradación de los compuestos, y a la pérdida de solubilidad (Universidad de Antioquia, 2004).

- Caracterización de los extractos fenólicos

Se utilizó la técnica de HPLC, para comprobar la presencia de compuestos fenólicos en los extractos realizados a las muestras de los biorreactores 1 y 2, a los tiempos -0,5, 6 y 24 horas, esto se debe a que al utilizar una longitud de onda de 280 nm, ésta es absorbida por el anillo aromático de los compuestos fenólicos, entre ellos, los de las antraquinonas, lo que permite su detección y cuantificación (Bussman *et al.*, 2013, Perea, 2013).

Como se puede observar en el anexo 7, para el biorreactor 1, se da un aumento de la intensidad de la señal de los compuestos, con respecto a tiempo -0,5 horas, mientras que para el biorreactor 2, además del aumento de intensidad también se puede notar nuevas señales, al tiempo 6 horas, lo cual implica la síntesis de compuestos, que bajo las condiciones de corrida no se induciría su producción, como se ha mencionado anteriormente, la síntesis de las diferentes antraquinonas está ligada a la ruta del ácido shikímico y la ruta del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), por lo que al cambiar el medio a una condición básica, las células compensarán el cambio mediante la síntesis y liberación de compuestos de carácter ácido, como lo son los compuestos fenólicos, para acidificar el medio (Namdeo, 2007, Martínez, 2012), así como, la inducción de la síntesis de diversos metabolitos secundarios por el ácido jasmónico (Camarena, 2009, Vivanco *et al.*, 2005), como se puede apreciar en la figura 23, donde con el paso del tiempo el pH disminuye de 11 hasta 7.

Se logró percibir la presencia de alizarina en todas las muestras, de otros compuestos con tiempos de retención menores, estos pueden ser antraquinonas que estén en forma glicosilada (Inoue *et al.*, 1981) y que la hidrólisis ácida realizada no lograra romper el enlace glicosídico, por lo que son arrastradas por el solvente, con mayor facilidad que las antraquinonas libres (Bussman *et al.*, 2013).

Por otro lado, las señales disminuyen a las 24 horas, como se ha observado con la concentración de azúcares y la determinación por el método de Folin-Ciocalteu, de fenoles totales, siendo más evidente en el biorreactor 1. Esta disminución en la cantidad y tipo de compuestos, se puede deber

a la reacción que tienen los fenoles con otros compuestos, ya que actúan como mediadores redox y receptores finales de electrones, de reacciones como la desnitrificación (Cadena *et al.*, 2004, Meza, 2008). Además, como la mayoría se encuentran en forma de glicósidos, es posible que las células que se están multiplicando, tomen los glicósidos del medio, para almacenarlos como futura fuente de carbono, así como que pierdan de solubilidad.

Para identificar los posibles compuestos encontrados al realizar la técnica de HPLC, se realizó una espectrometría de masas, con la cual se pudieron encontrar diversos tipos de antraquinonas producidas en biorreactor. Para esto se usaron patrones de fragmentación descritos para diversas antraquinonas

Al utilizar el patrón de fragmentación de alizarinas, se determinó la presencia de hasta cuatro compuestos, a las 6 horas, las cuales son antraquinonas que comparten la misma composición química y masa molecular, con la alizarina, pero difieren en el orden o distribución de los grupos funcionales, por lo que se fragmentan en estructuras similares, que se detectan a diferentes tiempos de retención. La alizarina tiene un peso de 240.21 g/mol, con la fórmula $C_{14}H_8O_4$, dos de los oxígenos son grupos hidroxilo, distribuidos en los carbonos 1 y 2 (Caro *et al.*, 2012, Grollier, Rosenbaum & Cottert, 1986).

En una espectrometría los siguientes compuestos se detectarían junto con la alizarina: la antraflavina con los grupos en las posiciones 2 y 6, el dantron con los grupos en los carbonos 1 y 8, la histazarina en el orden 2 y 3, mientras que la quinizarina con una orden en 1 y 4, otro compuestos que comparte las mismas propiedades es la xantopurpurina con los grupos distribuidos en 1 y 3 (Caro *et al.*, 2012, Grollier, Rosenbaum & Cottert, 1986). En el caso de *M. citrifolia* se han reportado la presencia de alizarina (Chan *et al.*, 2005). La xantopurpurina se ha extraído de *Rubia tinctorum* (Lacasse & Baumann, 2004).

Con 3-meO-histazarina, se logró identificar cuatro picos de detección (anexo 6), en ambos tiempos, con la diferencia que la mayoría de estos picos aumentaron su intensidad a las 6 horas, es decir, después de modificar el pH se intensificó la síntesis de estos compuestos, esto confirma que el aumento de pH tuvo una sinergia positiva con la producción de antraquinonas, debido a que la intensidad del compuesto refleja su concentración (Gómez, 2010). La 3-meO-histazarina posee un peso 254 g/mol, un grupo hidroxilo en el carbono 1 y un grupo alcoxi en el carbono 3; no se reportan antraquinonas similares, pero existen antraquinonas con el mismo peso, que pueden describir

patrones de fragmentación similares, estos son: crisofanol, el cual posee dos grupos hidroxilos en 1 y 8 y un grupo un carbono en el 3, la fomarina con los hidroxilos en los carbonos 1 y 7 y el carbono en el 3, el soranjidiol con los grupos en 1, 7 y 2, respectivamente, por último la rubiadina, con el siguiente orden: hidroxilos 1 y 3, carbono 2 (Caro *et al.*, 2012, Grollier, Rosenbaum & Cottert, 1986). De estos grupos, se ha reportado en *M. citrifolia* la presencia de rubiadina y sorajidiol (Singh, 2012)

En el caso de munjistin, solo se logró visualizar un pico (anexo 6), el cual corresponde a este compuesto, el cual posee una masa de 284 g/mol, con dos grupos hidroxilos en 1 y 3, y un carboxilo en 2, se ha reportado en especies de *Morinda* (Eastaugh *et al.*, 2008), con una coloración de naranja a rojo. Sin embargo, se notó la disminución de intensidad a las 6 horas, esto se puede deber a la oxidación de la muestra.

Además, se logró identificar antragalol y purpurina, ambos poseen un peso de 256 g/mol, el antragalol posee sus grupos hidroxilo en las posiciones 1, 2 y 3, mientras que el orden de los grupos en la purpurina es 1,2 y 4. La flavopurpurina es un compuesto similar a estos, sus grupos están distribuidos en los carbonos 1, 2 y 6 (Caro *et al.*, 2012, Grollier, Rosenbaum & Cottert, 1986). De estos compuestos se ha reportado antragalol en *M. citrifolia* (Singh, 2012) y en el caso de la purpurina se ha reportado en *Galium odoratum* (Lacasse & Baumann, 2004).

En el caso de antragalol y purpurina, se puede observar en el anexo 6, que la intensidad aumentó con respecto a tratamiento pre-elicitación, esto se puede debe a la intensificación de la biosíntesis, en respuesta del cambio de pH, esto confirma el efecto elicitante de exponer las células a un pH de 11.

En comparación con los extractos a partir de suspensiones celulares realizados por Moreira (2015), se logró obtener un mayor número de compuestos antraquinónicos, ya que en dicho trabajo se logró determinar la presencia de un sólo compuesto, cuyas posibles formas eran: antragalol 2-metil éter, purpurina 1-metil éter, 6-hidroxirubiadina, morindona, emodina o 1, 5, 8-trihidroxi-3-metil antraquinona. En otros trabajos realizados, se ha reportado la presencia de otras antraquinonas como: lucina, morindona, nordamnacantal y damnacantal, fisción, morenona, entre otras, las cuales no se pudieron observar, ya sea por la falta de patrones o por la ausencia de compuestos. Al utilizar el patrón de quinalizarina con un peso de 270 g/mol, fue posible identificar: morindona e islandicina,

por lo que sería adecuado utilizar otros patrones de rompimiento de las moléculas presentes en el extracto (Chan *et al.*, 2005).

4. Conclusiones

Mediante el cultivo de células en suspensión de *Morinda citrifolia* en biorreactor tipo tanque agitado de 7 litros, se obtuvo 10,51 g/L de biomasa seca, así como, 9,89 mg EAG/g de extracto liofilizado.

La elicitación mediante hidróxido de sodio a nivel de matraz, produjo un aumento de la concentración de compuestos fenólicos, siendo el tratamiento con pH 11 el de mayor producción de estos compuestos (4,38 mg EAG/g de extracto liofilizado).

La elicitación mediante la adición de hidróxido de sodio en biorreactor, aumentó la síntesis de compuestos fenólicos, pasando de 2,0 mg EAG/g de extracto liofilizado a 3,52 mg EAG/g, a las 6 horas.

El método de Folin-Ciocalteu, permitió cuantificar compuestos fenólicos en cultivos celulares de *M. citrifolia*.

Se determinó mediante espectrometría de masas, la presencia de diversos tipos de antraquinonas, como: alizarina, antragalol, purpurina, rubiadina, sorajidiol y munjistin, en el extracto de 6 horas después de elicitar.

5. Recomendaciones

Para la repetitividad de los ensayos, se recomienda inocular los biorreactores con una concentración conocida de biomasa fresca.

Se recomienda estudiar el efecto de la densidad del inóculo y la concentración de sacarosa, sobre la producción de biomasa y compuestos antraquinónicos, con el fin de optimizar las condiciones de cultivo.

Es importante evaluar métodos alternativos para el manejo de espuma, como utilizar aceite mineral.

Es recomendable sustituir las mantas por accesorios con superficies porosas más homogéneas, para mejorar la reproducibilidad de los ensayos.

También es aconsejable, repetir la elicitación en biorreactor probando tiempos de exposición más largos, ya que en el presente estudio no se controló automáticamente el pH a 11, por lo que este rápidamente disminuyó.

6. Bibliografía

Abdel, A; Shouman, S; Attia, A; Saad, S. 1997. A study on the reproductive toxicity of erythrosine in male mice. *Pharmacological Research*. 35(5): 457-462.

Ahmed, S; Hahn, E; Paek, K. 2008. Aeration volumen and photosynthetic photon flux affect cell growth and secondary metabolite contents in biorreactor cultures of *Morinda citrifolia*. *Jornal of Plant Biology*. 51(3):209-212.

Arias, M.; Aguirre, A.; Angarita, M.; Montoya, C.; Restrepo, J. 2009. Aspectos ingenieriles del cultivo in vitro de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna*. 76 (157): 109-121.

Arias, J. 2013. Optimización de parámetros de cultivo en suspensión de células de la especie vegetal *Thevetia peruviana* y su efecto en la producción de metabolitos secundarios. Tesis M.Sc. Medellín, CO: Universidad Nacional de Colombia. 71p.

Arguedas, L; Cordero, J; Gómez, P; Villalobos, K; Garro, G. 2004. *Morinda citrifolia* (Noni) y sus posibles efectos como planta medicinal. *Tecnología en marcha*. 17(1): 30-33.

Arrieta, G. 2012. Metodología de optimización numérica multi-objetivo y de simulación numérica de la interacción fluido-estructura del desempeño de un agitador con impulsor PBT variando ángulo, altura y velocidad de rotación utilizando ANSYS CFX, MECHANICAL y DESIGN EXPLORER. Tesis B.Sc. Lima, PE: Pontificia Universidad Católica Del Perú. 109p.

Baque, A; Elgirban, A; Lee, E; Paek, K. 2012. Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone, phenolics, flavonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(2): 405-415.

Baque, A; Shiragi, H; Moh, S; Lee, E; Paek, K. 2013. Production of biomass and bioactive compounds by adventitious root suspension culture of *Morinda citrifolia* (L) in liquid-phase airlift ballon-type biorreactor. *In Vitro Cell. Dev.Biol.-Plant*. 49:737-749.

Barz, W; Reinhard, E; Zenk, M. 1976. Plant tissue culture and its bio-technological application. Springer- Velarg. New York, US. 415 p.

Bassetti, L; Pinjnenbur, J; Tramper, J. 1996. Silicone-stimulated anthraquinone production and release by *Morinda citrifolia* in a Two-Liquid-Phase Sistem. Biotechnology Letters. 18(4): 377-382.

BBC. El 2012. El misterio de las pinturas rupestres más antiguas del mundo. En línea. Consultado 06 de marzo, 2017. Consultado 07 de abril. 2017. Disponible en http://www.bbc.com/mundo/noticias/2012/06/120614_pinturas_altamira_misterio_antiguas_lav.shtml

Bechtold, T; Mussak, R. 2009. Handbook of Natural Colorants (1era Ed.). Wiltshire: John Wiley & Sons. 434 pp.

Bedoya, J; Hoyos, R. 2010. Efecto de la Relación Agitación-Aireación sobre el Crecimiento Celular y la Producción de Azadiractina en Cultivos Celulares de *Azadirachta indica* A. Juss. Revista Facultad Nacional de Agronomía. 63(1):5293-5305.

Bedoya, J; Sánchez, C. 2010. Efectos hidrodinámicos sobre la producción de azadiractina en un biorreactor de tanque agitado. Revista Politécnica. 6(10): 109-121.

Birhanli, A; Ozmen, M. 2005. Evaluation of the toxicity and teratogenity of six commercial textile dyes using the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus. Drug and chemical toxicology. 28(1): 51-65.

Bhowmik, P; Basu, S; Goyal, A. 2009. Advances in Biotechnology. Kagawa: Bentham Science Publishers. 309 pp.

Bhuvanewari, C; Rao, K; Gandi, S; Giri, A. 2011. Abiotic elicitation of gymnemic acid in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(2): 741-747.

Borroto, J; Blanco, M; Rivas, M; Hernández, M; Concepción, O; Sánchez, T. 2005. Meroterpenos (Antraquinonas) en diferentes partes de la planta *Morinda royoc* L. Revista CENIC ciencias biológicas, 36.

Borroto, J., Trujillo, R., Hernandez, 2010. Antraquinonas a partir del cultivo in vitro de raíces de *Morinda royoc* L. Identificación y actividad antimicrobiana. Consultado 07 de abril. 2016. Disponible en <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CU2011400646>.

Bussmann, R; Hennig, L; Giannis, A; Ortwein, J; Kutchan, T; Feng, X. 2013. Anthraquinone Content in Noni (*Morinda citrifolia* L.). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 1-5.

Cadena, A; Texier, A; González, I; Gómez, J. 2004. Efecto de las quinonas en la oxidación anaerobia de materia orgánica por un lodo desnitrificante. Consultado 07 de abril. 2017. Disponible en http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_IV/CARTELES/CIV-113.pdf

Camarena, G. 2009. Señales en la interacción planta insecto. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. Distrito federal. Mx. 15(1) 81-85.

Caro, Y; Anamale, L; Fouillaud, M; Laurent, P; Pett, T; Dufosse, L. 2012. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. Nat. Prod. Bioprospect. 2: 174–193.

Carrillo, P. 2011. Comprobación del efecto hipoglucemiante del zumo del fruto del noni (*Morinda citrifolia*) en ratas (*Rattus norvegicus*) con hiperglucemia inducida. Tesis B.Sc. Riobamba, EC: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 139p.

Chan, Y; Vaillant, F; Perez, A; Reynes, M; Brillouet, J; Braf, P. 2005. The noni Fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. Journal of Food Composition and Analysis. EARTH University, Limón, CR. 19:645-654.

Chong, T; Abdullah, M; Fadzillah, N; Lai, O; Lajis, N. 2005. Jasmonic acid elicitation of anthraquinones with some associated enzymic and non-enzymic antioxidant responses in *Morinda elliptica*. Enzyme and Microbial Technology. 36(4): 469–477.

Dave, H; Ledwani, L. 2012. A review on anthraquinones isolated from Cassia species and their applications. Indian Journal of Natural Products and Resources. 3(3): 291-319.

Doran, P. 2013. Bioprocess Engineering Principles. Elsevier. Waltham, US. 918 p.

Dornenburg, H. & Knorr, D. 1994. Effectiveness of Plant-Derived and Microbial Polysaccharides as Elicitors for Anthraquinone Synthesis in *Morinda citrifolia* Cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4): 1048-1052.

Eastaugh, N; Walsh, V; Chaplin, T; Siddall, R. 2008. *Pigment Compendium: A dictionary and optical microscopy of historical pigments*. Elsevier. Waltham, US. 960 p.

European Food Safety Authority (EFSA). 2012. Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for anthraquinone according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. *European Food Safety Authority*. 10(6): 2761.

Federal Institute for Risk Assessment (BfR). 2013. BfR removes anthraquinone from its list of recommendations for food packaging. Consultado 07 de abril. 2017. Disponible en www.bfr.bund.de

George, E; Hall, M; De Klerk, G. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture (3era Ed.)*. Volume 1: The Background. Dordrecht, Países Bajos: Springer. 501 pp.

Gómez, M. 2010. Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales Tesis Ph. D. Granada, GT. Universidad de Granada. 298p.

Green.O.2001. *A Manual of Practical Laboratory and Field Techniques in Palaeobiology*. Springer Netherlands. 538p.

Grollier, J; Rosenbaum, G; Cotteret, J. 1986. Use of hydroxyanthraquinones for the coloration of human keratin fibres. Consultado 07 de mayo. 2017. Disponible en <https://patents.google.com/patent/US4602913A/en>

Hagendoorn, M; Van der Plas, L; Segers, G. 1994. Accumulation of Anthraquinones in *Morinda citrifolia* cell suspensions. *Plant cell, tissue and organ culture*. 38: 227-234.

Han, Y; Roytrakul, S; Verberne, M; Heijden, R; Linthorst, H; Verporte, R. 2003. Cloning of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Morinda citrifolia* and analysis of its expression in relation to anthraquinone accumulation. *Plant Science*, 164(6): 911-917.

Han, Y. 2002. Biosynthesis of Anthraquinones in Cell Cultures of *Cinchona* and *Morinda* Species. 141 pp.

- Hemwimon, S; Pavasant, P; Shotipruk, A. 2007. Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 54(1): 44–50.
- Herrera, A. 2008. La importancia de la comunicación en la formación de marca para un artista de la música. Tesis B.Sc. Bogotá, CO: Pontificia Universidad Javeriana. 121p.
- Huang, T; McDonald, K. 2009. Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal*. 45(3):168–184.
- Hvoslef, A., y Preil, W. 2005. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer. Holanda. 588p
- Jiménez, V. 2003. Elaboración de cuatro productos naturales a partir de Noni (*Morinda citrifolia* L). Tesis Lic. Guácimo, CR: Universidad EARTH.
- Kagedal, K; Bironaite, D; Ollinger, K. 1999. Anthraquinone cytotoxicity and apoptosis in primary cultures of rat hepatocytes. *Free Radical Research*. 31(5): 419-428.
- Krishnaiah, D; Nithyanandam, R; Sarbatly, R. 2012. Phytochemical Constituents and Activities of *Morinda citrifolia* L. *Phytochemicals*. MY: Intech. 538 pp.
- Komaraiah, P.; Kishor, K.; Carlsson, M.; Magnusson, K. & Mandenius, C. (2005). Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures. *Plant Science*, 168(5): 1337–1344.
- Lacasse, K; Baumann, W. 2004. *Textile Chemicals: Environmental Data and Facts*. Springer-Verlag. New York, US. 1181 p.
- Martínez, M; Hernández, C; Restrepo, L. 2007. Estandarización de un protocolo para la obtención de callos friables de borojó (*Borojoa patinoi* Cuatr.) fase I. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 9(2): 45-55.
- Martínez, A. 2012. *Quinonas y Compuestos Relacionados*. Medellín: Universidad de Antioquia. Consultado 07 de abril. 2017. Disponible en <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/quinonas.pdf>

Meza, E. 2008. Efecto de distintos mediadores redox en la eliminación simultánea de sulfuro y p - cresol por vía desnitrificante. Tesis Ph. D. Distrito federal, MX. Universidad Autonoma Metropolitana. 111p.

Mintel. 2014. Un nuevo informe de Mintel y Leatherhead Food Research revela que las ventas de colorantes alimentarios naturales superaron a las de colorantes artificiales/sintéticos (en línea). Consultado 07 de abril. 2017. Disponible en <http://es.mintel.com/blog/las-ventas-de-colorantes-alimentarios-naturales-suben>.

Miranda, M; Cuéllar, A. 2001. Farmacognosia y Productos Naturales. Ed. Félix Varela. Ciudad de La Habana, CU. pp. 159-161, 168-171, 242-243, 261-265, 273-274, 278-283.

Mohan, S; Saxena, P. 2009. Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants. Humana Press. New York, US. 398 pp.

Mondragón, V. 2006. Molienda de pigmentos hasta tamaño de partícula submicron con medición de potencial Z. Tesis Lic. Puebla. MX: Universidad de las Américas Puebla. 124p.

Morales, A. 2014. Plegable: Ácido jasmónico. Relación planta-insecto Especies de *Coccinelidae*. Biblioteca INIVIT. Consultado 07 de abril. 2017. Disponible en https://www.ecured.cu/%C3%81cido_jasm%C3%B3nico.

Moreira, M. 2015. Producción de antraquinonas a partir de cultivos celulares de *Morinda citrifolia* (Noni). Tesis B.Sc. Cartago, CR: Instituto tecnológico de Costa Rica. 84p.

Muñoz, A; Ramos, D; Alvarado, C; Castañeda, B. 2007. Evaluación de la Capacidad Antioxidante y Contenido de Compuestos Fenólicos en recursos vegetales promisorios. Rev Soc Quím Perú. 73(3): 142-149.

Muñoz, R. 2014. Bioprospección Fitoquímica de dos variedades de frutas de cas (*Psidium friedrichsthalianum* y *Psidium guineense*) oriundas de Costa Rica. Tesis Lic. Heredia, CR. Universidad Nacional de Costa Rica. 83p.

Mustafa, N; Winter, W; Iren, F. & Verporte, R. 2011. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. Nature protocols, 6(6): 715-742.

Namdeo, A. 2007. Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites: A Review. Department of Phyto-Biotechnology and Pharmacognosy, Centre for Advanced Research in

Pharmaceutical Sciences College of Pharmacy, Bharati Vidyapeeth University, Erandwane, INDIA. 1(1):69-79.

Neumann, K.; Imani, J. & Kumar, A. 2009. Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Basics and Application. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New Delhi, IN. 333 pp.

Orozco, C. 2016. Evaluación de la multiplicación in vitro de *Saccharum officinarum* (caña de azúcar) en sistemas de inmersión temporal. Tesis B.Sc. Cartago, CR: Instituto tecnológico de Costa Rica. 108p.

Pandurang, V; Sinnathambi, A; Ashok, P; Yeshmania, S. (2008). Wound Healing and Antioxidant Activities of *Morinda citrifolia* Leaf Extract in Rats. Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics, 71: 49-52.

Patnaik, P. 2007. A Comprehensive Guide to the Hazardous Properties of Chemical Substances. New Jersey, US, John Wiley & Sons. 1059 p.

Peña, V. 2008. Diseño de un sensor suave para estimar la K_{La} de un sistema fermentación utilizando sistemas no lineales. Tesis M.Sc. Distrito Federal, MX. Instituto Politécnico Nacional. 187p.

Perea, X. 2013. Análisis de compuestos fenólicos y valoración de bioactividad de extractos de testa de *Jatropha curcas* L. no toxica. Tesis M.Sc. Sinaloa, MX: Instituto Politécnico Nacional. 132p.

Potterat, O; Hamburger, M. 2007. *Morinda citrifolia* (Noni) Fruit-Phytochemistry, Pharmacology, Safety. Planta Med. 73:191-199.

Robles, M; Aguilar, A; Gutiérrez, M; Rodríguez, F; Morales, J; Guerrero, P; Madrigal, J; Del-Toro, L. 2016. Identificación Cualitativa de Metabolitos Secundarios y Determinación de la Citotoxicidad de Extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri* PITTIER). Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad de Sonora. Sonora, MX. 18(3): 3-8.

Ruíz, S; Venegas, E; Chávez, M; Eustaquio, C. 2010. Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. “noni” y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. UCV – Scientia. 2(2): 11-22

Sadegui, H; Tabarzadi, M; Zargui, A. 2004. Synthesis and cytotoxic evaluation of two novel anthraquinone derivates. Farmaco. 59(8): 645-649.

Sánchez, V; Santa, J. 2009. Estudio de antraquinonas presentes en extractos de mucílago y hojas de Aloe Vera de plantas cultivadas en la región cafetera. Tesis B.Sc. Pereira, CO: Universidad Tecnológica de Pereira. 60p

Shohael, A; Chakrabarty, D; Yu, K; Hahn, E; Paek, K. 2005. Application of bioreactor system for large-scale production of *Eleutherococcus sessiliflorus* somatic embryos in an airlift bioreactor and production of eleutherosides. *Journal of Biotechnology*. 120: 228–236.

Singh, D. 2012. *Morinda citrifolia* L. (Noni): A review of the scientific validation for its nutritional and therapeutic properties. *Journal of Diabetes and Endocrinolog*. Central Agricultural Research Institute, Port Blair, India. 3(6): 77-91.

Su, W. 2006. Biorreactor engineering for recombinant protein production using plant cell suspension culture. EN: *Plant Tissue Culture Engineering*. Eds. SD Gupta; Y Ibaraki. Netherlands. Springer. 6: 135-159.

Suvarnalatha, G; Rajendran, L; Ravishankar, G. & Venkataraman, L. 1994. Elicitation of Anthocyanun Production in Cell Cultures of Carrot (*Daucus carota* L) by using Elicitors and Abiotic stress. *Biotechnology letters*, 16(12): 1275-1280.

Taticcek; R., Moo-Young, M; Legge, R. 1991. The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 24:139-158

Tsuda, S; Murakami, M; Matsusaka, N; Kano, K; Taniguchi, K; Sasaki, Y. 2001. DNA damage induced by Red Food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicological Sciences*. 61:92-99.

Ulloa, J; Ulloa, P; Ramírez, J; Ulloa, B. 2012. El noni: propiedades, usos y aplicaciones potenciales. *Revista Fuente*. Universidad de Nayarit. Nayarit, Mx. 4(10):44-49.

Universidad de Antioquia. 2004. Química analítica I; Factores que afectan la solubilidad. Consultado 07 de abril. 2017. Disponible en http://docencia.udea.edu.co/cen/QuimicaAnaliticaI/otros_equilibrios/factores.htm

Verporte, R., Van der Heijden, R., Hoopen, H., Memelink, J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters* 21: 467–479

Vivanco, J; Cosio, E; Loyola, V; Flores, H. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia*. Lima, Perú. 68-75.

Weathers, P; Towler, M; Xu, J. 2010. Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85(5): 1339–1351.

Zenk, M; El-Shagi, H; Schulte, U. 1975. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica*. S1: 79–101.

7. Anexos

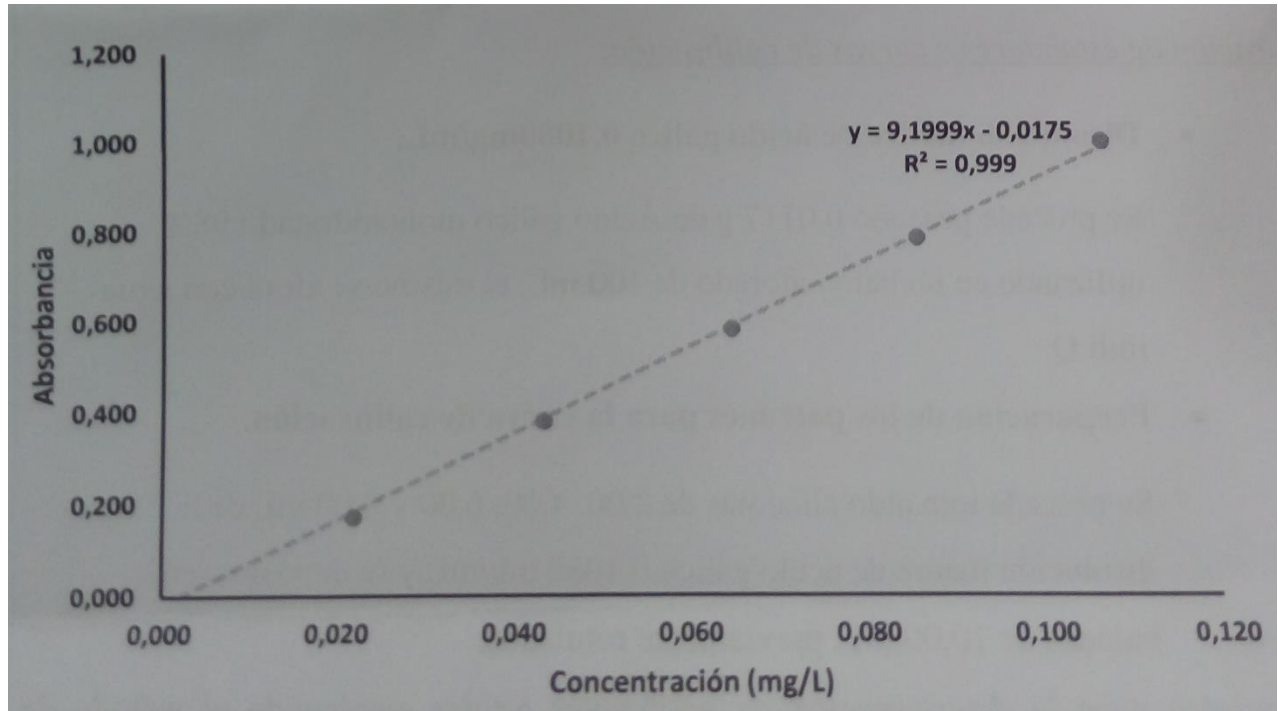
Anexo 1. Composición del medio de cultivo Hagendoorn (1994).

Compuesto	Concentración (mg/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
KNO ₃	2500
CaCl ₂ *2H ₂ O	113,24
MgSO ₄ *7H ₂ O	122,09
NaH ₂ PO ₄	130,5
EDTA-Fe/Na	43
H ₃ BO ₃	3
MnSO ₄	10
ZnSO ₄ *H ₂ O	2
KI	0,75
Na ₂ MoO ₄ *H ₂ O	0,25
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025
Myo-Inositol	100
Ácido nicotínico	1
Piridoxina	1
Tiamina	10

Anexo 2. Composición del medio de cultivo Gamborg (1968).

Compuesto	Concentración (mg/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
KNO ₃	2500
CaCl ₂ *2H ₂ O	113,23
MgSO ₄ *7H ₂ O	121,56
NaH ₂ PO ₄	130,88
EDTA-Fe/Na	36,7
H ₃ BO ₃	3
MnSO ₄	10
ZnSO ₄ *H ₂ O	2
KI	0,75
Na ₂ MoO ₄ *H ₂ O	0,25
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025
Myo-Inositol	100
Ácido nicotínico	1
Piridoxina	1
Tiamina	10

Anexo 3. Estimación de la concentración de miligramos de ácido gálico por miligramos material liofilizado.



$$mg \text{ EAG} = \left(\frac{\text{absorbancia} + 0,0175}{9,199} \right) * \text{Volumen de resuspensión} *$$

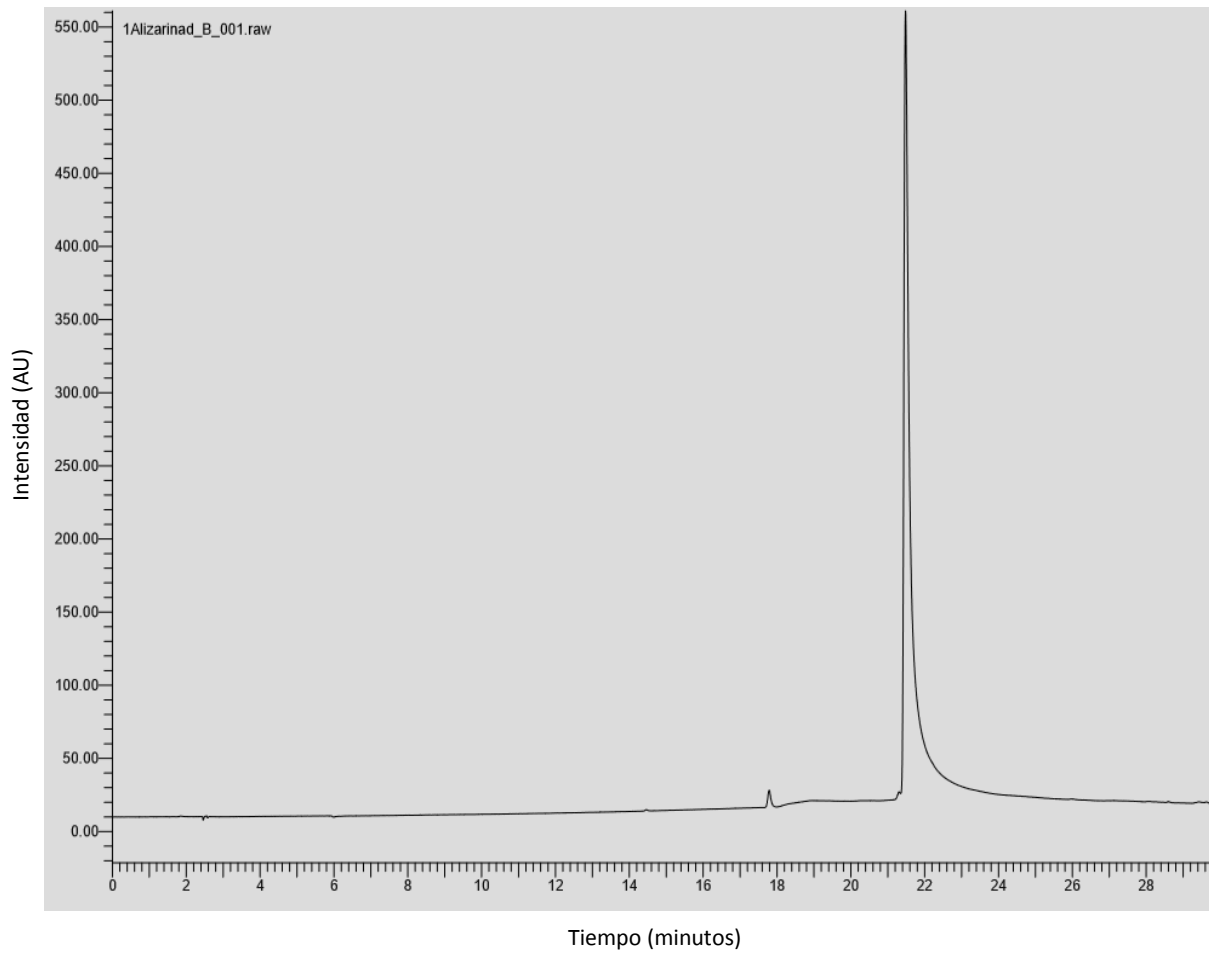
- *En el sobrenadante se utiliza 5 mL

$$\frac{mg \text{ EAG}}{g \text{ muestra liofilizada}} = \left(\frac{mg \text{ EAG}}{masa \text{ liofilizada}} \right)$$

Anexo 4. Supuestos estadístico de las variables del tratamiento de elicitación.

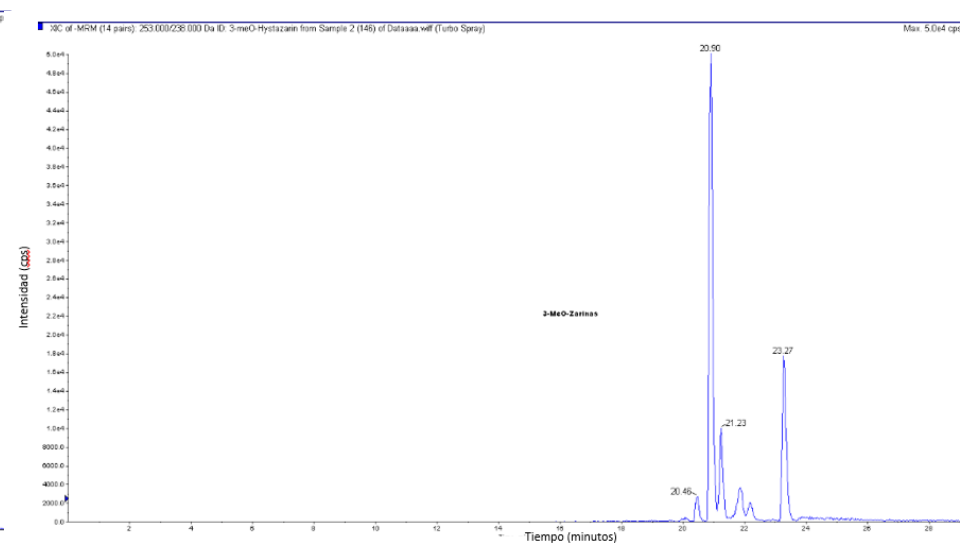
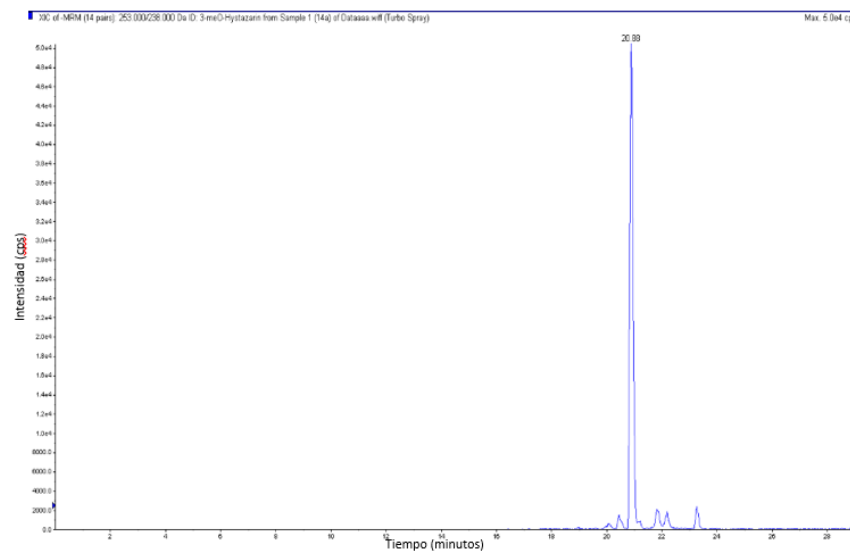
Datos	Prueba de Normalidad de Anderson Darling(valor de p)	Homocedasticidad por Levene (valor de p)
Peso seco suspensión	0,166	0,987
Residuos de peso seco suspensión	0,210	
EAG suspensión	0,099	0,894
Residuos de EAG suspensión	0,610	
Peso seco post elicitación	0,060	0,805
Residuos de peso seco post elicitación	0,718	
EAG post elicitación	0,176	0,741
Residuos de EAG post elicitación	0,268	

Anexo 5. Tiempo de retención del patrón de alizarina, con un tiempo de retención de 21,5 minutos.

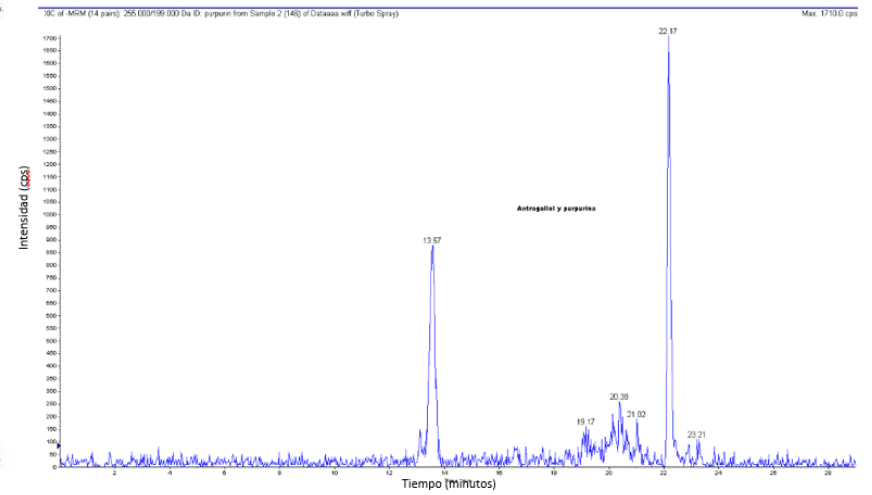
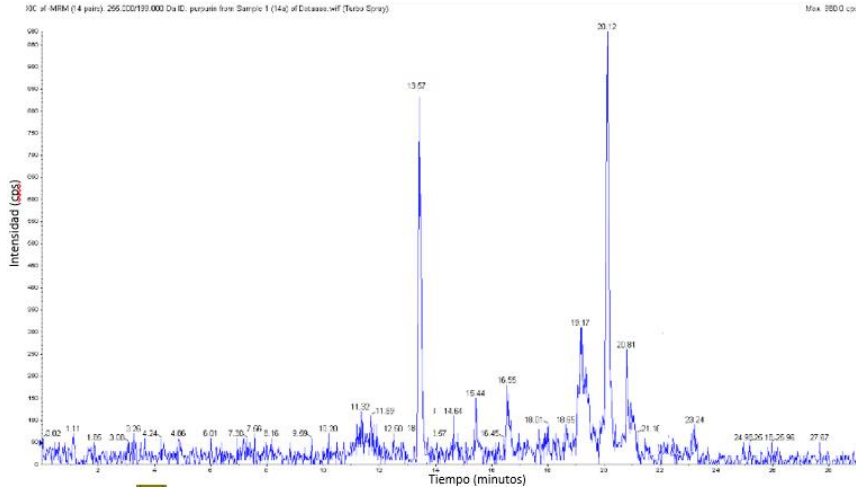


Anexo 6. Cromatograma de masas de las muestras -0,5H (izquierda) y 6 horas (derecha).

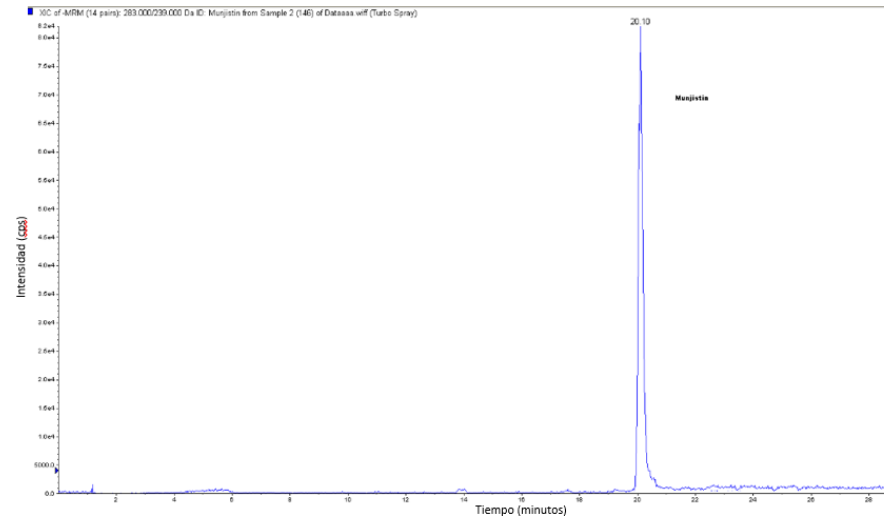
3-meO-histazarina.



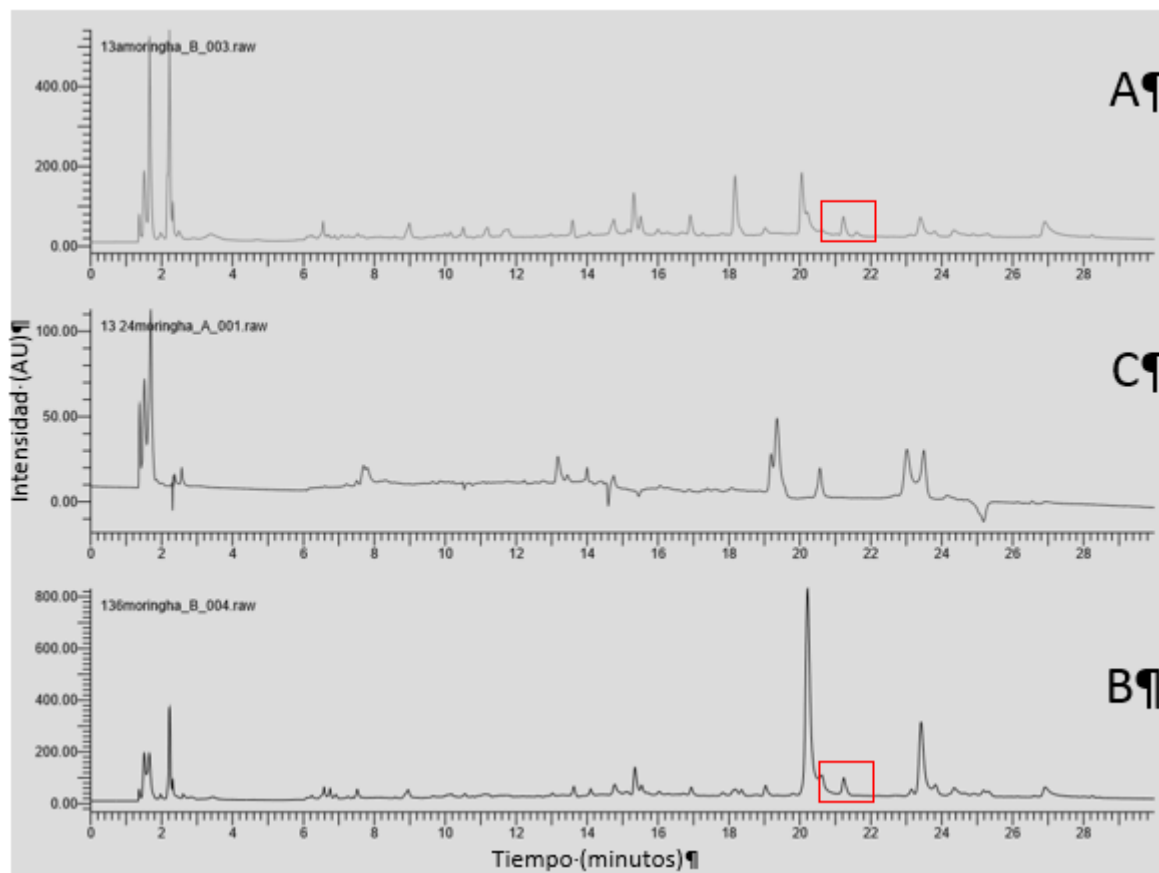
Purpurina



Munjistin



Anexo 7. Cromatogramas del biorreactor 1.



Tiempos: -0,5 horas (A), 6 horas (B) y 24 horas (C), la presencia de alizarina se denota con el cuadro rojo.