



## **Unidad de Bioprospección**

**Informe de Avance #1, al 30 de setiembre de 2015**

**Proyecto: GEF**

**“Promoviendo la aplicación del protocolo de Nagoya, a través del desarrollo de productos basados en la naturaleza, la distribución de los beneficios y la conservación de la biodiversidad en Costa Rica”**

**Elaborado por: Licda. Isis Calderón Tovar**

## Antecedentes

A partir de varios proyectos desarrollados entre el INBio y sus colaboradores, se obtuvieron 2 sustancias con potencial para ser usadas en la protección de cultivos, un compuesto alcaloide derivado del árbol del género *Lonchocarpus* y un compuesto derivado de un microhongo.

En estos estudios se determinó que tanto el aislamiento del microhongo 468B como el extracto obtenido de su fermentación, inducen a la activación de los sistemas de defensa naturales de las plantas en cultivos *in vitro* y en invernaderos, contra enfermedades de hongos y bacterias. Estos resultados le confirieron a este hongo un gran potencial para la protección de cultivos, pudiendo convertirse en un producto Bio-activador de resistencia (BAR).

Por otro lado el compuesto alcaloide 2,5-dihidroxi metil-3,4-dihidroxipirrolidina también conocido como DMDP, se consideró promisorio por reportar una importante actividad nematocida sin efectos tóxicos inmediatos, y por provenir de una fuente de origen apta para una producción sostenible, como lo es el árbol del género *Lonchocarpus*.

En vista de lo anterior, en el primer semestre de este proyecto se iniciaron las actividades relacionadas con los componentes, 1, 2 y 3 que involucran actividades relacionadas con el mejoramiento y estandarización de los protocolos de fermentación y extracción química para la producción de los compuestos de interés, necesarios para la evaluación de los mismos, en diferentes cultivos para la comprobación de su eficacia como protectores de éstos.

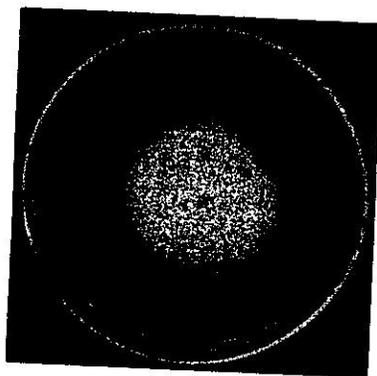
## Avance de Actividades

## **Componente 1: Prueba de concepto para los agentes de protección de cultivos basados en la naturaleza aplicada a dos cultivos de importancia económica en Costa Rica.**

### **1.1 Obtención de extractos estandarizados con concentraciones conocidas del componente activo para pruebas de formulación.**

#### **1.1.a Reactivación e Identificación Molecular del hongo 468B**

Para dar inicio a la parte técnica del proyecto se procedió a la reactivación del hongo 468B (Figura 1) y a la confirmación de la identificación del mismo empleando la taxonomía molecular, esto es, amplificando la región ITS (Internal transcribed spacer) utilizando 3 primers. La secuenciación del ADN se realizó en el Instituto Dana Farber, en Boston, Estados Unidos; y la comparación de las secuencias se realizó contra las bases de datos del National Center for Biotechnology information NCBI, en el GenBank usando el programa BLAST (Diciembre, 2014).



**Figura 1. Aislamiento de hongo 468B.**

#### **1.1.b Pruebas de fermentación y extracción química para mejorar la producción del compuesto activo(BAR) derivado del hongo 468B.**

De Noviembre del 2014 a Marzo del 2015 se hicieron diferentes pruebas de fermentación a pequeña escala (70ml) con el hongo 468B para mejorar la producción del compuesto activo. Estas pruebas incluyeron el protocolo original usado en el proyecto anterior donde se reportó la actividad de este hongo (Protocolo A) y además diferentes medios y condiciones de cultivo donde se variaron fuente de carbono, temperatura, pH, agitación, etc.

Se evaluaron 9 protocolos de fermentación y 7 protocolos de extracción química, y la selección del mejor protocolo en ambos casos se llevó a cabo tomando en cuenta el rendimiento y el porcentaje de pureza del compuesto activo en los extractos, lo cual fue determinado por cuantificación en Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC por sus siglas en inglés). El protocolo escogido fue el que produjo más compuesto (mejorando el rendimiento en cantidad, pureza del compuesto y además, disminuyó los días de fermentación).

**Cuadro 2.** Producción de compuesto activo BAR por fermentación del hongo 468B en diferentes protocolos de fermentación a pequeña escala.

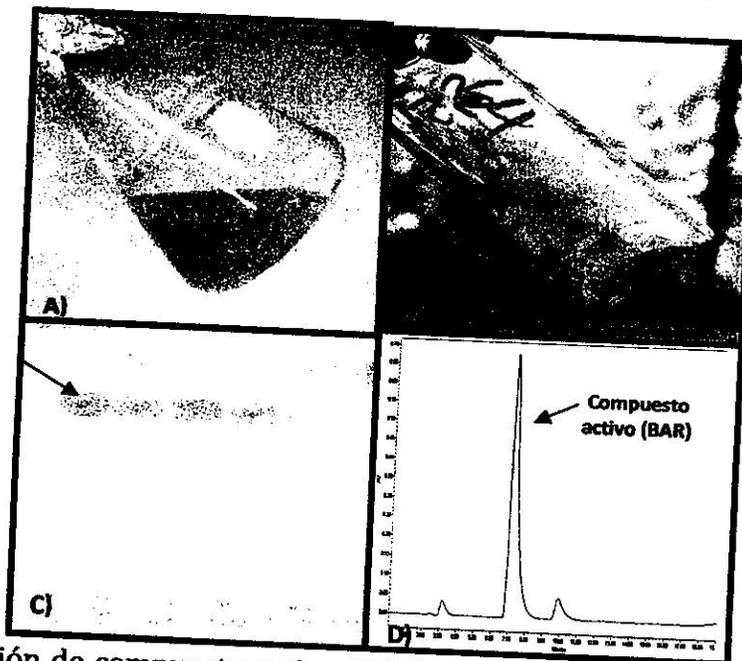
	Protocolo de Fermentación	Rendimiento (mg/ml)	% pureza de compuesto en extracto (% m/m)
1	A	0,202	45
2	B	0,778	80,8
3	Bm	0,27	75,3
4	B.1	0,20	78,6
5	B.2	0,11	76,8
6	C	0,111	31,4
7	D	0,748	80
8	E	0,5115	61,5
9	F	2,32	88,5

De estas pruebas, el protocolo F resultó ser el mejor superando en rendimiento y calidad al protocolo original. (Cuadro 2 y 3).

**Cuadro 3:** Comparación de protocolos de fermentación (original y optimizado) del hongo 468B en relación a la producción de del compuesto activo (BAR).

Protocolo	Días de fermentación	% pureza decompuesto en extracto (% m/m)	Rendimiento (mg de compuesto/ml de fermento)
A (original año 2009)	27	32,2	0,09
F (optimizado 2015)*	15	77,1	2,5

\*Este dato varia del cuadro 2 ya que se toma el promedio de producción de escala pequeña y grande.



**Figura 2.** Producción de compuesto activo (BAR) por el hongo 468B. A) Fermento líquido del hongo, B) Extracto crudo C) TLC de extractos crudos señalando la presencia del compuesto activo (BAR), D) Espectro de HPLC de extracto crudo señalando el compuesto de interés.

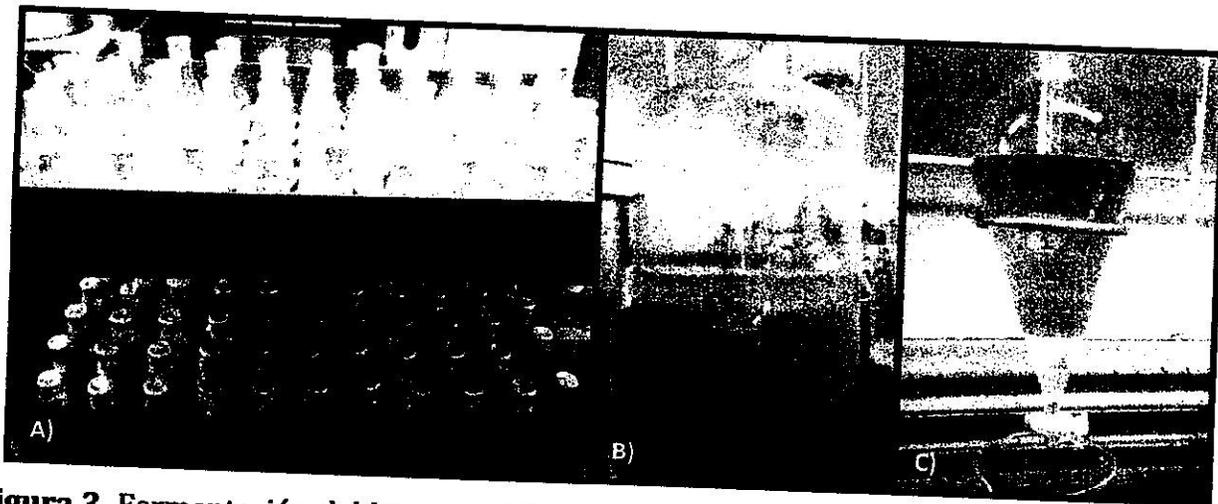
Con las mejoras obtenidas en la producción del compuesto se logró disminuir el volumen de fermentación calculado inicialmente, de 1945L a solamente 70L necesarios para la obtención de al menos 175 gramos de compuesto propuestos como meta para dar inicio a los primeros ensayos en campo con producto formulado.

### 1.1.c Producción de extractos crudos para la formulación.

El 11 de mayo del 2015 se llevó a cabo en INBio una reunión en la cual estuvieron presentes representantes de Formuquisa S.A, Monreri S.A, Ecos-La Pacífica e INBio; en esta reunión se expusieron los resultados obtenidos a esa fecha producto de la optimización del protocolo de fermentación del hongo 468B para la producción del compuesto BAR y además se acordó generar 175 gramos tanto del compuesto BAR como el compuesto DMDP para las primeras formulaciones y ensayos de campo.

Para la obtención de los 175 gramos de compuesto activo derivado del microhongo se realizaron 6 fermentaciones de entre 14 y 18 litros (en erlenmeyers) utilizando los protocolos de fermentación y extracción optimizados.

En total se fermentaron 97,5 L que generaron 270 gramos de extracto crudo, y se obtuvo un rendimiento promedio de 2,4 mg de compuesto activo por ml de fermento.



**Figura 3.** Fermentación del hongo 468B y extracción química. A) Fermentos líquidos, B) y C) Extracción químicas.

A junio del 2015 se logró exitosamente la meta de producción de los 175 gramos de compuesto BAR con un porcentaje de pureza de 77%.

Con respecto al compuesto DMDP, se preparó la cantidad de extracto necesaria al 91% de pureza para las pruebas de formulación.

## **1.2 Formulaciones para cada uno de los extractos derivados y formulación para combinaciones de ambos extractos.**

### **1.2.a. Pruebas de Formulación**

Con el objetivo de hacer pruebas de formulación preliminares con los dos extractos (BAR y DMDP) con potencial para la protección de cultivos, INBio hace entrega del siguiente material a la empresa Formuquisa S.A (ubicada en Chomes-Puntarenas) el día 27 de mayo del 2015:

- ✓ 5 g de Extracto de BAR al 84,6% m/m.
- ✓ 5 g de Extracto de DMDP al 70% m/m.
- ✓ 6 mg de Patrón de DMDP al 98% m/m.
- ✓ 5,1862g de Extracto de DMDP al 91% m/m.
- ✓ 3,6422g de Extracto de DMDP al 1-2% m/m.
- ✓ 1 vial de 1mL del reactivo Sigma-Sil-A para el análisis de DMDP por Cromatografía de Gases (GC).
- ✓ Información detallada sobre el análisis de ambos componentes mayoritarios en los extractos.

Durante los meses de junio, julio, agosto y setiembre, la empresa Formuquisa S.A ha estado trabajando en las pruebas preliminares de formulación de ambos extractos. Una vez se determine la formulación óptima para cada uno de ellos, se formularán los restantes 175 gramos requeridos para las pruebas de campo.

## **Componente 2: Optimización, escalamiento y licenciamiento de agentes de protección de cultivos.**

### **2.1 Protocolos de extracción y fermentación para aumentar el rendimiento de los productos químicos activos.**

Si bien ya se había trabajado en la optimización de los protocolos de fermentación y extracción química para la obtención del compuesto BAR desde el inicio del proyecto, como se explica en el apartado 1.1.b; se continuó con el trabajo de investigación fuertemente enfocado en aumentar aún más este buen rendimiento obtenido con el protocolo F optimizado (cuadro 3).

Con este propósito se hizo una exhaustiva búsqueda bibliográfica y se realizaron nuevamente, a partir de junio, diferentes pruebas de fermentación a pequeña escala (40-70ml) con el hongo 468B.

En total se evaluaron 28 protocolos de fermentación que incluyeron diferentes medios reportados en la literatura y diferentes condiciones de cultivo: fuente de carbono, temperatura, pH, agitación, etc.

El análisis de los protocolos evaluados se hizo, al igual que el punto 1.1.b, por determinación del rendimiento de la fermentación y del porcentaje de pureza de los extractos, realizando la cuantificación del compuesto activo BAR por HPLC.

Con el protocolo F.8 se logró obtener un mejor rendimiento de la fermentación y un alto porcentaje de pureza del compuesto activo BAR en el extracto en relación al protocolo F anterior (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Mejores protocolos de fermentación del hongo 468B en relación a la producción del compuesto activo BAR.

Protocolo	% pureza decompuesto en extracto (% m/m)	Rendimiento (mg de compuesto/ml de fermento)
F	77,1	2,50
F.1	98,7	2,80
F.8	98,5	3,00

El trabajo de optimización no ha finalizado, ya que es necesario lograr obtener un rendimiento estable y fermentar a gran escala, además se seguirá con la búsqueda de una mayor producción del compuesto en cada fermentación, para alcanzar estas metas se coordinó una capacitación en la Fundación Medina en España para 2 investigadores del proyecto en el mes de noviembre del año en curso donde el objetivo máximo será, el protocolo estandarizado para la fermentación a gran escala del microorganismo.

En cuanto al compuesto DMDP, aún no se han iniciado las pruebas de extracción a mayor escala, el énfasis ha estado en la preparación del material para las pruebas preliminares de formulación a cargo de Formuquisa. Sin embargo, en los próximos meses se realizarán evaluaciones del protocolo de extracción original (de proyecto previo) buscando mejoras que logren mayor producción y más eficiencia en el rendimiento del compuesto DMDP.