

OBTENCIÓN DE POTENTES ANTIOXIDANTES A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES DE MORA

P PATENTED TECHNOLOGY

CONTACT DETAILS:

Relaciones con la Empresa
Oficina de Transferencia de Resultados de la Investigación-OTRI
Universidad de Alicante
Tel.: +34 96 590 99 59
Email: areaempresas@ua.es
<http://innoua.ua.es>

ABSTRACT

El grupo de *Proteómica y genómica funcional de plantas* de la Universidad de Alicante, en colaboración con el *Instituto de Biología Integrativa de Sistemas* de la Universidad de Valencia, ha puesto a punto la tecnología de cultivos celulares vegetales del género *Morus* para obtener estilbenos. La innovación radica en la utilización simultánea de dos compuestos elicitors para promover su producción. Con esta tecnología, se obtiene trans-resveratrol y trans-oxiresveratrol en grandes cantidades, con la posibilidad de utilizarlos en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria gracias a su potente carácter antioxidante. Se buscan empresas interesadas en adquirir esta tecnología para su explotación comercial a través de acuerdos de licencia de la patente.



INTRODUCTION

Los estilbenos son compuestos fenólicos biológicamente activos con un amplio espectro de actividad antibiótica y farmacológica. No obstante, la producción en la naturaleza de este grupo de compuestos se restringe a un pequeño número de especies vegetales como la vid (*Vitis* sp.), la morera (*Morus* sp.) o el cacahuete (*Arachis hypogaea*) como un mecanismo adaptativo en respuesta al estrés (irradiación con rayos ultravioleta, infección microbiana, exposición a metales pesados o tratamiento con ozono). Dentro de este grupo de compuestos (estilbenos), cabe destacar el trans-resveratrol (en adelante, t-resveratrol), el piceanol y el trans-oxiresveratrol (en adelante, t-oxiresveratrol).

En la vid y en el cacahuete se encuentra t-resveratrol y piceanol, mientras que en la morera se encuentra t-resveratrol y t-oxiresveratrol, lo que indica que la síntesis de estilbenos es especie-dependiente.

Estudios epidemiológicos y de laboratorio han puesto de manifiesto que los estilbenos en general, y el t-resveratrol y el t-oxiresveratrol en particular, tienen efectos favorables para la salud, lo que hace deseable su inclusión en la dieta humana y animal.

El t-resveratrol es muy efectivo en la prevención y terapia de la aterosclerosis, como agente antiinflamatorio y como agente anti-hiperoxidativo, mientras que el t-oxiresveratrol destaca por sus propiedades farmacológicas como agente anticancerígeno, antiinflamatorio, antioxidante, neuroprotector, antibiótico y antiviral, además de exhibir una potente actividad como inhibidor de la tirosinasa, lo que le proporciona interesantes propiedades cosméticas.

Teniendo en cuenta el papel beneficioso del t-oxiresveratrol sobre la salud humana y animal, resulta importante poder disponer de una fuente biológica adecuada que permita su obtención.

La estimulación de la síntesis de estilbenos ha sido explorada con una diversidad de compuestos de tipo "elictor", tales como trozos de paredes celulares de hongos, ciclodextrinas, metiljasmonato, etc.

El tratamiento combinado de estos elicitors produce un efecto sinérgico en el cultivo de células de vid. Sin embargo, hay muy

poco conocimiento de la forma de producir t-oxiresveratrol.

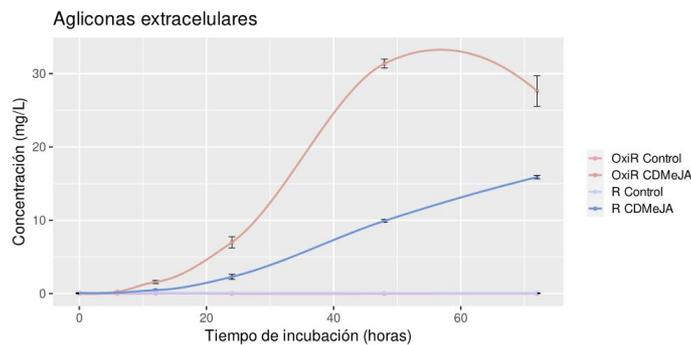
Con el conocimiento actual, la producción de t-oxiresveratrol por medios biotecnológicos requiere la implementación de dos procesos:

- Por un lado, la producción del mulberrósido A (forma doblemente glicosilada de t-oxiresveratrol) utilizando cultivos celulares de morera (*Morus alba*) elicitados con ácido salicílico, seguido de la extracción y purificación.
- Por otro lado, la bioconversión del mulberrósido A en t-oxiresveratrol mediante tratamiento enzimático.

TECHNICAL DESCRIPTION

Con el objetivo de resolver los problemas biotecnológicos anteriormente descritos, se hace necesario disponer de un **método de obtención de t-oxiresveratrol más eficiente y en un solo proceso.**

En este sentido, se ha desarrollado un **método de obtención de estilbenos** mediante la **adición combinada de ciclodextrinas y metil-jasmonato** a un medio de cultivo de **células vegetales del género *Morus***. Concretamente, se obtienen grandes cantidades extracelulares de reveratrol y, sobre todo, de t-oxiresveratrol (véase *Figura 1*):



*Figura 1: Cinética de acumulación extracelular de las formas aglicona (no glicosilada) de t-resveratrol y t-oxiresveratrol en miligramos por litro de medio extracelular, de un cultivo celular de la especie *Morus alba* clon rojo elicitadas con la combinación de ciclodextrinas y metil-jasmonato, frente al control sin tratamiento.*

Cualquier línea celular de una planta del género **Morus** es capaz de producir estos compuestos, bien de forma natural, bien tras modificación genética.

El método de obtención comprende las siguientes **etapas**:

- Adición de ciclodextrinas y metil-jasmonato a un medio de cultivo de células vegetales del género *Morus*.
- Incubación del medio de cultivo celular obtenido en la etapa anterior.
- Separación del t-resveratrol y t-oxiresveratrol (obtenidos en la etapa 2) del medio de cultivo.
- Purificación del t-resveratrol y del t-oxiresveratrol separados en la etapa anterior.

A continuación, se pueden observar algunas imágenes de las células vegetales de mora obtenidas:



Imagen 1: Evolución del crecimiento de las células vegetales de mora (clones "blanco" y "rojo") desde el estado sólido hasta el estado en suspensión líquida. El nombre de clon "rojo" obedece al color de los frutos del espécimen del que procede (las células vegetales de ambos clones, "blanco" y "rojo", tienen el mismo color).

TECHNOLOGY ADVANTAGES AND INNOVATIVE ASPECTS

VENTAJAS DE LA TECNOLOGÍA

El método desarrollado presenta las siguientes **ventajas**:

- 1) Es **más eficiente** que los actuales métodos biotecnológicos.
- 2) Se lleva a cabo en **un solo proceso**, lo que simplifica el procedimiento de obtención.
- 3) La **acumulación** de t-resveratrol y t-oxiresveratrol se realiza de forma **extracelular mayoritariamente**.
- 4) Se **simplifica el proceso de extracción y purificación** (no es necesario la ruptura de las células vegetales y posterior eliminación de los restos celulares).
- 5) Es posible utilizar las células vegetales en suspensión para **nuevos ciclos de síntesis** de t-resveratrol y t-oxiresveratrol.
- 6) Se genera de forma mayoritaria las **formas trans-** de ambos compuestos (que son las formas biológicamente activas, frente a los isómeros cis-).
- 7) Se obtienen **grandes cantidades** de estilbenos:
 - En el **clon rojo**:
 - **124 mg/L de t-oxiresveratrol**.
 - 24 mg/L de t-resveratrol.
 - En el **clon blanco**:
 - **114 mg/L de t-resveratrol**.
 - 81 mg/L de t-oxiresveratrol.
- 8) La **producción** de t-oxiresveratrol y de t-resveratrol es **estable e independiente de factores ambientales y socioeconómicos**.
- 9) Se **mejora la calidad** del producto final.
- 10) El procedimiento es **sostenible y respetuoso con el medioambiente**.
- 11) La tecnología permite obtener grandes cantidades de estilbenos a un **coste más bajo** que otras técnicas similares disponibles actualmente en el mercado, lo que aumenta su **accesibilidad para diferentes aplicaciones industriales**.

ASPECTOS INNOVADORES DE LA TECNOLOGÍA

De forma sorprendente e inesperada, el **uso conjunto de ciclodextrinas y metil-jasmonato** en cultivos celulares vegetales del género *Morus* da lugar a la producción de dos estilbenos no anticipados en el estado de la técnica, que son el t-resveratrol y, especialmente, el t-oxiresveratrol.

Las concentraciones acumuladas de ambos estilbenos son superiores en el tratamiento combinado que la suma de los tratamientos individuales, de ahí el **efecto sinérgico** de ambos elicitores.

La **acumulación** de ambos estilbenos se produce mayoritariamente en el medio **extracelular**, lo que simplifica el proceso de extracción y purificación, y disminuye los costes de producción.

La tecnología permite obtener **grandes cantidades de t-resveratrol** y, sobre todo, de **t-oxiresveratrol**.

CURRENT STATE OF DEVELOPMENT

La tecnología descrita se ha desarrollado a **escala de laboratorio** (*Technology Readiness Levels: TRL = 4*).

Los ensayos de laboratorio realizados han puesto de manifiesto el efecto sinérgico del uso de metil-jasmonato y de diferentes tipos de ciclodextrinas en la producción de t-resveratrol y t-oxiresveratrol en cultivos celulares de morera.

Cuando el cultivo celular de *Morus Alba* se elicitó con ciclodextrinas metiladas (o hidroxipropiladas aleatoriamente), se produce una acumulación extracelular de:

t-Resveratrol:

- Entre **60-140 veces superior** (en el clon blanco) respecto al control.
- Entre 30-60 veces superior (en el clon rojo) respecto al control.

t-Oxiresveratrol:

- Entre **600-800 veces superior** (en el clon rojo) respecto al control.
- Entre 30-60 veces superior (en el clon blanco) respecto al control.

Y cuando el cultivo celular se elicitó con la combinación de ciclodextrinas y metil-jasmonato, se consigue una acumulación extracelular adicional de t-resveratrol y t-oxiresveratrol **3 veces superior**, comparado con la suma de los niveles acumulados en los tratamientos simples, de ahí el **efecto sinérgico de la elicitación conjunta** (tanto en el clon blanco, como en el clon rojo).

Las formas glicosiladas que se encuentran dentro de las células no sufren cambios significativos a lo largo del tiempo por efecto de la elicitación, mientras que las agliconas (formas no glicosiladas), tanto intracelulares como extracelulares, exhiben un patrón acumulativo con el tiempo. Este cambio es más intenso para el t-oxiresveratrol que para el t-resveratrol en el caso de la estirpe celular del clon rojo.

MARKET APPLICATIONS

Esta novedosa tecnología pertenece al campo de la **biotecnología vegetal**.

Los principales sectores de aplicación son:

- Farmacéutico.
- Cosmético.
- Alimentario.
- Nutracéutico.

COLLABORATION SOUGHT

Se buscan empresas interesadas en adquirir esta tecnología para su **explotación comercial** mediante acuerdos de **licencia de la patente**.

INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS

La presente invención se encuentra protegida mediante **solicitud de patente**:

- *Título de la patente: "Método de obtención de estilbenos por cultivos celulares de una planta del género Morus".*
- *Número de solicitud: P202231084.*
- *Fecha de solicitud: 20 de diciembre de 2022.*

MARKET APPLICATION (3)

Biología Molecular y Biotecnología
Farmacéutica, Cosmética y Oftalmológica
Medicina y Salud

TECHNICAL IMAGES (1)



GENERALITAT
VALENCIANA

IVACE+i

INSTITUTO VALENCIANO
DE COMPETITIVIDAD E INNOVACIÓN



Financiado por
la Unión Europea