

OBTENCIÓN DE GALPHIMINA B (G-B) EN CULTIVOS DE CELULAS INMOVILIZADAS DE *Galphimia glauca* CAV.

^{1,2} Dra. Lidia Osuna, ² Dra. Elisabeth Moyano, ² Dra. Merce Bonfill, ² Dra. Rosa Cusidó, ¹ Dr. Alejandro Zamilpa, ¹ Dr. Jaime Tortoriello y ² Dr. Javier Palazón. ¹Centro de Investigación Biomédica del Sur. IMSS. Xochitepec, Mor. Argentina 1, Col. Centro. CP 62790. Tel y Fax 777 3612155. osunalidia@yahoo.com. ²Lab.. De Fisiología Vegetal, Fac. de Farmacia. Universidad de Barcelona, Barcelona, España.

Palabras clave: *Galphimia glauca*, células inmovilizadas, G-B.

Introducción. *G. glauca* produce diferentes metabolitos secundarios de origen triterpénico llamados galphiminas B, A, E y F, además de diferentes norfridelanos denominados glaucacetalinas A, B y C, entre otros compuestos (1). Recientemente la G-B ha demostrado ser eficaz y segura en el tratamiento de pacientes con ansiedad generalizada (2). Se estima que para el 2015 en México, aproximadamente 15 millones de personas padezcan de ansiedad, de ahí la necesidad de desarrollar una alternativa terapéutica para su tratamiento. Actualmente G-B se obtiene a partir de planta silvestre, por lo que el objetivo de este trabajo fue: Evaluar el efecto combinado del cultivo tipo lote en dos fases y la inmovilización celular para la obtención de G-B en cultivo de células de *G. glauca* a nivel de matraz y en dos tipos de biorreactores.

Metodología. Se utilizaron 30 g/l PF de la línea celular *ggx1*. Las células se cultivaron tipo lote en dos fases. En la primera fase se mantuvieron durante 14 d en 100 ml medio Murashige & Skoog (MS), 3% sacarosa, 100 mg de mioinositol, ANA:CN (2:2 mg/l) (medio de crecimiento). Los cultivos se mantuvieron en agitación (115 rpm), a 25 ± 2 °C, en condiciones de fotoperiodo (16 hr luz/8 hr Obs). En la segunda fase, las células se filtraron y se añadió medio MS+2,4-D (4 mg/l). Se inmovilizaron 30 g/l PF de células en alginato al 5% en solución de cloruro de calcio (0.038M). Las células inmovilizadas se mantuvieron en cultivo tipo lote en dos fases antes mencionado. Durante cada cinética, se tomaron muestras cada dos días, se tomó el peso fresco y seco; pH y volumen del medio, viabilidad celular y se cuantificaron las galphiminas presentes tanto en los cultivos de células libres como en las inmovilizadas. En el escalamiento se utilizaron dos biorreactores (agitado mecánicamente y tipo airlift, 5l). En la Tabla (1) se mencionan las condiciones de cultivo utilizados.

Tabla 1. Parámetros de cultivo para células inmovilizadas de *G. glauca* en biorreactor agitado mecánicamente (AM) y tipo airlift (TA)

| Tipo de Biorreactor/ rpm/ temperatura | Flujo de aire/ vol. de trabajo | Tipo de fermentación/ Inoculo. |
|---------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| AM/ 115/25 °C | 1/3L | Tipo lote en dos fases /30 g/l PF |
| TA-/25 °C | 2/3 L | “ “ |

Resultados y discusión. Los cultivos de células libres e inmovilizadas de *G. glauca* presentaron un patrón de crecimiento semejante, sin embargo el rendimiento en biomasa de las células inmovilizadas se afectó en un 50% con respecto a lo obtenido en células libres, (85% viabilidad) (Fig. 1).

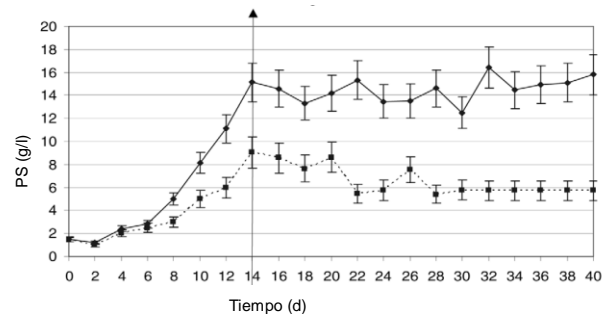


Fig.1. Crecimiento celular de células libres (◆) e inmovilizadas (■) de *G. glauca* en medio MS, n = 5 ± DE, p < 0.5. La flecha indica cambio de medio (MS + ANA:CN) a medio (MS + 2,4-D).

La máxima producción de G-B en células libres se obtuvo al t=24 d (2.8 mg/l) de manera intracelular; por otro lado la inmovilización celular estimuló la producción y excreción de la G-B (2.97 mg/l) al medio de cultivo, al tiempo 30 de la cinética. Al escalar los cultivos, el índice de crecimiento fue mayor (11.66) en el TA que en el AM (1.75); por el contrario la producción extracelular de G-B fue 5.4 veces mayor en el biorreactor agitado mecánicamente que en el tipo airlift al tiempo 24 de la cinética.

Conclusiones. La inmovilización celular estimula la producción y excreción de G-B en cultivos tipo lote en dos fases de células de *G. glauca* cultivadas en biorreactor agitado mecánicamente.

Bibliografía.

- Osuna L, Moyano E., Mangas S., Bonfill M., Cusidó R., Piñol T., Zamilpa., Tortoriello J., Palazón J. (2008). Immobilization of *Galphimia glauca* Plant Cell Suspensions for the Production of Enhanced Amounts of Galphimine-B. *Planta Medica* 74: 94-99.
- Herrera A, Jimenéz E, Zamilpa A, Morales M, García C, Tortoriello J. (2007). Efficacy and Tolerability of a Standardized Herbal Product from *Galphimia glauca* on Generalized Anxiety Disorder. A Randomized, Double-Blind Clinical Trial Controlled with Lorazepam. *Planta Med.* 73(8):713-717.