Proyecto 3.

Fortalecimiento de los procesos de investigación en bioprospección de la biodiversidad de la Amazonia colombiana para el uso sostenible y conservación en el Instituto SINCHI

Investigadora: Gladys Cardona

Palabras clave: Nioprospección, fortalecimiento, convenios, metabolómica, diversidad

Área geográfica: Bogotá, Amazonas

Objetivo: Fortalecer las capacidades en investigación científica del instituto SINCHI, para realizar procesos de investigación en bioprospección de la biodiversidad de la Amazonia colombiana con fines de uso sostenible y conservación.

Objetivos específicos:

- Actualizar la capacidad instalada en equipos e infraestructura de la unidad de bioprospección del instituto SINCHI para ampliar el rango de metabolitos bioactivos identificados para el desarrollo de nuevas aplicaciones.
- Consolidar redes de conocimiento con instituciones nacionales e internacionales con amplia experiencia en bioprospección de especies vegetales y de microorganismos que fortalezcan el quehacer científico en esta área de conocimiento.
- Fortalecer la capacidad para la generación de librerías de metabolitos bioactivos de origen vegetal y microbiano para facilitar la dereplicación de muestras y la identificación de nuevos productos naturales.
- Consolidar un banco de microorganismos productores de compuestos bioactivos.
- Generar una plataforma para el análisis de datos genómicos metabólicos, lipidómicos de la biodiversidad de plantas y microorganismos de la región, así como para el análisis de la viabilidad técnica y económica de bioprocesos seleccionados.

Importancia: La región amazónica cuenta con potencial para lograr la generación de nuevos componentes activos y productos que permitan explorar nuevos mercados mundiales donde se requieren una mayor innovación, evaluación, descubrimiento y desarrollo donde el poder fortalecer los laboratorios del Instituto SINCHI será fundamental con mejoras en la aplicación de ciencia transnacional que permita desarrollar aplicaciones que resuelvan los problemas de las poblaciones y los ecosistemas disminuyendo la pérdida de biodiversidad que se puede convertir en una amenaza sino se realiza de la manera adecuada utilizando conocimientos tradicionales y técnicas y métodos científicos adecuados a la región amazónica. Además, es fundamental y prioritario para la región amazónica apoyar la generación de empresas de base biotecnológica que aporten a una mayor sofisticación de los productos y su cadena de valor a partir de un uso responsable y sostenible de la biodiversidad lo cual requiere procesos de investigación, desarrollo e

innovación con altos estándares que logren impactar el sector real que es una de las prioridades de este proyecto y está acorde con el plan de negocios verdes (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, 2014) para el país que plantea el posicionamiento y consolidación de esta línea de negocio con impacto en la economía nacional donde los centros de investigación son fundamentales para lograr consolidar esta estrategia.

Relevancia: El Instituto SINCHI, actualmente cuenta con una base cercana a las 55 especies vegetales amazónicas las cuales han sido objeto de la primera etapa del ejercicio de bioprospección, permitiendo a partir de dicha información avanzar en el diseño Multiescala de emulsiones de uso cosmético a partir de aceites vegetales amazónicos: las emulsiones fueron desarrolladas a partir de los aceites extraídos de los frutos de palmas amazónicas y proteínas transmembranales de E. coli como biosurfactante. Se aplicó el enfoque de diseño multiescala para bioproductos, analizando los efectos combinados del proceso y la formulación del producto sobre las propiedades resultantes de la emulsión y sobre el comportamiento del producto. Este trabajo constituyó un primer acercamiento para la obtención de emulsiones estables formuladas exclusivamente con ingredientes naturales de origen vegetal y microbiano, incorporando no sólo aceites naturales en un porcentaje mucho mayor a la cantidad convencionalmente utilizada en formulaciones cosméticas, sino que también un biosurfactante nunca antes evaluado para la industria cosmética. Adicionalmente, el Instituto SINCHI actualmente participa en el proyecto global "Fortalecimiento de la capacidad legal, política e institucional para el desarrollo de los marcos nacionales de ABS (Acceso a los Recursos Genéticos y Participación Justa y Equitativa en los Beneficios que se deriven de su utilización)", en el cual a partir de la biodiversidad microbiana de la región amazónica se estudia la producción de pigmentos con potencial aplicación industrial. Específicamente, se adelanta el desarrollo de un bioproceso para la producción de melanina, la cual por sus especiales características fisicoquímicas muestra particulares aplicaciones y potencial actividad biológica. Se ha inventariado una gran biodiversidad microbiana en la región amazónica, la cual ha sido asociada se asocian con actividades funcionales y metabólicas importantes para el balance ecosistémico como: biorremediación de metales tóxicos, fijación de nitrógeno atmosférico y síntesis de fitohormonas vegetales que estimulan el crecimiento vegetal, así como movilización de nutrientes en el suelo y síntesis de antibióticos y compuestos de interés en el campo médico. Por último, es importante resaltar que las cepas cultivables provenientes de los inventarios hacen parte de colecciones microbianas; siendo el insumo básico para su aprovechamiento sostenible en programas como restauración de ecosistemas naturales, biorremediación, biotecnología, biocontrol, entre otros. De igual manera, estas colecciones constituyen una fuente valiosa para la obtención de productos y servicios, que generen recursos económicos que reviertan no solo para el desarrollo de la región amazónica sino para el posicionamiento del país en temas de bioprospección en el contexto mundial. Específicamente, para el tema de biorremediación el instituto cuenta con una colección de microorganismos resistentes a mercurio, con la capacidad de reducir enzimáticamente este catión a una forma menos tóxica, así como con la capacidad para secuestrar el metal y reducir su efecto tóxico en el ambiente.

Impacto: Este proyecto de fortalecimiento permitirá capturar el valor natural de la biodiversidad que combina la ecología, la biología, la química, la tecnología, conocimientos tradicionales, usos potenciales comerciales y ciencias relacionadas en busca de nuevas entidades y/o componentes activos de los organismos y/o plantas de la región de influencia del Instituto SINCHI lo cual ha sido motivado por los grupos de cooperación en biodiversidad que fomentan la investigación en estas temáticas que permitan proteger las pérdidas de biodiversidad, promover la creación de capacidad científica y la protección de los

derechos de propiedad intelectual en las economías emergentes e impulsar la búsqueda de nuevos recursos biológicos.

Resultados: El Instituto SINCHI, cuenta con una base cercana a las 55 especies vegetales amazónicas las cuales han sido objeto de la primera etapa del ejercicio de bioprospección, para la búsqueda de ingredientes naturales para la industria de alimentos y cosmética. También cuenta con una colección de 466 aislamientos, de los cuales 437 son bacterias y 29 levaduras, de estas, 317 cepas tienen asignación taxonómica por la secuenciación de los genes ribosomales 16S rRNA o 5.8S-ITS-18S. La colección cuenta con ocho grupos funcionales entre los que se destacan: bacterias fijadoras de nitrógeno, bacterias productoras de biosurfactantes, bacterias productoras de pigmentos, bacterias y levaduras resistentes a mercurio, bacterias solubilizadoras de fósforo, bacterias amilolíticas y levaduras fermentadoras. La colección de microorganismos del Instituto SINCHI – COLMIS, se encuentra registrada con el No. 282 en el RNC.

Se realizó el perfilado metabólico de 18 extractos y fracciones de origen vegetal de Achapo (*Cedrelinga catenaeformis*), Chilawang (*Vasconcellea* spp.), Asaí (*Euterpe precatoria*), Ñame morado (*Dioscorea trifida*), Copoazú (*Theobroma grandiflorum*), Canangucha (*Maurtia flexuosa*) y Andiroba (*Carapa guianensis*). Para tal fin, se solicitó el servicio de análisis de extractos de origen vegetal por medio de UHPLC - HSMS (QTOF) de la Pontificia Universidad Javeriana mediante CDP 1494 de 2021. En los análisis de los extractos vegetales se identificaron metabolitos de interés como el ß-tocoferol, en muestra de aceite de andiroba, moléculas biosurfactantes en la fracción polar de Achapo, ácidos orgánicos (oxálico, málico, succínico y acético), monosacáridos y 34% de fracción oleosa en Chilawang y antocianinas con actividad antioxidante en Ñame Morado.

Con respecto a los microorganismos, se analizaron 84 extractos crudos de cepas con características fenotípicas interesantes, asociadas a la resistencia a metales pesados como mercurio (Hg), producción de biosurfactantes, y pigmentos, entre otros. Los extractos y fracciones de origen microbiano fueron analizados por medio de UHPLC - HSMS (QTOF), por el Centro de Investigación Fundación Medina (Granada - España) en el marco del convenio de cooperación específico interinstitucional suscrito el 16 de febrero de 2021. Previo al envío de los extractos microbianos se tramitó un permiso de exportación NO CITES de especímenes de la biodiversidad otorgado por la autoridad nacional de licencias ambientales - ANLA N.º 2578 de 2021.

Los análisis de los extractos microbianos evidencian la producción de compuestos con actividad antimicrobiana (dicetopiperazinas, Germicidin A/B/C, Acidomycin, Albonoursin, Antibiotic MKN 003B, entre otros), con actividad antifúngica (piericidin B1, A1, ácido fenático), citotóxica (actifenol), biosurfactante (surfactina), con actividad promotora de crecimiento vegetal (sideróforos) y compuestos antivirales y antimaláricos.

Se profundizó en el biosurfactante producido por la cepa *Pseudomonas* sp (COLMIS 151), se optimizaron condiciones de cultivo y procesos de extracción para su posterior caracterización. La extracción del biosurfactante se realizó a partir del sobrenadante libre de células por extracción líquida: líquida usando como solvente acetato de etilo. Se logró determinar que la cepa produce un biosurfactante/emulsificante de tipo lipopéptido. Con este, se realizó una primera aproximación para determinar su utilidad en procesos de biorremediación de metales pesados como el mercurio.

A partir de la capacitación realizada con el Dr. Marcus Scotti, se diseñó la arquitectura de una base de datos de compuestos naturales de interés extraídos de plantas y/o microorganismos de la Amazonia

Colombiana, usando la plataforma SistematX (https://sistematx.ufpb.br/). Esta plataforma puede ser ajustada y modificada de acuerdo con las necesidades y ha sido distribuida a empresas privadas para el manejo de información usando los servidores de la UFPB. Sistemat X permite la consulta de información y la restricción de datos en casos de tener información que no deba ser compartida (información confidencial). Adicionalmente, se pueden correlacionar datos propios y de diferentes plataformas como PubChem, ChemSpider con la posibilidad de incluir el COAH virtual y la base de datos de la colección de microorganismos COLMIS.

Durante el periodo comprendido entre el 18 de mayo de 2020 y el 17 de mayo de 2021, se capacitó a la joven investigador Kimberly Lozano en temas relacionados con la estandarización de métodos de caracterización de metabolitos obtenidos a partir de plantas y microorganismos de origen amazónico, incluidas técnicas cromatográficas de HPLC, UHPLC y CG/MS. Gracias a la capacitación recibida, actualmente la joven investigador domina el manejo de CG para la identificación y cuantificación de metabolitos volátiles de diferente polaridad, el manejo de HPLC para la cuantificación de metabolitos polares y apolares en extractos de origen vegetal y microbiano, así como algunos métodos de derivatización, y caracterización básica por métodos de índices de calidad. Adicionalmente, conoce los principios básicos de la espectrometría de masas, y los aplica para identificación de metabolitos mediante cotejo con librerías de datos espectrales. A partir de los resultados obtenidos se ha iniciado con la consolidación de la librería de compuestos naturales del Instituto SINCHI. Como resultado de su capacitación, se elaboró un artículo científico para ser publicado en una revista categorizada (A o B). A la fecha, Kimberly Lozano se encuentra vinculada como profesional de apoyo al proyecto “Empoderamiento de ingredientes naturales amazónicos – Empoderamiento de la cadena de valor de los productos forestales no maderables del bosque a través de la transferencia de tecnología para el fortalecimiento de la bioeconomia circular en la región amazónica colombiana”.

Se realizaron capacitaciones presenciales y virtuales en las temáticas comprometidas en el proyecto como: construcción y manejo a largo plazo de librerías de compuestos naturales; conocimiento y aplicación de técnicas de biología molecular que faciliten determinar la función de los genes implicados en rutas metabólicas de interés en cepas microbianas; biodiversidad y conservación de rutas (hidrocarburos y metales pesados); regulación genética microbiana, bioseguridad de microorganismos ambientales, control de la expresión de rutas metabólicas; propiedad intelectual, análisis bioinformático de secuencias obtenidas por la tecnología shotgun y análisis bioinformático de secuencias obtenidas por la tecnología de Oxford nanopore – ONT.

Por otro lado, se fortaleció la capacidad tecnológica de los laboratorios del Instituto SINCHI: Biotecnología y Recursos genéticos, y Uso y Aprovechamiento de la Biodiversidad con la adquisición de dos equipos de laboratorio como UHPLC, liofilizador, fotodocumentador, Minifuga y pHmetro y tensiómetro para la preparación de medios y soluciones necesarios para la obtención y extracción de metabolitos de interés. Se suscribieron tres convenios de cooperación científica para la consolidación de redes de conocimiento con tres instituciones extranjeras. Convenio específico con Fundación Medina para la investigación conjunta en bioprospección de microorganismos amazónicos. Con la Universidad Autónoma de México para una colaboración de las partes en el campo de la biotecnología ambiental para realizar en conjunto actividades académicas o científicas en áreas de interés común. Con la Estación Experimental del Zaidin para realizar conjuntamente actividades académicas y/o científicas para el estudio de interacciones planta/microorganismo simbiótico al igual que la evaluación de cepas microbianas con potencial para la biorremediación. Convenio Nacional con el INVEMAR para aunar esfuerzos técnicos y administrativos para desarrollar estrategias conjuntas de investigación y acompañamiento académico.

Finalmente se realizaron mejoras en la infraestructura en la Estación Experimental el Trueno ubicada en el municipio del Retorno en el departamento de Guaviare, las mejoras consistieron en la construcción de un invernadero para el desarrollo de ensayos con especies amazónicas priorizadas por los servicios ecosistémicos que prestan, en la construcción de un pozo profundo para asegurar un caudal de agua que permita el mantenimiento de plántulas en los viveros y la producción de material vegetal de origen amazónico en el invernadero durante la época seca. También se diseñaron vallas de señalización para la identificación de zonas de propagación de especies vegetales.

A partir del material vegetal propagado en la EET se realizaron aislamientos de microorganismos endófitos a partir de la rizósfera de tres especies vegetales propagadas (Asai, Cuyubi y Achapo).

Bibliografía

Cárdenas, Dairon & Gustavo G. Politis. (2000). Territorio, movilidad, etnobotánica y manejo del bosque de los Nukak orientales, Amazonía colombiana. Bogotá: Editorial Uniandes/ Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI.

Fukuda, T., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Tomoda, H., & Ōmura, S. (2005). Phenatic acids A and B, new potentiators of antifungal miconazole activity produced by Streptomyces sp. K03-0132. The Journal of antibiotics, 58(4), 252-259.

Nielsen, T. H., Christophersen, C., Anthoni, U., & Sørensen, J. (1999). Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by Pseudomonas fluorescens DR54. Journal of Applied Microbiology, 87(1), 80-90.

Schnermann, M. J., Romero, F. A., Hwang, I., Nakamaru-Ogiso, E., Yagi, T., & Boger, D. L. (2006). Total synthesis of piericidin A1 and B1 and key analogues. Journal of the American Chemical Society, 128(36), 11799–11807. https://doi.org/10.1021/ja0632862.

Tetzlaff, C. N., You, Z., Cane, D. E., Takamatsu, S., Omura, S., & Ikeda, H. (2006). A gene cluster for biosynthesis of the sesquiterpenoid antibiotic pentalenolactone in Streptomyces avermitilis. Biochemistry, 45(19), 6179-6186.

Yin, M., Yan, Y., Lohman, J. R., Huang, S. X., Ma, M., Zhao, G. R., ... & Shen, B. (2014). Cycloheximide and actiphenol production in Streptomyces sp. YIM56141 governed by single biosynthetic machinery featuring an acyltransferase-less type I polyketide synthase. Organic letters, 16(11), 3072-3075.