

Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*

Naivy Pérez-Alonso*, Elio Jiménez *Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: naivy@ibp.co.cu

RESUMEN

El cultivo *in vitro* de células y tejidos es una fuente alternativa para la producción de valiosos compuestos activos a partir de plantas. El cultivo de células indiferenciadas ha sido objeto de numerosas investigaciones, sin embargo, un gran interés ha despertado en el cultivo de raíces y órganos durante los últimos años. Diferentes estrategias *in vitro* han sido desarrolladas con el objetivo de incrementar el contenido de metabolitos secundarios en plantas e incluso han permitido la obtención de nuevos compuestos de gran interés en la industria farmacéutica, fundamentalmente. Este trabajo persiguió como objetivo abordar los principales aspectos científicos de la producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el uso del cultivo *in vitro*. Son notables las técnicas de cultivo empleadas así como las estrategias relacionadas con el empleo de biorreactores, procesos de elicitación y la ingeniería metabólica como las más prometedoras para la producción de metabolitos secundarios de alto valor en la industria. En esta reseña se ponen en evidencia estos aspectos así como las perspectivas futuras de la producción de metabolitos secundarios *in vitro*.

Palabras clave: biorreactores, compuestos naturales, cultivo de órganos, elicitores, ingeniería metabólica

ABSTRACT

Plant cell and tissue cultures are considered as an alternative source to the whole plant for the production of valuable compounds. Undifferentiated cell cultures have been extensively studied, but a large interest has also been shown in hairy roots and other organ cultures during the last years. Different *in vitro* strategies have been developed to increase the content of plant secondary metabolites. They have also allowed obtaining new substances, especially pharmaceuticals. The objective of this work was to approach the main scientific aspects about plant secondary metabolites production using *in vitro* culture. The *in vitro* techniques and strategies related with bioreactor culture, elicitation and metabolic engineering are notable as the most promising for the production of high-value secondary metabolites of industrial importance. This review deals with these aspects and future prospects for the production of valuable secondary metabolites *in vitro*.

Key words: bioreactors, elicitors, metabolic engineering, natural compounds, organ culture

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN

IMPORTANCIA Y CLASIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

CULTIVO *IN VITRO* PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Cultivo de células

Cultivo de órganos

Optimización de la composición del medio y condiciones de cultivo

Inmovilización celular

Adición de precursores

Elicitores

Recuperación del producto *in situ*

Biotransformación

Escalado de la producción

Transformación genética

Ingeniería metabólica

PERSPECTIVAS DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS

INTRODUCCIÓN

Las plantas son fuentes de un gran número de productos metabólicos de importancia comercial y son usados en las industrias farmacéutica, alimenticia, de cosméticos y

como fuentes de numerosas sustancias de interés agroquímico (Karuppusamy, 2009). Se estima que más de 100 000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas (Bhalla *et al.*, 2005). Aproximadamente 1 600 estructuras químicas nuevas obtenidas a partir

de plantas superiores se describen cada año, de las cuales un gran número tiene actividad biológica (Sajc *et al.*, 2000; Fiehn, 2002). Esto hace que el estudio de los metabolitos presentes en las plantas sea un enorme reto, de ahí la necesidad de utilizar tecnologías diversas para su producción, caracterización e identificación.

La demanda de productos naturales de interés farmacéutico provenientes de plantas se ha incrementado en los últimos años dada la limitación de los procesos de obtención de medicamentos basados en la síntesis química (Pezzuto, 1995). A esto se le suma la gran diversidad química de estos sobre los compuestos sintéticos y la intensa actividad biológica como resultado de la selección natural (Guttman *et al.*, 2004). Adicionalmente, el costo de los biofármacos limita su disponibilidad en un amplio sector del mercado y no satisface las necesidades de la población mundial (Gleba *et al.*, 1999). Otro aspecto de gran interés ha sido que muchas especies vegetales están en peligro de extinción o se han extinguido debido a los problemas ambientales provocados por el hombre y a la sobreexplotación de las fuentes naturales (Makunga y van Staden, 2008).

Es comprensible entonces el interés de grandes industrias en la producción de compuestos naturales de importancia comercial, cuya calidad y costos no se afecten por condiciones climáticas, sanitarias o políticas de la región de producción. Es en este contexto, donde los avances de la biotecnología vegetal, especialmente el cultivo de células y tejidos constituyen una alternativa para la producción de metabolitos secundarios de gran interés (Vanisree y Tsay, 2007).

Este trabajo persiguió como objetivo abordar los principales aspectos científicos de la producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el uso del cultivo *in vitro*. Igualmente, se describen las diferentes estrategias que han sido empleadas ya sea en el cultivo de células indiferenciadas como el cultivo de órganos, que cobra cada vez mayor importancia.

IMPORTANCIA Y CLASIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios son compuestos derivados del metabolismo primario pero de limitada distribución en el reino de las plantas, restringidos a un grupo taxonómico particular

(Shilpa *et al.*, 2010). Antiguamente se aceptó que las sustancias secundarias se producían con funciones relativas inespecíficas, después se encontró que muchas de estas poseen altos rendimientos y que tienen múltiples funciones en las plantas (Wink, 2007). Los compuestos secundarios no tienen una función aparente en el metabolismo primario pero sí tienen una implicación ecológica como defensa contra herbívoros, virus, hongos, bacterias, como sustancias alelopáticas, fitoalexinas o disuasorios nutritivos (Bourgaud *et al.*, 2001). Otros tienen una función fisiológica, por ejemplo los alcaloides, las pectinas que pueden servir para el transporte de nitrógeno tóxico y compuestos de almacenamiento, mientras los compuestos fenólicos como los flavonoides realizan una función como protectores de rayos ultravioletas (Wink, 2007). Además, son una fuente importante de principios activos de medicamentos y de valiosos productos químicos (Goossens *et al.*, 2003).

Aunque gran parte de los medicamentos se obtienen por síntesis química, la mayoría de las estructuras principales están basadas en productos naturales. Mundialmente existe un 44% de nuevos medicamentos basados en productos naturales y en países desarrollados el 25% de los medicamentos son derivados de plantas (Haq, 2004). Se conoce que en la producción de medicamentos, según Hostettmann *et al.* (2000), el 11% representa productos naturales (extractos de plantas), 24% son productos de origen natural, es decir que para la síntesis de compuestos utilizan precursores de origen natural y el 9% son copias sintéticas de productos naturales. Tal es su importancia, que aproximadamente el 60% de compuestos anticancerígenos y el 75% de medicamentos contra enfermedades infecciosas son productos naturales o derivados de estos (Cragg y Newman, 2005). Muchos son los ejemplos que evidencian su uso. Entre ellos se mencionan a los alcaloides aislados de *Physostigmatis semina* usados para contraer la pupila, a diferencia de los alcaloides aislados de *Atropa belladonna* que la dilatan; glucósidos cardíacos de las especies de *Strophantus* efectivos como estimulantes del corazón. Igualmente, la aspirina, utilizada como analgésico y para prevenir infartos y trombos, es un derivado del ácido salicílico que se encuentra naturalmente en las especies del género *Salix*. Las propiedades de la mayor parte de las especies, condimentos, infusiones y bebidas

como el café, el té y el chocolate, aromas, saborizantes y estimulantes se les atribuyen a metabolitos secundarios farmacológicamente activos, como los alcaloides cafeína, teofilina y teobromina (Anaya-Lang y Espinoza-García, 2006).

Los compuestos secundarios de plantas de interés comercial, han sido incluidos en tres principales categorías según sus rutas biosintéticas: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados (Chinou, 2008). Los terpenos se forman por la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides (Sarin, 2005) y se dividen en seis grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides, dentro de los cuales se encuentran carotenos, glicósidos cardiotónicos, taxol, entre otros (Shilpa *et al.*, 2010). Entre los compuestos fenólicos se incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos. Las aplicaciones farmacéuticas de estos compuestos son considerables, se refieren sus efectos como analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antitumorales, inmunostimulantes, entre otras (Gurib-Fakim, 2006). Los compuestos nitrogenados son principalmente los alcaloides y glucósidos cianogénicos. Los alcaloides son un diverso grupo de compuestos con cerca de 4 000 estructuras conocidas. Estos son fisiológicamente activos en humanos (cocaína, nicotina, morfina) y por supuesto de gran interés en la industria farmacológica (Sajc *et al.*, 2000). Por otra parte, los glucósidos cianogénicos, se consideran posiblemente, los metabolitos secundarios con mayor relación en las funciones de defensa (Bennett y Wallsgrove, 1994).

Un amplio grupo de productos naturales también han sido clasificados según su aplicación. Entre ellos se agrupan los productos farmacéuticos que incluyen alcaloides (vincristina, vinblastina, ajmalicina, atropina, berberina, codeína, reserpina, nicotina, camptotecina), cardenólidos (digitoxina, digoxina); diterpenos (paclitaxel); saborizantes y flavonoides como el esteviósido, la quinina; productos utilizados como pigmentos y en la perfumería como los antocianinos, betalinos, el aceite de rosas y de jazmín y productos utilizados con fines

químicos y agroquímicos como proteasas, vitaminas, lípidos, aceites, látex (Ramachandra Rao y Ravishankar, 2002).

CULTIVO *IN VITRO* PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

El cultivo de tejidos presenta aspectos y aplicaciones prácticas muy variadas entre las que se destaca la producción de metabolitos secundarios de plantas (Kreis, 2007). Se ha revelado como una inapreciable ayuda en otros campos de la Fitoquímica, principalmente en estudios biogénéticos y enzimáticos como fuente para el aislamiento de metabolitos secundarios y comercialmente, para la rápida propagación de las plantas de interés. Además, tiene un amplio uso en el mejoramiento genético de plantas, en la obtención de clones libres de microorganismos patógenos así como en la conservación de germoplasma (George y Debergh, 2008).

Varios ejemplos corroboran el uso del cultivo *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios de plantas en laboratorios de investigación (Tabla 1).

Las principales ventajas del cultivo *in vitro* sobre el cultivo convencional de plantas son: se pueden obtener sustancias de gran utilidad (metabolitos secundarios) en condiciones controladas independientemente de factores ambientales bióticos (interacción con patógenos) y abióticos (sequía, luz ultravioleta y temperaturas extremas) así como obtener un incremento considerable en el rendimiento de los metabolitos específicos (Vanisree y Tsay, 2007). Además, es posible reducir los costos e incrementar la productividad mediante el control automatizado del proceso y la regulación de los procesos metabólicos; contar con sistemas de producción definidos, calidad uniforme y rendimientos constantes del producto, así como la posibilidad de establecer sistemas estrictos de control de la calidad del producto (Paek *et al.*, 2005; Vanisree y Tsay, 2007). El cultivo *in vitro* ofrece también la posibilidad de sintetizar proteínas foráneas en determinadas situaciones que incluyen proteínas terapéuticas y antigénicas (Doran, 2000). El proceso de extracción puede ser más simple, rápido y eficiente comparado con la y

Tabla 1. Metabolitos secundarios obtenidos mediante cultivo *in vitro* de células y tejidos de plantas en laboratorios de investigación.

Especies	Compuesto activo	Cultivo	Referencia
<i>Digitalis purpurea</i>	cardenólidos	suspensiones celulares	Hagimori <i>et al.</i> , 1982
<i>Catharanthus roseus</i>	alcaloides	suspensiones celulares	Moreno <i>et al.</i> , 1993
<i>Morinda citrifolia</i>	antraquinonas	suspensiones celulares	Bassetti <i>et al.</i> , 1995
<i>Camptotheca acuminata</i>	camptotecina	callos, plantas	Wiedenfeld <i>et al.</i> , 1997
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	altamisina	callos	Goleniowski y Trippi, 1999
<i>Panax ginseng</i>	saponinas	raíces	Choi <i>et al.</i> , 2000
<i>Plumbago rosea</i>	plumbagina	suspensiones celulares	Komaraiah <i>et al.</i> , 2003
<i>Taxus chinensis</i>	taxoides	suspensiones celulares	Dong y Zhong, 2002
<i>Digitalis minor</i>	cardenólidos	brotos	Sales <i>et al.</i> , 2002
<i>Nothapodytes foetida</i>	camptotecina	callos	Thengane <i>et al.</i> , 2003
<i>Centella asiática</i>	triterpenos	plantas	Kim <i>et al.</i> , 2004
<i>Hypericum perforatum</i>	hipericina	suspensiones celulares	Xu <i>et al.</i> , 2005
<i>Hypericum perforatum</i>	hipericina	brotos	Liu <i>et al.</i> , 2007
<i>Artemisia annua</i>	artemisina	callos	Baldi y Dixit, 2008
<i>Ruta graveolens</i>	alcaloides	brotos	Orlita <i>et al.</i> , 2008
<i>Mentha spicata</i>	monoterpenos	plantas	Tisserat y Vaughn, 2008
<i>Morinda royoc</i>	antraquinonas	raíces	Boroto <i>et al.</i> , 2008
<i>Digitalis purpurea</i>	cardenólidos	brotos	Pérez-Alonso <i>et al.</i> , 2009
<i>Panax ginseng</i>	ginsenósidos	raíces	Kim <i>et al.</i> , 2009
<i>Pueraria tuberosa</i>	isoflavonoides	hojas, raíces	Rathore y Shekhawat, 2009
<i>Pueraria candollei</i>	isoflavonoides	suspensiones celulares	Korsangruang <i>et al.</i> , 2010
<i>Morinda citrifolia</i>	antraquinonas, flavonoides	suspensiones celulares	Deshmukh <i>et al.</i> , 2011
<i>Atropa belladonna</i>	alcaloides	raíces	Yang <i>et al.</i> , 2011

fisicoquímicos (concentración de sacarosa, nutrientes minerales, reguladores de crecimiento, las condiciones de cultivo como pH, temperatura, composición gaseosa, agitación, calidad y cantidad de luz), selección de líneas celulares, inmovilización celular, adición de precursores e intermediarios biosintéticos, extracción continua del producto, elicitación, transformación genética (Goleniowski y Trippi, 1999; Wang *et al.*, 2001; Sales *et al.*, 2002; Shohael *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009; Arora *et al.*, 2010). La aplicación de estas estrategias, en especial la ingeniería genética y la biología molecular en combinación con la bioquímica para estudiar el metabolismo secundario y su regulación, condujo las investigaciones al desarrollo de nuevas estrategias experimentales que han culminado en la aparición de la ingeniería metabólica y la agricultura molecular. Las estrategias utilizadas para incrementar la producción de metabolitos secundarios serán abordadas en otro acápite.

La enorme demanda de productos naturales que tiene el mercado internacional le ha concedido gran importancia al cultivo *in vitro* como fuente de metabolitos secundarios y a su vez ha permitido desarrollar nuevas investigaciones en los procesos metabólicos que rigen su producción. Sin embargo, no es solo la importancia comercial de estos lo que ha permitido el desarrollo investigativo en este campo. La producción de compuestos químicos regulada por el cultivo *in vitro* brinda una excelente oportunidad para el desarrollo de investigaciones bioquímicas relacionadas con las rutas metabólicas bajo un ambiente controlado (Karuppusamy, 2009).

Hasta el momento, la mayoría de las investigaciones relacionadas con la producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro* han estado centradas en la utilización de tejidos indiferenciados (callos, suspensiones celulares) (Ketchum *et al.*, 1999; Sajc *et al.*, 2000; Wilken *et al.*, 2005; Korsangruang *et al.*, 2010; Arora *et al.*, 2010; Deshmukh *et al.*, 2011).

A pesar del gran número de investigaciones que se han llevado a cabo para incrementar las aplicaciones comerciales de las técnicas del cultivo de células en la producción de metabolitos secundarios, existen todavía pocos ejemplos exitosos. Entre ellos se destacan la

shikonina, la berberina, el ácido rosmarínico, los ginsenósidos (obtenidos de *Lithospermum erythrorhizon*, *Coptis japonica*, *Coleus bluemii*, *Panax ginseng*, respectivamente) son el resultado (tres primeros ejemplos) de la producción a gran escala que combina el cultivo de células con la tecnología de los biorreactores y el cuarto a partir del cultivo de raíces (Bourgaud *et al.*, 2001; Vanisree y Tsay, 2007). Varios grupos de investigación han desarrollado nuevas estrategias para la obtención de compuestos antitumorales como el paclitaxel de especies de *Taxus* (Ketchum *et al.*, 1999), podofilotoxinas de *Podophyllum peltatum* (Kutney *et al.*, 1991), camptotecina de *Camptotheca acuminata* (Wiedenfeld *et al.*, 1997) así como vinblastina y vincristina de *Catharanthus roseus* (Verpoorte *et al.*, 1997).

Cultivo de células

El cultivo de células de plantas fue introducido a finales de los años 60 del siglo XX, como una posible herramienta para el estudio y la producción de los metabolitos secundarios (Bourgaud *et al.*, 2001) y desde entonces ha sido extensamente estudiado con el objetivo de incrementar la acumulación de los compuestos deseados.

Las ventajas que ofrece el cultivo de células, específicamente suspensiones celulares, es que permite un manejo similar al que se realiza con microorganismos, una rápida multiplicación celular y es posible realizar el escalado en técnicas novedosas como los biorreactores (Vanisree *et al.*, 2004). Sin embargo, no todos los compuestos son producidos en células indiferenciadas en igual cantidad y calidad que los obtenidos en las plantas madres. Esto se debe a que muchos metabolitos se sintetizan integrados a eventos de diferenciación (Kreis, 2007). Además, existe una inestabilidad genética y fisiológica y se observa una pérdida del producto en el tiempo.

Sin embargo, varios autores han señalado la identificación de líneas celulares que pueden producir metabolitos en igual o superior cantidad a la producida en condiciones naturales. También nuevas sustancias han sido detectadas, las cuales no son sintetizadas por las plantas en su hábitat natural (Massot *et al.*, 2000; Capote *et al.*, 2008), por lo que se afirma que el cultivo de líneas celulares constituye una

tecnología de gran relevancia para la obtención de nuevos metabolitos secundarios.

La producción de metabolitos secundarios en cultivos celulares, principalmente suspensiones celulares ha impactado sustancial y ampliamente en la producción de sustancias bioactivas (Vanisree y Tsay, 2007). Por el contrario, el cultivo de callos si bien es considerado un material vegetal adecuado para estudios biosintéticos no lo es para la producción de metabolitos debido a su lento ritmo de crecimiento y no favorece el escalado en sistemas como los biorreactores (Kreis, 2007). Muchos metabolitos secundarios no se encuentran en cultivos de callos y en casos donde se ha detectado, la concentración es usualmente mucho más baja que en plantas (Steven, 1998).

El desarrollo de sistemas de cultivo de células de plantas tiene como objetivos obtener una alta producción del compuesto, alta productividad y un alto rendimiento del producto mediante técnicas novedosas de biosíntesis. Los principales problemas asociados a la producción comercial son la baja productividad, la inestabilidad de las líneas celulares y la dificultad para realizar el escalado de la producción (Zhong, 2001).

En la literatura científica se refieren numerosos ejemplos que describen los resultados de investigaciones realizadas. Por ejemplo, los resultados de las investigaciones realizadas con aceites esenciales mostraron que las células indiferenciadas no son capaces de producir monoterpenos por la ausencia de estructuras capaces de acumular estas sustancias (Dörnenburg y Knorr, 1997). Estos autores afirman que existen varios factores que se interrelacionan y que necesitan ser investigados con el objetivo de favorecer la producción del metabolito de interés.

Un ejemplo de relevancia del uso del cultivo de suspensiones celulares es la producción de taxol. Su baja productividad asociada al valor comercial e importancia ha estimulado el desarrollo de múltiples trabajos. Autores como Ketchum *et al.* (1999) y Wang *et al.* (2001) han informado que obtuvieron paclitaxel y otros taxoides a partir de diferentes sistemas de cultivo de tejidos, como callos, suspensiones celulares, brotes, raíces y cultivos

embrionígenos en diferentes especies de *Taxus*. El cultivo de suspensiones se considera como el método más viable para la obtención del taxol aunque los valores obtenidos son aún bajos para la producción comercial (Cusidó *et al.*, 2002).

Capote *et al.* (2008) encontraron en el cultivo de callos y suspensiones celulares de *Morinda royoc* el mayor número de compuestos identificados, los cuales no se detectaron en las hojas de las plantas en campo ni en los brotes *in vitro*. Entre los compuestos identificados en los callos y suspensiones celulares está la morindina, un compuesto específico del género *Morinda*.

Cultivo de órganos

Kreis (2007) menciona los aspectos a los cuales puede estar asociada la acumulación de los metabolitos secundarios. Estos son: la presencia de determinados tipos de células, la presencia de ciertos organelos y la expresión y regulación de genes biosintéticos o catabólicos. Por tanto, el cultivo de órganos representa una alternativa interesante para la producción de metabolitos secundarios de plantas. Dos tipos de órganos son considerados de mayor importancia: los brotes y las raíces (Bourgaud *et al.*, 2001), los cuales pueden ser cultivados a gran escala.

El cultivo de órganos puede producir sustancias de interés que no han sido obtenidos a partir de cultivos no diferenciados. Sin embargo, el cultivo de brotes no puede producir todos los compuestos que se obtienen en las hojas de las plantas en condiciones naturales. Según Kreis (2007) si el compuesto de interés se sintetiza en las raíces, entonces no aparecerá en el cultivo de brotes. Por otra parte, es necesario tener en cuenta que aunque el compuesto se sintetice en las hojas puede que su patrón y concentración sean diferentes a los que se obtienen en plantas intactas. Como principal ventaja, se señala que el cultivo de órganos es más estable genéticamente comparado con el cultivo de suspensiones celulares y callos.

El cultivo de brotes ha sido investigado como fuente de aceites esenciales, alcaloides, flavonoides. Por ejemplo, el cultivo de brotes de *Lavandula officinalis* en medios de cultivo

semisólidos mostró mayor contenido de ácido rosmarínico que el obtenido en plantas en condiciones naturales, según Wilken *et al.* (2005). Sin embargo, en otras especies como *Hypericum perforatum*, *Cymbopogon citratus* y *Fabiana imbricata* las concentraciones de los compuestos deseados fueron menores que los obtenidos en las plantas en condiciones naturales.

Igualmente, el cultivo de raíces se ha desarrollado a partir de diferentes métodos. El más utilizado, es el método basado en la infección del tejido con *Agrobacterium rhizogenes* que resulta en el desarrollo de raíces aéreas en el sitio de infección (Kreis, 2007). Dichas raíces aéreas tienen como ventaja una rápida multiplicación y no necesitan la aplicación exógena de reguladores de crecimiento (Giri y Narasu, 2000). Además, es un sistema ideal para llevar a cabo estudios metabólicos y es posible realizar el escalado de la producción en biorreactores (Yang *et al.*, 2011). Según Tepfer (1990) cultivos estables de raíces aéreas se habían obtenido en 116 especies de plantas y este tipo de cultivo se utiliza en muchos laboratorios (Kim *et al.*, 2009; Lan y Quan, 2010; Yang *et al.*, 2011).

Varios investigadores han comparado el cultivo de raíces transformadas y no transformadas respecto a crecimiento y productividad y han mostrado claras evidencias que confirman la suposición de que las raíces transformadas, generalmente, tienen un rápido crecimiento y mayor ritmo de producción del compuesto deseado. Boitel-Conti *et al.* (1997), Vanik *et al.* (2005) encontraron que el cultivo de raíces y específicamente raíces transformadas muestran un buen crecimiento *in vitro* y producen metabolitos secundarios en cantidades equivalentes, a veces mayor que las producidas por las plantas cultivadas en condiciones naturales.

ESTRATEGIAS DESARROLLADAS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE INTERÉS

Una vez estudiado y establecido el sistema de cultivo para la producción del metabolito de interés se deben desarrollar estrategias que permitan aumentar su rendimiento. Casi la totalidad de las investigaciones realizadas

culminan en un proceso que integra varias de estas estrategias lo que permite un incremento en los rendimientos de los metabolitos de interés. Entre ellas se mencionan:

Selección de líneas celulares

Una vez que se ha establecido el cultivo de células, se observa un proceso continuo de cambios epigenéticos o genéticos, el cual provoca que la población sea heterogénea. Es por esto que se hace necesario seleccionar clones con un alto ritmo de crecimiento y con una alta producción de los metabolitos de interés (Shilpa *et al.*, 2010). Las líneas celulares se obtienen mediante la selección a través de siguiendo varias estrategias que incluyen: los exámenes microscópicos, macroscópicos y químicos (Kreis, 2007). La selección de líneas celulares ha sido una estrategia favorable para la obtención de pigmentos en cultivos de *Lithospermum erythrorhizon* donde se encontraron clones con un alto incremento de shikonina (Fujita *et al.*, 1984). Sin embargo, esta estrategia no ha sido exitosa en investigaciones como es el caso del cultivo de células de *Papaver somniferum* para producir codeína en considerables cantidades (Park *et al.*, 1992).

Optimización de la composición del medio y condiciones de cultivo

La optimización del medio y las condiciones de cultivo pueden incrementar la productividad del compuesto de interés. Sin embargo, se ha demostrado en varios trabajos que las condiciones de cultivo y nutrientes necesarias para el desarrollo de la biomasa no coinciden con las necesarias para la producción del compuesto de interés (Wilken *et al.*, 2005). Este aspecto ha promovido el desarrollo de un sistema de cultivo en dos etapas, una primera que estimule el crecimiento de la biomasa y la segunda que favorezca la biosíntesis del metabolito deseado (Morris *et al.*, 1985).

Varios grupos de investigación han realizado modificaciones a los componentes básicos de los medios de cultivo, las cuales se han basado con mayor frecuencia en la concentración o naturaleza de compuestos como el nitrógeno, el fósforo, el potasio, el calcio, el magnesio, los reguladores de crecimiento u otras sustancias que intervienen en la ruta metabólica del

compuesto de interés (Briskin, 2007). Por ejemplo, en estudios realizados en el cultivo de suspensiones celulares de *Digitalis thapsi* los niveles de cardenólidos se incrementaron con la eliminación del calcio (Cacho *et al.*, 1999).

Varios estudios han demostrado el efecto del tipo y la concentración de la fuente de carbono que afecta no sólo el crecimiento celular sino también el rendimiento de productos, aunque no siempre de una forma predecible. Así, en suspensiones celulares de *Taxus chinensis* cultivadas en biorreactores se obtuvo un incremento de la producción de taxoides. Esto fue posible mediante la adición de sacarosa en combinación con el efecto del metil jasmonato (Dong y Zhong, 2002). Otros autores como Wang y Zhong (2002) encontraron que la adición de fructosa promovió la producción de taxol en el cultivo de células de *Taxus* spp. Estos resultados son considerados de gran utilidad en la producción de taxoides en el cultivo de células de *Taxus* spp.

Por otra parte, Arora *et al.* (2010) incrementaron en 14 veces el contenido de polifenoles en el cultivo de células de *Cayratia trifolia* con la adición de 3% sacarosa en combinación con el ácido salicílico y un extracto de *Cuscuta reflexa* comparado con el cultivo control.

Otro ejemplo del efecto de la composición del medio de cultivo se halla en el cultivo de callos de *Duboisia myoporoides* donde la presencia de citoquininas incrementa la producción de alcaloides. Sin embargo, la sustitución del ácido naftalenacético por el ácido indolbutírico en las mismas concentraciones inhibió la formación de la hiosciamina y escopolomina en plantas cultivadas en medio de cultivo líquido (Khanam *et al.*, 2000).

Rathore y Shekhawat (2009) han señalado que la acumulación de isoflavonoides en órganos de plantas regeneradas *in vitro* fue tan elevada como la obtenida en plantas madres. Este incremento pudo ser originado, según los autores, debido a las condiciones de cultivo *in vitro* y el efecto de los reguladores de crecimiento utilizados en la investigación.

En cuanto a las condiciones de cultivo varios autores reafirman el efecto del pH, la luz y la temperatura en el incremento de la concentración de los metabolitos deseados en diferentes especies. Es el caso de la acumulación de

podofilotoxinas que se vio estimulada por la iluminación en cultivos de *Linun flavum*, mientras que los mismos autores encontraron un incremento de podofilotoxinas en cultivos de suspensiones celulares de *Podophyllum hexandrum* en oscuridad, superior al obtenido en suspensiones celulares cultivadas en condiciones de luz (Van Uden, 1993). Shohael *et al.* (2006) evaluó el efecto de la temperatura en la producción de metabolitos secundarios en embriones somáticos de *Eleutherococcus senticosus*. Durante el crecimiento de los embriones somáticos a 12, 18 y 30°C observaron una disminución en el contenido de flavonoides y fenoles totales en comparación con 24°C.

Además, existen otros factores externos que pueden estimular o atenuar la acumulación de metabolitos como son: el número de subcultivos, el tipo y la edad del explante utilizado que se requiere tener en cuenta para desarrollar una estrategia favorable (Steven, 1998).

Inmovilización celular

La inmovilización celular tiene como ventajas que la biomasa producida puede ser utilizada continuamente, altos niveles de producción de biomasa y las células pueden ser separadas fácilmente del medio de cultivo (Kreis, 2007). Aunque la inmovilización celular fue propuesta originalmente para otros fines, evidencias experimentales indican que puede tener un impacto en la producción de metabolitos secundarios (Baldi *et al.*, 2007). Por ejemplo, suspensiones celulares de *Taxus cuspidata* fueron inmovilizadas durante seis meses y se alcanzaron niveles de paclitaxel de 0.012% de peso seco (Fett-Neto *et al.*, 1992). De igual forma, Komaraiah *et al.* (2003) realizaron estudios para incrementar el contenido de naftoquinonas en células inmovilizadas de *Plumbago rosea*. Junto a esta estrategia emplearon la elicitación y la recuperación del producto *in situ* lo que incrementó considerablemente la producción del metabolito secundario de interés.

Adición de precursores

La adición de precursores representa una interesante estrategia para explotar el potencial biosintético de las enzimas presentes en el cultivo de células. Precursores como la fenilalanina, ácido benzoico o serina han sido utilizados para incrementar la acumulación de

paclitaxel en el cultivo de callos y suspensiones celulares de *Taxus cuspidata* (Fett-Neto *et al.*, 1994). También estudios de precursores combinados se han empleado en cultivos de *Camptotheca acuminate* donde la estricteosidina fue fácilmente biotransformada pero no fueron detectados niveles de camptotecina (Silvestrine *et al.*, 2002). Por otra parte, en el cultivo de brotes de *Hypericum perforatum* en medios de cultivo líquidos se han empleado varios precursores con el objetivo de incrementar el contenido de hipericina y hiperforina (Liu *et al.*, 2007). Los resultados mostraron que la biosíntesis de hipericina fue estimulada por L-fenilalanina pero sólo en concentraciones elevadas favoreció la síntesis de hiperforina, mientras que el triptófano disminuyó el contenido de los metabolitos de interés. Estos resultados demostraron que los metabolitos secundarios pueden ser modulados por la adición de precursores de sus rutas biosintéticas.

Otros autores como Baldi y Dixi (2008) han evaluado el efecto de varios precursores de la biosíntesis de terpenos como el acetato de sodio, el ácido mevalónico, la caseína hidrolizada y el colesterol en el cultivo de células de *Artemisia annua*. La acumulación máxima de artemisina (96.8 mg l⁻¹) se obtuvo con el ácido mevalónico.

Elicitores

La elicitación es uno de los métodos más efectivos establecidos en procesos a gran escala para inducir la expresión de genes asociados con enzimas responsables de la síntesis de metabolitos secundarios como mecanismo de defensa contra el ataque de patógenos o daños en plantas (Namdeo, 2007; Baldi *et al.*, 2007).

El término «elicitador» se utiliza comúnmente para denominar los factores físicos y químicos que son responsables de las respuestas fisiológicas o morfológicas de las plantas. Según su origen y estructura molecular han sido clasificados como físicos o químicos, abióticos o bióticos y dentro de este grupo como elicitores de composición química compleja o definida (Radman *et al.*, 2003).

Entre los elicitores físicos están el déficit hídrico, la salinidad, temperaturas extremas, excesiva

o insuficiente radiación luminosa, anaerobiosis por encharcamiento o inundación, factores mecánicos como el viento o la compactación del suelo y las lesiones. Los químicos incluyen el estrés iónico (por salinidad), el estrés nutricional, o la presencia de contaminantes inorgánicos (dióxido de silicio, ozono o metales pesados) u orgánicos (clorofluorocarbonados, bifenilos policlorados o hidrocarburos aromáticos policíclicos). El estrés abiótico es el más común y generalmente, se produce una combinación de varios de ellos.

Los elicitores que son usados con más frecuencia en el cultivo *in vitro* con el objetivo de incrementar la producción de metabolitos secundarios incluyen al metil jasmonato (Ketchum *et al.*, 1999; Wang y Zhong, 2002; Kim *et al.*, 2004; Roat y Ramawat, 2009), los oligosacáridos (Prakash y Srivastava, 2008; Korsangruang *et al.*, 2010); extractos de hongos u otros microorganismos (Namdeo *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005; Arora *et al.*, 2010).

La mayor parte de las investigaciones relaciones con el uso de los elicitores han sido desarrolladas en el cultivo de células. Hasta la fecha, solo algunos investigadores han establecido el uso de elicitores en el cultivo de órganos (Spollansky *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007; Orlita *et al.*, 2008; Sakunphueak y Panichayupakaranant, 2010).

A continuación se reflejan resultados que muestran el efecto positivo de la combinación de diferentes elicitores bióticos y abióticos como una estrategia para el incremento de los metabolitos secundarios en plantas.

Entre los principales resultados se pueden citar los descritos por Króllicka *et al.* (2001) que describen la acumulación de umbeliferona en el cultivo *in vitro* de callos, suspensiones celulares y raíces de *Ammi majus* mediante elicitores abióticos (dióxido de silicio y ácido jasmónico) y elicitores bióticos como extractos de las bacterias *Enterobacter sakazaki* y *Erwinia chrysanthemi*.

Posteriormente, Namdeo *et al.* (2002) informaron del uso de microorganismos para elicitar suspensiones celulares de *Catharanthus roseus* (extractos de *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme* y *Trichoderma*

viride). La máxima producción de ajmalicina ($75 \mu\text{g g}^{-1}$ MS) fue observada en células tratadas con *T. viride*.

Autores como Luo y He (2004) señalan un máximo de 54 mg l^{-1} de paclitaxel producido en suspensiones celulares de *Taxus chinensis* mediante la adición de la combinación de diferentes elicitores como el metil jasmonato, nitrato de plata, chitosan, precursores como fenilalanina, glicina y resultó un incremento respecto al cultivo no elicitado.

El efecto de elicitores abióticos fue estudiado además, en la producción de podofilotoxinas en el cultivo de suspensiones celulares de *Linum album* y se obtuvo una producción de 0.24 mg g^{-1} de masa seca con la adición de 1 mM de plata (Shams-Ardakani *et al.*, 2005).

Otros estudios revelan el efecto positivo de la sacarina y el benzotiadiazol (función química análoga al ácido salicílico) en la biosíntesis de cumarinas y alcaloides en brotes de *Ruta graveolens* (Orlita *et al.*, 2008). Estudios en el cultivo de células de *Cayratia trifolia* revelaron el efecto del ácido salicílico, el metil jasmonato, el ethrel (regulador del crecimiento), extracto de levaduras en la producción de polifenoles (Roat y Ramawat, 2009). Los resultados mostraron un incremento en la producción de los polifenoles con el ácido salicílico y el metil jasmonato.

Korsangruang *et al.* (2010) demostraron el efecto de elicitores bióticos y abióticos en la acumulación de isoflavonoides en dos variedades de *Pueraria candollei*. El metil jasmonato fue el elicitor que incrementó notablemente el contenido del metabolito de interés.

Recuperación del producto *in situ*

La permeabilización mediante el uso de solventes y la adición de adsorbentes al cultivo de células son estrategias que han sido también usadas para incrementar la producción de metabolitos secundarios. Aunque no son estrategias ampliamente utilizadas tienen como ventajas estimular la biosíntesis de los metabolitos y además facilitar la separación de los productos (Baldi

et al., 2007). Kwon *et al.* (1998) estudió los efectos de la adición de adsorbentes en la producción de taxol y taxanos en el cultivo de células de *Taxus cuspidata* y encontraron un incremento en la biosíntesis de taxol entre un 40 y 70% a los 16 días de cultivo.

Biotransformación

Las enzimas de las plantas son capaces de catalizar reacciones específicas o estereoespecíficas. Por consiguiente, la inmovilización de células así como las preparaciones enzimáticas pueden ser usadas para la producción de biofármacos mediante la biotransformación (Baldi *et al.*, 2007). Los estudios de biotransformación que se han llevado a cabo en los cultivos de suspensiones celulares se han desarrollado para producir nuevos compuestos, producir compuestos conocidos de una forma más económica y elucidar rutas metabólicas (Kreis, 2007). Los trabajos realizados en *Digitalis lanata* son los mejores ejemplos, Kreis y Reinhard (1992) obtuvieron cardenólicos mediante la biotransformación con el uso de la digitoxina como sustrato.

La biotransformación como estrategia solo puede ser utilizada en el cultivo de células de plantas y para aquellos productos de alto valor económico de interés comercial.

Escalado de la producción

Aunque se han hecho promesas y especulaciones acerca de lo que la biotecnología puede alcanzar, el impacto real en el desarrollo de nuevos productos con técnicas de escalado no se ha demostrado suficientemente aunque desde el punto de vista académico, la tecnología disponible, ha sido eficaz porque ha permitido probar conceptos (Rocha, 2006).

Las razones para explicar el poco éxito comercial se derivan de los retos asociados con aspectos de la producción a gran escala. Así, Baldi *et al.* (2007) hacen referencia a los cambios que ocurren en el ambiente *in vitro* cuando se realiza el escalado de cultivos en agitación a biorreactores y que generalmente la productividad disminuye. Es notable señalar la gran atención que ha recibido el cultivo en biorreactores con el objetivo de

implementar los procesos a escala comercial.

Varios trabajos científicos muestran que el cultivo de órganos a pesar de ser una mejor fuente de obtención de metabolitos secundarios ha presentado serios problemas (propiedades físicas de los órganos) en el escalado en biorreactores convencionales. Esto ha llevado al desarrollo de numerosas estrategias en biorreactores modificados y sistemas de inmersión temporal.

Con estos últimos, se han llevado a cabo investigaciones con diferentes diseños pero el mismo principio y con los objetivos de incrementar la calidad de la biomasa producida y manipular las condiciones de crecimiento de la misma y acumulación de los metabolitos secundarios (Wilken *et al.*, 2005; Quiala *et al.*, 2006; Pérez-Alonso *et al.*, 2009).

Estos sistemas por su relación costo-beneficio y por la posibilidad de cultivar tejidos diferenciados con probada capacidad para la síntesis de metabolitos secundarios, pueden ser empleados para la producción de compuestos de interés farmacéutico. Además, brindan la posibilidad de regular o manipular el ambiente *in vitro*, así como otros parámetros primordiales de cultivo que pueden influir sobre la producción de biomasa y la acumulación de los metabolitos (Wilken *et al.*, 2005).

Por ejemplo, Gontier *et al.* (2005) desarrollaron un sistema de bajo costo para la producción de biomasa de brotes de *Ruta graveolens* y la obtención de furanocumarinas, basado en la inmersión temporal. Se obtuvieron 1.6 g de masa seca por día y una productividad de 3.8 mg de furanocumarinas, valores superiores a los que se obtuvieron mediante el cultivo de brotes en agitación y en biorreactores clásicos.

Igualmente, Vanik *et al.* (2005) emplearon diferentes sistemas de cultivo a gran escala para la multiplicación de raíces adventicias de *Panax ginseng*. El mayor contenido de saponinas de 28.51 mg.g⁻¹ de peso seco fue encontrado en las raíces adventicias cultivadas en los sistemas de inmersión temporal RITA®.

Posteriormente, autores como Tisserat y Vaughn (2008) evaluaron el efecto de la frecuencia de inmersión, entre otros factores,

en un sistema automatizado para el cultivo de plantas con igual principio que los sistemas de inmersión temporal. Ellos demostraron que los aceites esenciales de *Mentha spicata* pueden incrementarse considerablemente mediante cambios físicos en el ambiente *in vitro* en sistemas automatizados en comparación con sistemas convencionales de cultivo. Estos resultados sugieren que el uso de las plantas desarrolladas en estos sistemas automatizados para la producción de metabolitos permite su aplicación comercial.

Otros autores han desarrollado varias estrategias combinadas para incrementar el contenido de metabolitos secundarios como el uso de biorreactores y la elicitación. Así, Prakash y Srivastava (2008) realizaron estudios en suspensiones celulares elicidadas de *Azadirachta indica* cultivadas en biorreactores para la producción de azadiractina. Se obtuvo un incremento en la acumulación del metabolito (161.1 mg l⁻¹), tres veces mayor comparado con el control en biorreactores sin el uso de elicitores.

Transformación genética

La transformación genética en plantas ha tenido un gran impacto no sólo en la biología molecular sino como estrategia para el mejoramiento genético de los cultivos. Algunos estudios describen la transferencia estable y la expresión de genes foráneos en plantas de interés medicinal que producen compuestos de actividad farmacológica (Saito *et al.*, 1990; Sales *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2009). Un sistema eficiente de transformación ha sido el descrito por varios autores mediante *Agrobacterium rhizogenes*. Por otra parte, autores como Canter *et al.* (2005) mencionan varios ejemplos exitosos de transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* en especies de *Digitalis*, *Taxus*, *Artemisia*, entre otros géneros. Dicho sistema implica disponer de un método eficiente de regeneración de plantas, una metodología de transferencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) y un sistema de selección de células o tejidos transformados para cada una de las fases del proceso de regeneración.

En el género *Digitalis* el conocimiento de las rutas de biosíntesis de cardenólidos ha incrementado el interés por incluir la

transformación genética dentro de las alternativas de mejoramiento genético. Sales *et al.* (2002) describieron la regeneración eficiente de la plantas a partir de explantes foliares de *Digitalis minor* infectados con *Agrobacterium tumefaciens*. Sin embargo, ni los brotes y raíces regenerados, ni las plantas obtenidas resultaron transformadas. Posteriormente, este mismo grupo de investigadores en el año 2007 empleó un sistema de transformación mediado por *A. tumefaciens* en esta misma especie, pero esta vez utilizando cepas diferentes. Algunas de las líneas obtenidas presentaron un mayor contenido de cardenólidos (hasta un 40%) tanto *in vitro* como en condiciones de invernadero.

Otros autores como Zhu *et al.* (2009) establecieron un sistema de transformación mediado por *A. tumefaciens* para *Dioscorea zingiberensis* a partir de callos, el cual puede favorecer la introducción y expresión de genes que incrementen la producción de la diosgenina. Este metabolito es un precursor para la síntesis de varias drogas esteroidales de actividad androgénica, antiinflamatoria, anticonceptiva.

Ingeniería metabólica

Dentro de la ingeniería metabólica se han desarrollado diversos métodos como la sobreexpresión de enzimas requeridas para la síntesis de los productos deseados, la canalización del flujo metabólico hacia el producto de interés, creación de nuevas rutas en las redes metabólicas existentes, que pueden favorecer la acumulación de compuestos que no son normalmente producidos en ciertas especies de plantas (Guttman *et al.*, 2004).

Guttman *et al.* (2004) encontraron una gran diversidad de nuevas sustancias químicas mediante la transferencia de genes biosintéticos de *Catharanthus roseus* a un cultivo celular de *Nicotiana tabacum* con el objetivo de introducir nuevas rutas metabólicas. Mediante el uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución y la Electroforesis capilar identificaron diferencias en los perfiles metabólicos.

En los primeros estudios biosintéticos se adicionaban precursores radiomarcados a las plantas completas pero se prefiere la adición

de precursores isótopos marcados al cultivo de células. Esto permite el análisis de los metabolitos mediante métodos como la resonancia magnética, nuclear y la espectrometría de masa. La etapa final en el análisis de las rutas biosintéticas es la identificación de enzimas que catalizan la bioconversión individual así como la identificación de los genes que codifican para estas enzimas (Baldi *et al.*, 2007).

PERSPECTIVAS DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS

La demanda de los metabolitos secundarios producidos en plantas mediante el cultivo *in vitro* será cada vez mayor. La optimización de la producción a través del empleo de las diferentes estrategias como el cultivo de órganos en biorreactores, uso de elicitores y precursores (entre las de mayor importancia) que durante los años de investigación se han desarrollado, permitirá una reducción en el tiempo para lograr una producción óptima de los productos deseados con aplicación comercial y bajos costos.

La ingeniería metabólica parece ser la estrategia más promisoría y el conocimiento de las rutas metabólicas así como la identificación de genes y enzimas involucradas en la síntesis de los compuestos deseados permitirá la obtención de plantas de interés, altamente productoras y brindará la posibilidad de ampliar el espectro de sustancias muchas de las cuales pueden ser compuestos novedosos.

Los aspectos recogidos en esta reseña muestran las desventajas y ventajas que brinda el cultivo *in vitro* así como la necesidad de desarrollar nuevas estrategias que permitan implementar los procesos de obtención de metabolitos secundarios en plantas con aplicación comercial.

REFERENCIAS

- Anaya-Lang, AL, Espinoza-García FJ (2006) La química que entretiene a los seres vivos. Ciencias 83:4-13
- Arora, J, Goyal S, Ramawat KG (2010) Enhanced stilbene production in cell cultures of *Cayratia trifolia* through co-treatment with abiotic and biotic elicitors and sucrose. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 46:430-436

- Baldi, A, Bisaria VS, Srivastava (2007) Biotechnological approaches for the production of some promising plant-based chemotherapeutics. En: Kayser O, Quax W (Eds) Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application, pp. 117-156. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Baldi, A, Dixit VK (2008) Enhanced artemisinin production by cell cultures of *Artemisia annua*. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy 2:341-348
- Bassetti, L, Hagendoorn M, Johannes T (1995) Surfactant-induced non-lethal release of anthraquinones from suspension cultures of *Morinda citrifolia*. J Biotechnol 39:149-155
- Bennett, RN, Wallsgrove RM (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New Phytologist 127: 617-633
- Bhalla, R, Narasimhan K, Swarup S (2005) Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. Plant Cell Rep 24:562-571
- Boitel-Conti, M, Gontier E, Assaf C, Laberche JC, Ducrocq C, Sangwan-Norreel BS (1997) Procédés de production de métabolites primaires et secondaires a partir d'organes végétaux cultivés *in vitro*. Patent: France no. FR 97 00641
- Borroto, J, Coll J, Rivas M, Blanco M, Concepción O, Tandrón YA, Hernández M, Trujillo R (2008) Anthraquinones from *in vitro* root culture of *Morinda royoc* L. Plant Cell Tiss Organ Cult 94:181-187
- Bourgau, F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science 161:839-851
- Briskin, D (2007) Biotechnological methods for selection of high-yielding cell lines and production of secondary metabolites in medicinal plants. En: Kayser O, Quax W (Eds) Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application, pp. 187-201. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Cacho, M, Morán M, Corchete P, Fernández-Tárrago J (1999) Effect of calcium restriction on cardenolide accumulation in two cell lines of *Digitalis thapsi* grown under different light regimes. Acta Physiologiae Plantarum 21:335-340
- Canter, PH, Thomas H, Ernst E (2005) Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. TRENDS in Biotechnology 23:180-185
- Capote, A, Pérez-Alonso N, Pérez A, Barbón R, Salas E, Wilken D, Gerth A, Müller-Kuhr L, Jiménez E (2008) Perfil metabólico de extractos obtenidos de cultivos *in vitro* y plantas de campo de *Morinda royoc* L., *Psidium guajava* L. y *Morus alba* L. Biotecnología vegetal 8:119-121
- Chinou, I (2008) Primary and secondary metabolites and their biological activity. En: Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T (Eds) Thin layer chromatography in phytochemistry, pp. 59-76. CRS Press, Boca Raton
- Choi, SM, Son SH, Yun SR, Kwon OW, Seon JH, Paek KY (2000) Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system. Plant Cell Tiss Organ Cult 62:187-193
- Cragg, GM, Newman DJ (2005) Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. Pure Appl Chem 77:7-24
- Cusidó, RM, Palazón J, Bonfill M, Navia-Osorio A, Morales C, Piñol MT (2002) Improved paclitaxel and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus media*. Biotechnol Prog 18:418-423
- Deshmukh, SR, Wadegaonkar VP, Bhagat RP, Wadegaonkar PA (2011) Tissue specific expression of anthraquinones, flavonoids and phenolics in leaf, fruit and root suspension cultures of Indian Mulberry (*Morinda citrifolia* L.). Plant Omics 4:6-13
- Dong, HD, Zhong JJ (2002) Enhanced taxane productivity in bioreactor cultivation of *Taxus chinensis* cells by combining elicitation, sucrose feeding and ethylene incorporation. Enzyme Microb Technol 31:116-121
- Doran, PM (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. Curr Opin Biotechnol 11:199-204
- Dörnenberg, H, Knorr D (1997) Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. Foodtechnology 51:47-54
- Fiehn, O (2002) Metabolomics: The link between genotypes and phenotypes. Plant Mol Biol 48:155-171
- Fett-Neto, AG, Dicosmo F, Reynolds WF, Sakata K (1992) Cell culture of *Taxus* as a source of the antineoplastic drug taxol and related taxanes. Biotechnology 10:1572-1575
- Fett-Neto, AG, Melanson SJ, Nicholson SA, Pennington JJ, Dicosmo F (1994) Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell culture of *Taxus cuspidate*. Biotechnol Bioeng 44:967-971

- Fujita, Y, Takahashi S, Yamada Y (1984) Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives through protoplasts of *Lithospermum erythrorhizon*. Proc Euro Congr Biotechnol, 3rd, 1:161-166
- George, EF, Debergh PC (2008) Micropropagation: Uses and Methods. En: George EF, Hall MA, de Klerk G-J (Eds) Plant propagation by tissue culture 3rd edition, pp. 29-64. Springer, Dordrecht
- Giri, A, Narasu ML (2000) Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology Advances 18:1-22
- Gleba, D, Borisjuk N, Borisjuk L, Kneer R, Poulev A, Skarzhinskaya S, Logendra S, Gleba Y, Raskin I (1999) Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. Proc Natl Acad Sci 96:5973-5977
- Goleniowski, M, Trippi VS (1999) Effect of growth medium composition on psilostachyionolides and altamisine production. Plant Cell Tiss Organ Cult 56:215-218
- Gontier, E, Piutti S, Gravot A, Milesi S, Grabner A, Massot B, Lievre K, Tran M, Goergen J, Bourgaud F (2005) Development and validation of an efficient low cost bioreactor for furanocoumarin production with *Ruta graveolens* shoot cultures. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation, pp. 509-524. Springer, Dordrecht
- Goossens, A, Häkkinen S, Laakso I, Seppänen-Laakso T, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila AM, Söderlund H, Zabeau M, Inze D, Oksman-Caldentey K (2003) A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. Proc Natl Acad Sci USA 100:8595-8600
- Gurib-Fakim, A (2006) Medicinal plants: Tradition of yesterday and drugs of tomorrow. Mol Aspects Med 27:1-93
- Guttman, A, Khandurina J, Budworth P, Xu W, Hou Y-M, Wang X (2004) Analysis of combinatorial natural products by HPLC and CE. PharmaGenomics 4:32-42
- Hagimori, M, Matsumoto T, Obi Y (1982) Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture. II Effects of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. Plant Physiol 69:653-656
- Haq, N (2004) *In vitro* production of bioactive compounds from medicinal and aromatic plants [en línea] En: <<http://www.telmedpak.com>> [consulta: 12 octubre 2004]
- Hostettmann, K, Marston N, Ndjuko K, Wolfender JL (2000) The potential of african plants as a source of drugs. Curr Org Chem 4:973-1010
- Karuppusamy, S (2009) A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. Journal of Medicinal Plants Research 3:1222-1239
- Ketchum, R, Gibson D, Croteau R, Shuler ML (1999) The kinetics of taxoid accumulation in suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. Biotech Bioeng 62:97-105
- Khanam, N, Khoo C, Khan AG (2000) Effect of cytokinin combinations on organogenesis, shoot regeneration and tropane alkaloid production in *Duboisia myoporoides*. Plant Cell Tiss Organ Cult 62:125-133
- Kim, OT, Bang KH, Kim YC, Hyun DY, Kim MY, Cha SW (2009) Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. Plant Cell Tiss Organ Cult 98:25-33
- Kim, OT, Kim MY, Hong MH, Ahn JC, Hwang B (2004) Stimulation of asiaticoside accumulation in the whole plant cultures of *Centella asiatica* (L.) Urban by elicitors. Plant Cell Rep 23:339-344
- Komaraiah, P, Ramakrishna SV, Reddanna P, Kavi Kishor PB (2003) Enhanced production of plumbagin in immobilized cells of *Plumbago rosea* by elicitation and *in situ* adsorption. Journal of Biotechnology 101:181-187
- Korsangruang, S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P, Prathanturag S (2010) Effects of abiotic and biotic elicitors on growth and isoflavonoid accumulation in *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. Plant Cell Tiss Organ Cult 103:333-342
- Kreis, W, Reinhard E (1992) 12 α -Hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells. Production of digoxin in 20-litre and 300-litre airlift bioreactors. J Biotechnol 26:257-273
- Kreis, W (2007) *In-vitro* culturing techniques of medicinal plants. En: Kayser O, Quax W (Eds) Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application, pp. 157-185. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Królicka, A, Staniszevska I, Bielawski K, Malinski E, Szafranek J, Lojkowska E (2001) Establishment

- of hairy root cultures of *Ammi majus*. Plant Sci 160:259-264
- Kutney, JP, Arimoto M, Hewitt GM, Jarvis TC, Sakata K (1991) Studies with plant cell cultures of *Podophyllum peltatum* L. I. Production of podophyllotoxin, deoxypodophyllotoxin, podophyllotoxone, and 4'-demethylpodophyllotoxin. Heterocycle 32:2305-2309
- Kwon, IC, Yoo YJ, Lee JH, Hyun JO (1998) Enhancement of taxol production by *in situ* recovery of product. Process biochem 33:701-707
- Lan, XZ, Quan H (2010) Hairy root culture of *Przewalskia tangutica* for enhanced production of pharmaceutical tropane alkaloids. Journal of Medicinal Plants Research 4:1477-1481
- Liu, X-N, Zhang X-Q, Zhang S-X, Sun J-S (2007) Regulation of metabolite production by precursors and elicitors in liquid cultures of *Hypericum perforatum*. Plant Cell Tiss Organ Cult 91:1-7
- Luo, J, He GY (2004) optimization of elicitors and precursors for paclitaxel production in cell suspension culture of *Taxus chinensis* in the presence of nutrient feeding. Process Biochem 39:1073-1079
- Makunga, NP, van Staden J (2008) An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea* L. Plant Cell Tiss Organ Cult 92:63-72
- Massot, B, Milesi S, Gontier E, Bourgaud F, Guckert A (2000) Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. Plant Cell Tiss Organ Cult 62:11-19
- Moreno, PRH, van der Heijden R, Verpoorte R (1993) Effect of terpenoid precursor feeding and elicitation on formation of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. Plant Cell Reports 12:702-705
- Namdeo, A, Patil S, Fulzele D (2002) Influence of fungal elicitors on production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnol Prog 18:159-162
- Namdeo, AG (2007) Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. Pharmacognosy Reviews 1:69-79
- Orlita, A, Sidwa-Gorycka M, Kumirska J, Malinski E, Siedlecka E, Gajdus J, Lojkowska E, Stepnowski P (2008) Identification of *Ruta graveolens* L. metabolites accumulated in the presence of abiotic elicitors. Biotechnol Prog 24:128-133
- Paek, KY, Chakrabarty D, Hahn EJ (2005) Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. Plant Cell Tiss Organ Cult 81:287-300
- Park, JM, Yoon SY, Giles KL, Songstad DD, Eppstein D, Novakovski D, Roewer I (1992) Production of sanguinarine by suspension culture of *Papaver somniferum* in bioreactor. J Ferm Bioeng 74:292-296
- Pérez-Alonso, N, Wilken D, Gerth A, Jahn A, Nitzsche HM, Kerns G, Capote-Pérez A, Jiménez E (2009) Cardiotonic glycosides from biomass of *Digitalis purpurea* L. cultured in temporary immersion systems. Plant Cell Tiss Org Cult 99:151-156
- Pezzuto, JM (1995) Natural product cancer chemoprotective agents. En: Arnason JT, Mata R, Romeo JT (Eds). Recent advances in phytochemistry. Phytochemistry of medicinal plants, 29, pp. 19-45. New York
- Prakash, G, Srivastava AK (2008) Statistical elicitor optimization studies for the enhancement of azadirachtin production in bioreactor *Azadirachta indica* cell cultivation. Biochemical Engineering Journal 40:218-226
- Quiala, E, Barbón R, Jiménez E, de Feria M, Chávez M, Capote A, Pérez-Alonso N (2006) Biomass production of *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf., a medicinal plant, in temporary immersion systems. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 42:298-300
- Radman, R, Saez T, Bucke C, Keshavarz T (2003) Elicitation of plants and microbial cell systems. Biotechnol Appl Biochem 37:91-102
- Ramachandra Rao, S, Ravishankar GA (2002) Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances 20:101-153
- Rathore, MS, Shekhawat NS (2009) Micropropagation of *Pueraria tuberosa* (Roxb. Ex Willd.) and determination of puerarin content in different tissues. Plant Cell Tiss Organ Cult 99:327-334
- Roat, C, Ramawat KG (2009) Elicitor-induced accumulation of stilbenes in cell suspension cultures of *Cayratia trifolia* (L.) Domin. Plant Biotechnol Rep 3:135-138
- Rocha, PJ (2006) Biotecnología en plantas medicinales y aromáticas. II Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira
- Saito, K, Yamazaki M, Shimomura K, Yoshimatsu K, Murakoshi I (1990) Genetic transformation of foxglove (*Digitalis purpurea*) by chimeric foreign genes

- and production of cardioactive glycosides. *Plant Cell Reports* 9:121-124
- Sajc, L, Grubisic D, Vunjak-Novakovic G (2000) Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal* 4:89-99
- Sakunphueak, A, Panichayupakaranant P (2010) Increased production of naphthoquinones in *Impatiens balsamina* root cultures by elicitation with methyl jasmonate. *Bioresource Technology* 101:8777-8783
- Sales, E, Muñoz-Bertomeu J, Arrillaga I, Segura J (2007) Enhancement of cardenolide and phytosterol levels by expression of an N-terminally truncated 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in transgenic *Digitalis minor*. *Planta Medica* 73:605-610
- Sales, E, Nebauer SG, Arrillaga I, Segura J (2002) Plant hormones and *Agrobacterium tumefaciens* strain 82.139 induce efficient plant regeneration in the cardenolide-producing plant *Digitalis minor*. *Journal of Plant Physiology* 159:9-16
- Sarin, R (2005) Useful metabolites from plant tissue cultures. *Biotechnology* 4:79-93
- Shams-Ardakani, M, Hemmati S, Mohagheghzadeh A (2005) Effect of elicitors on the enhancement of podophyllotoxin biosynthesis in suspension cultures of *Linum album*. *DARU* 13:56-60
- Shilpa, K, Varun K, Lakshmi BS (2010) An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *J Plant Sci* 5:222-247
- Shohael, AM, Ali MB, Yu KW, Hahn EJ, Paek KY (2006) Effect of temperature on secondary metabolites production and antioxidant enzyme activities in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 85:219-228
- Silvestrine, A, Pasqua G, Botta B, Monacelli B, van der Heijden R, Verpoorte R (2002) Effects of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. *Plant Physiol Biochem* 40:749-753
- Spollansky, TC, Pitta-Álvarez SI, Giuletta AM (2000) Effect of jasmonic acid and aluminium on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Electronic Journal of Biotechnology* 3:72-75
- Steven, R (1998) Method for production of plant biological products in precocious neomorphic embryoids. US Patent 5850032
- Tepfer, D (1990) Genetic transformation using *Agrobacterium rhizogenes*. *Physiol Planta* 79: 14-16
- Thengane SR, Kulkarni DK, Shrikhande VA, Joshi SP, Sonawane KB, Krishnamurthy KV (2003) Influence of medium composition on callus induction and camptothecin(s) accumulation in *Nothapodytes foetida*. *Plant Cell Tiss Organ Culture* 72:247-251
- Tisserat, B, Vaughn S (2008) Growth, morphogenesis, and essential oil production in *Mentha spicata* L. plantlets *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 44:40-50
- Twyman, R, Schillberg S, Fischer R (2005) Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opin Emerg Drugs* 10:185-218
- Vaník, T, Langhansová Ly Maršik P (2005) Cultivation of root cultures of *Panax ginseng* in different bioreactors and in temporary immersion-Comparison of growth and saponin production. En: Hvoslef-Eide, AK, Preil W (Eds) *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, pp. 539-546. Springer, Dordrecht
- Van Uden, W (1993) The biotechnological production of podophyllotoxin and related cytotoxic lignans by plant cell cultures. *Pharm World Sci* 15:41-43
- Vanisree, M, Lee C-Y, Lo S-F, Nalawade SM, Lin CY, Tsay H-S (2004) Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sinica* 45:1-22
- Vanisree, M, Tsay H-S (2007) Plant cell cultures: Production of biologically important secondary metabolites from medicinal plants of Taiwan. En: Kayser O, Quax W (Eds) *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application*, pp. 267-285. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Verpoorte, R, van der Heijden R, Moreno PRH (1997) Biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* cells. En: Cordell GA (Ed) *The alkaloids*, pp. 221-299. Academic Press, San Diego
- Wang, C, Wu J, Mei X (2001) Enhancement of taxol production and excretion in *Taxus chinensis* cell culture by fungal elicitation and medium renewal. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:404-410
- Wang, Z-Y, Zhong J-J (2002) Repeated elicitation enhances taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* in bioreactors. *Biotechnology Letters* 24:445-448

- Wiedenfeld, H, Furmanowa M, Roeder E, Guzewska J, Gustowski W (1997) Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin in callus and plantlets of *Camptotheca acuminata*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 49:213-218
- Wilken, D, Jiménez E, Hohe A, Jordan M, Gómez R, Schmeda G, Gerth A (2005) Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Eds) *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*, pp. 525–537. Springer, Dordrecht
- Wink, M (2007) Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature. En: Kayser O, Quax W (Eds) *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application*, pp. 97-116. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Xu, M-J, Dong J-F, Zhu M-Y (2005) Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension cultures through a jasmonic-acid-dependent signal pathway. *Plant Physiology* 139:991-998
- Yang, C, Chen M, Zeng L, Zhang L, Liu X, Lan X, Tang K, Liao Z (2011) Improvement of tropane alkaloids production in hairy root cultures of *Atropa belladonna* by overexpressing *pmt* and *h6h* genes. *Plant Omics Journal* 4:29-33
- Zhong, JJ (2001) Biochemical engineering of the production of plant- specific secondary metabolites by cell suspension cultures. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 72:21-26
- Zhu, Q, Wu F, Ding F, Ye D, Chen Y, Li Y, Zhifan Y (2009) Agrobacterium-mediated transformation of *Dioscorea zingiberensis* Wright, an important pharmaceutical crop. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 96:317-324