



FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO:

Factores extrínsecos asociados a la producción de metabolitos secundarios en cultivo *in vitro* .

Autor: Elena Andreu Rubert

Fecha: Febrero 2020

Tutor: María Soledad Martín Gómez

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	3
3. OBJETIVO	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
1 <i>Diseños experimentales para hallar las condiciones óptimas.</i>	8
2 <i>El cultivo en biorreactor</i>	9
3 <i>Descripción de factores extrínsecos en la producción de metabolitos secundarios</i>	11
4 <i>Estrategias para incrementar la producción del metabolito.</i>	16
7. BIBLIOGRAFÍA	19

1. RESUMEN

El cultivo vegetal *in vitro* se presenta como una alternativa atractiva en cuanto a producción eco-sostenible de metabolitos secundarios de interés comercial frente a los métodos tradicionales de producción. Sin embargo, debido a su complejidad y costes es necesario optimizar el cultivo para el metabolito secundario de interés y lograr el mayor rendimiento posible. En el presente trabajo se tratan los factores extrínsecos de la producción de metabolitos secundarios en cultivo *in vitro* vegetal. La producción se suele dividir en dos etapas: la primera enfocada al crecimiento de la biomasa y la segunda a la producción del metabolito secundario de interés. Se enumerarán los factores que influyen en cada etapa y se mencionaran ejemplos concretos de aplicación. Por último, se citaran otras estrategias industriales para aumentar el rendimiento total como es la elicitación, la inmovilización, la permeabilización, la adición de precursores y la extracción *in situ*.

PALABRAS CLAVE: cultivo vegetal *in vitro*, metabolitos secundarios, medio de cultivo, productos naturales, elicitores, optimización del cultivo.

ABSTRACT

Plant cell culture systems are an attractive alternative in terms of sustainable organic production of secondary metabolites of commercial interest compared to traditional production methods. However, due to its complexity and costs it is necessary that the production of the secondary metabolite of interest achieves the highest yield. In the present work, extrinsic factors for the improvement of production in plant *in vitro* culture will be treated. Production is usually divided into two stages: the first stage is focused on biomass and the second stage on the secondary metabolite accumulation. These factors are listed and some specific application examples are mentioned. Finally, other industrial strategies to increase the total yield will be cited, such as elicitation, immobilization, permeabilization, precursor feeding and *in situ* extraction.

KEYWORDS: plant cell culture, secondary metabolites, culture media, natural products, elicitors, culture optimization.

2. INTRODUCCIÓN

Las plantas, inmóviles y carentes de sistema inmune, han evolucionado para poder adaptarse de forma ventajosa a su hábitat, para ello producen una gran cantidad y diversidad de productos orgánicos, que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo. Por el contrario, estos compuestos sirven para defenderse del estrés biótico y abiótico e interactuar con el resto de seres vivos; pueden actuar como disuasorios nutritivos como los glucosinolatos, o contra virus, hongos y bacterias (fitoalexinas), contra el crecimiento de otras plantas (sustancias alelopáticas) o incluso asegurar la reproducción atrayendo a los polinizadores. En cuanto al estrés abiótico pueden actuar como protección frente a especies reactivas de oxígeno o ante el exceso de radiación UV como lo hacen los carotenoides. (Arbona, Matías, de Ollas, & Gomez-Cadenas, 2013). Estos compuestos fueron denominados por A. Kossel en 1891 “metabolitos secundarios”. Algunos metabolitos secundarios tienen una distribución restringida en el reino vegetal. Es decir, se encuentran en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, por ello tienen interés taxonómico. No es fácil establecer una división entre metabolitos secundarios y primarios. Por ejemplo, el aminoácido prolina (C5) es un metabolito primario, mientras que su análogo molecular C6, el ácido pipecólico es un alcaloide. (Ahmed, Ashrad, & Khan, 2017)

El metabolismo primario, proporciona un número de moléculas de los cuales parten las rutas más importantes del metabolismo secundario, entre las que cabe destacar el ácido siquímico (ruta del ácido siquímico), el acetato (ruta del acetato-mevalonato y ruta del acetato-malónico) o los aminoácidos. También existen metabolitos secundarios de síntesis mixta, destacan los flavonoides formados por la ruta del ácido siquímico y del acetato mevalonato. Además ciertas variaciones en las rutas del metabolismo primario pueden dar metabolitos secundarios, como es el caso de variaciones en la ruta de las pentosas-fosfato son la fuente de los azúcares encontrados en los glucósidos cardiotónicos. (Piñol, Palazón, & Cusidó, 2008).

Basado en su origen biosintético, los metabolitos secundarios, se dividen en tres grandes grupos: los alcaloides, los provenientes de derivados fenólicos (fenilpropanoides) y los terpenoides. (Leyva & Navarro-Tovar, 2011)

Algunos ejemplos de los tres grupos serían:

- Alcaloides: entre otros, clasificados por su origen, encontramos los derivados del triptófano como la ergotamina.
- Terpenoides: carotenoides, compuestos volátiles de los aceites esenciales y cardenólidos.
- Fenoles: lignanos, el ácido fenólico, las cumarinas, ligninas y flavonoides.

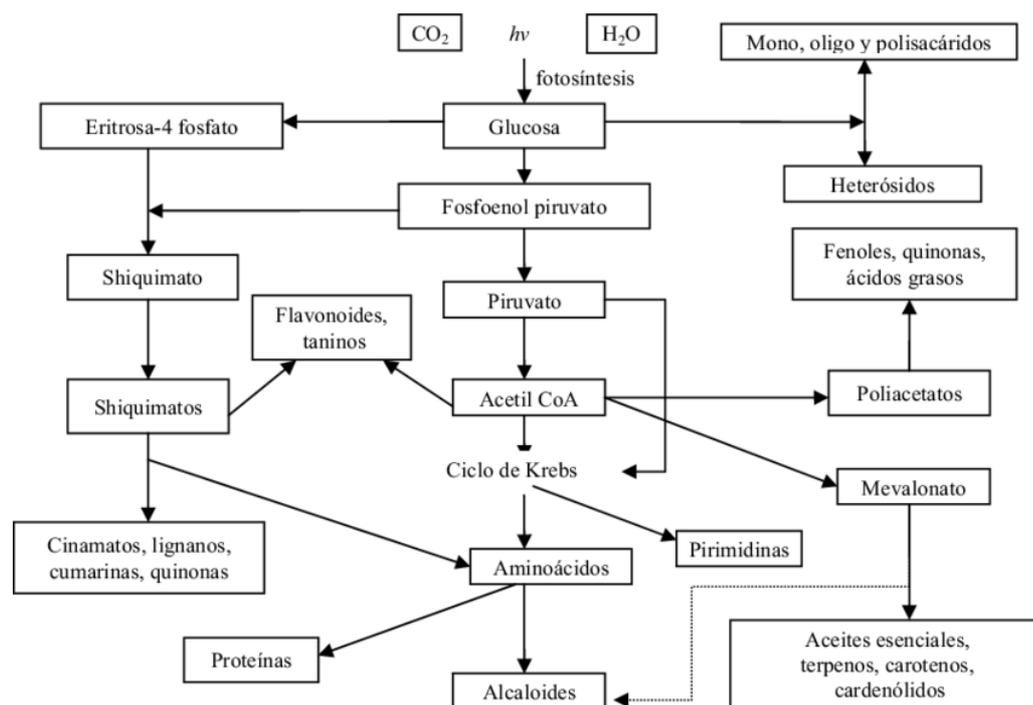


Figura 1 Esquema general de la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios en plantas. Figura tomada de (Leyva & Navarro-Tovar, 2011)

Las plantas medicinales deben sus propiedades curativas a su capacidad para sintetizar y acumular estos compuestos. Todas las culturas desde tiempos ancestrales han valorado las propiedades de las plantas medicinales y actualmente son el principal recurso farmacéutico para dos tercios de la población mundial. (JD, SK, & JT, 2007). Por otro lado, la industria farmacéutica,

se ha interesado en proveer fármacos a partir de sus productos o sintetizar estructuras inspiradas en sus metabolitos. Además de principios activos (codeína, morfina, paclitaxel), las plantas proveen al ser humano de productos naturales que actúan como agentes saborizantes y colorantes (antocianinas, betalainas, astaxantina, azafrán), pesticidas (nicotina y stricnina) y cosméticos (lavanda, romero y aloe) (Ochoa-Villarreal, Howat, & al., 2015).

Debido al uso industrial y tradicional más del 20% de las especies de plantas aromáticas y medicinales se encuentran amenazadas en distinto grado. Dos tercios de las 50,000 especies de plantas medicinales actualmente en uso son recolectadas de la naturaleza, por lo que preocupa cada vez más la disminución de poblaciones, la pérdida de diversidad genética, las extinciones locales, y la degradación de hábitats. En estos casos, los productos naturales pueden ser reabastecidos mediante, producción heteróloga, síntesis química total, o semisíntesis a partir de precursores más abundantes en la naturaleza, o la aplicación de cultivo *in vitro* de células o tejidos vegetales. (Atanasov, Waltenbergere, & Pferschy, 2015).

- Recolección de la naturaleza: además de las desventajas enumeradas arriba, la producción se ve limitada por la velocidad de crecimiento (así, un árbol del género *Taxus* tarda en madurar 30 años). Por otro lado, existen especies que no han sido domesticadas por lo que no pueden ser cultivadas en agricultura extensiva. Por último, la molécula activa suele estar en concentraciones bajas de <1% del peso seco de la planta. (Atanasov, Waltenbergere, & Pferschy, 2015)

- Síntesis química total: tiene principalmente dos desventajas. Debido al tamaño de las moléculas y a que la actividad biológica depende de la regio-especificidad y de los centros estereoquímicos de los productos naturales, la síntesis es compleja. Implica gran cantidad de pasos sintéticos, que en muchas ocasiones resultan en mezclas racémicas, por lo que se tienen bajos rendimientos. Este hecho lo ilustra la síntesis del Taxol, un antineoplásico, cuyo rendimiento final es del 0.002%. La segunda desventaja de la síntesis química total es que suele requerir solventes y reactivos derivados del petróleo para las propias reacciones y la purificación de los intermediarios y de los productos de reacción. Cuando actualmente la reducción del uso y la importancia del reciclado de los petroquímicos es una prioridad mundial. (Wu & Chappel, 2008).

- Semisíntesis a partir de precursores: esta estrategia se basa en obtener un precursor más abundante en la planta que este presente en la ruta biosintética de nuestro metabolito de interés. Una vez extraído del material vegetal se realizan las reacciones necesarias para obtener el metabolito deseado. Suele ser más viable económicamente que la síntesis total. (Ochoa-Villarreal, Howat, & al., 2015)

- Producción heteróloga: la producción de los metabolitos secundarios vegetales en levaduras o bacterias representa una alternativa. La tecnología de los fermentadores, fácilmente escalable, tiene la ventaja de proveer sistemas enzimáticos enantioselectivos. Los hospedadores más utilizados son *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

- Cultivos *in vitro* vegetales: representan una alternativa atractiva en cuanto a producción eco-sostenible de metabolitos secundarios de interés comercial frente a los métodos tradicionales.

Entre las ventajas del cultivo *in vitro* vegetal encontramos:

- a) El metabolito de interés puede ser producido en cualquier lugar del mundo con un control estricto de la calidad y de la producción.

- b) Independencia de fluctuaciones medioambientales y geográficas.
- c) Garantía de materia prima vegetal no contaminada, ya que las células vegetales están libres de microorganismos, herbicidas, pesticidas y fungicidas.
- d) Conservación de plantas en peligro de extinción.
- e) Los ciclos de crecimiento son de semanas en lugar de años como en la naturaleza.

Actualmente existen dieciocho compañías que se dedican a producir con cultivos vegetales *in vitro* productos naturales y a comercializarlos. Principalmente para aplicaciones farmacéuticas y alimentarias. (Ochoa-Villarreal, Howat, & al., 2015). Es esencial en estas industrias biotecnológicas mantener los costes por debajo del coste de un cultivo a gran escala. La complejidad del cultivo vegetal *in vitro*, junto con los costes de esterilización y cultivo en biorreactores, hace que la aplicación de estas nuevas tecnologías sea exclusivamente para producir compuestos de gran valor añadido. (Ramirez-Estrada, y otros, 2016)

Hoy en día, sólo catorce sustancias derivadas de plantas se producen comercialmente en cultivo *in vitro* vegetal, destacando el paclitaxel de *Taxus spp.* Otros ejemplos de productos cuya producción industrial es viable son la shikonina y la berberina. Esto se debe en parte a que se debe investigar más el metabolismo secundario y su regulación en cultivos *in vitro*. Por otro lado, muchos metabolitos no llegan a acumularse en cultivos de células vegetales debido a la falta de diferenciación y compartimentación (Atanasov, Waltenbergere, & Pferschy, 2015). Pues la biosíntesis de los metabolitos secundarios suele estar restringida a fases específicas del desarrollo tanto del organismo (ciclo ontogénico) como de células especializadas (histogénesis y organogénesis) y a periodos de estrés causados, por ejemplo por la deficiencia de nutrientes, por factores ambientales o por el ataque de microorganismos. Esto se debe a la producción de enzimas dependiente de fase. Por lo que conocer la idiosincrasia de cada especie a la hora de promover la producción de un determinado metabolito en condiciones *in vitro* es importante. (Torres, Martín, & Saco, 2018)

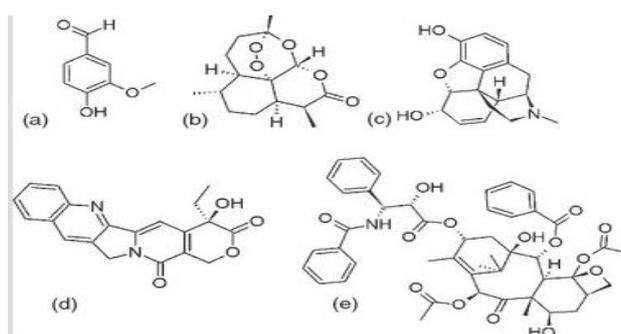


Figura 2 Algunos ejemplos de metabolitos secundarios disponibles comercialmente: a) Vanillina de *Vanilla panifolia*; b) Artemisina, antimalárico de *Artemisia annua*; c) Morfina, analgésico de *Papaver somniferum*; d) Camptotecina, antineoplásico de *Camptotheca acuminata*; e) Paclitaxel, antineoplásico de *Taxus spp.* Figura tomada de (Wilson & Roberts, 2012)

En 1902, Gottlieb Haberlandt propuso la idea de cultivar células individuales vegetales. Aunque fue incapaz de inducir la división celular es reconocido como el fundador de la ciencia del cultivo *in vitro* vegetal. Actualmente, los cultivos de células vegetales pueden generarse a partir de

cualquier planta mediante aislamiento del tejido vegetal. Las células vegetales son totipotentes fisiológicamente hablando, lo que significa que cada célula en el cultivo retiene la información genética completa para producir toda la diversidad química de la planta parental de la que procede sin importar su función o posición en ella y tiene la potencia de poder regenerar una planta entera. Así, los explantos (células o tejidos separados de la planta) son esterilizados con un tratamiento químico y son colocados en un medio sólido de crecimiento que esta formulado con los nutrientes y hormonas del crecimiento necesarias para cada especie. Con la composición correcta, los explantos proliferan hasta convertirse en un callo de células desdiferenciadas, que puede ser seleccionado por su producción del compuesto de interés, para luego ser aislado y transferido a un medio líquido para crear un cultivo de células en suspensión o a un medio semisólido.

Los cultivos de órganos diferenciados de raíces, brotes y embriones también son creados y mantenidos *in vitro*. Los cultivos de órganos vegetales producen cantidades parecidas a lo que produce la planta entera pero los gastos son prohibitivos a gran escala. (Verpoorte et al., 2002). Los cultivos de raíces son generados mediante infección del material vegetal con *Agrobacterium rhizogenes*, de esta manera, crecen muchísimo más rápido que los cultivos de raíces sin infectar y sin necesidad de añadir fitohormonas, por tanto pueden adaptarse al cultivo en biorreactor. (Giri and Narasu, 2000; Srivastava and Srivastava, 2007).

Existen varios tipos de cultivo *in vitro*:

- Los cultivos de células en suspensión:

Proceden del callo. En este tipo de cultivos es fácil controlar parámetros físico-químicos como aporte de oxígeno, luz, temperatura y pH. Tienen la desventaja de que la producción de metabolitos secundarios es poco homogénea, debido a la inestabilidad y variabilidad genética de las células. Por ello para establecer el cultivo a gran escala, la selección de líneas celulares de alta producción de biomasa y alto rendimiento debe hacerse previamente. El acceso uniforme a los nutrientes se facilita con el medio líquido pues favorece la distribución homogénea de las células pero se pueden formar agregados de células que tengan dificultado el acceso. Debido a que se puede modificar la diferenciación y la comunicación intracelular no sería la mejor opción el cultivo en suspensión cuando los metabolitos se biosintetizan y/o acumulan con el concurso de distintos tipos de células; o bien si requieren células diferenciadas específicas (existen células en distintos grados de diferenciación).

- Los cultivos de raíces en cabellera (hairy roots)

Constituyen un sistema alternativo al cultivo *in vitro* de raíces. Debido a que el ciclo de desarrollo es más corto la producción es más rápida. Se basa en la inoculación de una bacteria del suelo denominada *Agrobacterium rhizogenes* que alberga un plásmido inductor de raíces denominado Ri. La secuencia de T-ADN se transfiere a la célula vegetal, integrándose y expresándose en la planta. Las células transformadas se desarrollan desordenadamente, se forman raíces con alta tasa de crecimiento y se da la ramificación masiva de las mismas sin aporte hormonal. Haciendo uso de este tipo de cultivo entre otros ejemplos, se han producido alcaloides tropánicos de *Atropa belladonna* L.

- Cultivos de tejidos. Micropropagación.

La micropropagación consiste en propagar plantas de calidad uniforme a partir de un genotipo selecto en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. Puede

realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas *de novo* y embriogénesis somática. La embriogénesis somática, consiste en el desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto de una fusión gamética, o en otras palabras, es un proceso por el cual se produce una estructura bipolar (embrión) a partir de una célula somática. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia. (Sofía Olmos, págs. 351-355) Con la micropropagación se ha conseguido por ejemplo la regeneración de plantas de *Aloe barbadensis*. (Garro-Monge, 2008)

Especie	Metabolito	Tipo de cultivo
<i>Artemisa annua</i>	Artemisina	Callos
<i>Atropa belladonna</i>	Alcaloides	Raíces
<i>Digitalis minor</i>	Glucósidos cardiotónicos	Brotos
<i>Taxus chinensis</i>	Taxoides	Suspensiones celulares

Tabla 1 Ejemplos de algunos metabolitos secundarios obtenidos de distintos tipos de cultivo "in vitro". Tabla adaptada de (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011)

3. OBJETIVO

Se trata de examinar los diseños experimentales que se emplean en la producción industrial de metabolitos secundarios en cultivo *in vitro* vegetal, profundizar en la producción de cultivos en biorreactor, así como esclarecer los factores extrínsecos claves en cada etapa y las estrategias industriales para aumentar el rendimiento en metabolitos secundarios.

4. MATERIALES Y METODOS

Para el desarrollo del trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando las bases de datos de PUBMED, Science Direct y en CISNE, que es el catálogo automatizado de la Biblioteca Complutense basado en Worldcat Discovery, el mayor catálogo colectivo de bibliotecas del mundo. También se procedió a realizar búsquedas en revistas científicas, artículos científicos relacionados con los temas desarrollados, páginas web especializadas y libros de texto. Algunas de las palabras de búsqueda más empleadas fueron: "plant cell culture", "secondary metabolites", "culture media", "natural products", "media strenght", "elicitors", "culture optimization".

5. RESULTADOS Y DISCUSION

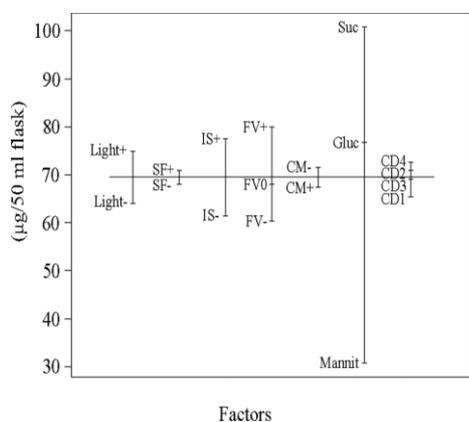
1. DISEÑOS EXPERIMENTALES PARA HALLAR LAS CONDICIONES ÓPTIMAS.

Para estudiar la producción de metabolitos secundarios en cultivo *in vitro* vegetal, se comienza estudiando a nivel de laboratorio la especie de interés.

Generalmente para encontrar las condiciones de cultivo óptimas se ha estudiado el efecto de un solo factor, dejando el resto de los factores sin modificar. La desventaja de este enfoque es que no permite identificar las interacciones entre factores coexistentes que pueden aumentar o inhibir la productividad, pero es muy eficiente en las primeras aproximaciones. En lugar de esto, se pueden emplear diseños estadísticos experimentales a gran escala para determinar el impacto de distintos factores nutricionales y físicos simultáneamente usando diseños multifactoriales. El modelo de optimización se acerca más a la realidad y beneficiará al futuro proceso industrial. Ejemplo de ello, es el trabajo de Vasilev et al. en el que optimizaron la producción de geraniol en cultivo de células de tabaco en suspensión. Se realizó un diseño experimental aleatorizado que contaba con setenta y dos experimentos individuales, en los cuales había una combinación de siete variables independientes (factores extrínsecos). Se vio tres respuestas: peso de la biomasa, contenido en geraniol y rendimiento en geraniol. También estudiaron las interacciones significativas entre factores, por ejemplo, el efecto sinérgico de la luz y la sacarosa.

Factor	Nivel	Abreviación
Luz	11.50 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{s}$	Light -
	35,62 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2/\text{s}$	Light+
Frecuencia de agitado	140 rpm	SF-
	180 rpm	SF+
Densidad del inóculo	0,75 g	IS-
	1,40 g	IS+
Volumen de llenado	15 mL	FV-
	20 mL	FV0
	25mL	FV+
Carbohidrato	Sacarosa	SUC
	Glucosa	GLUC
	D-Manitol	MANNIT

Tabla 2. Se pueden ver cinco de las siete variables y sus abreviaturas así como los niveles de cada factor. Tabla adaptada de (Vasilev, Schmitz, Grömping, Fischer, & Schillberg, 2014)



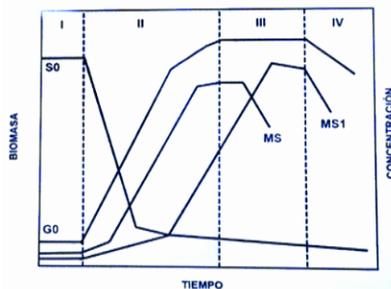
Gráfica 1. Se muestra el modelo del rendimiento de geraniol (μgramo geraniol/ 50mL de Erlenmeyer en agitación) en geraniol tiene como factores más determinantes la sacarosa, el volumen de llenado del biorreactor, seguido de la densidad del inóculo, y este de la intensidad lumínica. Gráfica tomada de (Vasilev, Schmitz, Grömping, Fischer, & Schillberg, 2014)

2. EL CULTIVO EN BIORREACTOR

La suspensión celular se utiliza para la producción a gran escala de compuestos de interés industrial en biorreactores, en condiciones parecidas a las células microbianas. El sistema de producción de cultivos celulares vegetales suele desarrollarse en dos etapas, una enfocada a la biomasa y una segunda a la producción de metabolitos. Cada cual tendrá sus condiciones óptimas.

Los sistemas de cultivo en biorreactores pueden ser:

- a) Continuos; el material se alimenta y se recoge de forma continuada, se mantiene tiempos prolongados la biomasa, aunque no es recomendable por la separación entre producción de biomasa y de metabolitos secundarios.
- b) Discontinuos; que permite después de un periodo de producción de metabolito estimable a partir de la curva de crecimiento, recoger las células para proceder a la extracción del metabolito formado y acumulado. (Torres, Martín, & Saco, 2018)



Gráfica 2. Evolución del crecimiento celular y de la producción de metabolitos secundarios formados en cultivo in vitro. I, fase de latencia; II, fase exponencial; III fase estacionaria; IV, fase de caída. G0, crecimiento inicia; S0, sustrato inicial; MS producción de metabolito; MS1 producción de metabolito secundario con patrón dissociado. Gráfica tomada de (Torres, Martín, & Saco, 2018)

Cuantificación de la biomasa. La biomasa puede medirse como volumen celular sedimentado (sedimented cell volume, SCV), peso húmedo celular (fresh cell weight, FCW) o peso seco celular (dry cell weight, DCW). (Park, Kim, & Kang, 2004). De esta manera la biomasa en cultivos en medio líquido obtenida como peso seco, se expresa con las unidades: g DW L⁻¹. El peso seco se puede obtener pesando tras secado en estufa o liofilización.

Cuantificación del crecimiento. El crecimiento se puede expresar por el aumento de volumen, de peso húmedo o de peso seco, o variaciones de longitud o diámetro, si queremos medir el crecimiento de una raíz, o un brote en un tiempo. La velocidad de crecimiento ($\Delta w / t$) resulta de la medida de la variación (Δw) expresada por unidad de tiempo.

Cuantificación del metabolito. De forma resumida se procede en tres pasos: aislar, identificar y cuantificar. Por el ejemplo, se puede liofilizar el material vegetal, pesar y obtener a partir de este un extracto del material vegetal. A partir de este los componentes de la mezcla se separan con cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) y se procede a la cuantificación con técnicas espectrofotométricas (con una solución patrón del metabolito puro). Se requieren productos

coloreados para estas técnicas por lo que muchas veces se deberán hacer reaccionar los metabolitos secundarios con reactantes que generen productos coloreados que puedan ser medidos por espectrofotometría en la región visible del espectro electromagnético.

3. DESCRIPCIÓN DE FACTORES EXTRÍNSECOS EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Los factores del cultivo in vitro que van a ser descritos pueden tener una influencia directa en la productividad bien en términos de acumulación de biomasa como o en cuanto a la biosíntesis de metabolitos secundarios.

Tras la obtención del explanto a partir de la planta madre se obtiene un callo, y de este se realiza el cultivo de células en suspensión. Para este último, existen factores que son clave como la fuerza iónica del medio basal, los niveles de fosfato y nitrato, la cantidad y tipo de fuentes de carbohidratos, los factores de crecimiento, y la adición de precursores (Niranjana Murthy, Lee, & Paek, 2014). Además hay factores físicos que influyen en el cultivo como son; la densidad del inóculo, la temperatura, la cantidad y calidad de la luz, el pH, la agitación y la aireación. (Atanasov, Waltenbergere, & Pferschy, 2015). Por último, encontramos estrategias industriales para aumentar el rendimiento total como es la elicitación, la inmovilización, la permeabilización o la adición de precursores.

Obtención de explantos a partir de plantas madre y selección de líneas celulares productivas

Cualquier cultivo se debe iniciar con la selección del material de alto rendimiento para obtener un explanto adecuado. Se debe seleccionar por su fenotipo y teniendo en cuenta en qué etapa de su ciclo ontogénico se encuentra. El explanto, obtenido en condiciones asépticas (para ello se utilizan varios agentes desinfectantes, solos o en combinación) se traslada, preservando el mismo ambiente, a un medio de cultivo sólido con una composición química y relación fitohormonal de auxina/citoquinina adecuada para el establecimiento del cultivo de una masa de células indiferenciadas conocida como callo. Los callos pueden ser propagados indefinidamente por subdivisión y son los callos que se disgregan con facilidad (friables) los más adecuados para el establecimiento de suspensiones celulares con miras a la producción de metabolitos secundarios. Por tanto los callos friables se transfieren a matraces con medio líquido y agitador orbital. (Pérez Navarro, 2008)

De estas células, previamente aisladas e identificadas, se pueden seleccionar las líneas celulares de interés: el procedimiento implica la siembra de las células en placa de agar, y se seleccionan en función de los ensayos de biomasa y rendimiento en metabolitos secundarios. Las líneas celulares seleccionadas se cultivan de nuevo en suspensión y se transfieren a un pequeño biorreactor para mayor crecimiento celular y producción de biomasa, y cuando este no es suficiente se transfiere a un segundo biorreactor de mayor volumen. (Torres, Martín, & Saco, 2018)

OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO

Influencia del medio nutritivo y fuerza iónica.

Las formulaciones de Gamborg (B5 1968), Linsmaier y Skoog (LS 1965), Murashige y Skoog (MS 1962), y Schenk y Hildebrandt (SH 1972) han sido ampliamente utilizadas para el cultivo de células y órganos vegetales in vitro. La selección del medio adecuado es imprescindible.

Las plantas terrestres toman del suelo los componentes esenciales de su biomasa. A excepción del carbono. Macronutrientes y micronutrientes son incorporados desde la solución salina del suelo hasta el interior de las células donde son almacenados, metabolizados o transportados a otras células tejidos u órganos. (Fernandez, García Sanchez, & Maldonado, 2008). Los nutrientes se clasifican en micronutrientes y macronutrientes según la cantidad que requieran en términos generales las plantas. Así los macronutrientes son requeridos en grandes cantidades y constituyen un 0,1% del peso seco (1000 mg Kg^{-1}) y los micronutrientes constituyen el 0,05% del peso seco (500 mg Kg^{-1}).

Las plantas contienen pequeñas cantidades de 90 elementos químicos pero solo dieciséis de estos son esenciales; se denominan esenciales en cuanto a que su deficiencia implica la muerte. (Epstein y Bloom, 2005) Son considerados macronutrientes: Hidrógeno (H), Oxígeno (O), Carbono (C), Nitrógeno (N), Potasio (K), Fósforo (P), Azufre (S), Calcio (Ca) y Magnesio (Mg). Los micronutrientes son: Cloro (Cl), Hierro (Fe), Boro (B), Manganeso (Mn), Zinc (Z), Cobre (Cu), Níquel (Ni), Molibdeno (Mo). (Chesworth, 2007).

El que haya tantos elementos esenciales implica que determinar la combinación óptima se convierta en un proceso difícil. Por ello fue tan importante tener como punto de partida el medio MS, pues aun no siendo óptimo para muchos tejidos, muchos crecen en este en distinto grado. (Randall & Terrence J, 2007)

Tras elegir un medio, la reducción de la fuerza iónica del medio se realiza mediante dilución y además se pueden adicionar suplementos. Por ejemplo en el cultivo de raíces adventicias del ginseng el máximo de biomasa se obtuvo con un medio MS de 0.75 de fuerza iónica, mientras que el medio MS de 0.5 de fuerza iónica dio lugar a mayor rendimiento y a mayor contenido en ginsenósido. (Sivakumar & Yu, 2005)

Sales principales (macronutrientes)	Sales menores (micronutrientes)	Vitaminas
Nitrato de amonio (NH_4NO_3) 1,650 mg/l	Ácido bórico (H_3BO_3) 6.2 mg/l	i-Inositol 100 mg/l
Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 440 mg/l	Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.025 mg/l	Niacina 0.5 mg/l
Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370 mg/l	Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.025 mg/l	Piridoxina · HCl 0.5 mg/l
Fosfato de potasio (KH_2PO_4) 170 mg/l	Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 27.8 mg/l	Tiamina · HCl 0.1 mg/l
Nitrato de potasio (KNO_3) 1,900 mg/l	Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 22.3 mg/l	Glicinas 2 mg/l
	Yoduro de potasio (KI) 0.83 mg/l	
	Molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.25 mg/l	
	Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 8.6 mg/l	
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.2 mg/l	

Tabla 3. Medio MS comercial de *Probiotek*. Tabla adaptada de (Probiotek S.A, 2017)

Influencia de la fuente y concentración de carbohidratos

La sacarosa ha sido utilizada como fuente de carbono principal y componente importante en la biosíntesis de metabolitos secundarios en cultivos de tejidos y células vegetales. Otros

carbohidratos empleados solos o en combinación son: la glucosa, la fructosa y la manosa. La velocidad del crecimiento de la biomasa se correlaciona con el consumo de carbohidratos y también la producción de metabolitos, pero puede ser que requieran distintas concentraciones. Por ejemplo en cultivos celulares de *Ginkgo biloba* la concentración de sacarosa del 3 % era adecuada para la acumulación de biomasa, mientras que para la producción de ginkgólidos y bilobalidas se favorecía con concentraciones más altas de sacarosa (entre 5 y 7%) (Park, Kim, & Kang, 2004).

La sacarosa puede ejercer también estrés osmótico afectando al metabolismo. El estrés osmótico causado por la sacarosa se estudió en cultivos de células en suspensión de *Vitis vinífera*, concluyendo que regulaba la producción de antocianidinas. (Do and Cormier 1990) (Murthy, Kim, & Park, 2014)

Influencia de la fuente de nitrógeno.

Las plantas toman el nitrógeno preferentemente como NO_3^- (que de forma natural se encontraría en el suelo aireado) y también, pero de forma secundaria como NH_4^+ . La asimilación del nitrógeno consta de tres etapas: absorción, reducción del nitrato a amonio, incorporación del amonio a esqueletos carbonados (denominado asimilación del amonio) (Maldonado, 2008). Las formulaciones de los medios MS, LS o B5 tienen fuentes tanto de nitrato como de amonio. La producción de metabolitos se ve afectada sobretodo por el ratio amonio/nitrato y los niveles totales de nitrógeno.

Como ejemplo, tenemos el experimento del efecto del distinto ratio $\text{NH}_4/\text{NO}_3^-$ en cultivos de brotes de *Bacopa monnieri*, la mayor producción de biomasa y de bacósido A se obtuvo cuando la concentración de NO_3^- era mayor a la de NH_4 (en un ratio de 14.38/37.60 mM). (Naik et al. 2011) (Murthy, Kim, & Park, 2014). En cuanto al nitrógeno total se ha observado que la reducción del nitrógeno total induce la producción de capsaicina en *Capsicum frutescens* y de antraquinonas en *Morinda citrifoli* y de antocianinas en especies de *Vitis* (Yamakawa et al., 1983; Yeoman et al., 1980; Zenk et al., 1975) (Ramachandra Rao & Ravishankarb, 2002)

Influencia de los niveles de fosfato

El fósforo se encuentra en la planta como ion fosfato, se absorbe en la naturaleza preferentemente como H_2PO_4^- en suelos ácidos y como anión divalente HPO_4^{2-} en suelos básicos. No se reduce como el nitrato, permaneciendo en forma libre o en compuestos orgánicos, como es el caso del ATP o el ADP donde forma enlaces anhídridos llenos de energía, desempeñando un papel importante en el metabolismo energético. Asimismo, forma parte de los ácidos nucleicos y los fosfolípidos. (Bonilla, 2008).

Tanto el aumento como su reducción en el medio puede tener un efecto notable sobre la producción de metabolitos secundarios. Al duplicar la concentración de fosfato en el medio MS se aumentó la producción de metabolito para las especies: *Gymnema sylvestre* en cultivo celular (ácido gimnémico) y *Lavandula vera* en cultivo de células en suspensión (ácido rosmarínico). En cambio, se encontró que la privación de fosfato en cultivos en suspensión de células de *Vitis vinífera* y de *Coffea arabica* aumenta la síntesis de antocianinas y cafeína respectivamente. (Murthy, Kim, & Park, 2014)

Influencia de los niveles de hormonas del crecimiento

Tanto el cultivo de células, el de raíces o de brotes requiere fitohormonas exógenas. En el cultivo de raíces en cabellera no es esencial pero se mejora la producción. Merece la pena nombrar que el descubrimiento de las fitohormonas dio lugar al dogma central del cultivo in vitro de tejidos vegetales; este describe que el ratio endógeno de citoquinas respecto a auxinas determina la naturaleza de la regeneración (Skoog and Miller, 1957). De esta manera, mayores concentraciones de citoquinas respecto a auxinas en el explanto favorece la regeneración del brote, y mayores concentraciones de auxina respecto a citoquinas favorece el crecimiento de la raíz; el ratio intermedio favorece la formación del callo. Normalmente se pone un exceso de fitohormonas en el medio (10^{-7} – 10^{-5} M) para asegurar la concentración endógena. La optimización de la concentración hormonal en el medio para aumentar la producción del metabolito secundario de interés se determina empíricamente con experimentos previos. (Prakash P. & Chiang Shiong, 2012)

-Auxinas. La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (IAA). Otras formas naturales de auxinas son el ácido 4-cloro-indolacético (4-Cl- IAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (IPA). El análisis de algunos ácidos fenoxiacéticos con actividad auxínica, llevó al descubrimiento del 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). A partir de éste se desarrollaron, el ácido 2-metoxi, 3,6-dicloro benzoico (dicamba), el ácido 2,4 dicloro- fenoxibutiírico (2,4-DB), el ácido 2-metil, 4-cloro fenoxiacético (MCPA) y el ácido 2,4,5- triclorofenoxiacético (2,4,5-T) (Jordán & Casaretto, 2006). Como ejemplo de la aplicación de auxinas tenemos que tras suplementación con el ácido indolacético se aumentó la producción de nicotina en cultivos de células en suspensión de la planta de tabaco.

-Citocinas: La mayoría de las citocininas naturales y artificiales conservan la base adenina, aunque a las segundas se les ha ligado diversas moléculas, generándose así, la benciladenina (BA) o la furfurilaminopurina (kinetina). Posteriormente se sintetizó, sin la base adenina, el tidiazurón (TDZ). (Jordán & Casaretto, 2006). Como ejemplo, la adición de benciladenina (BA) ha demostrado aumentar la producción de saponinas en el ginseng. (Murthy, Kim, & Park, 2014)

-Giberelinas: En 1955 se aisló del hongo *Gibberella fujikoro* el ácido giberélico (hoy GA₃), este hongo cuando infecta a las plantas de arroz produce un incremento en altura y fue esto lo que llevo a su investigación. Se descubrió que las GAs estaban ampliamente distribuidas en muchas especies de plantas, provocando principalmente efectos específicos sobre el crecimiento. Son diterpenos tetracíclicos ácidos. (Iglesias & Talón, 2008). Su acción en la producción de metabolitos secundarios es especie específica. (Murthy, Kim, & Park, 2014)

Influencia de la densidad del inóculo

Existe una densidad de inóculo crítica por debajo de la cual fracasa la instauración del cultivo células u órganos en un nuevo medio. Un inóculo de gran tamaño puede contribuir a la eliminación o disminución de la fase de latencia (Jeong, Park, Ryu, Hwang, & Woo, 2004). En general suele tener el efecto de producir mayor de biomasa. (Vasilev, Schmitz, Grömping, Fischer, & Schillberg, 2014)

OPTIMIZACIÓN DEL AMBIENTE DEL CULTIVO

Influencia de la temperatura

El rango de temperaturas en el que se suelen mantener los cultivos de células y órganos vegetales es de 17–25°C. Sin embargo, cada especie tiene temperaturas óptimas para el crecimiento y para determinadas rutas biosintéticas (Murthy, Kim, & Park, 2014). Los regímenes de temperaturas suelen acompañar a un ciclo de luz establecido.

Yu et al. En el 2005 estudió el crecimiento del cultivo de raíces en cabellera del ginseng con distintos regímenes de temperatura (13/20, 20/13, 25/25, y 30/25 °C en ciclos día y noche 16/8 h); la mayor producción de biomasa se obtuvo con la incubación a 20/13 °C pero la mayor producción de ginsenósidos totales se optimizó a 25/25 °C. (10.5 mg g⁻¹ of DW). (Yu, Murthy, Hahn, & Paek, 2005)

Influencia de la intensidad y calidad de la luz

La luz solar es la fuente primaria de energía para la vida sobre la Tierra, sin embargo, la fotosíntesis se puede realizar con cualquier fuente de luz visible (por ejemplo una lámpara incandescente o fluorescente o una LED). El espectro electromagnético esta constituido por ondas de distinta frecuencia, ν (o distinta longitud de onda $\lambda = 1/\nu$) y la radiación luminosa abarca una franja, que va desde los 400 nm a los 700 nm, se sitúa entre las radiaciones ultravioletas y las infrarrojas. La luz esta compuesta por paquetes elementales de energía denominados fotones, de modo que un fotón individual interacciona con una molécula. Cada fotón tiene una energía propia, que corresponde con su longitud de onda específica. La luz se suele medir con la unidad de energía “electrones voltio” (eV). $1\text{eV}=1.60222\times 10^{-19}\text{J}$. (de las Rivas, 2008)

La luz es la fuente de energía para la fotosíntesis y determina otros procesos fisiológicos como la producción de metabolitos secundarios o la morfogénesis, muy influenciados por ritmos circadianos.

Para la producción de metabolitos se han usado sobre todo lámparas fluorescentes. En los últimos veinte años se ha extendido el interés en los laboratorios de cultivo *in vitro* vegetal por las lámparas LED pues es una herramienta útil para estudiar el efecto de la luz porque permite control de la intensidad y emitir patrones espectrales específicos. Recientemente distintos estudios han confirmado los efectos de la calidad de la luz en la producción de metabolitos secundarios.

En el trabajo de (Yu, Murthy, Hahn, & Paek, 2005) se vio que las raíces en cabellera del ginseng que habían crecido en la oscuridad o bajo luz roja tuvieron más crecimiento de biomasa, sin embargo la mayor acumulación de ginsenósidos fue bajo luz fluorescente.

Influencia de la concentración de iones de hidrógeno

El pH del medio suele fijarse en valores entre 5 y 6 (antes del autoclave). La concentración de iones de hidrógeno cambia a lo largo del cultivo debido a el consumo de nutrientes y a la acumulación de metabolitos. En este sentido, McDonald and Jackman (1989) reportó la disminución y el aumento del pH causado por la asimilación de amonio y nitrato respectivamente. El pH óptimo para la producción de biomasa y de metabolito debe estudiarse, y puede ser distinto respectivamente.

En otro orden de ideas, debido a que cambiar el pH del medio resulta en cambios en la permeabilidad de membrana y en la liberación del metabolito secundarios al medio de cultivo se utiliza como técnica de recuperación del metabolito en la producción continua en biorreactor. Tal como se probó con la obtención de betalainas de *Beta vulgaris*, estas se liberan al medio en un pH de 5.5, tras una corta exposición a este pH se continúa con el crecimiento de las raíces. (Mukundan et al. 1998) (Murthy, Kim, & Park, 2014)

Influencia de la agitación y de la aireación

La agitación es un parámetro importante tanto en cultivos en matraz como a gran escala en biorreactor. La mezcla promueve la transferencia de nutrientes entre la fase líquida y gaseosa y las células u órganos. Las características diferenciales de las células vegetales sobre las microbianas son entre otras, el mayor tamaño, presencia frecuente de agregados celulares, bajos requerimientos de aireación y acumulación intracelular y extracelular del metabolito secundario. Tales diferencias se traducen en una rápida sedimentación celular (tamaño y agregación) y mayor sensibilidad a la rotura por corte (por lo que requiere de baja velocidad de agitación) mayor permeabilización y liberación *in situ*. Los tipos de biorreactores difieren principalmente en la aireación y la agitación. Se dividen en agitación mecánica, que tienen palas agitando y con zona de alta turbulencia, y aquellos con agitación neumática en los que la agitación es producida por una inyección de aire. En los segundos se evita el riesgo del efecto corte. (Torres, Martín, & Saco, 2018)

4. ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DEL METABOLITO

Una vez que se ha obtenido la producción de de biomasa, para estimular la síntesis de compuestos secundarios se utiliza: la elicitación, el suministro de nutrientes y la adición de precursores, la permeabilización, la inmovilización y la extracción *in situ* del metabolito.

Elicitación

Los metabolitos secundarios se acumulan en respuesta a distintos factores de estrés bióticos (cómo patógenos o insectos) y abióticos (como son temperatura, salinidad, radiación o metales pesados). Estas condiciones estresantes se perciben, se procesan, se amplifican e integran en rutas de transmisión de la información y finalmente regulan la expresión génica. Se denominan “elicitors” a los factores estresantes (Dornenburg and Knorr 1995), y ha sido una herramienta ampliamente utilizada para provocar la sobreproducción de metabolitos secundarios en cultivos vegetales. En la elicitación influyen las concentraciones del elicitor (si es químico), la duración de la exposición y la edad del cultivo en ese momento. El mecanismo de defensa que produce el elicitor es resultado de la compleja interacción del elicitor con la célula y la inducción de genes. (Ramirez-Estrada, y otros, 2016)

a) Elicitors bióticos:

- Hormonas vegetales: metil jasmonato (MeJA), ácido salicílico (SA), derivados del ácido salicílico y brasinoesteroide.
- Elicitors derivados de microorganismos: extractos obtenidos de bacterias,

extractos de levaduras, extractos de hongos, proteínas de origen fúngico y de origen bacteriano.

-Fragmentos de la pared vegetal: quitina y quitosano, oligosacarinas.

-Otros: péptidos de señalización vegetal y ciclodextrinas.

- b) Elicidores abióticos: pueden ser físicos o químicos. Se pueden citar: temperaturas extremas, la anaerobiosis, salinidad, sales concretas (HgCl₂, KCl, iones de Zn entre otras), que supongan condiciones de estrés para la especie dada.

La podofilotoxina empleada por sus acciones citotóxicas y antivirales, es un ejemplo de metabolito secundario cuya producción mejora mucho si se elicitada con metil jasmonato. (Ramirez-Estrada, y otros, 2016)

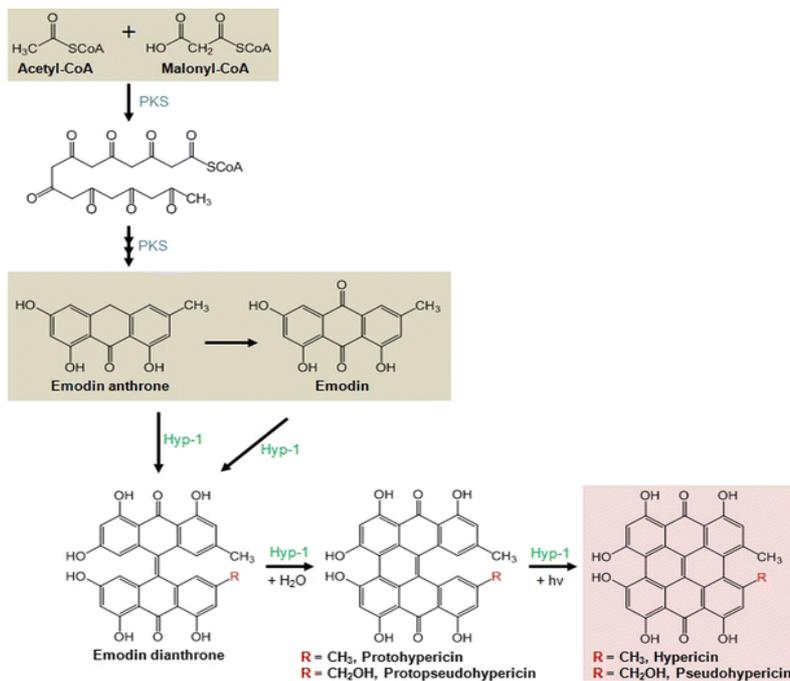
Suministro de nutrientes

Reponer el biorreactor con medio nutritivo nuevo cada cierto tiempo (por ejemplo cada 10 días tras el inicio del cultivo) se ha visto como una estrategia efectiva en ciertos cultivos. (Murthy, Kim, & Park, 2014)

Adición de precursores

Los precursores son moléculas que al incorporarse en determinadas rutas biosintéticas favorecen la producción de un metabolito concreto. Pueden ser moléculas propias de la ruta o moléculas de la ruta biosintética con alguna modificación. Tras ser añadidos al medio pueden metabolizarse en el medio intracelular, extracelular o acumularse en la vacuola. La degradación puede disminuir su disponibilidad y su aprovechamiento depende de la actividad de enzimas implicadas en la síntesis del metabolito. Los diferentes compuestos de interés pueden tener distintos precursores y distintas rutas metabólicas. Por ejemplo, los fenoles se pueden sintetizar por la vía de los policétidos (vía del acetato malonato) y por la vía del ácido siquímico, o pueden tener una biosíntesis mixta. Por lo tanto puede haber muchos precursores distintos, que se incorporen en distintos pasos o en distintas vías que convergen en la producción del metabolito de interés. El conocimiento de la metabolómica de la especie vegetal y la compartimentación de la síntesis, es necesario para saber cómo intervenir en la producción y cómo extraer el metabolito secundario de interés. La síntesis de hiperincina se puede favorecer utilizando la emodina-antrona como precursora. (Murthy, Kim, & Park, 2014)

Figura 3 Biosíntesis de hiperincinas en *H.mperforatum*. PKS polyketide synthase type III, *Hyp-1* *Hypericum perforatum* phenolic oxidative coupling protein, +hv indica fotoactivación. Tomada de (Murthy, Kim, & Park, 2014). (Siguiendo página)



Permeabilización

Es común que los productos formados se acumulen en las vacuolas. Para liberarlos, se deben penetrar dos barreras: la membrana plasmática y el tonoplasto (barrera de la vacuola). La permeabilización celular consiste en formar poros en una o más membranas de la célula vegetal para permitir la liberación de moléculas. Este proceso puede monitorizarse midiendo la actividad de enzimas del metabolismo primario como son la hexoquinasa o la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (Brodelius, 1988b). Se procura que la permeabilización sea transitoria para mantener la viabilidad celular. Existen muchos agentes permeabilizantes: solventes orgánicos como isopropanol, dimetilsulfóxido (DMSO), o el quitosán. Otros métodos de permeabilización incluyen la ultrasonificación y la electroporación. (Ramachandra Raoa & Ravishankarb, 2002)

Inmovilización

El cultivo de células inmovilizadas mejora la producción industrial de metabolitos secundarios de interés. Se consigue con la inclusión de células en suspensión en matrices poliméricas de distintos compuestos. Hay distintas técnicas de inmovilización, tales como: oclusión en gel por red iónica (alginato, carragen etc), oclusión en gel por precipitación (agar), oclusión por polimerización (poliacrilamida) y oclusión en estructuras preformadas (fibras, espumas de poliuretano).

Las mayores ventajas son:

- Puede mantenerse durante mayor tiempo en los biorreactores porque hay mayor estabilidad del cultivo, menor tasa de crecimiento y protección mecánica.
- La mejor comunicación celular favorece las relaciones metabólicas y la manipulación, la extracción y recogida del producto es más fácil. (Torres, Martín, & Saco, 2018)

Extracción *in situ* del metabolito.

La inhibición por feedback, la degradación enzimática o no enzimática del producto en el medio o a volatilidad de las sustancias puede hacer que el rendimiento de la producción sea bajo. En estos casos se puede añadir un material en que el metabolito se pueda acumular como puede ser un segundo sólido o una fase al medio acuoso. La extracción o secuestro del metabolito en un compartimento no biológico puede incrementar la producción total. (Ramachandra Raoa & Ravishankarb, 2002)

6. CONCLUSIONES

Las plantas medicinales, tienen propiedades que la ciencia desgrana, y asocia a compuestos particulares. La necesidad de abastecimiento de estos compuestos, principios activos y otros con diversas aplicaciones, ha llevado a desarrollar industrialmente el cultivo *in vitro* vegetal.

Conocer los factores extrínsecos óptimos del cultivo *in vitro*, el metaboloma y su regulación, y las biotransformaciones, junto con el conocimiento empírico industrial, ha permitido ampliar el número de especies cuya producción de metabolitos secundarios esta optimizada.

Entre las ventajas del cultivo *in vitro* tenemos la independencia de factores externos (nutricionales, edafoclimáticos, geográficos o estacionales), el control de las condiciones durante la producción y extracción, de acuerdo a estándares de calidad y de rendimiento más uniformes en comparación al aislamiento fitoquímico de plantas enteras. De esta manera hay mayor capacidad de producción a gran escala capaz de abastecer al mercado. En muchos casos es más sostenible que la síntesis química o partiendo de plantas enteras pues reduce el riesgo de extinción de las especies.

Como desventaja del cultivo *in vitro* observamos que no todos los compuestos son producidos en células indiferenciadas en igual cantidad y calidad que los obtenidos en las plantas madres. Esto es debido a que muchos metabolitos se sintetizan integrados a eventos de diferenciación. Otros factores como la inestabilidad fisiológica y genética que pueden conllevar una pérdida del producto en el tiempo. Además existen otros problemas asociados a la producción comercial como la baja productividad, la inestabilidad de las líneas celulares y la dificultad para realizar el escalado de la producción (Pérez-Alonso & Jiménez, 2011)

Es necesario por tanto, conocer en profundidad las peculiaridades de cada especie y de la biosíntesis del metabolito secundario de interés. Pues cada factor puede modificar de manera distinta para cada especie o metabolito concreto y es difícil generalizar. Por otro lado, además del conocimiento que da la optimización industrial existe la investigación en el campo de la fisiología vegetal en la naturaleza, que puede orientar al investigador industrial sobre el ciclo ontogénico de la especie y las condiciones favorables de producción del metabolito secundario.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, E., Ashrad, M., & Khan, Z. (2017). Secondary Metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6 (2), 205-214.
- Arbona, V., Matías, M., de Ollas, C., & Gomez-Cadenas, A. (2013). Metabolomics as a tool to investigate stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Science* (14), 4885-4991.

- Atanasov, A., Waltenbergere, B., & Pferschy, E. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnology Advances* , 1582-1614.
- Bonilla, I. (2008). Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. En J. Acón-Bieto, *Fisiología vegetal* (pág. 107). Madrid: Mc Graw Hills.
- Chesworth, W. (2007). *Encyclopedia of Soil Science*. Springer Netherlands.
- Iglesias, D. J., & Talón, M. (2008). *Giberalinas*. Madrid: Mc Graw Hills.
- JD, M. C., SK, V., & JT, H. (2007). Plant Natural Products: back to the future. *Phytochemistry* , 68, 2015-2022.
- Jeong, G., Park, D., Ryu, H., Hwang, B., & Woo, J. (2004). Effects of inoculum conditions on growth of hairy roots of Panax ginseng. *Applied Biochemistry and Biotechnology* , 113-116, 1193-1207.
- Jordán, M., & Casaretto, J. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Gibberelinas y Citocininas*. (C. (-x. La Serena, Ed.) Recuperado el 8 de enero de 2020, de Cátedra de Fisiología Vegetal- Fac. Cs. Exactas y Naturales y Agrimensura - UNNE : <http://www.exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>
- Lallana, V. H. (febrero de 2004). <http://www.fca.uner.edu.ar/f>. Recuperado el 5 de enero de 2020, de Facultad de ciencias agropecuarias: http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/WEBFV_2010/mat_did/UT7.pdf
- Maldonado, J. M. (2008). Asimilación del nitrógeno y del azufre. En A.-B. Joaquín, *fisiología vegetal* (pág. 287). Madrid: Mc Graw Hills.
- Murthy, H., Kim, Y., & Park, S. (2014). Hypericins: biotechnological production from cell and organ cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 98, 9187-9198.
- Niranjana Murthy, H., Lee, E.-J., & Paek, K.-Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Cultures* , 118, 1-16.
- Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., & al., M. O. (2015). Cambial meristematic cells: a platform for the production of plants natural products. *New biotechnology* , 32 (6), 581-586.
- Park, Y., Kim, S., & Kang, Y. J. (2004). Production of ginkgolides and bilobalide from optimized the Ginkgo biloba cell culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* (9), 41-46.
- Pérez-Alonso, N., & Jiménez, e. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro.
- Piñol, M. T., Palazón, J., & Cusidó, R. M. (2008). Introducción al metabolismo secundario. En J. Azcón-Bieto, & M. Talón , *Fundamentos de fisiología vegetal* (págs. 323-324). Madrid : Mc Graw Hill.

- Prakash P., K., & Chiang Shiong, L. (2012). Plant tissue culture for biotechnology. *Plant Biotechnology and Agriculture* , 131-138.
- Probiotek S.A. (2017). *Probiotek: productos y servicios biotecnológicos*. Recuperado el 5 de enero de 2020, de A. sitio Web de Probiotek: <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/medios-de-cultivo-reactivos/murashige-and-skoog-ms-medium/>
- Ramachandra Raoa, S., & Ravishankarb, G. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites . *Biotechnology advances* (20), 101-153.
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M., y otros. (2016). Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules* , 21 (2), 182.
- Randall, N., & Terrence J, E. (2007). Regulating plant tissue growth by mineral nutrition . *In Vitro Cellular & Developmental Biology:* , 43 (4), 370-381.
- Sivakumar, G., & Yu, K. (2005). roduction of biomass and ginsenosides from adventitious roots of Panax ginseng in bioreactor cultures. *Engineering in life sciences* (5), 333-342 .
- Sofía Olmos, G. L. (s.f.). <http://www.argenbio.org>. (I. ediciones, Ed.) Recuperado el 8 de enero de 2020, de Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología : http://www.argenbio.org/adf/uploads/Libro_INTA_II/Parte_IV.pdf
- Tohda, C., T, K., & Komastu, K. (2005). Search for natural products related to regeneration the neuronal network. *Meurosignals* , 14, 34-45.
- Torres, M., Martín, S., & Saco, D. (2018). Biotecnología vegetal. optimización de la producción de metabolitos secundarios de interes farmacéutico en cultivos *in vitro*. En M. B. Humberto, *Fundamentos de biotecnología vegetal* (págs. 377-405). Madrid: Dextra .
- Vasilev, N., Schmitz, C., Grömping, U., Fischer, R., & Schillberg, S. (2014). (2014) Assessment of Cultivation Factors that Affect Biomass and Geraniol Production in Transgenic Tobacco Cell Suspension Cultures. *PLOS ONE* , 9 (8).
- Wilson, S. A., & Roberts, S. C. (2012). Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnology Journal* , 10, 249-268.
- Wu, S., & Chappel, J. (2008). Metabolic engineering of natural products in plants; tools of the trade and challenges for the future. . *Current opinion in biotechnology* , 19, 145-152.
- Yu, K., Murthy, H., Hahn, E., & Paek, K. (2005). Ginsenoside production by hairy root cultures of Panax ginseng: influence of temperature and light quality. *Biochemical engineering* , 23, 53-56.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia y el/la Tutor/a no se hacen responsables de la información contenida en el mismo.

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia y el/la Tutor/a no se hacen responsables de la información contenida en el mismo.