



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**El cultivo *in vitro*: una alternativa al cultivo
tradicional de plantas medicinales.**

Autor: Francisco Martínez Milla
Tutor: Margarita Torres Muñoz
Convocatoria: Julio 2018

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. OBJETIVOS.....	7
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
6. CONCLUSIÓN.....	19
7. BIBLIOGRAFÍA.....	20

1. RESUMEN

La demanda de productos naturales de interés farmacéutico que depende de las plantas, se ha incrementado en los últimos años debido a las limitaciones de los procesos de obtención de sustancias medicamentosas basadas en las síntesis químicas. Es por esta razón por la que surge un interés por parte de la industria en establecer un método de producción cuya calidad, cantidad y coste de los metabolitos secundarios obtenidos, no se vean afectados por las condiciones edafoclimáticas o por las reglamentaciones sanitarias o políticas de la región productora. La biotecnología a través del cultivo *in vitro* de células vegetales, es una alternativa al cultivo tradicional, lo que no implica que esté exenta de problemas. A través de la selección celular que recurre a diferentes estrategias, como pueden ser exámenes microscópicos, macroscópicos, fenotípicos y químicos, se seleccionan las líneas celulares que en último término pasarán a producir metabolitos secundarios a escala industrial, donde factores físico y químicos van a condicionar el éxito de este tipo de cultivo. A nivel industrial, siconina, ginsenósidos y paclitaxel son una realidad de la producción de principios activos a gran escala, lo cual refleja el potencial de los cultivos *in vitro*, que se incrementará con la mejora de la estandarización de los cultivos *in vitro* y de la selección de líneas celulares altamente productivas de principios activos.

PALABRAS CLAVE: Biorreactor; Cultivo celular; Cultivo *in vitro*; Cultivo tradicional; Escala industrial; Metabolito secundario; Planta medicinal; Rendimiento.

2. INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo, todas las civilizaciones se han interesado por el uso y potencial alimentario, industrial, ornamental y de servicios de las plantas, y muy especialmente por aquellas con aplicaciones farmacológicas. Estas últimas forman el grupo de **plantas medicinales**, definadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como *cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos*.

La demanda de productos naturales de interés farmacéutico de origen vegetal se ha incrementado en los últimos años debido, entre otras causas, por la limitación de los procedimientos de obtención de sustancias medicamentosas basados en la síntesis química. En los países desarrollados, el 25% de los medicamentos son derivados de plantas, de los cuales

el 60% de los compuesto anticancerígenos y el 75% de medicamentos contra enfermedades infecciosas productos naturales o derivados de estos (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Los metabolitos secundarios constituyen un grupo de compuestos muy numeroso y estructuralmente muy heterogéneo, que se clasifican, según sus rutas biosintéticas, principalmente en tres clases: terpenos o derivados de la vía del ácido mevalónico y vía MEP, compuestos fenólicos o derivados de la vía del ácido shikímico y de la vía del acetato-malonato y los alcaloides o derivados de aminoácidos, haciendo la salvedad de protoalcaloides y pseudoalcaloides, que se incluyen generalmente en este aunque no se ajustan en su totalidad a la definición de alcaloides (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). La síntesis y la utilización de especies moleculares como azúcares, aminoácidos, ácidos grasos comunes, nucleidos y polímeros derivados de ellos (polisacáridos, proteínas, lípidos, ARN y ADN, etc.) se define como metabolismo primario, siendo los metabolitos primarios aquellos compuestos fundamentales para la realización de funciones básicas y esenciales para la supervivencia y bienestar de la plantas.

Además, las plantas también utilizan otras vías metabólicas derivadas del metabolismo primario, que reciben el nombre de *metabolismo secundario*. Los compuestos así sintetizados se denominan *metabolitos secundarios*, lo cual no implica que sean accesorios, irrelevantes o banales, ya que algunos de ellos por su importancia funcional están considerados *metabolitos fisiológicamente primarios*, tales como fitol, ácido abscísico, giberelinas, carotenos o ligninas, cuya presencia en la planta es esencial para la realización de la fotosíntesis, procesos del desarrollo y la estructura de la pared celular, mientras que otros metabolitos secundarios tienen reconocido un papel importante en procesos ecológicos como atrayentes o repelentes de polinizadores o consumidores o como fitoalexinas en respuesta a situaciones de estrés ambiental (limitaciones de nutrientes y agua, contaminantes químicos o presencia de microorganismos). Sin embargo, se desconocen las funciones que ejercen en la planta la mayoría de los principios activos de interés farmacológico, tales como vincristina, vinblastina, ajmalicina, atropina, berberina, codeína, reserpina, nicotina), cardenólidos como digoxina o digitoxina, o diterpenos cíclicos como paclitaxel (Rao y Ravishankar, 2002). Probablemente, ello se deba a que presentan una extraordinaria heterogeneidad estructural, de complejidad muy diversa y distribución restringida (Serrano y Piñol, 2007; Yeoman y Yeoman, 1996). Así, los metabolitos secundarios tienen una enorme heterogeneidad (Fig. 1) que va desde moléculas sencillas, por ejemplo el mentol, hasta complejas, e incluso de biosíntesis mixta, como por ejemplo el placlitaxel, lo cual representan un extraordinario valor quimiotaxonómico

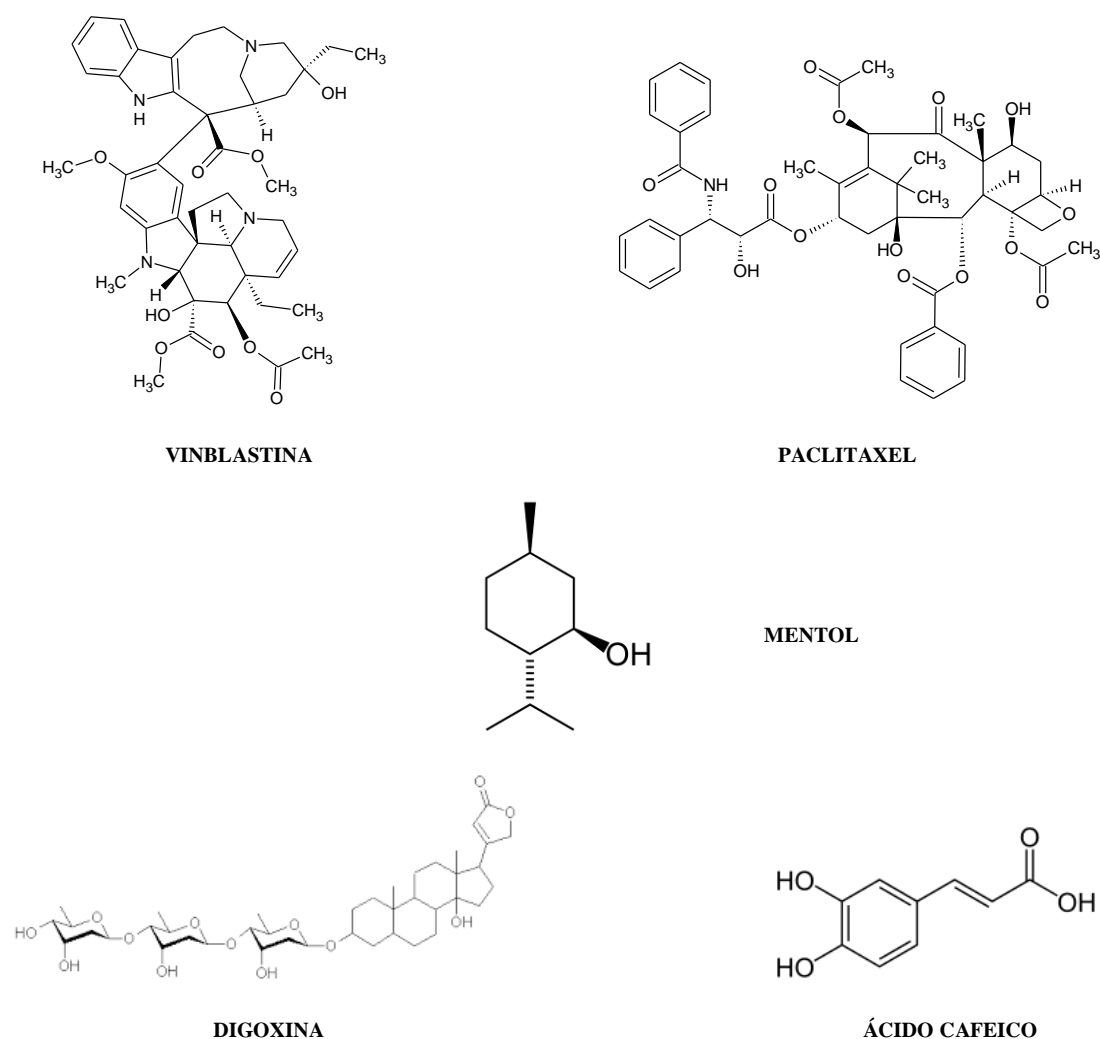


Figura 1. Metabolitos secundarios de interés farmacéutico

Algunos compuestos se localizan en las membranas o en el citoplasma, como son los metabolitos de naturaleza lipófila. Los de naturaleza hidrófila, se localizan principalmente en las vacuolas, las cuales permiten el paso de estos compuestos por distintos sistemas de transportadores específicos localizados en el tonoplasto. A nivel celular, los metabolitos secundarios están íntimamente relacionados con la localización de sus moléculas precursoras y de las enzimas implicadas en la biosíntesis de los mismos. Incluso las enzimas participantes pueden estar distribuidas en distintos tejidos (Martín *et al.*, 2018).

En cuanto a los métodos de obtención del principio activo, el aislamiento de los principios de las plantas es a veces muy difícil debido a las concentraciones extremadamente bajas. Además,

cuando la materia prima es escasa o su producción química es insuficiente para atender el mercado de forma regular, puede suponer un problema de abastecimiento (Vanisree y Tsay, 2007).

Dada la aplicación y potencial de las plantas medicinales, tradicionalmente su producción se ha basado en dos sistemas de aprovechamiento diferenciados:

- 1) **Recolección a partir de plantas silvestres:** se fundamenta en la recolección espontánea de las plantas silvestres, e incluso, en muchas ocasiones, recurriendo al furtivismo. Este tipo de aprovechamiento de no llevarse a cabo por personas expertas deriva en una falta de garantías de identidad y calidad de las plantas productoras de principios activos, lo cual no permite atender las exigencias de un mercado regulado en términos equivalentes a los exigidos a los medicamentos de fabricación industrial. Tampoco resulta ser un sistema adecuado para mantener una producción constante y homogénea, que permita abastecer la demanda creciente del mercado, sobre todo teniendo en cuenta el alto riesgo de extinción de especies medicinales que este tipo de recolección conlleva.
- 2) **Recolección a partir de plantas cultivadas:** se basa en la recolección de plantas sometidas a cultivo tradicional empleando las técnicas adecuadas desde el punto de vista agronómico. Este tipo de aprovechamiento garantiza la identidad y calidad de la planta y una producción homogénea sin presencia de plantas foráneas, si bien es dependiente –obviamente- de los factores externos e internos que afectan a cualquier cultivo tradicional, tales como condiciones edafoclimáticas (tipo suelo, nivel hídrico, pH, temperatura, altitud, luz, etc.), ciclo ontogénico, estado fenológico, grado de diferenciación celular o presencia de patógenos. Este tipo de recolección está indicado para algunas especies en peligro de extinción como *Thymus* spp., por la recolección masiva e incontrolada de plantas silvestres, y para aquellas otras que presentan dificultades de reproducción como *Paeonia officinalis*.

A excepción de los cultivos oficinales y de los de algunas plantas aromáticas y otras alimentarias, una de las mayores dificultades para la implantación más extendida del cultivo tradicional de plantas medicinales reside en el escaso conocimiento de sus ciclos ontogénicos y de la tipificación de sus estados fenológicos, ya que muestran patrones de desarrollo muy diversos (plantas anuales, bienales y perennes), leñosas, arbustivas, herbáceas, rizomatosas, estoloníferas, o bulbosas, de propagación sexual o vegetativa, pudiendo presentar los principios activos en toda la planta o en cualquiera de sus órganos (hojas, tallos, raíces,

flores, frutos, semillas, bulbos, rizomas o tubérculos), lo que dificulta enormemente la labores culturales y la aceptación de esta práctica agrícola.

Todas las razones expuestas, desde finales de la década de los años setenta, se ha propiciado la introducción, desarrollo e implantación de técnicas biotecnológicas como alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales. El cultivo *in vitro* de plantas productoras de metabolitos secundarios surge a partir del interés por parte de la industria que se abastece de estas materias primas, en establecer un método de producción cuya calidad, cantidad y coste no se vean afectados por condiciones edafoclimáticas, sanitarias o políticas de la región de producción. Por ello, el cultivo *in vitro* de plantas medicinales es una alternativa para resolver los problemas que supone un mercado definido por el mantenimiento de la producción regular. En la actualidad la biotecnología a través del cultivo *in vitro* es la alternativa eficaz, lo que no implica que esté exenta de problemas, especialmente la estandarización de las condiciones de los cultivos *in vitro* de las células vegetales dado el número y variedad de principios activos producidos por las plantas medicinales.

3. OBJETIVOS

Examinar el estado actual del cultivo *in vitro* para la producción de principios activos como alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado una revisión bibliográfica mediante la búsqueda básica en libros especializados en Biotecnología Vegetal-Farmacéutica; revisiones bibliográficas, artículos científicos y publicaciones de organizaciones de ámbito sanitario (OMS).

Los artículos científicos y las revisiones bibliográficas fueron encontrados en el buscador Google Académico y el motor de búsqueda Pubmed de libre acceso a la base de datos Medline, mediante la introducción de los siguientes términos de búsqueda cruzados: Biorreactor; Cultivo celular; Cultivo *in vitro*; Cultivo tradicional; Escala industrial; Metabolito secundario; Planta medicinal; Rendimiento.

Los criterios de inclusión para la selección de artículos y revisiones se basan en que las publicaciones revisadas hayan sido escritas en inglés y en español. Además, se ha priorizado aquellas más recientes y con mayor número de citas por artículos relacionados.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los últimos años se han ideado técnicas que unos casos tratan de mejorar y en otros de reemplazar al sistema tradicional de cultivos vegetales. El término cultivo vegetal *in vitro* se refiere al cultivo de plantas o sus partes (células, tejidos, órganos o protoplastos) en medios artificiales y en condiciones asépticas, basándose y sacando partido a dos características fundamentales de la célula vegetal: la totipotencia o capacidad para regenerar una planta completa, y la dediferenciación o la capacidad de retención para volver al estado meristemático, a diferencia del mundo animal (Martín *et al.*, 2018). Las células meristemáticas en la planta se encuentran en los ápices y constan de una pared pequeña y un núcleo grande. Se encuentran indiferenciadas y se encuentran en constante división por mitosis. Se considera que en general, las células vegetales son totipotentes, de modo que, menos las altamente especializadas, contienen la información genética necesaria para, en condiciones de cultivo apropiadas, regenerar de una célula simple una planta completa. Como consecuencia, cualquier tejido en un medio que reúna las condiciones químicas y fisiológicas adecuadas podrá ser inducida a sintetizar las sustancias características de la planta madre (Serrano y Piñol, 2007).

Las plantas tienen un enorme potencial bioquímico para producir una gran variedad de compuestos secundarios, muchos de ellos de alto valor terapéutico y/o industrial. El número de estructuras químicas de plantas conocido es del orden de $2,5 \times 10^4$. Ciertos tejidos y células vegetales se utilizan para la producción *in vitro* de metabolitos secundarios propios de la especie vegetal de la que proceden (citodiferenciación específica). A veces, las células vegetales producen una forma compleja o estereoespecífica de interés, difícil o imposible de sintetizar en el laboratorio químico. También el cultivo *in vitro* se utiliza para efectuar biotransformaciones de compuestos ajenos a la especie cuyas células pueden transformarlos (Serrano y Piñol, 2007).

A) Estrategia para la obtención de metabolitos secundarios

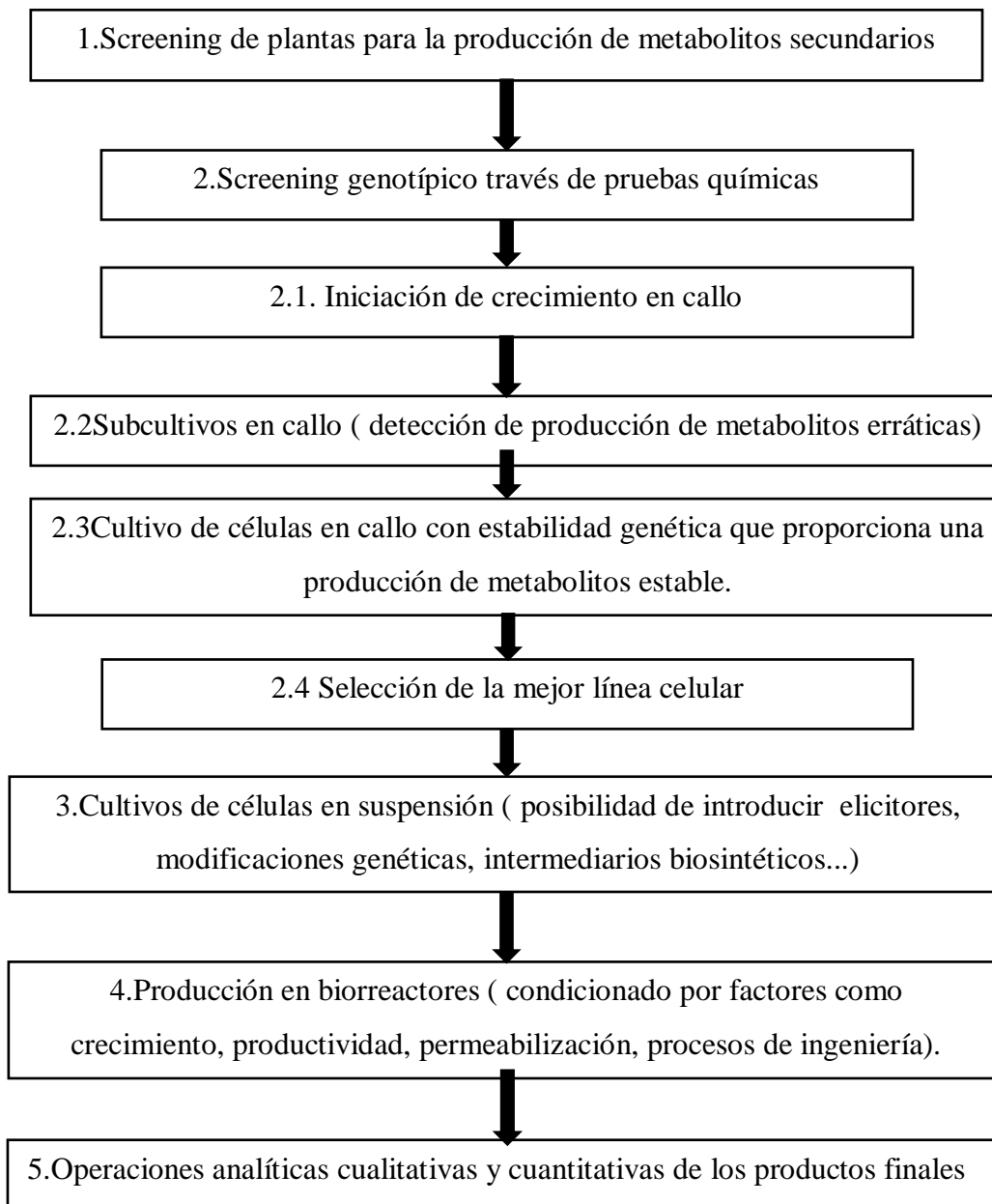


Figura 2. Esquema-resumen de las etapas requeridas para obtener metabolitos secundarios a escala industrial.

B) Etapas requeridas hasta la selección de líneas celulares

La finalidad del cultivo vegetal *in vitro*, en su aspecto industrial, se basa en el rendimiento del producto y en el coste de producción. Las líneas variantes se distinguen de las silvestres por un carácter que les confiere una ventaja selectiva. Se seleccionan clones que posean un alto ritmo de crecimiento y una alta producción de los metabolitos de interés. Estas líneas celulares se seleccionan mediante diferentes estrategias como pueden ser exámenes microscópicos, macroscópicos y químicos (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Las estrategias de cribado, con el objetivo de obtener líneas celulares estables de alto rendimiento se pueden resumir en:

- *Cribado* de plantas de alto rendimiento.
- Separación de explantes (segmento de tallo, de raíz de hoja, ápices de tallo que es transferido un medio artificial de crecimiento. Parte de donde se obtiene el material de partida). de plantas madre seleccionadas y establecimiento de los cultivos de callos y células en suspensión.
- Selección al azar de clones de alto rendimiento característico, basada en la inestabilidad celular, o bien, utilizando técnicas mutagénicas o procedimientos fisiológicos.

1,2. Por tanto, partimos de una planta madre o planta diana que se obtiene a través de un cribado fenotípico, que implica la adaptación al medio ambiente, resistencias a los insectos... ya sea mediante selección para resistencia, selección visual o contraselección y selección total. Para poder comprobar las características que hagan que la planta seleccionada se convierta en la planta diana, se utilizan cultivos en callo y de células en suspensión o en placa posteriormente (Serrano y Piñol, 2007). Aún así, para la selección de las líneas celulares no basta con una selección fenotípica, puesto que es muy importante conocer el estado fisiológico de la planta que viene determinado por la etapa del ciclo ontogénico en el que se encuentre (Martín *et al.*, 2018).

2. Los protoplastos (células vegetales que han perdido la pared celular por acción enzimática) son la forma celular más apropiada para la selección de mutantes y variantes en general. En general, se seleccionan pequeñas colonias de protoplastos, que no ofrecen dificultades para los intercambios entre sí y con el medio (Serrano y Piñol, 2007). Los protoplastos también pueden ser utilizados para la regeneración de las plantas de las que proceden y realización de transformaciones genéticas que mejoren la productividad de las plantas medicinales, resistencia a patógenos y herbicidas y a una mayor tolerancia a condiciones ambientales adversas (Martín *et al.*, 2018).

El medio de cultivo seleccionado para el desarrollo del callo (masa amorfa de células sin diferenciar), es un medio solidificado con agar (fig. 2), que va a disponer en una proporción adecuada los nutrientes necesarios (macro y micronutrientes), las fuentes de carbono (sacarosa, glucosa, fructosa o maltosa), fuentes de nitrógeno orgánico en forma de aminoácidos (glicina, fenilalanina, glutamina, arginina entre otros) y hormonas, fundamental y básicamente auxinas y citoquininas (de este balance va a depender que el medio sea precursor de la organogénesis y/o rizogénesis). Las proporciones exactas de cada componente del medio de cultivo irá condicionada para la finalidad del cultivo, lo que pone de manifiesto la dificultad de estandarización de los medios de cultivo, a pesar de las ventajas que nos ofrece la adición de precursores. De hecho muchas empresas quimiofarmacéuticas y/o biotecnológicas facilitan medios de cultivo básicos a los que se puede añadir los componentes que cada empresa o equipo investigador considere más conveniente para el éxito de su cultivo.

3.Una vez realizado el screening de productividad de las células en el agar y paso previo a la producción en biorreactores, se realizar un estudio de células en suspensión, donde se trata de obtener información acerca de las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios, elicitación, inmovilización de las células y modificaciones genéticas, condicionantes que pueden mejorar la productividad del proceso de cultivo en biorreactores.

En cuanto la estructura molecular, para obtener resultados favorables en la obtención de metabolitos secundarios de origen vegetal, se utilizan varias estrategias, que varían en función del cultivo *in vitro* empleado, del metabolito de interés y de su aplicación o utilización (Martín *et al.*, 2018).

Existen diferentes estrategias con la finalidad de producir y diseñar medicamentos:

- El metabolito concreto de la planta puede ser directamente el compuesto deseado. Por ejemplo: la morfina.
- Modificación parcial en el laboratorio de la molécula específica de la planta . Ejemplo: la bacatina III, obtenida de las hojas y de cultivos celulares del tejo americano, proporciona la molécula base para la obtención, por modificación sintética del taxol.
- El metabolito específico de la especie puede servir como molde para al síntesis de nuevas moléculas.

Si lo que pretendemos es la generación a gran escala de principios activos de forma directa , con el fin de producir y diseñar medicamentos, es fundamental la selección de este tipo de células productoras a través de las estrategias citadas anteriormente, es decir, teniendo en cuenta su fisiología, metabolismo e inter-relación entre el metabolismo primario y secundario (Martín *et al.*, 2018). Una vez seleccionadas, pasarán a un cultivo en medio líquido en biorreactores (4).

C) Cultivo in vitro en biorreactores

La suspensión celular se utiliza para la producción a gran escala de compuestos de interés industrial en biorreactores, en condiciones muy similares a las células microbianas, donde se facilita por una parte la distribución homogénea de las células y por otra parte, la transferencia de nutrientes y oxígeno al citosol.

Se ha observado a través de varios trabajos de investigación que las condiciones de cultivo y nutrientes necesarias para el desarrollo de la biomasa no coinciden con las necesarias para la producción de los metabolitos secundarios de interés. Es por ello que se ha promovido un sistema de cultivo en biorreactores en dos etapas, una primera que estimule el crecimiento de la biomasa y la segunda que favorezca la biosíntesis del metabolismo deseado (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

El patrón de crecimiento celular transcurre en cuatro fases diferenciadas:

-Fase I o de latencia: fase en la cual las células se adaptan a las condiciones de cultivo sin experimentar crecimiento.

-Fase II o fase exponencial: fase de crecimiento celular rápido donde hay alto consumo de nutrientes del medio.

-Fase III o fase estacionaria: fase en la que una vez consumido la gran cantidad de nutrientes del medio, especialmente de carbono, nitrógeno y fósforo, lo que se traduce en niveles sostenidos-ligeramente reducidos de crecimiento al final de esta fase.

Fase IV o de caída: fase donde se da lisis celular lo que conlleva una reducción en la biomasa. Esta fase normalmente se evita en crecimiento en biorreactores ya que esta lisis puede suponer una degradación de los metabolitos secundarios producidos.

Por tanto, durante las etapas tempranas cuando el crecimiento es muy activo, las cadenas de carbono están principalmente distribuidas para el metabolismo primario. Cuando se detiene este crecimiento, las cadenas de carbono largas no son necesarias en grandes cantidades para el

metabolismo primario y los compuestos secundarios son sintetizados activamente. Existe una relación muy estrecha entre la diferenciación celular y la formación de metabolitos secundarios. (Bourgaud *et al.*, 2001).

Frecuentemente, la diferenciación morfológica es necesaria para obtener mayores rendimientos de metabolitos secundarios. Sin embargo, esto no siempre se busca en el cultivo a gran escala, ya que el periodo de cultivo para tejido diferenciado es mucho más largo que para células indiferenciadas. Un mayor periodo de tiempo para alcanzar la producción deseada, va directamente ligado con una mayor probabilidad de contaminación microbiana y un mayor coste de producción (Serrano y Piñol, 2007).

Esta comprobado científicamente que cultivos celulares compactos u organizados y en crecimiento lento acumulan mayores cantidades de metabolitos secundarios que los cultivos friables, que crecen rápidamente. Esto se debe a que un cierto nivel de organización parece esencial para que las células efectúen su metabolismo normal, y cuanto más se aproximen las células a su organización en la planta, más fácil es que realicen las rutas de su propio metabolismo (Serrano y Piñol, 2007). Así como el nivel de organización celular es muy importante, también hay que tener en cuenta la naturaleza del material biológico de partida y que condiciones en el biorreactor son las más favorables para obtener una mayor cantidad de principio activo en ese material en concreto. Por tanto, los biorreactores para cultivo *in vitro* (de órganos de tejidos células, ya sean estas normales o en suspensión) de células vegetales tienen que estar adaptados al cultivo. Es una gran diferencia que existe con los fermentadores para microorganismos. Por ejemplo, si se tiene un cultivo de raíces en cabellera, hay que adaptar el biorreactor a ese tipo de cultivo. En ese caso en concreto al tratarse de raíces debe constar un pulverizador, por ejemplo, como adaptación particular del biorreactor. Esta modificación junto con otras, permiten la ventaja de una producción más rápida.

Los cultivos de suspensiones celulares de plantas muestran una tendencia a formar agregados celulares de tamaño considerable, lo que supone un aumento en la viscosidad del sistema de cultivo en las últimas etapas debido a la excreción de polisacáridos por las células de la planta. Estas estructuras funcionalmente transportan oxígeno y nutrientes entre el interior y el exterior de los agregados, estando muy relacionados con el metabolismo secundario ya que para la producción y almacenamiento de muchos metabolitos secundarios es necesario un cierto nivel de diferenciación (Capote, 2006).

Los estudios de biorreactores representan el paso final que conduce a una posible producción comercial de metabolitos secundarios. Es una fase fundamental ya que surgen problemas

cuando se traslada el trabajo de laboratorio a la escala industrial. Por ejemplo, el crecimiento se modifica considerablemente cuando las células se cultivan en grandes tanques o, en otros casos, la biomasa generada puede interferir en la producción de metabolitos. El cultivo en biorreactores va a depender de los siguientes factores: (Zhong, 2001) & (Martín *et al.*, 2018)

D) Componentes básicos del cultivo

Sacarosa: Fuente de carbono, factor muy significativo en el metabolismo de la planta. En la producción de ginsenósidos, la modificación de la cantidad de sacarosa en el medio de cultivo fue demostrado ser muy eficaz para mejorar la productividad del cultivo. Bajas concentraciones de sacarosa, favorecen la proliferación celular, mientras altas concentraciones (iguales o mayores al 3%) favorecen la formación de metabolitos secundarios y una ralentización del crecimiento celular.

Nitrógeno: la fuente de nitrógeno también es muy importante en la formación de los metabolitos en la planta, condicionando la cinética de crecimiento celular, jugando con las proporciones de nitrógeno en forma de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. Altas concentraciones de nitrógeno favorecen la proliferación celular, mientras que bajas concentraciones (en algunos casos) favorecen la formación de metabolitos secundarios.

Ion potasio: Tiene un rol muy importante en procesos bioquímicos y biofísicos de la planta. K^+ contribuye a un mejor potencial osmótico, a un requerimiento específico para la síntesis proteica y como activador de sistemas enzimáticos.

Frecuencia en la alimentación: tiene un efecto muy importante a la hora de mejorar la densidad y producción de metabolitos secundarios en la planta. Por ejemplo, el rendimiento del cultivo de paclitaxel fue potenciado por la presencia de ácido carboxílico aromático y aminoácidos en el medio de cultivo de *Panax notoginseng*.

Aporte de oxígeno: O_2 afecta tanto al crecimiento como a la producción de metabolitos secundarios.

Hormonas: la regulación del desarrollo se efectúa principalmente mediante la adición de auxinas y citoquinas. De las auxinas, el ácido indolacético (IAA) es el menos activo, pero existen análogos de síntesis como el ácido indolbutírico (IBA) y alfa-naftalencético (NAA) que son más estables y efectivos. En explantes de muchas especies, estos ácidos inducen con facilidad la formación de callo o inhiben considerablemente la organogénesis.

Estrés hídrico: la morfología y tamaño de agregación son muy dependientes del estrés hidrodinámico del fluido que contiene el cultivo celular. Además, las células vegetales en cultivo en suspensión tienden a adherirse a las paredes de los biorreactores del cultivo. En altas densidades celulares, el volumen de biomasa puede ocupar entre el 50 y el 90 % del volumen de cultivo debido a el alto contenido de agua de las células vegetales.

Otros:, pH, fosfato, sulfato.

Factores físicos

Irradiación lumínica: La densidad, cantidad y frecuencia de la irradiación lumínica va a tener repercusión sobre diversos aspectos del cultivo de las células vegetales. Equipos de investigadores han demostrado el efecto de la irradiación lumínica en la formación de compuestos como antocianinas, vindolina, catarantina y cafeína en cultivos vegetales en suspensión.

Reología: Importante para el desarrollo y mejora de proceso de cultivo celular. El conocimiento de la reología puede proporcionar problemas en el cultivo debido a la viscosidad, mezcla, estrés hidrodinámico y crecimiento celular, así como la producción de metabolitos, todas interrelacionadas en el cultivo celular.

Temperatura: Importante para el desarrollo y mejora de proceso de cultivo celular.

Con el fin de obtener una mayor cantidad de los metabolitos deseados, elicitores y precursores son estrategias muy efectivas para obtener los productos finales deseados. Los elicitores son factores físicos y químicos responsables de respuestas fisiológicas o morfológicas de las plantas que se emplean para potenciar la producción de metabolitos secundarios. Un ejemplo de elicitador físico puede ser la salinidad y un ejemplo de elicitador químico puede ser el estrés nutricional (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011). Es un método usado en procesos industriales a gran escala para “inducir la expresión de genes” asociados a enzimas del metabolismo secundario”. Algunas veces puede actuar estimulando la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios y otras, sobre la transcripción o sobre la formación de metabolito secundario. Los precursores son moléculas que se incorporan directamente en las rutas biosintéticas para formar determinado metabolitos primarios o secundarios, según interese. Se caracterizan por tener un bajo coste, tener baja o nula toxicidad y poseer una estructura bastante semejante a la del metabolito final de la ruta metabólica.

Además se puede recurrir a la estrategia de la biotransformación o bioconversión, una estrategia basada en la capacidad de modificar determinados grupos funcionales de compuestos orgánicos, mejorando así la producción de metabolitos determinados y la obtención de nuevos compuestos, así como el conocimiento con mayor precisión de determinadas rutas metabólicas. Para que se de esta transformación con éxito, es necesario que el sustrato o precursor no sea tóxico para el cultivo, que dispongamos de las enzimas adecuadas y que la formación de producto sea más rápida que su metabolismo (Martín *et al.*, 2018).

E) Biorreactores

Las condiciones del biorreactor se deben adecuar a las características morfológicas y fisiológicas de las células vegetales, ya que condicionan el cultivo en suspensión de estas células en biorreactores si lo comparamos con las suspensiones microbianas. Las características diferenciales con este tipo de cultivos hacen referencia, entre otras, a la frecuente presencia de agregados celulares, al mayor tamaño, mayor sensibilidad a fuerzas de corte, bajos requerimientos de aireación y acumulación intracelular o extracelular de los metabolitos secundarios, lo que supone una rápida sedimentación, mayor tiempo de cultivo, menor productividad, necesidad de control de la agitación del rotor.

Los sistemas de cultivo en biorreactores se pueden clasificar en dos tipos:

-Continuo: ofrece la ventaja de alimentación continuada de material en condiciones controladas, permitiendo mantener la biomasa durante periodos prolongados.

-Discontinuo: Después de un periodo en el medio de producción, se recolectan las células para extraer de ellas el producto que se ha sintetizado y acumulado

Los tipos de de biorreactores se diferencian principalmente en la aireación y en la agitación, los factores más condicionantes a la hora de desarrollar una estrategia de producción de metabolitos secundarios con éxito. Dos tipos de biorreactores atendiendo a estos criterios:

-**Biorreactores de agitación mecánica**: sistemas en los que la homogeneización del medio se produce debido a la energía procedente de las palas del agitador que transmite velocidad al medio adyacente. Tiene el inconveniente que produce zonas de altas turbulencias en las proximidades de las palas agitadoras, por lo que las células no están exentas del efecto corte que pueden producir las palas agitadoras. Dentro de este tipo de biorreactores están los biorreactores con tanques de agitación con rotor, que produce una agitación regular a una velocidad moderada

y además pueden disponer de difusores que permiten una mejor expansión del aire. Por otro lado, están los biorreactores con tanques de agitación con turbina, que tienen una turbina que mueve las palas del agitador de forma helicoidal, favoreciendo la aireación y reduciendo el riesgo de efecto corte producido por las palas.

- **Biorreactores de agitación neumática:** la homogeneización del medio se consigue por una inyección de aire, evitando los riesgos del efecto corte. Se pueden dividir en dispositivos sin circulación de aire, donde se encuentra encasillada la columna de borboteo, que permite un mayor tiempo de permanencia de las burbujas de aire. Por otro lado están los dispositivos con circulación de aire o airlift que están agitados exclusivamente de forma neumática, donde la fase gaseosa es inyectada desde la base del tanque, arrastrando en su ascenso a la fase más densa. Este tipo de sistema presenta ventajas frente a otros como la facilitación de construcción de instalaciones, menor cantidad de flujo de aire para garantizar la suspensión, eliminación de volúmenes muertos del tanque, menor tiempo de mezclado y sobre todo, posibilidad de su uso industrial, con reproducción satisfactoria de los resultados a pequeña escala (Torres *et al.*, 2018)

5. Una vez finalizado el proceso de obtención de metabolitos secundarios se realizan operaciones analíticas donde se comprueban de forma cuantitativa y cualitativa los productos finales.

F)Inconvenientes del cultivo in vitro

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 genética y fisiológica 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 y Jiménez, 2011).

Los cultivos de suspensiones celulares de plantas muestran una tendencia a formar agregados celulares de tamaño considerable, lo que supone un aumento en la viscosidad del sistema de cultivo en las últimas etapas debido a la excreción de polisacáridos por las células de la planta. Estas estructuras funcionalmente transportan oxígeno y nutrientes entre el interior y el exterior de los agregados, estando muy relacionados con el metabolismo secundario ya que para la

producción y almacenamiento de muchos metabolitos secundarios es necesario un cierto nivel de diferenciación (Capote, 2006).

En general, uno de los principales problemas, además de los problemas técnicos que conlleva el cultivo *in vitro* de material vegetal, es la falta de conocimientos básicos de rutas biosintéticas y mecanismos regulatorios. (Zhong, 2001)

G) Rendimiento del cultivo *in vitro* frente al cultivo tradicional

Como se muestra en la tabla 1, se han realizado estudios científicos donde se comprueba un mayor rendimiento en los cultivos de células vegetales *in vitro*, si lo comparamos con el cultivo tradicional de la misma especie vegetal.

Tabla 1. Rendimiento de metabolitos secundarios en cultivo *in vitro* en relación con el cultivo tradicional. Adaptado de Zhong, 2001.

Planta	Producto	Rendimiento (% peso seco)		
		En cultivo <i>in vitro</i>	En cultivo tradicional	Relación
<i>Vitis sp.</i>	Antocianina	16	10	1,6
<i>Morinda citrifolia</i>	Antraquinona	18	2,2	8
<i>Thalictrum minor</i>	Berberina	10	0,01	1000
<i>Coleus blumei</i>	Ácido	27	3	9
	Rosmárico			
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Shikonina	14	1,5	9,3

Aún así, si tenemos en cuenta que el cultivo *in vitro* de células vegetales sigue siendo de baja productividad, solo puede ser rentable, si hablamos en términos económicos, en la producción de metabolitos de un alto valor añadido.

H) Obtención de metabolitos secundarios a escala industrial

En la actualidad se obtienen principalmente tres metabolitos secundarios de origen vegetal a gran escala: siconina, ginsen y paclitaxel (Zhong, 2001).

El taxol o paclitaxel es un diterpeno anticancerígeno extraído del *Taxus brevifolia*. Ha sido aprobado para el tratamiento clínico del cáncer de ovario y de mama por la FDA y también muestra actividad terapéutica significativa contra el melanoma maligno, cáncer de pulmón y otros tumores sólidos. Por todo esto el taxol se considera como el prototipo de una nueva clase de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer.

La corteza de tejo contiene 0,001% de taxol en peso seco, lo que supone que un árbol de 100 años cuyo promedio de corteza es aproximadamente 3 kg, que se corresponderían a 300 mg de taxol, que es aproximadamente una dosis única para el curso de un tratamiento contra el cáncer. Debido a la escasez de estos árboles de crecimiento lento y a su bajo contenido en taxol, el cultivo *in vitro* de este tipo de célula vegetal supone una alternativa que permite abastecer al mercado en calidad y cantidad (Vanisree *et al.*, 2007).

La raíz del *Panax ginseng*, contiene ginsenósidos, un grupo de saponinas triterpénicas, ampliamente utilizado como un tónico, antifatiga, cardio-protector, inmunomodulador y con propiedades antioxidantes. Ha sido reconocido como un promotor milagroso de salud y longevidad. En cuanto a las condiciones del cultivo *in vitro*, destaca un estudio que muestra que la adición de metil-jasmonato o dihidrometiljasmonato en el medio de suspensión incrementa la producción de ginsenósidos (Vanisree y Tsay, 2007).

6. CONCLUSIÓN

En los últimos años, el mercado de los productos naturales se experimenta un aumento. Cultivo de células vegetales en un futuro van a contribuir más al mercado con los avances tecnológicos. Por ejemplo, el mercado mundial de materias primas derivadas del Ginsen mueve en torno a un billón de dólares. Aunque el cultivo de células *in vitro* del mercado del Ginsen ocupa menos del 1%, su participación aumentará enormemente con la mejora de la productividad de los cultivos *in vitro* de las células vegetales.

Recientes estudios han establecido que en los países occidentales, donde la química es la columna vertebral de la industria farmacéutica, el 25% de las moléculas utilizadas son de plantas de origen natural (Bourgaud *et al.* 2001).

Las principales ventajas del cultivo *in vitro* sobre el cultivo tradicional son:

- Se pueden obtener metabolitos secundarios en condiciones controladas independientemente de factores ambientales bióticos (interacción con patógenos) y abióticos (sequía, temperaturas extremas y luz ultravioleta)
- Mayor rendimiento en la obtención de metabolitos.
- Una producción regular y fiable capaz de abastecer las exigencias del mercado.
- Obtención de nuevos compuestos no existentes en la planta diana.
- Oportunidad para producir perfiles fitoquímicos a través de la manipulación de las condiciones de cultivo para producir metabolitos secundarios con un potencial mayor para su uso clínico.
- La automatización del proceso supone una reducción de costos así como la posibilidad de realizar controles de calidad estrictos.
- Estos sistemas por su relación costo-beneficio y por la posibilidad de obtener metabolitos secundarios mediante el cultivo de tejidos diferenciados, pueden ser empleados para la producción de compuestos de interés farmacéutico (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).
- El cultivo de células crece en condiciones asépticas libres de insectos y microbios, siendo las sustancias orgánicas más fácilmente extraíbles de cultivos en callo (Vanisree y Tsay, 2007).

Puesto que la demanda de metabolitos secundarios mediante el cultivo *in vitro* será cada vez mayor, la utilización de diferentes estrategias que durante años de investigación se han desarrollado, permitirá una reducción en el tiempo de producción y por tanto una reducción de costos (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

6. BIBLIOGRAFÍA

Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.

Capote, P. (2006). *Perfil metabólico de extractos obtenidos de cultivos in vitro de Morinda royoc L., Psidium guajava L. var "EEA18-40" y Morus alba L. var "Criolla"* (Doctoral dissertation, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas).

Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and applied chemistry*, 77(1), 7-24.

Kim, O. T., Bang, K. H., Kim, Y. C., Hyun, D. Y., Kim, M. Y., & Cha, S. W. (2009). Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng

hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 98(1), 25-33.

Martín, B.H., Torres, M., Saco, D (2018). Capítulo 14: Biotecnología vegetal. Cultivos vegetales *in vitro*. Obtención de productos de interés farmacéutico, en: Fundamentos de biotecnología Farmacéutica. Madrid: Dextra.

Pérez-Alonso, N., & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología vegetal*, 11(4).

Serrano G.M. & Piñol S.T (2007). Biotecnología Vegetal. Madrid: Síntesis.

Torres, M., Martín, B.H., Saco, D (2018). Capítulo 15: Biotecnología Vegetal. Optimización de la producción de metabolitos secundarios de interés farmacéutico en cultivos *in vitro*, en: Fundamentos de biotecnología Farmacéutica. Madrid: Dextra.

Vanisree, M., Lee, C. Y., Lo, S. F., Nalawade, S. M., Lin, C. Y., & Tsay, H. S. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 45(1), 22.

Vanisree, M., & Tsay, H. S. (2007). Plant cell cultures: Production of biologically important secondary metabolites from medicinal plants of Taiwan. *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 267-285.

Yeoman, M. M., & Yeoman, C. L. (1996). Tansley Review No. 90. Manipulating secondary metabolism in cultured plant cells. *New Phytologist*, 553-569.

Zhang, X. (2018). Medicina tradicional: definiciones. Ginebra. Recuperado de: <http://www.who.int/>

Zhong, J. J. (2001). Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. In *Plant cells* (pp. 1-26). Springer, Berlin, Heidelberg.

