

# OBTENCION DE PRODUCTOS SECUNDARIOS DE INTERES FARMACOLOGICO EN CULTIVO DE TEJIDOS II

## Efecto de la modificación del medio en su producción (1)

Segura-Mora, J., Dpto. de Bioquímica Vegetal. - M. Robert, Dpto. de Biología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yuc. - J. Reyes, Farmacia y productos Naturales, DEPg, Facultad de Química, UNAM. 04510, México, D.F. y Loyola -Vargas, Dpto de Bioquímica Vegetal.

(1) Apoyado parcialmente por el CONACYT (PCCBCNA-020845) y el Fondo Ricardo Zebada.

### INTRODUCCION

Durante las últimas décadas hemos aprendido como cultivar una amplia variedad de plantas en medios artificiales perfectamente definidos. Varios cientos de plantas pueden ahora ser cultivadas en un estadio de desdiferenciación como el de callo o el de cultivo en suspensión. Los cultivos en suspensión pueden ser manipulados de manera análoga a los procesos tradicionales de fermentación con la salvedad de que algunos problemas y perspectivas son únicas al cultivo de células vegetales.

Entre los metabolitos secundarios encontramos sustancias de interés económico tales como: alcaloides (utilizados como fármacos), aceites glucósidos (utilizados como colorantes y fármacos) y enzimas. Estos compuestos generalmente son obtenidos por extracción de la planta. Existe un gran número de problemas asociados con la manufactura de tales compuestos: los niveles de suministro de la materia prima pueden ser erráticos debido a calamidades naturales; otro problema es que las plantas deberán ser mantenidas durante el transporte y almacenamiento en el estado de máxima actividad fisiológica para asegurar altos rendi-

mientos de los metabolitos deseados. La domesticación de las plantas silvestres o la pérdida en su capacidad biosintética por sobreexplotación son otros problemas adicionales. Debido a estos problemas la operación en su conjunto es ineficiente por sí misma.

Estos problemas han sido reconocidos desde hace tiempo por lo que se ha buscado en los cultivos de tejidos vegetales (CTV) una alternativa. Estos sistemas pueden proveer un suministro continuo y homogéneo de la materia prima en un estadio fisiológico uniforme debido a su independencia del medio ambiente, por las condiciones controladas utilizadas para su crecimiento. Por otro lado los CTV pueden ser manipulados más fácilmente que las plantas completas para incrementar los rendimientos o también pueden ser usados para generar aún desconocidos.

Para ser útil como fuente industrial alterna de compuestos secundarios un cultivo de células deberá satisfacer varios requerimientos. Un buen rendimiento de producto final es esencial. Además, su velocidad de acumulación en la célula o liberación al medio deberá ser más rápida que su veloci-

dad de degradación. Las células deberán ser genéticamente estables de tal manera que produzcan una cantidad constante del producto. La producción deberá ser costeable.

Los CTV tienen un gran potencial industrial para la producción de metabolitos secundarios, sin embargo aún existen problemas que deben ser solucionados. Los problemas claves son: crecimiento lento, inestabilidad genética, agregación celular, control de la diferenciación celular, su incapacidad para crecer autotróficamente y factores morfológicos. Entre las posibles soluciones tenemos: optimización de las condiciones ambientales, adición de precursores, selección de líneas de alto rendimiento, mutagénesis, uso de tejidos diferenciados, congelamiento, uso del ciclo de crecimiento, inmovilización de células y biotransformación.

Recientemente hemos discutido las ventajas y desventajas de la obtención de metabolitos secundarios tanto de las plantas como de los CTV (1). En el presente artículo analizamos como la manipulación del medio puede llevarnos a mejores rendimientos de los metabolitos secundarios en los CTV.

La síntesis de metabolitos secundarios específicos por los cultivos de tejidos vegetales (CTV) es una área de intensa investigación en virtud de sus implicaciones biotecnológicas y por lo tanto económicas. A pesar de los grandes esfuerzos realizados en los últimos años, poco se ha obtenido en inducir a los CTV a producir los compuestos deseados en la cantidad que lo hace la planta completa. Sin embargo, cada vez se comprende mejor la fisiología y bioquímica de los CTV por lo que cada vez se está más cerca de tener logros que llevan a la producción de metabolitos secundarios por los CTV.

## I. EFECTO DE LOS NUTRIENTES EN LA OBTENCION DE PRODUCTOS SECUNDARIOS

### I.1. Carbohidratos

El efecto de la concentración de carbohidratos en el rendimiento de metabolitos secundarios ha sido examinado por varios grupos. Por ejemplo, incrementando la concentración de sacarosa del 2 al 4% se incrementaron los polifenoles en cultivos en suspensión de *Rosa* sp. (2) y de *A. pseudo-*

*platanus* (3), mientras que un incremento del 2 al 5% disminuyó la ubiquinona por gramo de células secas de *N. tabacum* L. c.v. BY-2 (4), pero incrementó el peso total; así, probablemente hubo un pequeño pero sistemático efecto en la cantidad total de ubiquinona por matraz. El rendimiento de derivados de shikonina por gramo de peso fresco de callos de *Lithospermum erythrorhizon* se incrementó cuando la sacarosa se aumentó del 1 al 5% y permaneció casi constante entre 7 y 10%. Sin embargo, a concentraciones mayores de sacarosa, el peso fresco del callo por matraz declinó (5). Las antocianinas totales en callos de híbridos de *Populus* aumentaron cuando la sacarosa se incrementó del 0.3 al 5%, en tanto que no se vió afectado el crecimiento. Las antraquinonas totales producidas por un cultivo de *M. citrifolia* fueron máximas a 7% de sacarosa (6). Al incrementar la glucosa del 0.05 al 0.2% se incrementó tanto el contenido total de fenoles como el de las leucoantocianinas totales producidas por cultivos en suspensión de *Rosa* sp. (7).

La respuesta de productos secundarios a los diferentes carbohidratos suministrados en el medio parecen indicar que la sacarosa puede ser la mejor fuente de carbono. Sin embargo, los datos de este fenómeno son limitados, de tal manera que estas conclusiones deberán tomarse con cuidado. El rendimiento de ubiquinona ( $\mu\text{g/g}$  peso seco) en *N. tabacum* var. BY-2 fue comparable a concentraciones iguales de sacarosa y glucosa (4), en tanto que la sacarosa fue claramente superior a la glucosa, fructosa o una mezcla igual de ambas en los niveles de derivados de shikonina en cultivos de *L. erythrorhizon* (5) al igual que para la obtención de alcaloides ergóticos derivados de *Evolvulus alsinoides* L. (8).

El grupo de Zenk demostró que, a concentraciones óptimas de glucosa para la producción de antraquinonas por cultivo (7.5%) el rendimiento fue de tan solo el 75% del obtenido a la concentración óptima de sacarosa (7%) (6). Por otro lado es muy significativo el hecho de que en algunos cultivos, *C. roseus* por ejemplo, un aumento en la concentración de sacarosa produce un marcado incremento en la concentración de alcaloides (9). Este hecho sugiere, puesto que una concentración del 2 al 3% de sacarosa es suficiente para el crecimiento, que

concentraciones tan elevadas lo que hacen es producir un estrés osmótico y que probablemente los alcaloides se sintetizan como respuesta a este estrés.

Por otro lado la concentración de sacarosa puede influir en la actividad de algunas enzimas claves del metabolismo, como es el caso de la triptofano sintasa de *E. alsinoides*, cuya actividad se ve aumentada por sacarosa al 2% y disminuida por sacarosa al 4% (8).

## 1.2. Nitrógeno

Mizukami et al. (5) demostraron que la formación de los derivados de shikonina (1:4 naftoquinonas) en cultivos de *L. erythrorhizon* se incrementó cuando el nitrógeno total en el medio se elevó de 67 a 104 mM. Nuevos incrementos en el nitrógeno total disminuyeron la formación de estos compuestos. Además, la adición de 0.3% de peptona o de hidrolizado de caseína a un medio de cultivo de *L. erythrorhizon* conteniendo 67 mM de nitrógeno disminuyó la cantidad de derivados de shikonina formados.

La producción de antraquinonas por cultivos en suspensión de *M. citrifolia* no fue inhibida y el crecimiento no fue estimulado cuando se incrementó el  $\text{KNO}_3$  de 2 a 4.5g/l. Tanto el crecimiento como la producción de antraquinona disminuyeron rápidamente por debajo de dicho rango (10). Zenk et al. (10) demostraron que cuando se adiciona hidrolizado de caseína a niveles mayores de 4g/l la producción de antraquinona, pero no el crecimiento, se ve fuertemente inhibido. Estudios más recientes de este grupo han permitido elucidar que la concentración de triptofano puede estar ejerciendo un fuerte control en la vía de síntesis de la antraquinona (11).

En cultivos de tabaco no se afectó la cantidad total de ubiquinona cuando se alteró la relación  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  en el medio de 3:1 a 1:3, y se mantuvo constante la cantidad total de nitrógeno (12). Sin embargo, el contenido de ubiquinona-10 mostró un incremento cuando la relación de nitrógeno  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  aumentó.

La producción del inhibidor de plasmina por cultivo en suspensión de *Scoloparia japonica* se incrementó marcadamente, mientras que el crecimiento no se vio afectado, disminuyendo el  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  de 1.66 a 0.83 g/l y aumentando el  $\text{KNO}_3$  de 1.9 a

7.6 g/l en el medio de cultivo (13).

La síntesis de alcaloides derivados del triptofano por callos de *P. harmala* disminuyó al sustituir al  $\text{NH}_4^+$  o a la glutamina por  $\text{NO}_3^-$  pero no al sustituir a la alanina pero no al sustituir a la alanina por nitrato (14). El crecimiento del tejido no se vio afectado por estos cambios en el medio.

En cultivos de *C. roseus* L. la edición de triptofano incrementó notablemente el crecimiento, pero disminuyó el contenido de alcaloides (15), en tanto que la adición de triptamina incrementó el contenido de alcaloides (16). En nuestro grupo hemos determinado que una variación en la fuente nitrogenada en plantas de *C. roseus* de 6 meses de edad no sólo afecta la cantidad, sino también la calidad de los alcaloides (17), sugiriendo que existe una estricta regulación en la síntesis de los alcaloides.

En *A. pseudoplatanus* urea produce una marcada inhibición en la síntesis de compuestos fenólicos, que previamente había sido estimulada por la adición de 2% de sacarosa en cultivos en suspensión en fase estacionaria (18).

Las evidencias sugieren que los efectos del estrés de nitrógeno en células en cultivo son variables, y dependen en parte del estatus nutricional de las células durante el tiempo que dure el estrés. Evidentemente cualquier molécula que contenga nitrógeno puede ser afectada por el estrés de nitrógeno; estos incluyen aminoácidos, proteínas, aminoácidos no proteicos, alcaloides, amidas y pseudoalcaloides. Sin embargo, cualquier perturbación metabólica que afecte el metabolismo de las proteínas puede seguramente influir en la formación de compuestos no nitrogenados.

## 1.3. Potasio

Los alcaloides en el cultivo fueron mayores a bajos niveles de K en *Argyrea* (19). Sin embargo, en *Rivea corymbosa* se ve una disminución en la síntesis de los alcaloides (19).

## 1.4. Calcio

El crecimiento de callos de *L. erythrorhizon* y el rendimiento de derivados de shikonina disminuyó al incrementarse el  $\text{Ca}^{+2}$  por arriba de 3 mM (5).

## 5. Fósforo

Nettleship y Slaytor (20) demostraron que al eliminar el P del medio se incrementaba el contenido de harmolol y harmina en callos de *P. harmala*, mientras que Carew y Kruger (21) demostraron que un aumento en la concentración de P en el medio produjo un incremento en la concentración de compuestos indólicos en el medio de cultivo de cultivos en suspensión de *C. roseus*. Dobberstein y Staba (22) determinaron que para cultivos en suspensión de *Ipomoea*, el incremento en la concentración de P produjo un aumento en la cantidad de alcaloides, en tanto que en cultivos de *Argyreia* y de *Rivea* no se produjo ningún cambio en la cantidad de alcaloides. Zenk et al. (6) obtuvieron un incremento del 50% en el contenido de antraquinonas en *M. citrifolia* cuando el fosfato se incrementó a 5 g/l. En soya el P disminuye el contenido de flavonoides (23).

## 1.6. Hierro

El crecimiento de callos de *L. erythrorhizon* aumentó cuando la concentración de Fe se incrementó de 0.1 a 0.2 mM y disminuyó con concentraciones de hierro mayores, mientras que la producción de derivados de shikonina disminuyó en ambos casos (5). Cuando se omitió el Fe del medio de crecimiento para cultivos de *M. citrifolia* no hubo ni crecimiento ni producción de antraquinonas (6).

## 1.7. Elementos trazas.

Zenk et al. (6) concluyeron que el KI podía ser omitido del medio de crecimiento de *M. citrifolia* y que los elementos trazas Mn, B, Zn, Cu y Co podrían ser omitidos por lo menos por una transferencia sin afectar el crecimiento, pero con una reducción del 30% en la producción de antraquinona, lo que sugiere que algunos de los elementos podría estar siendo utilizado como cofactor por alguna(s) de las enzimas de la biosíntesis de la antraquinona, o por algunas otras enzimas fundamentales. Por ejemplo, la nitrato reductasa requiere Mo, en tanto que la ureasa necesita Co, mientras que una deficiencia en Cu podría afectar al complejo de la citocromo oxidasa y por ende la respiración.

## 1.8. Vitaminas y otros compuestos orgánicos

La adición de ácido ascórbico  $10^{-4}M$  a

cultivos de *L. erythrorhizon* estimuló la producción de derivados de la shikonina (naftoquinona) (5).

El sulfato de estreptomicina en el rango de 1 a 50 mg/l inhibió el crecimiento e incrementó el rendimiento de los derivados de shikonina en callos de *L. erythrorhizon* (5).







## 1.9. Fitorreguladores

Carew y Kruéger (24) determinaron que al incrementar las concentraciones de 2,4-D se incrementaba ligeramente la producción de alcaloides indólicos en cultivos en suspensión de *C. roseus*. La disminución en los niveles de 2,4-D da como resultado la desaparición del crecimiento y disminuye la recuperación de alcaloides. Mulderkrieger et al. (25) establecieron que los alcaloides quinamina y cinconamina eran producidos por cultivos de *Cinchona pubescens* creciendo en presencia de  $1 \mu M$  de las auxinas AIA, AIB y 2,4-D y  $1 \mu M$  de zeatina.

La síntesis de alcaloides derivados del fenantreno: papaverina, morfina, codeína o isotebaina por células en suspensión de *Papaver bracteatum* es inhibida por 0.1 mg/l de 2,4-D (26). Por el contrario, Hodges y Rapaport (27) establecieron que los alcaloides tebaina, codeína y morfina sí eran producidos por callos de *P. somniferum* creciendo en presencia de 2,4-D, ANA, 6-N-(2-isopentenil) aminopurina es suministrada al medio.

También se han usado otros reguladores del crecimiento, tales como la 2-(3,4-diclorofenoxi)-triethylamina, la cual produce un incremento del 91% en el contenido de hule en cultivos de guayule (28).

El grupo de Zenk (29) ha realizado una exhaustiva investigación de la relación estructura actividad para la síntesis de antraquinona en *Morinda citrifolia* respecto a derivados del ácido fenoxiacético. Este grupo determinó que el sustituyente para es fundamental para mantener su capacidad de inducir la formación de antraquinonas.

						
		F	Cl	Br	I	CH <sub>3</sub>
Crecimiento (%)	0	90	100	100	85	100
Formación de antraquinonas (%)	0	5	10	15	100	130


El crecimiento y la síntesis de metabolitos secundarios son procesos mutuamente excluyentes, este hecho explica el porque condiciones nutricionales o físicas que restringen el crecimiento producen un aumento en el nivel de metabolitos. Esto sugiere que es necesario definir un compromiso entre velocidad de producción de biomasa y la acumulación de productos o bien separar ambas fases aunque represente un mayor número de pasos. La división del cultivo en 2 fases, una de mantenimiento y otra de producción empleando un medio de cultivo diferente parece una buena estrategia para incrementar la formación de metabolitos secundarios, como lo demuestra el incremento del 400% en la producción de shikonina por cultivos de *L. erythrorhizon* (30).

En resumen, se requiere de mucho más estudio de las vías de biosíntesis para poder entender los procesos de síntesis de los metabolitos secundarios y de esta manera poder intervenir en ellos con mucho mayor probabilidad de éxito que el obtenido hasta ahora.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Loyola-Vargas, V.M. Obtención de productos secundarios de interés farmacológico en cultivos de tejidos I. Consideraciones generales y proposición de un modelo. *Rev. Mex. de Ciencias Farmacéuticas* 14, 26-36, (1984).
2. Davies, M. E., Polyphenol synthesis in cell cultures of Paul's Scarlet Rose, *Planta*, 104, 50, (1972).
3. Westcott, R. J., G. G. Henshaw and W. M. Roca, Tissue culture storage of potato germplasm: culture storage of potato germplasm: culture initiation and plant regeneration, *Plant Sci. Lett.*, 9, 309, (1977).
4. Ikeda, T., T. Matsumoto and M. Noguchi, *Agric. Biol. Chem.* 40, 1765-1770, (1976).
5. Mizukami, H., M. Konoshima and M. Tabata, Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation on *Lithospermum* callus cultures, *Phytochemistry*, 16, 1183-1186, (1977).
6. Zenk, M. H., El-Shagi, H. and Schulte, V. Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*, *Planta Med.*, Suppl., 79, (1975).
7. Amorim, H. V., D. K. Dougall and W. R. Sharp, The effect of carbohydrate and nitrogen concentration on phenol synthesis in Paul's Scarlet Rose cell grown in tissue culture, *Physiol. Plant.*, 39, 91, (1977).
8. Nambior, G. R. and A. R. Mehta, Influence of sugars on ergot alkaloid production by cell suspension of *Evolvulus alsinoides* L., *Ind. J. Exp. Biol.*, 19, 535-537, (1981).
9. Knobloch, K. H., G. Bast and J. Berlin, Medium and light-induced formation of serpentine and anthocyanins in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Phytochem.* 21, 591-594, (1982).

10. Zenk, M. H., H. El-Shagi and U. Schulte, *Planta Med. Suppl.* 79, 79-101, (1975).
11. El-Shagi, H., U. Schulte and M. H. Zenk, Specific inhibition of anthraquinone formation by amino compounds in *Morinda* cell cultures, *Naturwissenschaften* 71, s. 267, (1984).
12. Ikeda, T., T. Matsumoto and M. Noguchi, Effects of inorganic nitrogen sources and physical factors on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture, *Agric. Biol. Chem.*, 41, 1197-1201, (1977).
13. Misawa, M., H. Tanaka, O. Chiyo and M. Moka, Production of a plasmin inhibitory substance by *S. japonica* suspension cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 305, (1975).



## LAMBDA S.C.

LABORATORIO DE CONTROL ANALITICO  
AUXILIAR DE LA INDUSTRIA QUIMICO  
FARMACEUTICA

LIC. SANITARIA 0002176-F S S A

Bldv. Cervantes Saavedra 20 - 102  
Col. Anahuac - México D.F.  
Tel. 545-0178

### CASA LUX, S.A.



**54 años**

Servicio a toda la República



**LUX-LAB**  
Muebles para Laboratorio

**LUX-HOSP**  
Muebles para Hospital

**LUX-REST**  
Muebles para Cocina Industrial

**LUX-FRIG**  
Refrigeración Especial

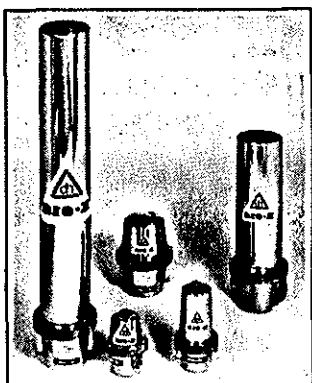
M. Cervantes Saavedra 83 al 93; Col. Granada, Deleg. Miguel Hidalgo  
11520 México, D.F. Apdo. 53-052

**Ventas: 531 32 93/94/95**

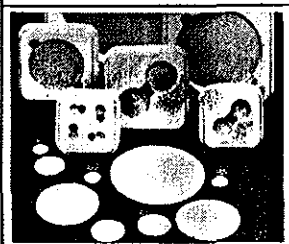
14. Nettleship, L. and M. Slaytor, *J. Exp. Bot.* 25, 114-123, (1974).
15. Zenk, M. H., H. El-Shagi, H. Arens, H. Stockigt, E.W. Weiler, B. Deus, *Plant Tissue Culture and its Bio-technol. Application* (W. Barz, W. Reinhard, M. H. Zenk, eds.) Springer-Verlag, Berlin, New York, pp. 27-43 (1977).
16. Deus, B. and G. Doller, *Production of Natural Compounds by Cell Culture Methods* (A. W. Alfermann, E. Reinhard eds.) Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH Munich pp. 109-123 (1978).
17. Loyola-Vargas, V. M., I. Gómez, M. E. López, J.



**dominick hunter  
filters**



**LIDERES EN  
FILTRACION  
FARMACEUTICA**



**Filtros de calidad farmacéutica para las siguientes aplicaciones:**

- Esterilización de Productos
- Esterilización del Aire
- Protección de Sistemas de Vacío
- Proporcionar Aire Respirable
- Venteo de Autoclaves
- Sistemas de Vapor
- Odontológico

**ASESIM**  
S.A. de C.V.

Pedro Luis Ogazón 85 P.B.-San Angel  
01000 México, D.F.  
Tels. 5-48-11-23 5-50-70-64  
Telex 1760294 MERME A.P. 20-598

- Reyes, M. Fierro and M. Robert, Nitrogen metabolism and alkaloids content in *C. roseus*, *Plant Physiol.*, 75, 1443 (1984).
18. Phillips, R. and G. G. Henshaw, The regulation of synthesis of phenolics in stationary phase cell cultures of *A. pseudoplatanus* L., *J. Exp. Bot.* 28, 785-794, (1977).
19. Dobberstein R. H. and E. J. Staba, *Lloydia* 32, 141-152, (1969).
20. Nettleship, L. and M. Slaytor, Adaptation of *P. harmala* callus to alkaloid production, *J. Exp. Bot.*, 25, 1114, (1974).
21. Carew, D. P. and Krueger, R. J. *C. roseus* tissue culture: the effects of medium modifications on growth and alkaloids production, *Lloydia* 40, 326, (1977).
22. Dobberstein, R. H. and E. J. Staba, *Ipomoea*, *Rivea* and *Argyria* tissue cultures: influence of various chemical factors on indole alkaloid production and growth, *Lloydia*, 32, 141, (1969).
23. Murali, N. S. and A. H. Teramura, Effects of ultraviolet-B irradiance on soybean, VI. Influence of phosphorus nutrition on growth and flavonoid content.
24. Carew, D. P. and R. J. Krueger, *J. Nat. Prod.* 4, 326-336, (1977).
25. Mulder-Krieger, T., R. Verpoorte, Y. P. de Graaf, M. Vander Kfeek and A. Baerheim-Svendsen, *Planta Médica* 46, 15-18, (1982).
26. Zito, S. W. and E. J. Staba, *Planta Médica* 45, 53-54, (1932).
27. Hodges, C. C. and H. Rapaport, *J. Nat. prod.* 45, 482-485, (1982).
28. Hayman, E., H. Yokoyama and S. Gold, Effect of bioregulators on the accumulation of fubber in guayule, *J. Agric. Food Chem.*, 31, 1120-1121, (1933).
29. Zenk, M. H., U. Schulte and H. El-Shagi, Regulation of anthraquinone formation by phenoxyacetic acids in *Morinda* cell cultures, *Naturwissenschaften* 71s, 266, (1984).
30. Fujita, Y., M. Tabata, A. Nishi and Y. Yamada, New medium and production of secondary compounds with the two-staged culture method, *Proc. Sth Int. Cong. Plant Tissue C. Cell Culture*, (A. Fujiwara, ed.) Japanese Ass. for Plant Tissue Culture, (1985), pp. 399-400 (1982).



**FARMAENVASES GRAFICOS, S.A.**

MONROVIA 710 MEXICO 13, D.F. TELS 539-67-54 y 532-76-65

*Cajas Plegadizas e Impresos en General  
Para la Industria Farmacéutica Mexicana  
desde hace 25 años*