

Capítulo 9

Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivadas in vitro

M. L. Robert*

J. Reyes**

V. M. Loyola***

Agradecimientos

Los autores agradecen a la señora Genny Gil por la mecanografía del manuscrito del presente capítulo. Reconocen además que las investigaciones efectuadas por ellos, y mencionadas aquí, han sido posibles gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México PCCBCNA-020845.

* Departamento de Genética y Fisiología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.

** Departamento de Química Orgánica, Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.

*** Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.

Introducción

Los cultivos de células y tejidos vegetales in vitro constituyen actualmente una alternativa para producir sustancias de uso farmacéutico, agrícola o industrial, cuya producción comercial por los métodos convencionales —síntesis química o extracción de las plantas que los sintetizan— resulta difícil o económicamente poco viable.

Estos cultivos in vitro constituyen asimismo una promesa para aumentar el rendimiento de los principios activos presentes en las plantas, así como para controlar más adecuadamente su producción.

Los conocimientos que se adquirieran acerca de los metabolitos secundarios y de su biosíntesis son necesarios, no sólo por el conocimiento en sí, sino para aprovechar mejor los componentes sintetizados por las plantas, especialmente las nativas. Conocer la regulación de una vía metabólica en particular dará mayores posibilidades de producir el compuesto deseado en mayor cantidad. En este caso, la bioquímica, el cultivo de células vegetales y la genética tendrán un papel muy importante.

La Fitoquímica y los Metabolitos Secundarios

La industria farmacéutica tuvo su origen en los pequeños laboratorios que se encontraban en la parte posterior de las boticas (las actuales farmacias) donde se preparaban las mezclas de ‘yerbas’ que serían usadas en algún té o infusión, o donde se extraían principios activos de las plantas cuando esto era posible. Surgieron así medicamentos tan importantes como el derivado de la *Cinchona ledgeriana*, conocido entre los indígenas de la Nueva España como la “yerba para las fiebres” y en Europa como los “polvos de la condesa”. El principio activo, ahora usado y conocido como quinina, se sigue extrayendo de la misma *C. ledgeriana* y de *C. officinalis*.

Otra planta muy importante estudiada en la ‘botica’ fue la portadora del principio alcalino del opio, el cual es capaz de disminuir o quitar el dolor más fuerte. Se trata de un analgésico que hasta nuestros días no tiene igual, pero cuyos efectos secundarios son tan agudos que han limitado fuertemente su uso. Sin embargo, se sigue estudiando la morfina para obtener compuestos que puedan usarse como analgésico, sin producir adicción (opiáceos sintéticos).

Hasta principios del siglo XX, todos o casi todos los medicamentos usados provenían de las plantas. Vino después la época en que la síntesis

orgánica sustituyó a las plantas como fuente de los principios activos y se produjeron los llamados medicamentos de patente; aún no se lograba la síntesis de la quinina, la morfina y muchos otros compuestos, pero la fitoquímica pasó a ser una disciplina secundaria pues ya las plantas no constituían la única fuente de fármacos. Sólo muchos años después del aislamiento de la morfina y de la identificación de su estructura, Gates y Tschudi (1952; 1956) lograron su síntesis total, pero sin que ésta tuviera posibilidades comerciales. En 1944, Woodward logró la síntesis de la quinina, pero el método quedó también como una curiosidad de laboratorio.

Entre tanto, la fitoquímica siguió produciendo compuestos útiles; se aislaron los glucósidos de *Digitalis purpurea*, de los cuales se obtuvo el mejor cardiotónico que se conoce. En 1926, Cloetta logró el aislamiento de la digitoxina, y Windaus y Freese lograron su purificación en 1925; siguieron después la digitoxigenina (Cloetta, 1926; Stoll y Kreis, 1934) y la digitonina (Tschesche y Hagedorn, 1936; Marker et al., 1942).

La síntesis de los compuestos anteriores es un reto para los químicos, pues la lactona de cinco miembros conjugados, unida al carbono 17 con giro libre, y el grupo hidroxilo en posición beta del carbono 14 no facilitan esta síntesis. Por esta razón, todavía se sigue usando un extracto de *Digitalis*, a pesar de que otros medicamentos con estructuras químicas diferentes a los glucósidos mencionados son también útiles para mantener el ritmo cardíaco.

En 1940, Marker y colaboradores aislaron la diosgenina de *Dioscorea compositae*; se trata de una sapogenina esteroidal, la cual se convirtió en la base de la industria para la producción de las hormonas que se usan en el control de la natalidad o bien para sintetizar compuestos de la importancia de la cortisona; ésta se emplea en el tratamiento de la artritis. Pese al enorme desarrollo de la industria, no se ha logrado la síntesis comercial de estos compuestos; primero se debe extraer una genina, por ejemplo diosgenina, o alguna similar como la hecogenina (hasta hoy sin posibilidad comercial) para efectuar una degradación. Así se obtiene, del núcleo básico de estos compuestos, la 16-dihidro-pregnenolona, la cual se puede modificar químicamente para obtener los productos deseados, como corticoides y hormonas.

Otros compuestos de gran interés farmacológico y comercial son los alcaloides de *Cathartus roseus*, planta conocida en México como jua-nita, chula, vicaria, maravilla, etc., según la región. Se trata de la fuente natural de un gran número de compuestos, entre los cuales sobresalen la vincleucoblastina y la vincristina por su actividad antitumoral (Noble et

al., 1958); una vez más, la síntesis química ha fallado en sustituir una planta que produce rendimientos muy bajos.

Extracción de principios activos de plantas: algunas limitaciones

En los ejemplos anteriores se observa que existen muchas dificultades para sintetizar principios activos, no sólo de uso farmacéutico, sino también de otro tipo como las piretrinas (insecticidas), y esto ha hecho que se vuelva la atención hacia las plantas como fuentes de productos naturales. Sin embargo, las plantas también presentan problemas para la obtención de los compuestos.

La quinina, que se extrae de la corteza de *Cinchona officinalis* y de *C. ledgeriana*, es un ejemplo al respecto; hay que esperar aproximadamente 21 años para que la planta llegue a la edad adecuada y se pueda explotar, y se hace necesaria una reforestación bien organizada para no perder la producción.

También hay ejemplos de sobreexplotación de recursos silvestres no domésticos, que trae como consecuencia una reducción en el rendimiento o la extinción de la especie. Tal es el caso de *Dioscorea compositae*, especie que no se ha cultivado sino que se ha explotado como planta silvestre; como resultado, el contenido de diosgenina de las plantas ha disminuido actualmente de 8% a 3% ó 3.5% y, además, el recurso es ahora escaso.

Catharantus roseus presenta problemas diferentes para el aislamiento de la vincristina y la vincoleucoblastina; estos compuestos se encuentran en cantidades pequeñas en la planta, lo que ha creado la necesidad de buscar variedades con mayores porcentajes de tales alcaloides; sin embargo, aun después de una búsqueda exhaustiva como la que realizaron Zenk et al. (1977), quienes analizaron 184 muestras provenientes de diferentes sitios geográficos, no se ha encontrado una planta con mayor rendimiento.

Otro caso es el de *Papaver somniferum*; pese a que el cultivo puede hallarse en muchos lugares del mundo, presenta dificultades especiales porque requiere un control muy estricto por parte de las autoridades, debido al tráfico ilegal de morfina. De esta planta se obtiene también la codeína, un derivado de la morfina, que es un antitusivo muy eficaz, además de analgésico.

El empleo del cultivo in vitro de células y tejidos vegetales ofrece actualmente una alternativa de solución a los problemas expuestos, con la

posibilidad de un mayor rendimiento en los principios activos de cada planta.

Conceptos básicos sobre los metabolitos secundarios

Se definen como metabolitos o productos secundarios aquellos compuestos que no tienen una función reconocida en el mantenimiento de los procesos fisiológicos fundamentales de los organismos que los sintetizan. Aunque estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos entre los microorganismos, los que se encuentran en las plantas superiores son los que han despertado mayor interés desde el punto de vista de su posible función biológica y su aplicación.

Puesto que las plantas no se desplazan de un lugar a otro, han desarrollado gran cantidad de estrategias para sobrevivir en su condición sedentaria, y en este sentido los metabolitos secundarios desempeñan las siguientes funciones importantes: protegerlas contra los depredadores, permitirles competir ventajosamente por el hábitat con otras plantas, atraer polinizadores y simbiosistas y, tal vez, brindarles protección contra los diferentes tipos de estreses a los que se ven sometidas a lo largo de su vida (Loyola-Vargas, 1985).

Por otro lado, Bell (1981) sugiere que algunos metabolitos secundarios serían el producto final de un proceso biosintético aberrante y otros serían productos de excreción; propone además que tales productos se han mantenido a lo largo de la evolución debido a que los genes que codifican su síntesis se encuentran ligados a un gen esencial para la sobrevivencia de la planta.

Sin embargo, existen evidencias de que los metabolitos secundarios se encuentran bajo una estricta regulación metabólica (Reyes et al., 1985; Loyola-Vargas et al., 1984) y que su síntesis está regulada también por factores como la luz (Endress et al., 1984; Hagimori et al., 1982), los reguladores del crecimiento (Hagimori et al., 1982; Elliot, 1983) y la temperatura (Lipskii et al., 1982). Esto sugiere que los metabolitos pueden tener una función importante para la sobrevivencia de las plantas, y que la falta de información sobre las vías de su síntesis es lo que ha provocado la especulación.

En la actualidad se dispone de un esquema general sobre la biosíntesis de los metabolitos secundarios (Figura 9.1), pero se desconocen en gran medida los pasos intermedios y las estrategias que siguen las células para regularla. Se sabe, por ejemplo, que un estrés nutricional puede modificar la calidad y la cantidad de los alcaloides en *C. roseus* (Loyola-Vargas et al., 1984; Reyes et al., 1985) pero no se sabe cómo lo hace.

Técnicas para la Producción de Metabolitos Secundarios

Para que el cultivo de células vegetales *in vitro* tenga aplicación en la producción industrial de metabolitos secundarios, se requiere que éstos se puedan obtener en grandes cantidades; no ocurre así en la mayoría de los cultivos celulares que producen esos compuestos en niveles inferiores a los obtenidos en las plantas de las cuales se derivan tales cultivos. No obstante, este panorama cambia rápidamente, como se verá en los ejemplos que se presentan más adelante; la producción de algunos metabolitos específicos ha aumentado notablemente mediante diferentes métodos que se empezaron a utilizar recientemente. Las tres alternativas principales son:

- Seleccionar variantes genéticas sobreproductoras.
- Optimizar el medio de cultivo para la producción de biomasa y para la biosíntesis.
- Producir biomasa en gran escala.

Modificación genética y selección de líneas sobreproductoras

A diferencia de lo que ocurre con la biología de los microorganismos en cuanto a sus aplicaciones biotecnológicas, las células vegetales no han recibido todavía un beneficio de los métodos de modificación genética disponibles actualmente.

El desconocimiento de los factores que regulan el metabolismo secundario, e inclusive de las reacciones y enzimas involucradas en él, ha dificultado el desarrollo de métodos de selección para obtener líneas sobreproductoras de metabolitos específicos —inducidas por tratamientos mutagénicos— o simplemente para obtener productos de la variación somaclonal presente en las células vegetales.

Se pueden aplicar eventualmente en este caso las técnicas para transferir genes, descritas en el Capítulo 33. Por ejemplo, existen enzimas que desvían los metabolitos primarios hacia las vías metabólicas secundarias y son, por lo tanto, factores importantes en la acumulación de los productos de tales vías; estas enzimas constituyen blancos específicos de los productores en la manipulación de la expresión de los genes. Recientemente, Berlin (1984) comunicó los resultados preliminares de experimentos sobre

modificación genética tendientes a aumentar el rendimiento de quinalizidina en cultivos de *Lupinus* sp.; este objetivo podría lograrse introduciendo genes para la expresión (constitutiva) de una lisina-decarboxilasa bacteriana.

Probablemente, una de las más grandes aplicaciones de la fusión somática es la obtención de líneas celulares sobreproductoras de metabolitos secundarios. La falta de rediferenciación no es un impedimento si tales líneas se van a cultivar en fermentadores, y lo único que se requiere son métodos de selección adecuados. Los resultados obtenidos con algunos híbridos somáticos de *Nicotiana tabacum* x *N. rustica*, que producen cuatro veces más alcaloides que *N. rustica* y 10 veces más que *N. tabacum* (Douglas et al., 1981), son muy sugestivos acerca del potencial que tiene la fusión somática en esta área de la biotecnología. Sería también factible pensar en líneas sobreproductoras normales pero con más rápido crecimiento u otras cualidades deseables.

A menudo, los cultivos in vitro que se seleccionan porque producen niveles de metabolitos suficientemente elevados y despiertan, por ello, el interés comercial, son inestables y no se pueden conservar sin una selección repetida; esto se debería a que las células sobreproductoras tendrían una velocidad de crecimiento menor que las demás, lo que conduce a su eliminación por dilución al hacer los subcultivos. La selección y clonación de las células sobreproductoras pueden dar como resultado líneas celulares sobreproductoras estables. Sin embargo, se tropieza con dos grandes dificultades: tener que seleccionar estas líneas entre una población de millones de células, y clonarlas cultivándolas a baja densidad; esto ha sido siempre difícil, si no imposible en algunas especies.

Chaprin et al. (1984) sugirieron una solución para el primer problema; midieron, por microespectrofotometría, la concentración intracelular de ácido rosmarínico en células de *Coleus blumei* cultivadas en suspensión, cuya absorbancia a 330 nm se debe exclusivamente a este ácido. No se ha demostrado, sin embargo, que cultivos derivados de células seleccionadas por este método sean sobreproductoras o estables.

Un método más eficiente de selección es el descrito por Brown et al. (1984), quienes separaron por fluorocitometría protoplastos de *Catharanthus roseus* con alto contenido de alcaloides, valiéndose de la fluorescencia azul causada por el contenido de serpentina. Este método permite separar, cada segundo, 1000 células con una viabilidad elevada; de 30% a 50% de estas células generan plantas (Galbraith et al., 1984), lo que representa la ventaja de no requerir el cultivo de células aisladas.

Otras técnicas, como la separación por punto isoelectrico, la cual se ha aplicado recientemente en la selección de productos de fusión de protoplastos, serían también de gran utilidad en la separación de células que acumulan algún compuesto (Griffin et al., 1985).

El preacondicionamiento al medio de cultivo es una alternativa que puede tener una aplicación generalizada en el plaqueo a baja densidad; consiste en cultivar las células a altas densidades sobre un papel filtro colocado encima del medio de cultivo sólido, removiendo posteriormente el papel y las células. Se ha logrado con este método una eficiencia de recuperación del 70%, plaqueando células de *C. roseus* a baja densidad.¹

Aunque la mayoría de los cultivos celulares producen metabolitos en cantidades más pequeñas que las producidas por la planta completa, los cultivos de tejidos organizados (órganos) producen a menudo cantidades mucho mayores de esos metabolitos. Estos cultivos no han recibido mucha atención por la dificultad que se presenta para mantenerlos; sin embargo, empleando líneas tumorales derivadas de cepas mutantes de *Agrobacterium tumefaciens* y de *A. rhizogenes*, las cuales forman tumores organogénicos fácilmente cultivables, se podrían obtener buenos rendimientos de ciertas sustancias.

Investigaciones realizadas por Florez et al. (1985) indican que las raíces que se forman en cultivos de *Nicotiana tabacum*, *Hyoscyamus muticus* y *H. niger*, transformados con *A. rhizogenes*, crecen a velocidades semejantes a las de los cultivos en suspensión, y producen niveles de alcaloides semejantes a los de la planta madre en el medio de White carente de hormonas. Los niveles de alcaloides se pueden incrementar optimizando el medio de cultivo.

Optimización de los medios de cultivo

Una de las principales dificultades del uso de células vegetales cultivadas in vitro para producir metabolitos a nivel industrial es la lentitud de crecimiento de aquéllas; esto aumenta significativamente el tiempo que se requiere para la producción de biomasa.

En los sistemas microbianos, el crecimiento y la síntesis de productos secundarios son procesos mutuamente excluyentes; algo similar parece suceder en los sistemas vegetales, en los que la acumulación de metabolitos ocurre durante la fase estacionaria.

1. Cresswell, P. Información publicada en Agricell Report, 1984.

Ejemplos de tal situación son la producción de antraquinonas por cultivos de *Gallium molugo* (Wilson et al., 1978) y la de alcaloides por *C. roseus* (Zenk et al., 1977). Más aún, se ha informado acerca de condiciones nutricionales o físicas que restringen el crecimiento y producen un aumento en el nivel de metabolitos (Knobloch et al., 1980; Curtois et al., 1980). Lindsey et al. (1983a y 1983b) han sugerido, inclusive, que en los cultivos de solanáceas es indispensable un cierto grado de rediferenciación para la producción de alcaloides de tropano.

Lo anterior sugiere la necesidad de definir la relación (o compromiso) entre la velocidad de producción de biomasa y la acumulación de productos, o la de separar ambas fases aunque esto represente mayor número de pasos en el proceso. La división del cultivo en dos fases, una de mantenimiento (crecimiento rápido) y otra de producción, empleando diferentes medios de cultivo (Zenk et al., 1977), parece ser una estrategia importante para lograr una mayor producción de metabolitos específicos; así demuestra el incremento del 400% en la producción de shikonina alcanzado por cultivos de *Lythosperum erythrorhizon* (Yamada et al., 1983).

Pese a lo anterior, Stafford et al. (1985) consideran que la separación entre el crecimiento y la acumulación se debe a la variedad de condiciones experimentales empleadas con células que se encuentran en un mismo estado fisiológico y que, por lo tanto, no corresponde a una característica propia de las células. Cuando ellos analizaron la producción de alcaloides en relación con el crecimiento del cultivo en células de *C. roseus* provenientes de diferentes fases de crecimiento, pero cultivadas en condiciones idénticas, encontraron que en todas las etapas de cultivo la acumulación de serpentina era proporcional a la acumulación de biomasa.

Las técnicas básicas para la inducción y el mantenimiento de callos y células en suspensión (descritas en otros capítulos de este libro) han sufrido modificaciones específicas dirigidas a resolver los problemas que ocasiona la producción de biomasa y el incremento de la productividad. Prácticamente todos los factores físicos y químicos que constituyen el medio de cultivo afectan, de una u otra forma, la velocidad del crecimiento o la acumulación de metabolitos— o ambas variables.

El análisis de todos esos efectos está fuera del objetivo del presente capítulo y, por lo tanto, sólo se darán algunos ejemplos para ilustrar la importancia de la influencia de tales factores.

Factores nutricionales y pH. Lógicamente, la cantidad de nutrimentos en el medio de cultivo tiene influencia directa sobre la velocidad del

crecimiento. En general, las concentraciones elevadas de macronutrientes como nitratos, potasio, amonio y fosfatos permiten un crecimiento acelerado, mientras que su eliminación lo limita, estimulando al mismo tiempo la acumulación de metabolitos.

El efecto anterior se ha observado en la producción de alcaloides por *C. roseus* (MacCarthy et al., 1980a) y de nicotina en cultivos de tabaco (Mantell et al., 1983), entre otros. Sin embargo, la calidad de los nutrientes presentes ejerce también influencia en la producción de metabolitos específicos; así, se observa que en cultivos de *C. roseus* diversos medios pueden sostener adecuadamente el crecimiento, pero sólo en MS ocurre la mayor acumulación de alcaloides (Zenk et al., 1977). Se observa también que la sustitución de nitrógeno inorgánico por nitrógeno orgánico, como peptonas o extracto de levaduras, incrementa grandemente la producción de alcaloides (Dougall, 1980).

Los bajos niveles intracelulares de fosfatos producen, en los microorganismos, una baja carga energética que resulta en la activación de las enzimas del metabolismo secundario (Drew et al., 1977). En las células vegetales, tales niveles son característicos de cultivos seniles; por tanto, no es sorprendente que el agotamiento de los fosfatos influya dramáticamente en la biosíntesis de metabolitos secundarios.

La fuente de carbono, principalmente sacarosa y glucosa, es también fundamental para mantener el crecimiento celular; sin embargo, en algunas ocasiones su adición incrementa la acumulación de metabolitos (Davies, 1972). Este efecto se debe probablemente a factores osmóticos.

La mayoría de los cultivos celulares se desarrollan a un pH inicial óptimo, entre 5 y 6, el cual cambia durante el curso del cultivo. Estos cambios pueden afectar gravemente la acumulación de metabolitos, como lo demuestra la conversión de triptofano a una variedad de metabolitos indólicos. A un pH constante de 6.3, la cantidad de triptofol producido dobla la del cultivo con pH variable, y si el pH decae a 4.8, la síntesis se inhibe totalmente (Veliky, 1977).

Factores físicos. Las mismas características de la radiación que afectan el desarrollo de las plantas in vivo afectan el de las células cultivadas in vitro: tanto la longitud de onda, como la intensidad y el fotoperíodo, pueden estimular o inhibir la biosíntesis de algún metabolito. Para revisar las investigaciones hechas sobre estos efectos, el lector consultará Seiber et al. (1980).

La aireación, ya sea por flujo controlado de gases o por agitación mecánica, es indispensable para el incremento de la biomasa y afecta

también la acumulación de metabolitos. Este aspecto será discutido más adelante cuando se trate sobre el empleo de los fermentadores.

Existen pocos datos sobre el efecto de la temperatura en la síntesis de metabolitos secundarios, pero este efecto no se debe descuidar, como lo muestra el caso de los callos de *Peganum* sp. La temperatura óptima para el crecimiento de estos callos es de 30 °C, pero la producción óptima de alcaloides ocurre a 25 °C con un rápido decaimiento a temperaturas superiores (Nettleship et al., 1974); por otra parte, el contenido de ácidos grasos de las células cultivadas in vitro aumenta notablemente a temperaturas subóptimas para el crecimiento (MacCarthy et al., 1980b). Estos datos son congruentes con el hecho de que la acumulación de metabolitos ocurre principalmente en fases de lento o nulo crecimiento.

Reguladores. Los reguladores del crecimiento inducen generalmente la formación de metabolitos secundarios in vitro e in vivo. La cantidad y calidad de las auxinas presentes al principio del desarrollo del cultivo y durante él tiene un marcado efecto sobre el metabolismo primario y secundario.

Es necesario verificar la calidad y las proporciones de los reguladores, no sólo por su efecto sobre el crecimiento, sino también sobre la biosíntesis. La KIN no ejerce ningún efecto sobre el crecimiento de los callos de *Datura tatula*; no obstante, a elevadas concentraciones, inhibe la biosíntesis de alcaloides (Tabata et al., 1971). Detalles sobre la amplia literatura acerca del tema se pueden consultar en Mantell et al. (1983).

Otro grupo de compuestos que regulan el metabolismo celular y que pueden tener un efecto importante sobre la producción de metabolitos secundarios es el de las poliaminas. Muhitch et al. (1985) informaron que, cuando se añade sacarosa y espermidina a cultivos celulares de la rosa Escarlata de Paul en fase estacionaria, se previene el envejecimiento y se incrementa la cantidad y la variedad de los fenoles acumulados en las células. Este tratamiento podría alargar la vida de los cultivos maduros en la fase de producción.

Otros factores. La adición de carbón activado induce la síntesis de ciertos compuestos, como la benzoquinona, en cultivos de *Lithospermum erythrorhizon* (Fukui et al., 1984).

La infección por microorganismos patógenos induce la producción de una gran variedad de metabolitos secundarios in vitro; de la misma forma, la adición de extractos microbianos induce la síntesis de alcaloides, flavonoides, cumarinas, etc., en las células cultivadas in vitro. Por ejemplo,

Heinstein (1985) añadió muestras de *Verticillium dahlia* o *Fusarium moniliforme*, esterilizadas en el autoclave, a cultivos de *Gosypium arbo-reum*, *Papaver somniferum* y *Cephalotaxus harringtonia*, y obtuvo rendimientos que eran, respectivamente, 19, 92 y 106 veces superiores a los testigos.

El cultivo en gran escala

Para la producción industrial de cualquier compuesto se requieren grandes volúmenes de mezclas de reacción, o de medios de cultivo, en fermentadores que permitan obtener toneladas del producto. El cultivo de células vegetales en gran escala presenta varias dificultades, las cuales se deben resolver antes de que esta técnica tenga mayor aplicabilidad comercial. Los principales problemas son: a) el lento crecimiento de la biomasa; b) una tendencia a la agregación celular; c) la acumulación intracelular de los productos; y d) poca resistencia a la agitación mecánica.

Ya se ha discutido aquí la rápida producción de biomasa y la acumulación de metabolitos mediante la optimización de los medios de cultivo; los otros problemas se están afrontando por medio de las siguientes técnicas:

- a) Inmovilización de células en matrices inertes.
- b) Permeabilización.
- c) Diseño de biorreactores especiales.

Inmovilización de las células. Se trata de una de las técnicas biotecnológicas más importantes para la bioconversión de sustancias por microorganismos. El desarrollo de esta técnica se inició en 1966, cuando Mosbach et al. (1966) atraparon células del líquen *Umbicaria pustulata* en un gel de poliacrilamida; desde entonces se ha empleado una gama de sustratos que comprende DEAE sephadex, dextrano, carboximetil-celulosa, lana metálica, ECTEOLA celulosa, colágeno y, más recientemente, geles de alginato, agarosa y carragenina (Lindsey et al., 1983a). La utilización de la técnica de inmovilización de células es posterior a 1966 y fue motivada por el interés de emplear estas células como reactores biológicos (Brodelius et al., 1979).

En Lindsey et al. (1983a) se encuentra un análisis más completo de las ventajas de la inmovilización de las células, aunque las razones que justifican esta práctica se pueden resumir así:

- a. Las células en suspensión se encuentran en un ambiente muy diferente al natural y sufren severos cambios en su metabolismo. Este hecho ha

sido demostrado por Zeleneva et al. (1980), quienes encontraron que los patrones de actividad de una variedad de enzimas eran similares en callos en desarrollo y en el tejido de la raíz del cual se originaron tales callos, pero eran muy diferentes en las células en suspensión derivadas de los mismos callos.

- b. Las células inmovilizadas tienden a crecer más lentamente y a diferenciarse, condiciones que conducen a una acumulación de metabolitos secundarios, como se mencionó anteriormente.
- c. La inmovilización de las células permite cambiar con facilidad la composición química del medio de cultivo y colectar los productos secretados sin tener que manipular físicamente las células; la manipulación, que es frecuente en los cultivos en suspensión, maltrata generalmente las células.

Se ha estudiado, empleando varios métodos, la viabilidad de las células inmovilizadas en esferas de alginato, agarosa o carragenina, y se ha encontrado que este proceso no afecta las condiciones metabólicas de las células. El análisis espectroscópico del metabolismo del 2iP y del pH celular por resonancia magnética nuclear no reveló ninguna diferencia entre células de *C. roseus* cultivadas en suspensión o inmovilizadas en agarosa o alginato.

El estudio de la viabilidad por medio de mediciones de la respiración, por incorporación de diacetato de fluoresceína, y por la actividad de la enzima 5-beta hidroxilasa (que es dependiente de la viabilidad celular) muestra que los protoplastos de *Daucus carota* y de *C. roseus* inmovilizados en carragenina, agarosa o alginato poseen, después de catorce días, una viabilidad superior a la de los que se cultivan libres bajo las mismas condiciones (Linsefors et al., 1985).

Otro método es el presentado por Lindsey et al. (1984), quienes inmovilizaron células de *Capsicum frutescens* permitiendo que invadieran pasivamente los poros de la espuma reticulada de poliuretano. Las células inmovilizadas de esta manera no muestran reducción en su actividad respiratoria ni en la actividad de las esterasas, y producen niveles de capsaicina mil veces superiores a los producidos por las células en suspensión. El método es menos tóxico y más barato que la inmovilización en esferas de alginato, y los autores lo consideran básico para el desarrollo de la inmovilización celular a escala industrial.

Permeabilización. Al contrario de las células animales, la mayoría de las células vegetales no secretan sustancias al medio de cultivo sino que

tienden a almacenarlas en vacuolas; esto es un gran inconveniente cuando lo que se desea es una producción continua y barata de tales sustancias, pues implica la necesidad de aplicar procesos de extracción y purificación, y de regenerar continuamente la biomasa. Lo ideal sería que las células secretaran sus productos al medio de cultivo, de donde éstos se recuperarían sin necesidad de destruir la biomasa.

La permeabilización celular se puede inducir por medio de tratamientos químicos, los cuales se deben definir antes de que el método pueda ser aplicado extensivamente.

Se ha empleado sulfóxido de dimetilo (DMSO) al 10% durante 30 min para inducir, en células inmovilizadas de *C. roseus*, la liberación de ajmalicina; después del tratamiento se puede usar la misma biomasa para producir más ajmalicina y repetir el proceso varias veces. Sin embargo, este método no es aplicable a todos los tipos de células y de procesos; en *Cinchona ledgeriana* la liberación de alcaloides intracelulares requiere concentraciones de DMSO superiores al 20%, los cuales causan daños a las células (Parr et al., 1984).

No todos los metabolitos son almacenados intracelularmente, y existen algunos informes de liberación espontánea. Cultivos en suspensión de *Thalictum minus* secretan mayor cantidad de berberina (10% del peso seco) que la producida por las raíces de la planta madre (0.01% del peso seco); las concentraciones son tan altas que el alcaloide se cristaliza como nitrato o cloruro, dependiendo de la composición del medio (Nakagawa et al., 1984).

Biorreactores. Por su diferente tamaño y características estructurales, las células vegetales no se pueden cultivar a gran escala en el mismo tipo de reactores biológicos que se emplean para el cultivo de microorganismos. Esto ha obligado al diseño de contenedores y sistemas de agitación y aireación especiales.

Se ha empleado un gran número de fermentadores con diferentes características, y con capacidades que fluctúan entre 2 y 20,000 litros (Martin, 1980; Fowler, 1983); estos fermentadores presentan ventajas y desventajas que dependen del tipo de cultivo. Aquí se citan algunas de las características que se deben considerar.

Las células vegetales son de 10 a 100 veces más grandes que las células microbianas (20 a 150 μ de diámetro) por lo que tienden a sedimentarse con rapidez. Esto produce zonas de maduración y de necrosis que afectan la población celular que se mantiene en suspensión, dando como resultado cultivos multifásicos.

Un problema adicional es el aumento en la viscosidad de los cultivos, los cuales, por esa razón, deben estar bien agitados. Sin embargo, la agitación no se puede hacer por sistemas que produzcan gran turbulencia, debido a la presencia de vacuolas (más marcada en las últimas fases de crecimiento) y a la baja resistencia que las paredes celulares de las células vegetales ofrecen a la agitación; la ruptura del tonoplasma en particular ocasiona la liberación de sustancias tóxicas que afectan tanto el crecimiento como la producción de las células. Por todo esto, la agitación debe ser lo más suave posible y con poca turbulencia.

El lento crecimiento, con tiempos de generación que fluctúen entre 25 y 100 horas, conduce a períodos de incubación de días o semanas durante los cuales los fermentadores deben ser inaccesibles a microorganismos del exterior, ya que con el crecimiento de éstos no podrían competir las células vegetales.

En este caso, tal vez la mejor solución disponible está en los fermentadores agitados por corriente de aire. Usados por primera vez por Wagber et al. (1977), fueron mejorados por Fowler (1983), quien empleó un sistema cerrado de circulación del medio de cultivo, impulsado por aire. Este sistema tiene la ventaja de dañar poco las células y de no poseer uniones de piezas que faciliten la contaminación.

Se está investigando acerca de otros sistemas promisorios de agitación. El rendimiento más elevado, hasta la fecha, de un cultivo de células vegetales es el de Ulbrech et al. (1985), quienes obtuvieron 5 g (21% de peso seco) de ácido rosmarínico por litro de cultivo de *Coleus blumei* en un reactor agitado por un agitador en espiral.

Estrategia general. Como se aprecia, ha habido considerables avances en la producción de metabolitos secundarios a partir de cultivos de tejidos vegetales; en general, esto se ha logrado mediante la manipulación del medio de crecimiento y la aplicación de métodos de producción en gran escala. Esta es una estrategia que consume mucho tiempo, sobre todo porque las condiciones óptimas son características de cada especie y se deben determinar en cada caso; sin embargo, tal estrategia ha permitido obtener cultivos que producen algún compuesto específico en cantidades mayores que las producidas por la planta original (Constabel et al., 1982; Staba, 1982).

Deus et al. (1982) y Heinstein (1985) han propuesto una estrategia que ofrece las mejores posibilidades de obtener líneas celulares con alto rendimiento; es la siguiente:

1. Selección de plantas con alto rendimiento para el metabolito deseado.
2. Establecimiento de una(s) línea(s) celular(es) a partir de la planta seleccionada.
3. Desarrollo de un medio óptimo de crecimiento (no considera la producción de metabolitos secundarios).
4. Desarrollo de condiciones para inducir la síntesis de los productos secundarios.
5. Selección clonal de las líneas celulares de alto rendimiento.
6. Desarrollo de un medio óptimo para la producción de los metabolitos secundarios.

Esta estrategia ha permitido a Deus et al. (1982) obtener líneas celulares de *Catharanthus roseus* cuyo rendimiento de ajmalicina es del orden de 369 mg/litro, así como una elevada frecuencia de colonias (23%) con más de 1% (peso fresco) de serpiente.

Micropropagación

Aunque en este trabajo se ha discutido únicamente el empleo de células cultivadas in vitro, no se debe olvidar otra forma en que el cultivo de tejidos vegetales puede contribuir a la obtención de metabolitos importantes: la selección y la micropropagación en gran escala de plantas sobrepadoras, que son la fuente natural de ciertos compuestos. Esta alternativa es particularmente importante para los países del tercer mundo que, como se discute más adelante, se verán seriamente afectados por el desarrollo biotecnológico a nivel mundial.

Cultivo in Vitro para Producir Metabolitos Secundarios

Algunos de los compuestos químicos de importancia económica cuya producción por células cultivadas in vitro se está investigando se presentan en el Cuadro 9.1. Los beneficios esperados de la industrialización de estos cultivos se pueden resumir así:

- Producción, en escala industrial, de algunas sustancias naturales.

- Producción de sustancias difíciles de obtener por extracción o por síntesis química.
- Reducción de los costos de producción de estas sustancias, a largo plazo.
- Eliminación de la dependencia en materia de importación.
- Producción continua y controlada de sustancias, independientemente de los factores del medio ambiente.
- Precios estables.
- Posibilidad de realizar la producción cerca de las fábricas de procesamiento final y de los mercados.

Cuadro 9.1. Productos naturales obtenidos de plantas y sus usos industriales.

Producto	Especie vegetal	Uso industrial
Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico
Diosgenina	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Anticonceptivo
Quinina	<i>Chinchona ledgeriana</i>	Antimalárico Amargorizante
Digoxina	<i>Digitalis lanata</i>	Cardiotónico
Escopolamina	<i>Datura stramonium</i>	Antihipertensivo
Vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>	Antileucémico
Piretreina	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i> ; <i>Pyrethrum</i> sp.	Insecticida
Taumatina	<i>Thaumatococcus danielli</i>	Edulcorante
Jasmina	<i>Jasminum</i> sp.	Perfume
Shikonina	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Colorante
Teobromina	<i>Theobroma cacao</i>	Saborizante
Reserpina	<i>Ranwolfia serpentina</i>	Antihipertensivo
Vainillina	<i>Vainilla planifolia</i>	Saborizante
Menta	<i>Mentha piperita</i> , <i>M. viridis</i>	Saborizante
Capsaicina	<i>Capsicum frutescens</i>	Saborizante
Esteriosida	<i>Stevia rebaudiana</i>	Edulcorante

La biosíntesis de la shikonina y la biotransformación de precursores, que se describen enseguida, son ejemplos que indican la posibilidad de lograr, en un futuro no muy lejano, grandes producciones de un gran número de sustancias de importancia industrial, médica y agronómica mediante esta técnica, y bajo condiciones económicamente factibles.

Biosíntesis de shikonina

La shikonina es un pigmento que se extrae de las raíces de *Lithospermum erythrorhizon*, una planta perenne nativa de Japón, China y el sureste asiático, donde crece en forma silvestre. Esta planta está sufriendo una rápida disminución en su población, y además su rendimiento en shikonina depende de la distribución geográfica y del clima, lo que hace muy variable la disponibilidad de este pigmento. Aunque éste se puede sintetizar químicamente, el proceso es económicamente impracticable, ya que requiere doce pasos y tiene un rendimiento final de sólo 0.7%.

La biosíntesis de shikonina por medio de cultivos celulares de *L. erythrorhizon* es el mejor ejemplo que se puede dar sobre la aplicabilidad de la tecnología para la producción de metabolitos secundarios. Por un lado, las dificultades para la obtención y la síntesis química del pigmento caracterizan el tipo de problemas que el cultivo in vitro puede resolver, y por otro, la metodología empleada ejemplifica el uso de las técnicas descritas aquí. La shikonina ya entró en la etapa de producción en gran escala: la produce la compañía petroquímica Mitsui del Japón y constituye el primer producto industrial de esta tecnología.

La estrategia para la producción de shikonina por células cultivadas in vitro (Yamada et al., 1983) consistió primero en el desarrollo de un sistema de cultivo en dos fases, una de rápido crecimiento celular y otra de producción del pigmento; las dos fases dieron como resultado un incremento cuatro veces mayor que el obtenido en el sistema de una sola fase. Luego se hizo la optimización de las condiciones del medio de cultivo de cada fase, lo que aumentó 13 veces la productividad. Posteriormente, se hizo la selección de las líneas celulares derivadas de protoplastos, cuyas elevadas velocidades de crecimiento y producción de shikonina incrementaron aún más la productividad.

La optimización de la oxigenación de los cultivos (a nivel de planta piloto) para alcanzar una densidad celular elevada constituyó el último paso en un proceso de optimización que produce cantidades de shikonina 800 veces superiores a las obtenidas de la planta natural. Según investigadores de Mitsui, la cantidad de pigmento producido en un fermentador de 750 litros en 14 días equivale a la que podría extraerse de las plantas en una superficie de aproximadamente 18 ha.

La shikonina producida in vitro se está vendiendo actualmente a US\$4000 por kilogramo.

Biotransformación de precursores

La biotransformación de precursores mediante cultivo de tejidos vegetales permite la síntesis de compuestos de interés económico, como también elucidar las vías de la biosíntesis; en este último sentido se ha trabajado más arduamente. El potencial de esta técnica para producir moléculas marcadas específicamente en alguna posición clave, o productos estereoquímicamente puros, permite suponer que habrá un incremento muy marcado en el estudio de los productos secundarios.

La biotransformación se lleva a cabo empleando varias de las metodologías descritas; por ejemplo, Furuya et al. (1984), usando alginato de calcio, inmovilizaron células de *P. somniferum* capaces de transformar codeinona (-) en codeína (-), con una eficiencia del 70.4% en suspensiones agitadas; en un biorreactor la eficiencia fue del 42%.

Se han utilizado cultivos en suspensión de *Cannabis sativa* L. para transformar el cannabidiol en cannabielsoína y en un compuesto aún no identificado; ésto constituye otra posible aplicación de la biotransformación, o sea, la producción de metabolitos hasta ahora desconocidos (Loh et al., 1983).

La 1-O-(1-¹⁴C)hexadecil-2-acetil-glicero-3-fosfolina es un factor de activación de las plaquetas, que se emplea en la investigación biomédica y que es extremadamente difícil de sintetizar químicamente. Aunque las plantas no producen esta clase de compuestos, las células cultivadas in vitro se pueden usar como biorreactores para transformar sus precursores; Weber et al. (1985) emplearon cultivos celulares de *Brassica napus* para convertir los 1-O-alkil-sn-glicerole en sus correspondientes 1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfolinas, con una eficiencia del 70 al 78%; la hidrólisis alcalina y la acetilación posteriores producen el derivado final. Adicionalmente, tales cultivos producen los compuestos esteroquímicamente uniformes a partir de muestras racémicas, reducen en cuatro pasos la síntesis total y permiten marcar con ¹⁴C las cadenas alquilo que antes solamente habían podido ser marcadas con ³H.

Un último ejemplo de biotransformación es el trabajo de Alferman et al. (1984), quienes han desarrollado una metodología para la biotransformación de β -metil digitoxina en β -metil digoxina por medio de células de *Digitalis lanata* inmovilizadas en alginato. En un reactor de 200 lt, estas células llevan a cabo la conversión, por más de 170 días, a una velocidad constante; en un lapso de 13 días se pueden extraer 430 mg de β -metil digoxina por litro de cultivo, lo cual representa el 70% del sustrato añadido y la base para producir 800,000 tabletas cardiovasculares.

Producción de Metabolitos Secundarios en los Países en Desarrollo

Como se ha visto, son muy grandes los beneficios potenciales de la síntesis de productos químicos por células cultivadas en reactores biológicos. No se debe subestimar el atractivo que sobre los métodos convencionales de producción agrícola y farmacéutica tiene la nueva tecnología para las empresas de los países industrializados, particularmente en lo que se refiere a la obtención de la materia prima de los países en desarrollo. La mayoría de las sustancias cuya producción *in vitro* se está considerando actualmente provienen de plantas nativas de los países en vías de desarrollo.

La industrialización del cultivo de tejidos vegetales podría representar dos tipos de situaciones para el tercer mundo: a) el desplazamiento de algunas de sus exportaciones de productos naturales, lo que parece ser una consecuencia inevitable de la revolución biotecnológica en general; y b) un aumento de su dependencia de los países industrializados (Kenney et al., 1983).

Al considerar el impacto socioeconómico de la biotecnología no se puede hablar de hechos, ya que la situación actual no tiene precedente comparable. Sin embargo, dada la importancia y el alcance de este campo, parece conveniente intentar hacer algunas predicciones basadas en la experiencia adquirida y en el análisis de las tendencias actuales.

Las instituciones nacionales deberían disponer de toda la información posible al respecto, para anticipar a tiempo y de manera adecuada la dirección de los cambios rápidos provocados por la biotecnología. La acción rápida es necesaria para evitar el crecimiento de la brecha tecnológica con los países industrializados, por dos causas principales: a) las grandes inversiones de capital que demanda la investigación básica para desarrollar un producto biotecnológico hasta llevarlo al mercado; b) la alta especialización de los conocimientos científicos y tecnológicos que se requieren para desarrollar esos procesos, y que implicaría dificultades para adquirir recursos humanos adecuadamente capacitados.

La privatización de la biotecnología tendría los siguientes efectos:

1. Se restringirá el acceso a la información en este campo.
2. Habría competencia para los mercados de los nuevos productos, y los países sin suficientes recursos se sentirían afectados.

3. Posiblemente estos países tendrían que adquirir sustancias que anteriormente provenían de cultivos nativos.

En resumen, todo lo anterior parece indicar que los países menos desarrollados no sólo perderían algunos de sus mercados tradicionales, sino que también tendrían dificultades para establecer su propia industria biotecnológica. Sin embargo, es necesario insistir en que en este momento el futuro no está determinado.

Es necesario planear a corto y largo plazo la tecnología del cultivo de tejidos vegetales y de la biotecnología en general. Es esencial que cada país en vías de desarrollo tenga una idea clara acerca de los últimos adelantos de la biotecnología a nivel mundial, y con este propósito debería disponer de una lista de todas las especies sobre las cuales se está investigando, y conocer los objetivos de estas investigaciones.

Por otra parte, las instituciones nacionales no deben ignorar la vulnerabilidad de los sectores campesinos y de los pequeños productores ante los posibles efectos negativos de la biotecnología. Es importante que se creen a tiempo alternativas para evitar dichos efectos negativos.

La estrategia más importante para los países en vías de desarrollo sería desarrollar su propia infraestructura, y los conocimientos necesarios, para la utilización del cultivo de tejidos vegetales. Esto les permitirá hacer una investigación básica acorde con sus necesidades. Para un análisis más profundo sobre este tema ver Eastmond (1985).

Consideraciones Finales

Los autores del presente capítulo no consideran apropiados los análisis y las evaluaciones tecnológicas que se han hecho sobre el estudio del metabolismo secundario de las células vegetales. Es ésta una disciplina biológica que, aunque se encuentra aún en una fase temprana de su desarrollo, posee un enorme potencial para generar conocimientos que pueden aplicarse al desarrollo de tecnologías económicamente factibles (Goldstein et al., 1980; Fowler, 1983).

Tomando como ejemplo la biología molecular, se observa que ella se desarrolló felizmente desde los años cuarentas hasta 1972 sin que nadie sospechara cómo iba a ayudar a la comprensión de problemas médicos como el cáncer, ni mucho menos cuál sería su potencial económico en la ingeniería genética. A pesar de lo anterior, nadie puso en duda la conveniencia de llevar a cabo investigaciones en ese campo, ni nadie tomó en

cuenta los costos de la misma. Se trataba de una investigación por el conocimiento mismo, mientras que la investigación biotecnológica actual es, en muchos casos, una investigación por el desarrollo comercial tecnológico.

Referencias

- Alfermann, A. W.; Bergmann, W.; Figur, C.; Helimbold, U.; Schwantag, D.; Schuller, I. y Reinhard, E. 1984. Biotransformation of β -methyl digitoxin to β -methyl digoxin by cell cultures of *Digitalis lanata*. En: Mantell, S. H. y Smith, H. (eds.). Plant biotechnology. Crambridge University Press, Londres. p. 67-74.
- Bell, E. A. 1981. The physiological role(s) of secondary (natural) products. En: Conn, E. E. (ed.). The biochemistry of plants; 7: Secondary plant products. Academic Press, Nueva York. p. 1-19.
- Berling, J. 1984. Plant cultures, a future source of natural products. Endeavor 8:5-8.
- Brodelius, P.; Deus, B.; Mosbach, K. y Zenk, M. H. 1979. Immobilized plant cells for the production and transformation of natural products. FEBS Letters 103:93-97.
- Brown, S.; Renaudin, J. P.; Prevot, C. y Guern, J. 1984. Flow cytometry and sorting of plant protoplasts: Technical problems and physiological results from a study of pH and alkaloids in *Catharantus roseus*. Physiol. Veg. 22:541-554.
- Chaprin, N. y Ellis, B. E. 1984. Microspectrophotometric evaluation of rosmatinic acid accumulation in single cultured plant cells. Can J. Bot. 62:2278-2282.
- Cloetta, M. 1980. Chemistry and pharmacology of digitoxin and its cleave products. Arch. Exptl. Path. Pharm. 88:113-157.
- . 1926. Preparation and chemical composition of the active substances of *Digitalis* leaves, their pharmacological and therapeutic properties. Arch. Exptl. Path. Pharm. 112:261-342.
- Constabel, F.; Kurz, W. G. W. y Kutney, J. P. 1982. Variation in cell cultures of perwinkle, *Catharantus roseus*. En: Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue and cell culture: Proceedings of the 5th International Congress, Tokio. p. 301-304.
- Courtois, D. y Guern, J. 1980. Temperature response of *Catharantus roseus* cells cultivated in liquid medium. Plant Science Lett. 17:473-482.
- Davies, M. E. 1972. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet rose. Planta 104:50-65.

- Deus, B. y Zenk, M. H. 1982. Exploitation of plant cells for the production of natural compounds. *Biotech. Bioengin.* 24:1965-1974.
- Dougall, D. K. 1980. Nutrition and metabolism. En: Staba, E. J. (ed.). *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 21-58.
- Douglas, G. C.; Wetter, L. R.; Nakamura, C.; Keller, W. A. y Setterfield, G. 1981. Somatic hybridization between *Nicotiana rustica* and *N. tabacum*; 3: Biochemical morphological and cytological analysis of somatic hybrids. *Can. J. Bot.* 59:228-237.
- Drew, J. W. y Demain, A. L. 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* 31:346-356.
- Eastmond, A. 1985. Probables efectos socioeconómicos de la industrialización del cultivo de tejidos vegetales sobre los países en vías de desarrollo. En: Robert, M. L. (ed.). *El cultivo de tejidos vegetales en México*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.
- Elliot, D. C. 1983. Accumulation of cytokinin induced betacyanin in specific cells of *Amaranthus tricolor* seedlings. *J. Exp. Bot.* 34:67-73.
- Endress, R.; Jager, A. y Kreis, R. W. 1984. Catecholamine biosynthesis dependent on the dark in betacyanin *Portulaca* callus. *J. Plant Physiol.* 115:291-295.
- Flores, H. y Filner, P. 1985. Hairy roots of Solanaceae as a source of alkaloids. *Plant Physiol.* 77:125.
- Fowler, M. W. 1983. Commercial applications and economic aspects of mass plant cells culture. En: Mantell, S. H. y Smith, H. (eds.). *Plant biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.
- Fujita, Y.; Tabata, M.; Nishi, A. y Yamada, Y. 1982. New medium and production of secondary compounds with two-staged culture method. En: Fujiwara, A. (ed.). *Plant tissue and cell culture*. Proceedings of the 5th International Congress, Tokio. p. 399-400.
- Fukui, H.; Yoshikawa, N. y Tabata, M. 1984. Induction of benzoquinone formation by active carbon in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Phytochemistry* 23:301-305.
- Furuya, Y.; Yoshikawa, T. y Taira, M. 1984. Biotransformation of codeinone to codeine by immobilized cells of *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 23:999-1001.
- Galbraith, D. W. et al. 1984. Flow sorting and culture of protoplasts: Conditions for high frequency recovery, growth and morphogenesis from sorted protoplast of suspension cultures of *Nicotiana*. *Plant Cell Reports* 3:151.

- Gates, M. y Tschudi, G. 1952. The synthesis of morphine. *J. Am. Chem. Soc.* 74:1109-1110.
- . 1956. The synthesis of morphine. *J. Am. Chem. Soc.* 78:1381-1393.
- Goldstein, W. E.; Lasaure, L. C. y Ingle, M. B. 1980. Product cost analysis. En: Staba, E. J. (ed.). *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.
- Gorman, M.; Neuss, N. y Svoboda, G. H. 1959. *Vinca* alkaloids: Structural features of leurosine and vincalcalbustine, representatives of a new type of indole indoline alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* 81:4745-4746.
- Griffin, L. R.; Cutler, A. J.; Shargool, P. D. y Fowke, L. C. 1985. Isoelectric focusing of plant cell protoplasts. *Plant Physiol.* 77:765-769.
- Hagimori, M.; Takashi, M. y Obi, R. Y. 1982. Studies on the production of *Digitalis* cardenolides by plant tissue culture; 2: Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Plant Physiol.* 69:653-656.
- Heinstein, P. F. 1985. Future approaches to the formation of secondary natural products in plant cells suspension cultures. *J. Nat. Prod.* 48:1-9.
- Kenney, M. J.; Kloppenburg Jr., R.; Buttel, E. H. y Cowan, J. T. 1983. Genetic engineering and agriculture: Socioeconomic aspects of biotechnology in development and developing countries. En: *Biotech 83: Proceedings of the International Conference on the Commercial Applications and Implications of Biotechnology*. On-line Conferences, Middlesex, Inglaterra.
- ; Buttel, F. H. y Kloppenburg Jr., J. 1984. Advance technology alert system; 1: Tissue culture technology for development. Centre for Science and Technology for Development, United Nations, Nueva York.
- Knobloch, J. H. y Berlin, J. 1980. Influence of medium composition on the formation of secondary compounds in cell suspension cultures of *Cathartus roseus* (L.) G Don. *Z. Naturforsch.* 35:551-556.
- Lindsey, K. y Yeoman, M. M. 1983a. Novel experimental systems for studying the production of secondary metabolites by plant tissue cultures. En: Mantell, S. H. y Smith, H. (eds.). *Plant biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra. p. 39-66.
- y ———. 1983b. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *J. Exp. Bot.* 34:1055-1065.
- y ———. 1984. The viability and biosynthetic activity of cells of *Capsicum frutescens* Mill cv. *annuum* immobilized in reticulate polyurethane. *J. Exp. Bot.* 35:1684-1696.

- Linsefors, L. y Brodelius, P. 1985. Immobilization of plant protoplasts: Viability studies. *Plant Cell Reports* 4:23-27.
- Lipskii, A. Kh. y Chernyak, N. D. 1983. Effect of temperature on a cell culture of *Dioscorea deltoidea* wall during submerged cultivation. *Sov. Plant. Physiol.* 30:329-337.
- Loh, W. H. T.; Hartsel, S. C. y Robertson, L. W. 1983. Tissue culture of *Cannabis sativa* L. and in vitro biotransformation of phenolics. *Z. Pflanzenphysiol.* 111:395-400.
- Loyola-Vargas, V. M. 1984. Obtención de productos secundarios de interés farmacológico en cultivo de tejidos; I: Consideraciones generales y proposición de un modelo. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 14:26-36.
- . 1985. Efecto del stress en la síntesis de productos secundarios. En: Loyola-Vargas, V. M. (ed.). Cuadernos de posgrado. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).
- ; Gómez, I.; López, M. E.; Reyes, J.; Fierro, M y Robert, M. L. 1984. Nitrogen metabolism and alkaloid content in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 75:144s.
- MacCarthy, J. J.; Ratcliffe, D. y Street, H. E. 1980a. The effect of nutrient medium composition on the growth cycle of *Catharanthus roseus* G. Don cells grown in bath culture. *J. Exp. Bot.* 31:1315-1325.
- y Stumpf, P. K. 1980b. Effect of different temperatures on fatty acid synthesis and polyunsaturation in cell suspension cultures. *Planta* 147:389-395.
- Mantell, S. H. y Smith, H. 1983. Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue culture. En: Mantell, S. H. y Smith, H. (eds.). *Plant biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra.
- Marker, R. E. y Krueger, J. 1940. Sapogenins; 41: The preparation of trillin and its conversion to progesterone. *J. Am. Chem. Soc.* 62:3349-3350.
- ; Tsukamoto, T. y Turner, D. L. 1940. Diogenin. *J. Am. Chem. Soc.* 62:2525-2532.
- ; Turner, D. L. y Ulshafer, P. R. 1942. Sapogenins; 63: The position of the hydroxyl groups in digitogenin. *J. Am. Chem. Soc.* 64:1843-1847.
- Martin, S. M. 1980. Mass culture systems for plant cell suspensions. En: Staba, J. E. (ed.). *Plant tissue culture as a source of biochemicals*. CRC Press, Boca Raton, Florida, E. U.
- Mosbach, K. y Mosbach, R. 1966. Entrapment of enzyme and microorganisms in synthetic crosslinked polymers and their application in column techniques. *Acta Chemica Scandinavica* 20:2807-2810.

- Muhitch, M. J. y Fletcher, J. S. 1985. Influence of culture age and spermidine treatment on the accumulation of phenolic compounds in suspension cultures. *In vitro* 21(3):53A.
- Nakagawa, K.; Konagai, A.; Fukui, H. y Tabata, M. 1984. Release and crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* cells suspension cultures. *Plant Cell Reports* 3:254-257.
- Nettleship, L. y Slaytor, M. 1984. Adaptation of *Paganum harmala* callus to alkaloids production. *J. Exp. Bot.* 25:1114-1123.
- Noble, R. L.; Beer, C. T. y Cutts, J. H. 1958. Role of chance observations in chemotherapy: *Vinca rosea*. *Ann. New York Acad. Sci.* 76:882-894.
- Parr, A. J.; Robins, R. J. y Rhodes, M. J. C. 1984. Permeabilization of *Cinchona ledgeriana* cells by dimethylsulphoxide: Effects of alkaloid release and long term membrane integrity. *Plant Cell. Rep.* 3(6):262-265.
- Reyes, J.; Oropeza, C.; Robert, M. L.; Ríos, P.; Alpizar, L.; Robles, M. L. y Loyola-Vargas, V. M. 1985. Alkaloids in *Catharantus roseus* cultures. *Plant Cell Reports* 3:262-265.
- Seibert, M. y Kadkade, P. G. 1980. Environmental factors; A: Light. En: Staba, E. J. (ed). *Plant tissue culture as a resource of biochemicals*. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. p. 123-141.
- Staba, E. J. 1982. Production of useful compounds from plant tissue cultures. En: Fujiwara, A. (ed.). *Plant cell culture: Proceedings of the 5th International Congress, Tokio*, p. 25-30.
- Stafford, A.; Smith, L. y Fowler, M. W. 1985. Regulation of product synthesis in cell cultures of *Catharantus roseus* (L.) G Don. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 4:83-94.
- Stoll, A. y Kreis, W. 1934. Acetyldigitoxin, acetylgitoxin and acetyldigoxin. *Helv. Chim. Acta* 17:592-613.
- Tabata, M.; Yamamoto, H. y Hiraoka, N. 1971. Alkaloid production in the tissue cultures of some solanaceous plants. En: *Les cultures de tissu de plantes*. Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), París.
- Tschesche, R. 1985. Neutral saponins; conversion of digitogenin, gitogenin and tigogenin into identical derivatives. *Ber.* 68B:1090-1094.
- y Hagedorn, A. 1936. Saponins of the cyclopentanehydrophenantrene group; 4: Constitution of gitogenin and digitogenin. *Ber.* 69B:797-805.
- Ulbrech, B. y Wiesner, W. 1985. High yield rosmarinic acid production from plant cell culture in a stirred bioreactor system. *In vitro* 21(3):60A.
- Veliky, I. A. 1977. Effect of pH on triptophol formation by cultures of *Ipomoea* sp. plant cells. *Lloydia* 40:482.

- Wagner, F. y Vogelmann, H. 1977. Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. En: Barz, W.; Reinhard, E. y Zenk, M. H. (eds.). Plant tissue culture and its biotechnological applications. Springer-Verlag, Berlín.
- Weber, N. y Mangold, H. K. 1985. Semisynthesis preparation of 1-O-(1-¹⁴C)hexadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocoline (platelet activating factor) using plant cell cultures. J. Lipid Res. 26:495-500.
- Wilson, G. y Marron, P. 1978. Growth and entharquinose biosynthesis by *Gallium mollugo* (L.) cells in bath and chemostat culture. J. Exp. Bot. 29:837-851.
- Windaus, A. y Freese, C. 1925. Digitoxin. Ber. 58B:2503-2510.
- Woodward, R. B. y Doerin, W. E. 1944. The total synthesis of quinine. J. Am. Chem. Soc. 66:849.
- . 1945. The total synthesis of quinine. J. Am. Chem. Soc., 67:860-874.
- Yamada, Y. y Fuhita, Y. 1983. Production of useful compounds in culture. En: Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture; I: Techniques for propagation and breeding. MacMillan Publishing, Nueva York.
- Zeleneva, I. y Khavrin, E. E. 1980. Rearrangement of enzyme patterns in maize callus and suspension cultures: Is it relevant to the changes in the growing cells on the intact plant? Planta 148:108-115.
- Zenk, M. H.; El-Shagi, H.; Arens, H.; Stockigt, J.; Weiler, E. W. y Deus, B. 1977. Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension culture of *Catharantus roseus*. En: Barz, W.; Reinhard, E. y Zenk, M. H. (eds.). Plant tissue culture and its biotechnological applications. Springer-Verlag, Berlín. p. 27-43.