



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

Producción de Metabolitos Secundarios

UNIDAD DE APRENDIZAJE:
BIOTECNOLOGÍA

PLAN DE ESTUDIOS:
INGENIERO AGRÓNOMO FITOTECNISTA

AUTOR:
DR. CÉSAR VENCES CONTRERAS



METABOLISMO

PRIMARIO

Procesos químicos que intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas.

Fotosíntesis

Respiración

Transporte de solutos

Síntesis de proteínas

Asimilación de nutrientes

Diferenciación de tejidos

Formación de carbohidratos, lípidos y proteínas



METABOLISMO SECUNDARIO

Comprende aquellos procesos químicos que son únicos para una planta dada, y no son universales, además que no son necesarios para el crecimiento, reproducción y supervivencia de las plantas pero que cumplen roles muy importantes como defensa, atracción de polinizadores etc.



METABOLITOS SECUNDARIOS

Compuestos que no tienen una función reconocida en el mantenimiento de los procesos fisiológicos fundamentales de los organismos que los sintetizan.

Se sintetizan y acumulan únicamente en determinadas etapas del desarrollo y de la diferenciación celular. Generalmente ante situaciones de estrés o enfermedad.



METABOLITOS SECUNDARIOS

Aunque los 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.



METABOLITOS SECUNDARIOS

Este tipo de compuestos resultan indispensables para un sinnúmero de procesos igualmente importantes para el bienestar humano.



METABOLITOS SECUNDARIOS

A pesar de los grandes avances en la síntesis de compuestos orgánicos, en la actualidad el 25% de los fármacos prescritos en los EU se obtienen directamente de plantas cultivadas o silvestres.

Las plantas son la materia prima industrial necesaria para la extracción de sustancias utilizadas para la elaboración de fármacos, colorantes, fragancias y saborizantes.

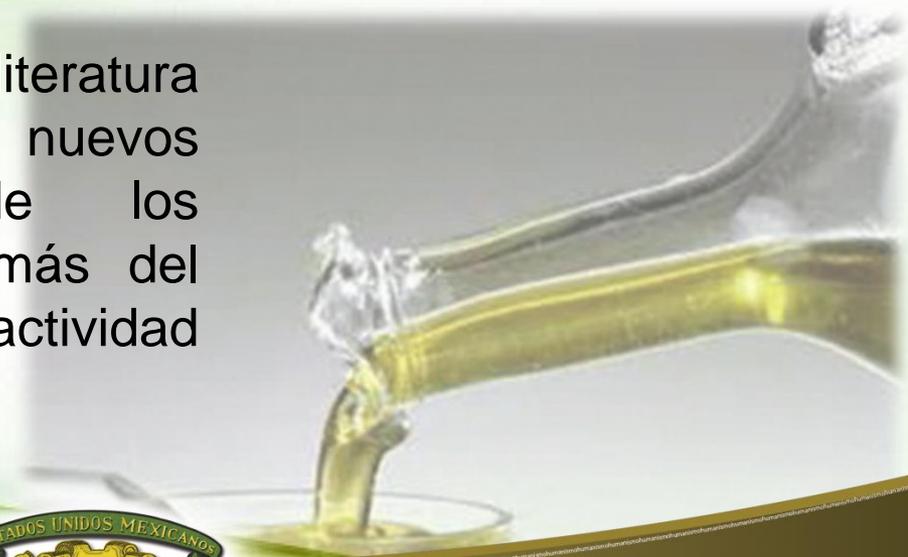


METABOLITOS SECUNDARIOS

Potencial:

De las cerca de 300 000 especies de plantas vasculares que se conocen, sólo entre el 1 y 5% de ellas se han investigado para la producción comercial de productos.

Cada año se reportan en la literatura científica unos 1 500 nuevos productos obtenidos de los vegetales, de los cuales más del 20% presentan una actividad biológica importante.



METABOLITOS SECUNDARIOS

Limitantes:

Lento crecimiento vegetal que presentan las plantas productoras

- *Coptis* requiere 5 a 6 años de desarrollo antes que pueda utilizarse para la extracción de berberina.
- *Lithospermum* necesita de 5 a 7 años de crecimiento para poder aislar la shikonina de sus raíces.
- *Cinchona* requiere esperar 20 años para extraer niveles apropiados de quinina.



METABOLITOS SECUNDARIOS

Limitantes:

Generados en muy bajas concentraciones (0.0005%) requiriendo procesar grandes cantidades de material vegetal

- Se requiere de 200 kg de hojas de *Catharantus* para producir 1 g de alcaloide tipo vinca.
 - Se requieren 7 kg de corteza seca de *Taxus* para obtener 1 g de taxol.
 - Distribución taxonómica estrecha.
 - Conocimiento de los mecanismos que controlan su síntesis y acumulación.
- Costos elevados.



METABOLITOS SECUNDARIOS

Productos de plantas medicinales en venta en países desarrollados

Compuesto	Uso	Precio US/kg
Mentol	Saborizante, fragancia	30
Quinina	Saborizante, fármaco antimalárico	500
Piretrinas	Insecticida	300
Codeína	Sedante	17 000
Ajmalicina	Problemas circulatorios	37 500
Digitalis	Desórdenes cardiacos	3 000
Taxol	Anticancerígeno	600 000



METABOLITOS SECUNDARIOS

Productos de metabolitos secundarios en cultivo *in vitro*

Especie	Metabolito	A	B	A/B
<i>Coffea arabica</i>	cafeína	1.6	1.6	1
<i>Captis japonica</i>	berberina	7	7	1
<i>Panax ginseng</i>	gingsenoides	27	4.5	6
<i>Nicotiana tabacum</i>	nicotina	2.5	0.7	3.6
<i>Nicotiana tabacum</i>	ubiquinona	0.18	0.003	60
<i>Catharanthus roseus</i>	catarantina	0.24	0.002	77

- A. Producción del metabolito en cultivo *in vitro* expresada en % del peso seco
B. Producción del metabolito en la planta completa expresada en % del peso seco



METABOLITOS SECUNDARIOS

Se considera que aquellos productos secundarios con un precio de \$1 000 US dólares/kg son susceptibles de producirse por cultivo de tejidos vegetales.

En la actualidad sólo 4 productos de valor comercial se obtienen a nivel industrial por CTV: shikonina, berberina, purpurina y saponina (gingseng) (*Mitsui Petrochemical Industries*).



ESTRATEGIAS

1. Manipulación del medio de cultivo y condiciones ambientales.
2. Selección de líneas altamente productoras.
3. Incitación celular.
4. Cultivos celulares en dos etapas.
5. Cultivo de órganos.



ESTRATEGIAS

Micropropagación

‡ Por medio de esta técnica es posible obtener un sinnúmero de plantas genéticamente homogéneas a partir de ejemplares seleccionados por su capacidad de producir compuestos activos determinados.



El material obtenido se usará para posterior cultivo en campo o como base para otras biotécnicas.



ESTRATEGIAS

Cultivo de células

- # El cultivo de células, fundamentalmente en forma de suspensiones
- # celulares, es similar al que se realiza con microorganismos.
- # Permite una rápida multiplicación celular, se puede realizar a varias escalas, desde un sistema de Erlenmeyer de varios mililitros hasta el escalado en biorreactores de varios litros.



ESTRATEGIAS

Cultivo de órganos

- ‡ La síntesis de los metabolitos secundarios está asociada a la expresión y regulación de genes biosintéticos de ciertos organelos en cierto tipo de células de determinados órganos. Es por ello que el cultivo a gran escala de brotes y raíces aislados representa una alternativa prometedora.



ESTRATEGIAS

Selección de líneas celulares

- # Consiste en el monitoreo de las características celulares a lo largo del cultivo, por la posibilidad de cambios epigenéticos o genéticos.
- # Se realizan mediante exámenes microscópicos, macroscópicos y químicos



ESTRATEGIAS

Inmovilización celular

- ‡ La inmovilización celular tiene como ventaja las altas tasas de producción de biomasa; la misma puede ser utilizada continuamente, y las células pueden ser separadas fácilmente del medio de cultivo. Por ejemplo, suspensiones celulares de *Taxus cuspidata* fueron inmovilizadas durante seis meses y se alcanzaron niveles de paclitaxel de 0.012% de peso seco.



ESTRATEGIAS

Agregado de precursores

- ‡ Los metabolitos secundarios pueden ser modulados por la adición de precursores de sus rutas biosintéticas, esta técnica resulta una herramienta interesante a fin de aumentar el potencial biosintético de las enzimas presentes en el cultivo de células. Ejemplo de ello es la adición de fenilalanina, ácido benzoico o serina para aumentar acumulación de paclitaxel ® en el cultivo de callos y suspensiones celulares de *Taxus cuspidata*. La síntesis de hiperflorina aumentó por el uso de L-fenilalanina en el cultivo de brotes en medio líquido de *Hypericum perforatum*.



ESTRATEGIAS

Elicitores

- ‡ La elicitación consiste en inducir la biosíntesis de metabolitos por exposición de cultivos a moléculas capaces de generar algún tipo de estrés mediante la expresión de genes asociados con las enzimas catalizadoras de diferentes vías metabólicas. Ejemplo de ello son: elicitores bióticos (micelios y componentes de la pared celular de hongos, polisacáridos, glucanos, glucoproteínas y ácidos orgánicos de bajo peso molecular; elicitores abióticos (radiación ultravioleta, sales de metales pesados, los herbicidas y el estrés osmótico).



ESTRATEGIAS

Transformación genética

- ✦ Un sistema eficiente de transformación ha sido el descrito por varios autores mediante *Agrobacterium rhizogenes*. Por otra parte, autores como Canter y otros. (2005) mencionan varios ejemplos exitosos de transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* en especies de *Digitalis*, *Taxus*, *Artemisia*, entre otros géneros.



ESTRATEGIAS

Plantas como biorreactores

- # El uso de plantas transgénicas para la producción de proteínas recombinantes para uso farmacéutico es una nueva tecnología conocida como “Molecular farming”. Las proteínas de interés farmacéutico pueden ser expresadas de una manera estable en plantas transgénicas o a través de expresiones transitorias en plantas infectadas con virus portadores de genes para proteínas de interés.



ESTRATEGIAS

Ingeniería metabólica

- ⌘ Es posible alterar rutas metabólicas para permitir que las plantas, o sus células, funcionen como biorreactores (reactores biológicos); y de esta manera, estimular la producción de sustancias de valor farmacológico, como por ejemplo, vacunas y biofármacos.



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS CON POTENCIAL ANTICANCERÍGENO EN CULTIVOS *IN VITRO* DE *TANACETUM PARTHENIUM*”

P. Biol. Victor Mendoza González



INTRODUCCIÓN

El cultivo *in vitro* proporciona la capacidad de controlar condiciones que pueden intervenir en la producción de los metabolitos secundarios, que se han usado como fuente alternativa de fármacos en el tratamiento de diversas enfermedades.

Tanacetum parthenium ha sido investigada por la producción de compuestos con actividad anticancerígena y otras enfermedades degenerativas.



OBJETIVOS

Establecer cultivos *in vitro* de *Tanacetum parthenium* para caracterizar el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios.

Cuantificar, durante 30 días, en 4 intervalos, el contenido de metabolitos secundarios como: partenolida, ácido caféico, ácido p-coumárico, ácido clorogénico, ácido salicílico y quercetina, en plántulas de *Tanacetum parthenium* tratadas con RCV.



RESULTADOS

Órgano	Día	Ácido Clorogénico (mg/g biomasa)	Ácido cafeico (mg/g biomasa)	Ácido salicílico (mg/g biomasa)
HOJA	21	2.52±0.45b	0.78±0.2c	ND
HOJA	24	2.67±0.35b	0.40±0.06b	ND
HOJA	27	0.65±0.1a	0.35±0.07b	0.48±0.09a
HOJA	30	0.55±0.11a	0.06±0.1a	2.93±0.88b
TALLO	21	1.94±0.33c	0.27±0.05c	ND
TALLO	24	0.11±0.03a	0.01±0.01a	ND
TALLO	27	ND	ND	ND
TALLO	30	1.33±0.21b	0.11±0.02b	ND
RAIZ	21	1.24±0.24b	0.50±0.07b	0.31±0.06b
RAIZ	24	0.67±0.11a	ND	ND
RAIZ	27	ND	ND	ND
RAIZ	30	0.75±0.15a	0.24±0.05a	0.18±0.05a



CONCLUSIONES

Proceso de desinfestación:

- Cloro 20% / 15 min.

Brotación:

- KIN 0.5 mg/L y ANA 0.05 mg/L
- hojas (109 ± 20.71), brotes (13 ± 2.34), long de tallo (7.5 ± 1.35 cm)
- Control (60 ± 10 hojas, 4 ± 0.76 brotes, 4 ± 0.72 cm long de tallo).



CONCLUSIONES

Metabolitos secundarios identificados por HPLC:

- ácido clorogénico (AC): hoja 2.67 mg/g; 24 días
- ácido cafeico (Acaf): hoja 0.78 mg/g; 21 días
- ácido salicílico (AS): hoja 2.9 mg/g; 30 días



GRACIAS



BIBLIOGRAFÍA

- Arora, J, Goyal S, Ramawat KG. 2010. Enhanced stilbene production in cell cultures of *Cayratia trifolia* through co-treatment with abiotic and biotic elicitors and sucrose. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 46:430-436.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. Review Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161 (2001) 839–851.
- Bresciani LFV, Yunes RA, Bürguer C, De Oliveira LE, Bof KL, Cechinel-Filho. 2004. Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). *Z Naturforsch* 59c: 229-232.
- Canter, PH, Thomas H, Ernst E. 2005. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *TRENDS in Biotechnology* 23:180-185.



BIBLIOGRAFÍA

- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NM. 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). En “Biochemistry and Molecular Biology of Plants”, Buchanan B, Gruissem R, Jones R, (Eds). American Society of Plant Physiologists. EU.
- Daniell H. 2002. Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. Nat Biotechnol. 20(6):581-6.
- Fiehn, Oliver. 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. Plant Molecular Biology 48: 155–171, Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Goldhaber-Pasillas GD, Mustafa NR, Verpoorte R. Molecules. 2014. Jul 15;19(7):10242-60. doi: 10.3390/molecules190710242. Jasmonic acid effect on the fatty acid and terpenoid indole alkaloid accumulation in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*.



BIBLIOGRAFÍA

- Guttman, A, Khandurina J, Budworth P, Xu W, Hou Y-M, Wang X. 2004. Analysis of combinatorial natural products by HPLC and CE. *PharmaGenomics* 4:32- 42.
- Komaraiah, P, Ramakrishna SV, Reddanna P, Kavi Kishor PB. 2003. Enhanced production of plumbagin in immobilized cells of *Plumbago rosea* by elicitation and in situ adsorption. *Journal of Biotechnology* 101:181-187.
- Kreis, W. 2007. In-vitro culturing techniques of medicinal plants. En: Kayser O, Quax W (Eds) *Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application*, pp. 157-185. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Liu, X-N, Zhang X-Q, Zhang S-X, Sun J-S. 2007. Regulation of metabolite production by precursors and elicitors in liquid cultures of *Hypericum perforatum*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 91:1-7.



BIBLIOGRAFÍA

- Paek, KY, Chakrabarty D, Hahn EJ. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 81:287-300.
- Pérez-Alonso, Naivy, Jiménez, Elio .2011 .Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Biotecnología Vegetal* Vol. 11, No. 4: 195 – 211.



DIRECTORIO

Dr. en D. Jorge Olvera García
Rector

Dr. Alfredo Barrera Baca
Secretario de Docencia

Dra. Ángeles Ma. del Rosario Pérez Bernal
Secretaria de Investigación y Estudios Avanzados

Mtro. José Benjamín Bernal Suárez
Secretario de Rectoría

Mtra. Ivett Tinoco García
Secretaria de Difusión Cultural

Mtro. Ricardo Joya Cepeda
Secretario de Extensión y Vinculación

Mtro. Javier González Martínez
Secretario de Administración

Dr. Manuel Hernández Luna
Secretario de Planeación y Desarrollo Institucional

Dr. Hiram Raúl Piña Libien
Abogado General

