

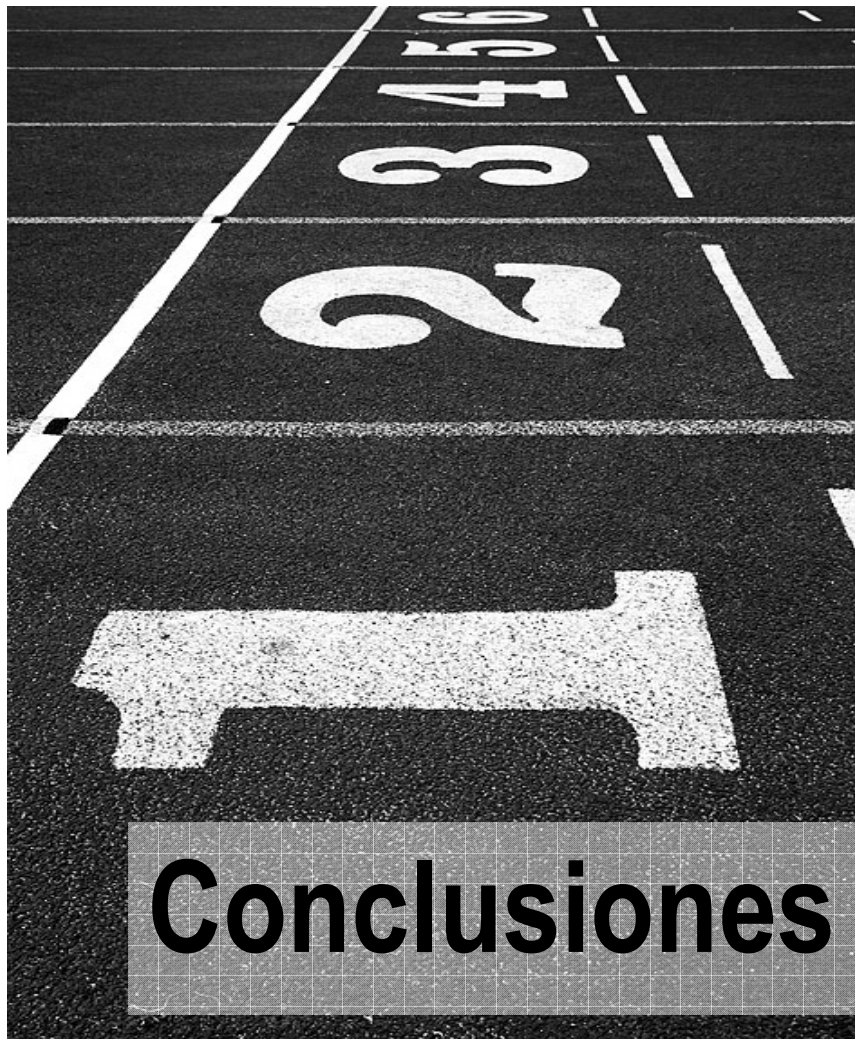
UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE
PRODUCTES NATURALS, BIOLOGIA VEGETAL I EDAFOLOGIA

**Producción de saponinas triterpénicas en cultivos
in vitro de *Centella asiatica***

Susana Mangas Alonso
2009



Conclusiones

Como conclusión general de esta Tesis Doctoral se puede decir que *Centella asiatica* es una planta que se adapta relativamente bien a su cultivo *in vitro* y que no requiere el desarrollo de estructuras organizadas, para lograr la síntesis de centelósidos, sus principales compuestos bioactivos. No obstante, las producciones que se han logrado hasta el momento son bajas y se requieren estudios posteriores para alcanzar niveles industriales. También hemos progresado en el conocimiento de la biosíntesis de centelósidos, concretamente en el papel regulador de algunas enzimas clave del proceso y en la competencia entre esta vía de síntesis y la que lleva a la formación de fitoesteroles. Los resultados de esta tesis también han mostrado, la acción específica del jasmonato de metilo en la regulación de ambas vías metabólicas. Todo ello, puede contribuir a un mejor conocimiento de la biosíntesis de triterpenoides en plantas y del papel regulador de los elicitores. Finalmente, y puesto que los cultivos celulares de *C. asiatica* obtenidos, mantienen operativos los sistemas enzimáticos que catalizan los últimos pasos en la formación de centelósidos, también pueden ser usados para biotransformar de forma eficiente el sustrato α -amirina en saponinas, abriendo una nueva vía a la utilización comercial de este sistema biotecnológico.

En relación con los distintos capítulos, las conclusiones específicas de esta Tesis son:

- I. Se ha desarrollado un sistema para la obtención de una fuente renovable de explantos de *C. asiatica*, basado en la micropropagación de plantas, obtenidas a partir de fragmentos provenientes de nódulos meristemáticos, englobados en perlas de alginato. El sistema permite el almacenamiento del germoplasma a bajas temperaturas por periodos de tiempo de hasta tres meses, y las plantas micropropagadas mantienen una apariencia similar a las plantas crecidas *ex vitro*.
- II. Tras probar el efecto de la adición de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento a los medios de cultivo (más de 16 tratamientos), los resultados de este estudio permiten concluir que una relación hormonal de 2,4D 2 mg/l y 4PU-30 3 mg/l, provoca el desarrollo de callo de *C. asiatica* friable, a partir del cual se pueden establecer suspensiones celulares. Además, de las tres concentraciones de la citoquinina sintética (4PU-30) ensayadas, 1, 2 y 3 mg/l, la más eficiente para producir biomasa y centelósidos en los cultivos de callo fue la concentración más elevada.

Conclusiones

- III. La presencia de las saponinas asiaticósido y madecasósido, y de sus geninas los ácidos asiático y madecásico, en los cultivos de callo establecidos, demuestra que en *C. asiatica* no se requiere un nivel de organización elevado para lograr la síntesis de centellósidos, si bien las hojas de las plantas tienen la capacidad de biosintetizar y/o acumular mayores cantidades de centellósidos. Además, la desdiferenciación de los tejidos vegetales y la formación de callo, altera significativamente el patrón de centellósidos de estos cultivos, en relación con la planta.
- IV. El análisis de los contenidos de centellósidos en los cultivos *in vitro* de plantas de cuatro semanas, ha demostrado que estos compuestos se acumulan mayoritariamente en las hojas, pero también pueden encontrarse en raíces, y que el tratamiento de los cultivos con jasmonato de metilo (0,1 mM) consigue incrementar significativamente los contenidos en principios activos, aunque también provoca una cierta toxicidad en los cultivos. Estos resultados confirman el papel elicitor del jasmonato de metilo en plantas de *C. asiatica*.
- V. Por el contrario, los niveles de fitoesteroles descienden en respuesta al tratamiento elicitor, lo que podría sugerir una competencia entre las vías de formación de saponinas y fitoesteroles, ya que ambas comparten en su inicio los mismos precursores.
- VI. Las suspensiones celulares de *C. asiatica* obtenidas presentaron una alta tasa de viabilidad al ser cultivadas en medio MS adicionado de 2,4-D 2 mg/l y BA 0,1 mg/l, mostrando un curso de crecimiento lineal y ascendente hasta el décimo día de cultivo, para entrar posteriormente en fase estacionaria, periodo en el que se observó la máxima acumulación de centellósidos. Este comportamiento refleja un curso de producción dissociado del curso de crecimiento.
- VII. El tratamiento de los cultivos celulares, al final de la etapa de crecimiento lineal, con jasmonato de metilo, corrobora su efecto elicitor previamente observado en planta, llegando a incrementos de la producción de centellósidos de hasta 13 veces en relación a los cultivos control. Además, nuestro estudio demuestra que el efecto elicitor es máximo durante los primeros 4 días del tratamiento. Un efecto que varía totalmente, al

Conclusiones

incrementar la concentración del elicitor, por lo que podemos deducir que en este sistema, la elicitación con jasmonato de metilo es dosis-dependiente.

- VIII. En relación con ello, se ha podido demostrar que el jasmonato de metilo activa a dosis bajas, la expresión del gen de la escualeno sintasa, enzima que retira el carbono del “pool” general de la biosíntesis de terpenos y lo dirige a la formación de centelósidos y esteroides. Por el contrario, altas concentraciones de jasmonato de metilo inhiben la expresión del gen. Estos resultados, podrían explicar que la respuesta del cultivo al elicitor dependiera de la dosis y a la vez justificar, el papel activador del jasmonato de metilo, a bajas concentraciones, en la formación de centelósidos.
- IX. Por el contrario, con independencia de la concentración de jasmonato de metilo, los niveles de fitoesteroles disminuyeron en respuesta a la elicitación, confirmando los efectos producidos en planta y sugiriendo también, a nivel de cultivos celulares, una competencia por el flujo de carbono entre las vías de formación de saponinas y fitoesteroles.
- X. El efecto diferencial del jasmonato de metilo sobre ambas vías, se justifica al demostrar que la elicitación activa la expresión del gen de la β -amirina sintasa, una enzima clave de la formación de centelósidos, a la vez que inhibe el gen de la cicloartenol sintasa, enzima que cataliza uno de los primeros pasos de la formación de fitoesteroles. La distinta respuesta de ambos genes, podría explicar en parte, la alteración de los niveles de saponinas y fitoesteroles de los cultivos elicitados.
- XI. En este trabajo también se ha desarrollado un método eficiente para el aislamiento de α - y β -amirina, posibles precursores de los centelósidos, a partir de resinas comerciales y plantas medicinales. El método combina la rápida detección de las amirinas por TLC, su fácil extracción en *n*-hexano, su cuantificación por HPLC y su aislamiento por TLC-preparativa y cristalización. Los resultados han demostrado que la mejor fuente de α -amirina es la resina de copal Tepoztlan y de β -amirina los residuos de nanche. Si bien, este último compuesto no ha podido aislarse con la suficiente pureza para ser utilizado en los ensayos posteriores de biotransformación.

Conclusiones

- XII. Estos ensayos han demostrado que un tratamiento conjunto de los cultivos celulares de *C. asiatica* con el permeabilizante DMSO a la concentración del 1% y α -amirina 100 mg/l disuelta en acetona, provoca una tasa de absorción del sustrato por las células vegetales del 15,7%, del cual, un 15% fue convertido en centelósidos. Por el contrario, la sustitución del DMSO por β -ciclodextrina, como vehículo para la biotransformación, no mejora las tasas de conversión, y la producción de centelósidos en el primer sistema fue 3,8 veces superior a la lograda utilizando la β -ciclodextrina.
- XIII. Ambos tratamientos, DMSO y β -ciclodextrina, a la vez que activaron la productividad del sistema, provocaron un incremento en la liberación de los centelósidos al medio de cultivo, un factor clave en un proceso biotecnológico, pues facilita la extracción de los principios activos y mejora la rentabilidad del sistema.