OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE CULTIVO EN SUSPENSIÓN DE CÉLULAS DE LA ESPECIE VEGETAL *Thevetia peruviana* Y SU EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Juan Pablo Arias Echeverri

Ingeniero Biológico

Tesis de Grado presentada para optar al Título de

Magíster en Ciencias - Biotecnología

Director

Mario Arias Zabala, Ph.D.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE MEDELLÍN

FACULTAD DE CIENCIAS

2013

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi familia por estar siempre a mi lado impulsándome y apoyándome a alcanzar estos logros. A mi padre, que más que una inspiración, se ha convertido en mi asesor académico y personal brindándome en todo momento lo necesario para convertirme en un gran ser humano.

A la Universidad Nacional de Colombia – Sede Medellín y al laboratorio de Bioconversiones y sus integrantes por brindarme el espacio y apoyo perfecto para llevar a cabo cada una de mis ideas y vivir en un ambiente idóneo la experiencia de la investigación.

TABLA DE CONTENIDO

1. Resumen 1
2. INTRODUCCIÓN 2
3. REVISIÓN DE LITERATURA 5
3.1 Especie vegetal y principales metabolitos secundarios 5
3.2 Cultivos celulares 8
3.2.1 Tipos de cultivos 9
3.3 Metabolismo secundario 14
3.3.1 Terpenoides 15
3.3.2 Glicósidos cardiotónicos 16
3.3.3 Flavonoides 17
3.4 Biorreactores para el cultivo de células vegetales 18
3.4.1 Agitación y estrés hidrodinámico 19
4. OBJETIVOS 21
4.1 Objetivo General 21
4.2 Objetivos Específicos 21
5. Metodología 22
5.1 Establecimiento de cultivo *in vitro* de células de *Thevetia peruviana* 22
5.1.1 Iniciación de callos y suspensiones celulares 22
5.2 Métodos analíticos 23
5.2.1 Peso seco 23
5.2.4 Cuantificación de azúcares reductores 24
5.2.2 Determinación de metabolitos secundarios 24
5.2.3 Determinación cualitativa de otros metabolitos secundarios 24
5.2.4 Viabilidad celular 25
5.3 Diseño experimental 25
5.3.1 Evaluación de la fuente de carbono y tamaño de inóculo 25
5.3.2 Efecto del tipo de tapón y la relación área superficial/volumen 26
5.3.3 Cultivo en biorreactor de 7 litros 28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 29
6.1 Establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión 29
6.2 Efecto de la fuente de carbono y tamaño de inóculo 31
6.3 Efecto del tipo de tapón y la relación área superficial/volumen 37
6.4 Efecto de la velocidad de agitación en cultivos en biorreactor de tanque agitado 40
6.4.1 Velocidad de agitación 200 rpm 40
6.4.2 Velocidad de agitación 300 rpm 45
6.4.3 Velocidad de agitación 400 rpm 49
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 56
9. BIBLIOGRAFIA 58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Papel de algunos terpenoides en la planta ……16
Tabla 2. Matriz experimental- Diseño central compuesto (So,Xo) con puntos estrella. 25
Tabla 3. Matriz Experimental - Diseño multifactorial categórico (As/V)……..…...27
Tabla 4. Matriz de resultados – Efecto de la fuente de carbono y tamaño de inoculo. Rendimientos Biomasa/Sustrato (Yxs) y producción de glicósidos…….....31
Tabla 5. ANOVA Rendimiento biomasa/sustrato (Yxs)…….32
Tabla 6. Velocidades específicas máximas de crecimiento en cultivos celulares en suspensión de distintas especies vegetales…...……... 35
Tabla 7. Matriz experimental - Efecto del volumen de trabajo y del tipo de tapón sobre el crecimiento celular……37
Tabla 8. ANOVA: Tipo de tapón - Relación área superficial/volumen……..…38
Tabla 9. Resumen de resultados de cultivos en biorreactor de tanque agitado……...51
Tabla 10. Rendimientos (Yx/s) en cultivos a escala de matraz agitado y biorreactor….53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de glicósidos cardiotónicos presentes en la semilla de *Thevetia peruviana*……..……...7
Figura 2. Esquema aproximado de la biosíntesis de glicósidos cardiotónicos……8
Figura 3. Estructura general de un glicósido cardiotónico…….17
Figura 4. Superficie de respuesta estimada del rendimiento biomasa/sustrato (Yx/s) *vs.* Concentración de Inóculo (X_0) y Concentración Inicial de Sustrato (S_0)……33
Figura 5. Cinética de crecimiento con Xo=2.61 g/l y So=28 g/l…….34
Figura 6. Cinética de consumo de sustrato con Xo=2.61 g/l y So=28 g/l……...36
Figura 7. Gráfico de medias. Tipo de tapón (Aluminio – Algodón)…….….…….39
Figura 8. Cinética de crecimiento (CVS vs. Tiempo). Cultivo en biorreactor de tanque agitado, 200 rpm……..41
Figura 9. Cinética de crecimiento (CVS vs. Tiempo). Cultivo en biorreactor de tanque agitado, 300 rpm……..46
Figura 10. Cinética de crecimiento (CVS vs. Tiempo). Cultivo en biorreactor de tanque agitado, 400 rpm……..50
Figura 11. Cinéticas de crecimiento CVS vs. Tiempo. Cultivos en biorreactor 3L (200, 300 y 400 rpm)…….……52

LISTA DE FOTOS

Foto 1. Obtención de callos a partir de explantes de pulpa de *T. peruviana*……...29
Foto 2. Cultivo en matraz de células en suspensión de *T. peruviana*……..29
Foto 3. Morfología y viabilidad celular de cultivos in vitro de *Thevetia peruviana*…...30
Foto 4. Volumen de células sedimentadas (CVS) cultivo en biorreactor de tanque agitado, 200 rpm…….41
Foto 5. Viabilidad celular al día 20 de cultivo en biorreactor de tanque agitado a 200 rpm……..…….42
Foto 6. Medio sobrenadante liofilizado-200 rpm……44
Foto 7. Volumen de células sedimentadas (CVS)-300 rpm……46
Foto 8. Viabilidad celular al día 20 de cultivo en biorreactor a 300 rpm……47
Foto 9. Medio sobrenadante liofilizado-300 rpm……48
Foto 10. Viabilidad celular día 20 de cultivo en biorreactor -400 rpm…….…..49
Foto 11. Volumen aproximado de células sedimentadas (CVS)-400 rpm…….….49
Foto 12. Medio sobrenadante liofilizado-400 rpm……..54

1. RESUMEN

Los cultivos de células vegetales en suspensión se han venido perfilando en los últimos años como procesos atractivos para la obtención de sustancias naturales de alto valor económico, como el caso de metabolitos secundarios, las cuales se encuentran en las plantas en muy bajas concentraciones, conllevando a unos elevados costos de estas sustancias en el mercado debido a las dificultades y bajos rendimientos que se presentan en su obtención tradicional o síntesis química.

El estudio de factores que influyen sobre el crecimiento celular en cultivos vegetales en suspensión a escala de matraz agitado y biorreactor es clave para la optimización y posterior escalado de los procesos con miras a obtener altos rendimientos en la producción de los metabolitos secundarios de interés. En este trabajo, se evaluó el efecto de la concentración inicial de la fuente de carbono (S_0), la concentración del inóculo (X_0) y la relación área superficial/volumen (As/V), este último como medida indirecta del suministro de oxígeno, sobre la producción de biomasa y metabolitos secundarios del tipo glicósidos cardiotónicos a escala de matraz agitado. Adicionalmente, se establecieron las condiciones iniciales adecuadas para el escalado del cultivo en biorreactor de 7 litros. Para los experimentos a escala de matraz agitado, el montaje se basó en un Diseño Central Compuesto (CCD) en el cual se evaluó el efecto de varios niveles de las variables de estudio (S_0, X_0, As/V) sobre la variable respuesta (Rendimiento Biomasa/Sustrato, $Y_{X/S}$), lo cual permitió, finalmente, generar la superficie de respuesta que suministró información sobre el punto óptimo para cada uno de los parámetros en los rangos medidos. Con relación al estudio en biorreactor de 7 litros, se evaluó el efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios.

2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, gran variedad de sustancias naturales vienen siendo empleadas por las industrias química, farmacéutica, alimenticia y cosmética, entre otras, para la elaboración de múltiples productos, los cuales mueven un mercado de miles de millones de dólares al año (Sasson et al., 1992). Los métodos de obtención de estas sustancias son aquéllos que se han venido implementando desde hace muchos años, tales como el cultivo y procesamiento de plantas completas, lo cual resulta costoso y dispendioso en muchos casos. También se han desarrollado procesos de síntesis o semi-síntesis química de varias de estas sustancias, pero estos han mostrado ser igualmente dispendiosos y costosos dada la gran cantidad de etapas que requieren.

El cultivo de células vegetales surge como una alternativa que muestra tener, como principales ventajas, la posibilidad de proveer de manera continua y reproducible productos naturales de interés, dejando a un lado todas las variables que afectan a los cultivos *in vivo*, como las condiciones climáticas, las condiciones del suelo, el ataque de plagas y problemas geopolíticos que puedan presentar ciertas regiones, logrando así tener un mayor control de las sustancias de interés y optimizando tiempo y dinero en su obtención.

Actualmente hay diversos cultivos de células vegetales a escala industrial, tales como *Lithospermum erythrorhizon* para la producción de shikonina, en donde una sola corrida de 14 días en un fermentador de 750 L produce la misma cantidad de shikonina que la obtenida en un cultivo en campo de 176.400 m^2, *Taxus* sp. para obtención de Taxol y *Panax ginseng* para la obtención de ginsenósidos, entre otros (Arias et al., 2009). Sin embargo, los cultivos de células vegetales, por ser tan específicos de cada especie, se encuentran en constante desarrollo e investigación, sobrellevando características no muy deseables que presentan algunos de ellos, como bajas productividades, crecimiento lento de las células, inestabilidad genética y pobre control de la diferenciación, entre otros, lo cual ha dificultado su implementación a escala industrial (Sajc et al., 2000).

Para tratar de superar las desventajas anteriormente descritas, se ha venido incursionado en estrategias que permitan incrementar la producción de biomasa y metabolitos secundarios, destacándose la selección y mejoramiento de líneas celulares, estudios a nivel genético y de rutas metabólicas, así como de los requerimientos fisicoquímicos de los cultivos, dentro de los cuales se pueden mencionar la naturaleza y concentración de la fuente de carbono, el tamaño de los inóculos y la velocidad de agitación.

Las semillas de *Thevetia peruviana* constituyen una fuente rica de tevetina, un heterósido utilizado en casos de insuficiencia miocárdica suave y cuando se presenta intolerancia a la digoxina. La tevetina, mediante hidrólisis parcial y la pérdida de dos moléculas de glucosa, produce peruvósido, cuyas propiedades terapéuticas cardio-activas son conocidas (Evans, 1991). Las semillas de *T. peruviana* también han sido estudiadas con respecto a su actividad antifúngica, donde los terpenos parecen ser las principales sustancias responsables de dicha actividad (Gata et al., 2003).

Estudios sobre el establecimiento de cultivos de células de *T. peruviana* y la producción de metabolitos secundarios del tipo glicósidos cardiotónicos se encuentran a nivel mundial en etapas tempranas de investigación. En los últimos años se han reportado avances en el establecimiento de cultivos celulares de varias especies de *Thevetia* (Taha et al., 2011) y el efecto de diversos factores sobre la formación de plántulas, callos y suspensiones celulares de esta especie (Odhiambo et al., 2010; Siwach et al., 2011), al igual que en la identificación de compuestos presentes en diferentes partes de la misma y sus propiedades químicas (Bisset, 1961; Abe et al., 1996; Villa et al., 2011; Kohls et al., 2012a; Kohls et al., 2012b).

En el Laboratorio de Bioconversiones de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín se han desarrollado estudios enfocados al establecimiento de cultivos *in vitro* de células en suspensión (Arias et al., 2009) e inmovilizadas (Aguirre, 2010) de esta especie y en la producción de algunos de sus metabolitos secundarios. Hasta la fecha se han establecido protocolos de desinfección del material vegetal, siembra en medio sólido y líquido y determinación de la viabilidad de los cultivos. Además, se ha

establecido el medio de cultivo, el régimen de fotoperiodo, el efecto de las condiciones de inmovilización y elicitación con Metil Jasmonato (Arias et al., 2009), sobre la producción de peruvósido.

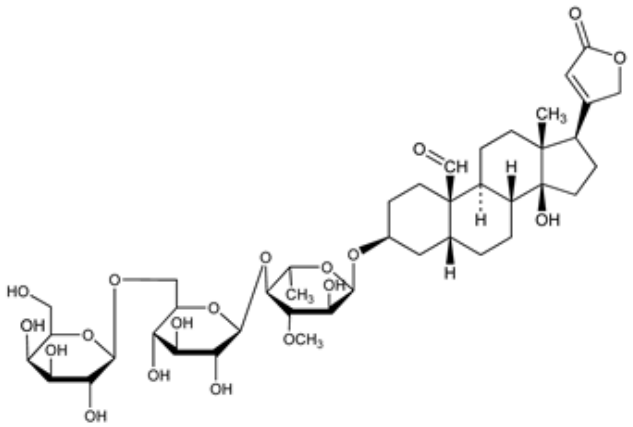
Con el fin de dar continuidad a los estudios a la fecha realizados, este trabajo tuvo como objetivo buscar condiciones óptimas, dentro de un rango evaluado, del tamaño de inóculo y la concentración inicial de la fuente de carbono y energía, a escala de matraz agitado, y así dar inicio a la etapa de escalado de estos cultivos en biorreactor de tanque agitado de 7 litros, en el cual se evaluó el efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

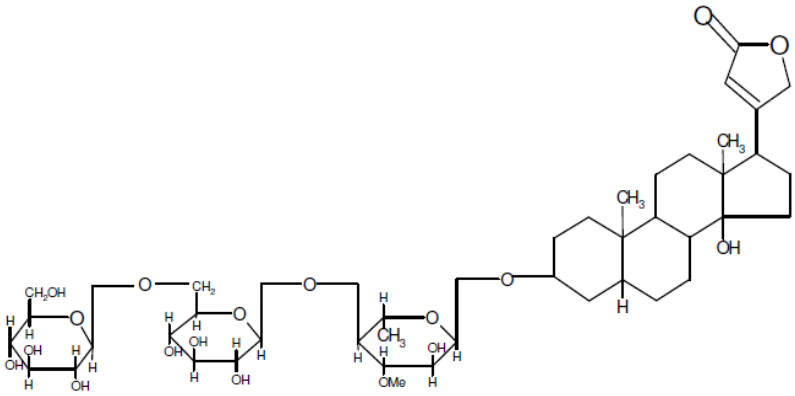
3.1 Especie vegetal y principales metabolitos secundarios

Thevetia peruviana Merr. es un árbol pequeño comúnmente ornamental, perteneciente a la familia *Apocynaceae*, ampliamente distribuido en los continentes Americano, Asiático y Africano. En Europa, esta planta fue reconocida como venenosa en el S. XVI; sin embargo, en años recientes es considerada como una fuente potencial de compuestos biológicamente activos, a saber, antitermitas (Tagbor, 2009), antimicrobial (Hassan et al., 2011; Kareru et al., 2010) insecticidas, rodenticidas, fungicidas (Ambang et al., 2007), anti VIH (Tewtrakul et al., 2002), anticancerígeno (Newman et al., 2008) y bactericidas, (Gata et al., 2003), entre otros. Esta planta es particularmente conocida desde 1863, cuando fue descubierta su actividad cardiotónica (Arora et al., 1967), adicionalmente sus semillas, hojas, frutos y raíces han sido usados en la medicina tradicional como agentes purgantes, eméticos y para el tratamiento de la fiebre intermitente.

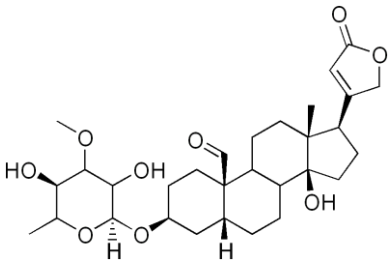
A la fecha se ha identificado la presencia de glicósidos cardiotónicos, tales como tevetina A, tevetina B, tevetoxina, peruvósido, y neriifolina (Figura 1), en diferentes partes de la planta, los cuales tienen un índice terapéutico relativamente alto comparado con la digoxina, un metabolito obtenido de *Digitalis lanata*, ampliamente utilizado en el tratamiento de la fibrilación auricular y en el fallo cardíaco congestivo (Batra & Zibbu, 2012).



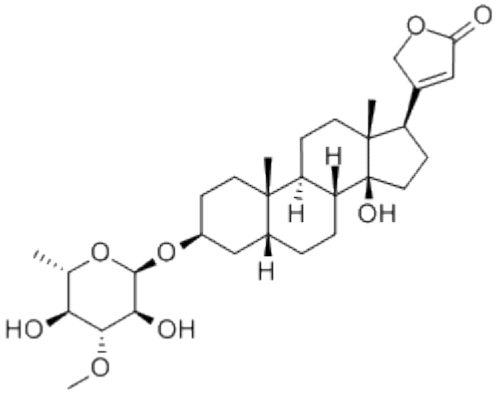
Tevetina A



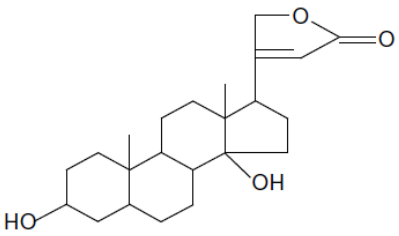
Tevetina B



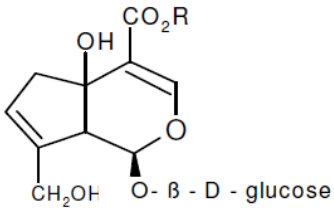
Peruvósido



Nerifolina



Digitoxigenina (Tevetigenina)



Tevetósido: R=H; Teveridósido: R=Me

Figura 1. Estructura de glicósidos cardiotónicos presentes en la semilla de *Thevetia peruviana* (Oluwaniyi, 2010; Batra & Zibbu, 2012)

Aunque la ruta biosintética de los glicósidos cardiotónicos en *Thevetia peruviana* no ha sido completamente dilucidada, es posible identificar los precursores principales de algunos de ellos (tevetinas A y B) dado que dichos metabolitos provienen de la ruta del mevalonato que da lugar a la síntesis de triterpenos (Dewick, 2011). Un esquema aproximado es mostrado en la Figura 2 (a) y (b).

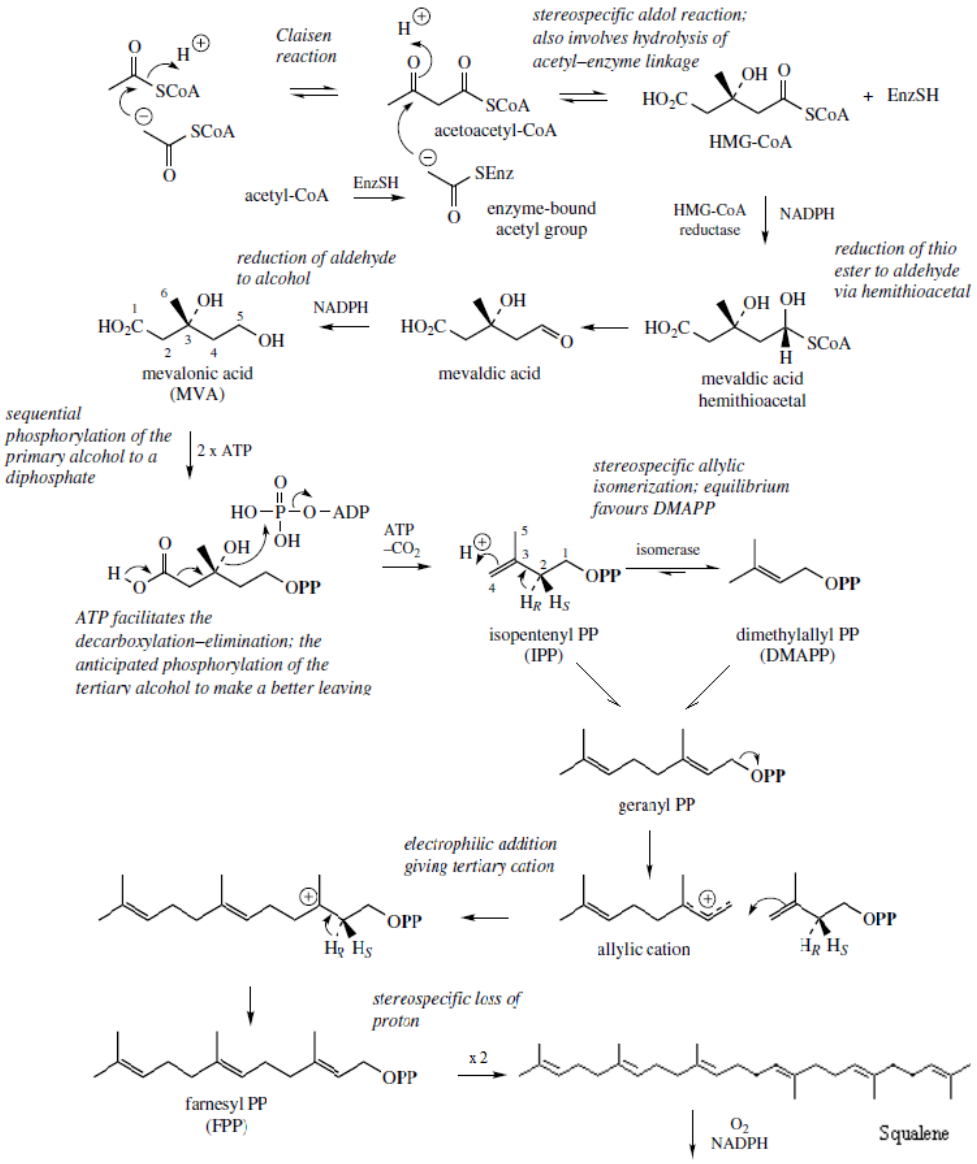


Figura 2 (a). Esquema aproximado de la biosíntesis de glicósidos cardiotónicos (Dewick, 2011).

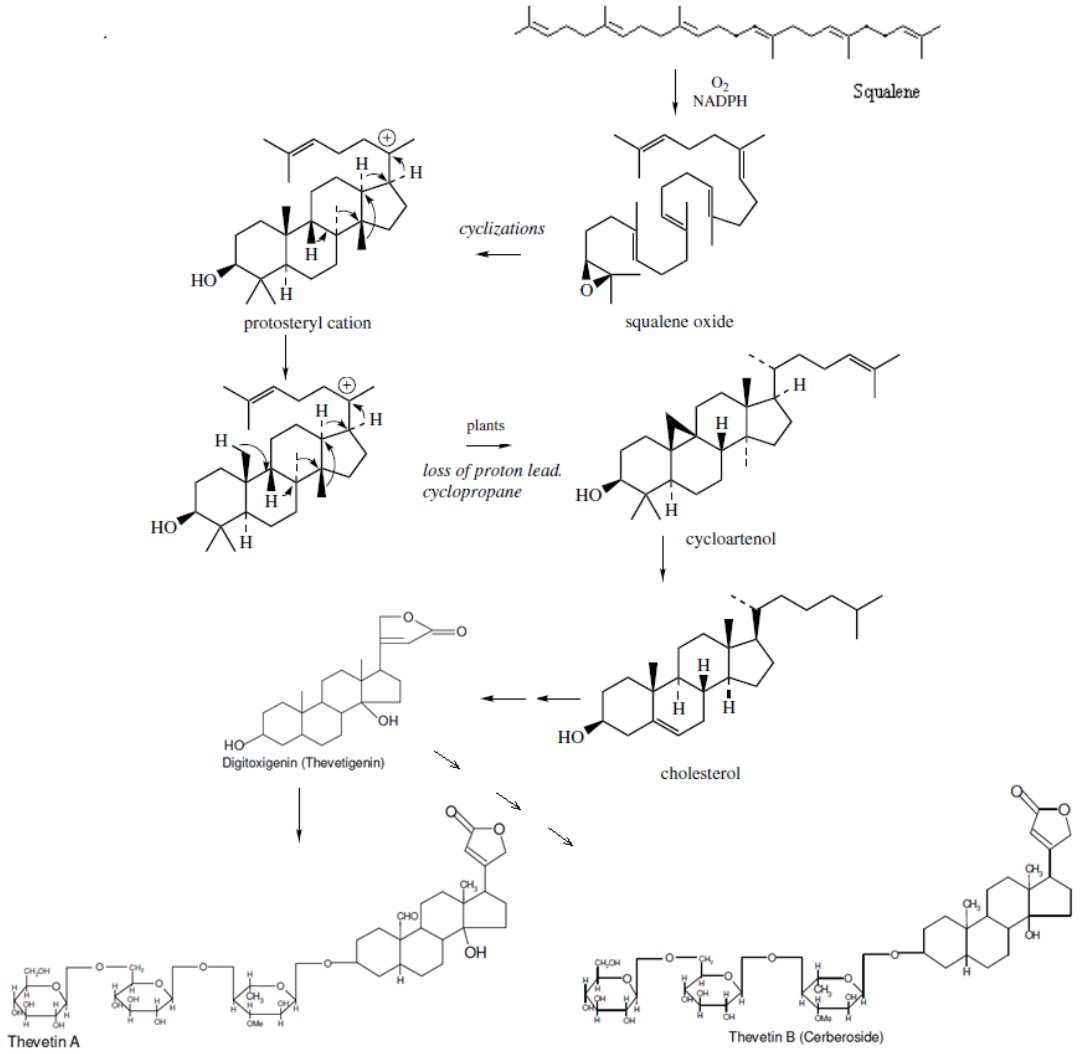


Figura 2 (b). Esquema aproximado de la biosíntesis de glicósidos cardiotónicos (Dewick, 2011).

3.2 Cultivos celulares

La implementación de cultivos celulares de especies vegetales requiere de la integración de un conjunto de parámetros y variables que tienen en cuenta desde características propias de las células a cultivar hasta las técnicas aplicadas en la obtención de los metabolitos secundarios, pasando por las condiciones y composiciones óptimas de los

cultivos y las variables físicas que pueden afectar el adecuado desarrollo de éstos y, finalmente, su productividad (Verpoorte et al., 1999).

La tecnología de los cultivos celulares de especies vegetales supera satisfactoriamente la mayoría de los problemas relacionados con la agricultura convencional tales como variaciones en la calidad de los cultivos debido a factores ambientales como sequías, inundaciones, enfermedades, ataque de plagas y otros factores de estreses bióticos o abióticos. Por otra parte, los prolongados periodos de almacenamiento del material vegetal y las técnicas de manipulación empleadas, generan perdidas y disminución en la cantidad y calidad de los metabolitos (Ruffoni et al., 2010) y por tanto se ven afectadas las productividades y rentabilidades de los cultivos, que finalmente impactan en gran medida el costo al consumidor final de estos productos.

Es por esto que el mayor potencial que ofrecen los cultivos celulares *in vitro* es el estricto control de variables que pueden tener influencia sobre el desarrollo y crecimiento celular; además de la eventual producción de metabolitos tanto primarios como secundarios de alto interés industrial o comercial, los cuales deben garantizar unas cantidades, características estructurales y funcionales idóneas para su extracción, purificación y posterior aplicación, que hagan de estos cultivos opciones rentables que liberen a la tierra cultivable de la presión por parte de cultivos intensivos para la obtención de dichos productos.

3.2.1 Tipos de cultivos

Los diferentes tipos de cultivos que se han reportado en la bibliografía para la producción de metabolitos secundarios de las plantas son cultivo de órganos o tejidos (brotes, raíces o pelos radicales), cultivo de células en suspensión y cultivo de células inmovilizadas.

Los cultivos de brotes y raíces son ampliamente usados para la obtención de células diferenciadas mediante regulación hormonal con diferentes combinaciones de auxinas o

citoquininas. En efecto, estos cultivos producen a menudo los mismos metabolitos secundarios que la planta intacta (Verpoorte et al., 1999).

Los pelos radicales o “hairy roots” son un tipo de cultivo celular que se genera debido a la infección de las células por *Agrobacterium rhizogenes* generando proliferación celular en forma de raíces (Verpoorte et al., 1999). Las principales características de este cultivo son rápido crecimiento en medio libre de hormonas y estabilidad genética y bioquímica, entre otras (Shanks & Morgan, 1999). La mayor desventaja de estos cultivos es la dificultad de garantizar su crecimiento a mayor escala, lo cual hace necesario la implementación y diseño de biorreactores específicos para los mismos (Ramachandra & Ravishankar, 2002).

Las suspensiones celulares consisten de células libres y pequeños agregados celulares en un medio de cultivo líquido en constante movimiento, siendo esta una de las formas para mantener y propagar células vegetales (Casas, 2003), proporcionando un ambiente de cultivo uniforme, eliminando los gradientes de nutrientes que se presentan en los cultivos en medio sólido y garantizando la disponibilidad de nutrientes para todas las células, pero a su vez teniendo un relativo bajo control sobre el tamaño de los agregados celulares.

Los cultivos de células inmovilizadas consisten en células o agregados celulares que se adhieren a una matriz ya sea en geles de carbonato o separadas en soportes de polímeros rígidos. La inmovilización proporciona una mayor cantidad de células por volumen del reactor, obteniendo una alta productividad volumétrica de células y productos (Roca y Mroginski, 1993); además, se elimina el problema de “lavado” celular en cultivos continuos, lo cual permite trabajar a mayores ratas de dilución y aumentar el rendimiento de los procesos de recuperación y purificación de los metabolitos (si los productos son secretados), se reducen los esfuerzos de corte a los cuales se ven sometidas las células durante la agitación, se minimiza la viscosidad de los fluidos, lo cual en las suspensiones celulares llega a ser un problema en aspectos relacionados con el mezclado y la aireación, y los riesgos de contaminación se ven ligeramente disminuidos (DiCosmo y Misawa, 1995).

El cultivo de células en suspensión y el cultivo de células inmovilizadas comparten la metodología requerida para la iniciación adecuada del cultivo como es la toma y procesamiento del explante, la formación del callo y el inicio de las suspensiones celulares.

Explante

El explante es el fragmento de tejido vegetal que se obtiene de la planta para iniciar el cultivo *in vitro*; puede conseguirse prácticamente de cualquier parte de ésta (hojas, raíces, tallos, semillas o polen, entre otros).

La obtención del explante debe llevarse a cabo de manera aséptica, posteriormente debe ser sometido a un proceso de esterilización usando etanol, hipoclorito de sodio u otros químicos que remuevan todos los microorganismos para así ser cultivado en un medio definido bajo condiciones ambientales controladas; cualquier explante que contenga células nucleadas vivas se puede emplear potencialmente para la obtención de callos (Misawa, 1994).

Un aspecto importante a tener en cuenta al momento de tomar el explante para llevar a cabo cultivos vegetales, es su tamaño; entre más grande sea, mayores son las probabilidades de obtener proliferación callosa (efecto deseado) y de obtener una mayor heterogeneidad (efecto indeseado); es por esto que dependiendo del tipo de cultivo vegetal que se desee realizar es importante determinar el tamaño mínimo del explante, por debajo del cual no se obtiene proliferación callosa u otras respuestas deseadas (Roca y Mroginski, 1993).

Callos

El callo es una masa de tejido parenquimático indiferenciado en crecimiento activo que se forma generalmente como respuesta a una lesión física en la planta. El tipo de organización del callo depende principalmente de la especie vegetal y de la composición hormonal del medio del cultivo utilizado (Serrano, 1991).

La formación de callos a partir de una especie vegetal no está limitada por el tipo de explante, permitiendo así basar la selección del mismo en parámetros como disponibilidad, facilidad de manipulación, homogeneidad, baja contaminación por microorganismos y una rápida respuesta *in vitro*.

Los callos formados a partir de un explante, pueden perder fácilmente la capacidad de regenerar una planta u órgano por completo, debido a que en las repetidas divisiones celulares a las que está sometida el callo durante su crecimiento, se pueden presentar un sin número de variaciones cromosómicas que pueden llegar a inducir cambios genómicos perjudiciales.

La proliferación de callos a partir del cultivo de un explante *in vitro* es de un gran valor práctico para llevar a cabo ya sean estudios básicos, la regeneración de órganos y plantas, la iniciación de suspensiones celulares o para la bioconversión y producción de compuestos útiles.

Los callos pueden ser embriogénicos o no embriogénicos. Los primeros se caracterizan por ser compactos y organizados; pueden obtenerse a partir de explantes inmaduros y están formados por células redondeadas, de pared celular gruesa y de crecimiento lento; tienen potencial para producir una plántula vía embriogénesis somática, se utilizan para desarrollar plantas transgénicas y variación somaclonal (Shah et al., 2003). Los callos no embriogénicos son aquellos que no generan plántulas, son friables, desorganizados, conformados por células de crecimiento rápido, alargadas, de pared celular delgada e individualizadas (Shah et al., 2003). En estos callos se distinguen dos tipos de células, unas vacuolizadas internas que proveen soporte físico y nutricional a las pequeñas células meristemáticas que se encuentran en zonas superficiales. Debido a su morfología, los callos friables son fácilmente disgregables y por lo tanto adecuados para el establecimiento de suspensiones.

Una de las consideraciones más importantes que hay que tener en cuenta al momento de obtener los callos son las composiciones adecuadas de los medios de cultivo que se estén utilizando, garantizando que en estos se encuentren los nutrientes, sales,

minerales, fitohormonas y demás elementos que sean necesarios y en las cantidades adecuadas para así poder alcanzar la adecuada formación y posterior crecimiento del callo.

Suspensiones celulares

La formación de suspensiones de células vegetales es llevada a cabo a partir de callos friables, pues se facilita la disgregación de las células que lo conforman. La iniciación de suspensiones se debe generalmente a la búsqueda del mejoramiento de la transferencia de nutrientes a todas las células del callo, pues en éste las células que se encuentran en su interior no tienen un contacto adecuado con los nutrientes del medio lo cual hace posible que disminuya el crecimiento celular y la producción de los metabolitos de interés.

La iniciación de una suspensión celular se realiza transfiriendo los callos ligeramente separados manualmente a erlenmeyers que contengan medio de cultivo líquido de composición similar, o exacta, a la del medio sólido en el cual se encontraban los callos, para no generar trastornos en el metabolismo celular y evitar prolongadas fases de latencia (*lag*) en el crecimiento de las células. Estos cultivos deben ser agitados constantemente e incubados a las condiciones de luz y temperatura adecuadas para cada especie; es importante realizar el mantenimiento periódico de las suspensiones pues las células contenidas en éstas tienden a formar agregados celulares los cuales, de no controlarse mediante tamizados de las suspensiones, presentarían el mismo problema en cuanto a bajas transferencias de nutrientes a las células que se encuentran en su interior.

Es de vital importancia, al momento del establecimiento de las suspensiones celulares, determinar el tamaño óptimo del inóculo ya que éste ha mostrado tener una gran influencia sobre el crecimiento y producción de metabolitos en los cultivos. Estudios realizados por Zhong y Yoshida (1995) muestran la importancia del tamaño del inóculo y su relación con la concentración final de biomasa, reportando un incremento de 3.3 veces la biomasa total en cultivos de *Perilla frutescens* al pasar de 15 g wc/l[1] a 50 g

[1] g wc/l: unidad de concentración celular. gramos de células frescas por litro.

wc/l. Akalezi y colaboradores (1999) evaluaron el efecto conjunto de la concentración de sacarosa y el tamaño de inóculo (1.5, 3, 4.5, 6 g/l) en la producción de saponinas en cultivos de *Panax ginseng* y observaron que los mayores valores de peso seco, 22.4 g/l, y producción de saponinas, 275 g/l, se obtuvieron con la combinación de 6 g/l de tamaño de inóculo y 60 g/l de sacarosa. Chiou y colaboradores (2001), en suspensiones de *Marchantia polymorpha*, observaron que se requerían menores tiempos de cultivo y se alcanzaban mayores rendimientos de biomasa usando mayores tamaños de inóculo; así, al incrementar el tamaño a 8%, obtuvieron productividades de biomasa y PUFA de 958.09 ± 13.7 y 19.79 ± 4.7 mg/l*día, respectivamente, valores muchos mayores en comparación con un tamaño de inóculo del 2%.

3.3 Metabolismo secundario

Las sustancias producidas por las plantas pueden dividirse en dos categorías: metabolitos primarios y metabolitos secundarios. Los primarios son compuestos que están dispersos ampliamente en la naturaleza y que de una forma u otra lo poseen todas las especies vegetales; son requeridos para el desarrollo fisiológico puesto que tienen un rol en el metabolismo celular básico, son compuestos económicos comercialmente y son usados como materia prima, alimentos o aditivos para éstos. Los secundarios son compuestos biosintéticamente derivados de los primarios pero más limitados en su distribución entre plantas, restringiéndose a ciertos grupos taxonómicos; no parece que tengan una función en el metabolismo primario de la planta (Balandrin et al., 1985), juegan más bien un papel ecológico muy importante en la adaptación de las plantas al medio ambiente (Mulabagal & Tsay, 2004) ya sea actuando como mecanismos de defensa contra microorganismos, insectos, depredadores y otras plantas (alelopatía) o como sustancias de reserva de energía, precursores de importantes compuestos orgánicos o fuentes de nitrógeno que pueden ser recirculados en la planta (Seigler, 1998), permitiendo una respuesta química a situaciones de estrés causadas por la reducción de nutrientes o por condiciones ambientales adversas.

Los metabolitos secundarios se acumulan en pequeñas cantidades en la planta y tienden a ser sintetizados en células especializadas en distintas etapas del desarrollo lo cual hace que su extracción y purificación sea bastante compleja y por consiguiente su costo final, para la implementación en las diferentes industrias, por el momento sea elevado (Balandrin et al., 1985).

La clasificación de los metabolitos secundarios en plantas se basa principalmente en sus rutas biosintéticas y se consideran entre 3 y 4 grandes familias o grupos de moléculas: fenoles, terpenos, esteroides y alcaloides (Bourgaud et al., 2001; Bernards, 2000).

En el caso específico de *T. peruviana* y la familia a la cual pertenece (*Apocynaceae*) se ha reportado la presencia de cuatro tipos de metabolitos: terpenoides, glicósidos cardiotónicos, flavonoides, y esteroides (De la Rosa et al., 2005).

3.3.1 Terpenoides

Los terpenoides son compuestos que provienen estructuralmente de una unidad de cinco carbonos, el isopentilpirofosfato (IPP), el cual puede obtenerse en la célula mediante diversas rutas (Bernards, 2000); pueden ser considerados como el grupo más grande de metabolitos secundarios en plantas (Verpoorte y Memelink, 2002) encontrándose, hasta el momento, aproximadamente unos 25000 de estos compuestos.

La mayoría de los terpenoides tiene estructuras multicíclicas, las cuales difieren entre sí no sólo en grupo funcional sino también en su esqueleto básico de carbono, el cual se compone de unidades de isopreno. Su clasificación se da con base en el número de unidades de isopreno que posean.

Los terpenos desempeñan diversas funciones en la planta (Tabla 1) y además tienen diversos usos en la industria como solventes, saborizantes, fragancias, adhesivos, agroquímicos y fármacos, entre otros.

Tabla 1. Papel de algunos terpenoides en la planta.

Función	Sustancia
Reguladores de crecimiento	Giberelinas, ácido abscísico
Pigmentos fotosintéticos	Fitol, carotenoides
Transportadores de electrones	Ubiquinona, plastoquinona
Componentes de membrana	Esteroles
Compuestos de defensa	Fitotoxinas, repelentes, antibióticos

3.3.2 Glicósidos cardiotónicos

Su distribución en la naturaleza está restringida a un número reducido de familias botánicas, principalmente aquellas estrechamente relacionadas a *Apocynaceae* (géneros Nerium, Strophantus y Thevetia) y *Asclepiadaceae* (Asclepias), entre otras familias de dico y mono cotiledóneas (Campos, 2009).

Los glicósidos cardiotónicos poseen una estructura esteroidal (genina o aglicona) que se caracterizan por llevar en el C-17 un anillo de lactona no saturado, y en el C-3 una parte glicosídica denominada glicona constituida por una o varias moléculas de azúcar como sustituyentes (Figura 3), siendo las más comunes, la glucosa y los 6-desoxiazúcares (ramnosa, mucosa, digitalosa y thevetosa) (Campos, 2009; Villa et al., 2011). Los glicósidos cardiotónicos pueden clasificarse en 2 grupos según las características del anillo de lactona en: cardenólidos (lactona C5) y bufadienólidos (lactona C6) (Campos, 2009).

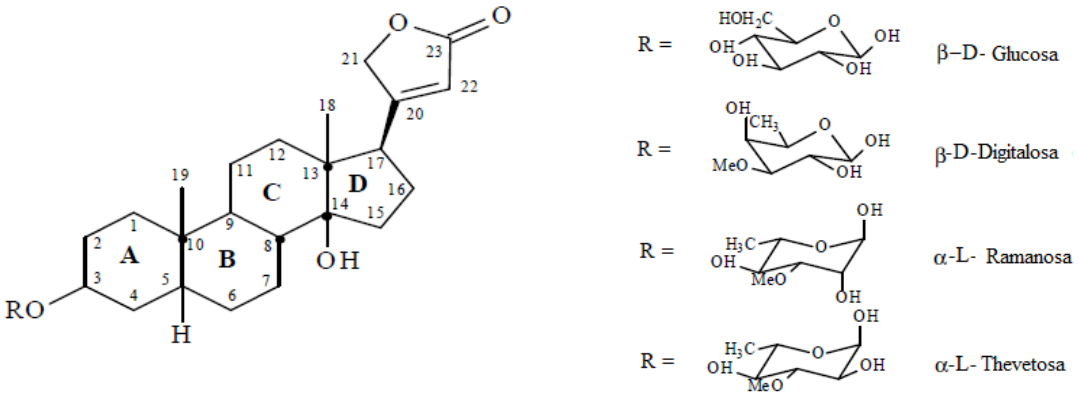


Figura 3. Estructura general de un glicósido cardiotónico (Villa et al., 2011).

Su mecanismo de acción en el cuerpo humano, en casos de insuficiencia cardiaca, es mediante inhibición de la bomba Na/K ATPasa dependiente, generando un incremento de la concentración de sodio intracelular y potasio extracelular, aumentando la contractibilidad intrínseca de la fibra muscular (Batra y Zibbu, 2012).

3.3.3 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", cuyo producto final o estructura base consta de un esqueleto C6-C3-C6, el cual puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, los cuales determina finalmente su actividad, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua (Culebras & Tuñón, 2002).

Los flavonoides poseen propiedades muy apreciadas en medicina, como antimicrobianos, anticancerígenos, disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, entre otros efectos. También son conocidos por los cultivadores de plantas

ornamentales, que manipulan el ambiente de las plantas para aumentar la concentración de flavonoides que dan el color a las hojas y a las flores.

3.4 Biorreactores para el cultivo de células vegetales

Algunas de las desventajas que presentan los cultivos de células vegetales en biorreactores son las bajas tasas de crecimiento, la inestabilidad genética y el pobre control que se tiene en la diferenciación celular; estos parámetros están ampliamente relacionados con ciertas condiciones físicas que se presentan al momento de realizar el cultivo en biorreactores a escala industrial, como los esfuerzos de corte y la transferencia de oxígeno, entre otros. Dada la complejidad de estos fenómenos, para poder alcanzar condiciones óptimas de cultivo se requiere de un trabajo interdisciplinario que involucre áreas como biología celular y molecular, fisiología vegetal, genética e ingeniería, para conocer detalladamente la morfología y composición del tejido, las condiciones de flujo y transferencia de masa y calor, la cinética del crecimiento y formación de producto, alcanzar la estabilidad genética de las líneas hiperproductoras y controlar el micro y macro ambiente celular, así como optimizar los procesos de purificación y separación (Sajc et al., 2000).

Se han realizado amplias discusiones en cuanto al tipo de reactor adecuado para llevar a cabo diferentes procesos con cultivos vegetales (Huang y McDonald, 2009; Yesil y Gurel, 2010; Weathers et al., 2010); sin embargo, la adecuada selección es enteramente dependiente de los requerimientos específicos de cada especie. Aunque en los últimos años se ha incursionado en el uso de diversos tipos de biorreactores (air-lift y columnas de burbujeo, entre otros) el más ampliamente usado es el STR (reactor de tanque agitado); claro está que se han tenido que realizar numerosas modificaciones a este reactor, principalmente en cuanto al tipo de aireación y el tipo de impulsor utilizado, buscando que se adapte de la mejor manera a cada proceso que se desee llevar a cabo.

El control y la flexibilidad del STR, en términos de la facilidad de realizar ajustes independientes a la aireación y al mezclado, lo hacen el reactor más trabajado con

cultivos celulares, a pesar de sus limitaciones como altos consumos de energía y altos esfuerzos de corte (Huang y McDonald, 2009).

Aunque son diversas las aproximaciones para lograr un adecuado establecimiento de cultivos de células vegetales en suspensión en biorreactor como tipo de biorreactor, medio de cultivo, temperatura, requerimiento de oxígeno, nutrientes, entre otras, (Ruffoni et al., 2010), la agitación y el esfuerzo de corte han sido blanco de diversos estudios pues son variables que se han identificado como de gran importancia al momento de pensar en el escalado de los procesos y deben ser evaluadas para cada especie vegetal trabajada.

3.4.1 Agitación y estrés hidrodinámico

Los cultivos de células vegetales en medios de cultivo líquido agitados están sometidos constantemente a fuerzas hidrodinámicas generadas por los procesos de agitación y aireación requeridos para que haya una adecuada oxigenación de las células y distribución de los nutrientes en el medio; estas fuerzas a escala de matraz agitado pueden considerarse despreciables en cuanto a los efectos que pueden tener en la morfología y fisiología de las células, pero al pasar a trabajar a nivel industrial y estar cultivando con suspensiones densas se aumentan los requerimientos de transferencia de masa en el sistema y por tanto las condiciones de agitación y aireación se intensifican, haciendo que las fuerzas hidrodinámicas y los fenómenos de turbulencia que se presentan no sean despreciables a grandes escalas (Kieran et al., 1997).

La estructura básica de la turbulencia envuelve el espectro de los tamaños de los remolinos, donde remolinos grandes pasan su energía cinética a los más pequeños y a su vez los más pequeños disipan su energía por disipación viscosa al medio, que es el mecanismo clave por el cual la turbulencia afecta la forma y función de la célula. Para que las células no se vean dañadas por la turbulencia, los remolinos más pequeños deben ser grandes cuando se comparan con las células y mucho más pequeños que la totalidad de la muestra celular (Sajc et al., 2000).

Las células cultivadas pueden responder de diferentes maneras a estas fuerzas hidrodinámicas; dependiendo de la magnitud se puede incrementar la producción de biomasa o de un metabolito secundario o se pueden presentar daños irreparables de la célula ocasionando su muerte.

Entre los diferentes estudios llevados a cabo para determinar las velocidades de agitación óptimas para un proceso, Kato y colaboradores (1975) sugieren que una velocidad de agitación de 50 a 100 rpm es la más adecuada para el crecimiento de células de tabaco en reactores de tanque agitado. Por otra parte, Pavlov y colaboradores (2005) observaron en cultivos en suspensión de *Lavandula vera MM* en biorreactor de 3 litros que la velocidad de agitación, junto con el oxígeno disuelto, tiene un efecto importante sobre el crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios (ácido rosmarínico) obteniendo un máximo crecimiento (34,8 g/l) a 100 rpm y 50% de densidad óptica (OD) y producción de ácido rosmarínico (1870,6 mg/l) a 300 rpm y 30% OD. Cultivos de *Azadirachta indica* en biorreactor de tanque agitado mostraron tener una alta susceptibilidad a los esfuerzos de corte generados por incrementos en la velocidad de agitación (180 y 240 rpm), mientras que los mejores valores de producción de biomasa se alcanzaron a 100 rpm (Pérez y Sánchez, 2010).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Optimizar algunos parámetros del cultivo en suspensión de células vegetales de la especie *Thevetia peruviana* y evaluar su efecto sobre el crecimiento de la biomasa y la eventual producción de metabolitos secundarios del tipo glicósidos cardiotónicos a escala de matraz agitado y su posterior escalado en biorreactor de 7 litros.

4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar el punto óptimo, en la región a evaluar, de las variables concentración inicial de sacarosa, concentración de inóculo y relación área superficial/volumen, sobre el crecimiento celular de *T. peruviana* a escala de matraz agitado.
- ✓ Evaluar el efecto de los parámetros anteriores, a escala de matraz agitado, sobre la eventual producción de metabolitos secundarios del tipo glicósidos cardiotónicos.
- ✓ Establecer cultivos de células en suspensión en biorreactor agitado de 7 litros.
- ✓ Evaluar el efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento de la biomasa y la eventual producción de metabolitos secundarios, tipo glicósidos cardiotónicos, en fermentador de 7 litros.

5. METODOLOGÍA

5.1 Establecimiento de cultivo *in vitro* de células de *Thevetia peruviana*

5.1.1 Iniciación de callos y suspensiones celulares

El material vegetal usado, frutos, previamente establecido en estudios previos (Arias, et al., 2011) provino de arbustos ubicados en el barrio Los Colores contiguo a la canalización La Iguaná en la ciudad de Medellín. Este material fue seleccionado según características visuales (tamaño del arbusto, coloración de hojas y frutos, presencia de flores y ataques de plagas, entre otros) que garanticen una buena calidad del material.

Los frutos recolectados fueron desinfectados con agua destilada y detergente; posteriormente se sometieron a lavados con etanol al 70% (v/v), hipoclorito de sodio 10% (v/v) y agua destilada estéril.

Se realizó una disección de los frutos tomando pequeños trozos de la pulpa los cuales fueron usados como explantes para la inducción de callos en medio SH suplementado con 2,4-D (2 mg/l), kinetina (0.5 mg/l), agar (7 g/l) y sacarosa (30 g/l). El pH del medio se ajustó a 5.8 antes de autoclavar a 120°C y 15 psi por 15 minutos. Los callos se mantuvieron a temperatura ambiente bajo fotoperiodo natural y fueron subcultivados cada 15 días (Arias et al., 2009).

Las suspensiones celulares se obtuvieron mediante transferencia de callos friables a erlenmeyers de 250 ml con 100 ml de medio SH líquido suplementado, sin agar. Los cultivos fueron mantenidos en un agitador orbital (IKA KS501 digital) a 110 rpm y temperatura ambiente bajo fotoperiodo natural, a los 10 días de cultivo se realizo un tamizado para eliminar callos y agregados celulares, posterior a este proceso las suspensiones se subcultivaron cada 12-15 días en medio SH fresco (Arias et al., 2009; Aguirre, 2010).

5.2 Métodos analíticos

5.2.1 Peso seco

El crecimiento celular, a escala de matraz agitado, fue determinado midiendo el peso seco por triplicado cada 3 días por un periodo de 16-20 días, para lo cual se tomó un volumen de 20 ml del cultivo el cual fue filtrado en papel Whatman 595 en una unidad de filtración al vacío; las células retenidas fueron lavadas 3 veces con agua destilada y secadas a 60°C en horno de convección por 48 horas; el medio filtrado fue almacenado a 4°C para posteriores análisis de azúcares y metabolitos secundarios extracelulares.

5.2.2 Volumen de células sedimentadas

El crecimiento celular a escala de biorreactor fue determinado mediante una ligera variación del método no invasivo descrito por Mustafa et al. (2011) conocido como CVS (Cell Volumen after Sedimentation), la cual consistió en parar la agitación y aireación del cultivo y dejar sedimentar por 10 minutos marcando el volumen de células sedimentadas en el sistema. Se recurrió a esta técnica debido a los problemas de contaminación que se presentan al momento de la utilización de los sistemas tradicionales para toma de muestras en biorreactores.

5.2.3 Índice de crecimiento

Para determinar el efecto de las condiciones de cultivo (concentración de fuente de carbono y tamaño de inoculo) el crecimiento celular también fue determinado mediante el índice de crecimiento (IC) el cual se define como:

$$I.C = \frac{X_f - X_0}{X_0}$$

Donde Xf y Xo son las concentraciones finales e iniciales en el cultivo.

5.2.4 Cuantificación de azúcares

La cuantificación de azúcares durante los cultivos se hizo por HPLC acoplado a un detector de índice de refracción (RID-10A) usando una columna amino, fase móvil de acetonitrilo/agua (80:20), flujo de 2 mL/min a 30°C, resolviendo picos de fructosa (t_R: 7,013 min), glucosa (t_R: 8,037 min) sacarosa (t_R: 11,590 min) maltosa (t_R: 13,833 min) y lactosa (t_R: 15,968 min).

5.2.2 Determinación de metabolitos secundarios

Para el caso de los cultivos en matraz agitado se exploró la eventual producción de metabolitos secundarios en medio de cultivo recolectado cada tres (3) días en la toma de muestras para la curva de crecimiento celular. Este medio fue centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos; el sobrenadante fue filtrado en filtros de membrana (0.2 μm). Las muestras fueron analizadas mediante HPLC usando una columna LiChrospher® 100RP-18 (4×250 mm, 5 μm) y el método para glicósidos cardiotónicos descrito por Kyerematen et al. (1985). La producción o no de estos compuestos, así como de betulina, fue determinada mediante comparación con estándares externos de peruvósido (Sigma/Aldrich USA) y betulina (Sigma/Aldrich USA).

5.2.3 Determinación cualitativa de otros metabolitos secundarios

A escala de biorreactor de tanque agitado, fue indagada de manera cualitativa la producción de metabolitos secundarios, mediante pruebas fitoquímicas (escala reportada: Abundante, Media y Escaza), realizadas en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Nacional – Sede Medellín, en muestras obtenidas del medio de cultivo a los 20 días y concentradas mediante liofilización (SYCLON-18N) a -60°C y vacío (1 bar) para evitar la degradación de compuestos termolábiles. Se exploró la presencia de alcaloides, esteroides, flavonoides, taninos y fenoles, saponinas, antraquinonas, lactonas sesquiterpénicas y glicósidos cardiotónicos.

5.2.4 Viabilidad celular

La determinación de la viabilidad celular durante los distintos experimentos llevados a cabo se realizó mediante una modificación de la técnica de marcaje con diacetato de fluoresceína (FDA) según el protocolo descrito por Loyola y Vásquez (2006).

5.3 Diseño experimental

5.3.1 Evaluación de la fuente de carbono y tamaño de inóculo

Con miras a evaluar el efecto de la concentración inicial de fuente de carbono y tamaño del inoculo sobre la producción de biomasa y de metabolitos secundarios (glicósidos) se realizó un diseño central compuesto incluyendo 2 puntos centrales (Tabla 2). Los resultados fueron analizados con ayuda del paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XV. II para Windows. El diseño fue corrido en un solo bloque. El orden de los experimentos fue completamente aleatorizado lo cual aportó protección contra el efecto de variables ocultas.

Tabla 2. Matriz experimental - Diseño central compuesto So y Xo con puntos estrella.

Factores	Bajo	Alto	Unidades
Conc. Sacarosa	30	80	g/l
Tamaño de Inóculo	1.5	6.0	g/l

	Factores	
Unidad experimental	S_0 [g/l]	X_0 [g/l]
1	55	5,554
2	80	5,068
3	55	2,136
4	80	2,046
5	81,952	3,258

6	55	3,312
7	30	1,458
8	28,047	2,432
9	30	3,766
10	55	3,514

Los cultivos se llevaron a cabo en erlenmeyers de 100 ml con 20 ml de medio SH liquido suplementado, a temperatura ambiente, fotoperiodo natural (12 horas luz / 12 horas oscuridad) y agitación orbital a 110 rpm por un tiempo de 16 días, tiempo en el cual fueron recolectados para determinar consumo de azúcares, producción de metabolitos secundarios y crecimiento celular.

Como variables respuesta de este ensayo se midió la concentración de metabolitos secundarios a los 16 días de cultivo y el rendimiento biomasa/sustrato (Yxs), pues debido a que entre todas las unidades experimentales, hay variaciones en las concentraciones de inoculo y fuente de carbono, este parámetro puede aportar más información que la biomasa final en el cultivo.

5.3.2 Efecto del tipo de tapón y la relación área superficial/volumen

Una vez se establecieron los valores óptimos de concentración de sacarosa y tamaño de inóculo, se evaluaron las variables área superficial/volumen y tipo de tapón mediante un diseño experimental multifactorial categórico. La variable área superficial/volumen se evaluó mediante los volúmenes de trabajo, los cuales fueron 10, 20 y 30 ml en erlenmeyers de 100 ml. Los tipos de tapón utilizados fueron aluminio y algodón (Tabla 5), los cuales presentan menor y mayor transferencia de oxígeno, respectivamente (Orozco y Monroy, 2009).

Los cultivos se realizaron en medio SH liquido suplementado a temperatura ambiente bajos fotoperiodo natural y agitación orbital a 110 rpm por un tiempo de 16 días, tiempo

en el cual fueron recolectados para determinar el crecimiento celular y producción de metabolitos secundarios.

Tabla 3. Matriz Experimental - Diseño multifactorial categórico (As/V).

Factores	Nivel	Unidades
Volumen (As/V)	10, 20, 30	ml
Tipo de tapón	1. Aluminio 2. Algodón	----

	Factor A	Factor B
Unidad Experimental	**Volumen (ml)**	**Tapón (tipo)**
1	10	Aluminio
2	10	Aluminio
3	10	Aluminio
4	10	Algodón
5	10	Algodón
6	10	Algodón
7	20	Aluminio
8	20	Aluminio
9	20	Aluminio
10	20	Algodón
11	20	Algodón
12	20	Algodón
13	30	Aluminio
14	30	Aluminio
15	30	Aluminio
16	30	Algodón
17	30	Algodón
18	30	Algodón

Como variables respuesta de este ensayo se midió la concentración final de biomasa a los 16 días de cultivo.

5.3.3 Cultivo en biorreactor de 7 litros

Con base en los resultados óptimos obtenidos para concentración de sacarosa, tamaño de inóculo y relación área superficial/volumen (como medida indirecta del suministro de oxígeno), se establecieron cultivos en biorreactor de 7 litros, con un volumen de trabajo de 3 litros, bajo tres velocidades de agitación (200, 300 y 400 rpm) las cuales garantizaron una adecuada homogenización del cultivo.

Todos los cultivos se realizaron en un biorreactor de tanque agitado que contaba con una turbina tipo Pitch blade, microdifusor de acero inoxidable sinterizado y un flujo de aire de 5 litros/min antes de ingresar al biorreactor, medio SH suplementado, pH de 5,8 antes de autoclavar y temperatura ambiente.

En estos cultivos se determinó la curva de crecimiento, mediante la técnica CVS, viabilidad celular y producción de metabolitos secundarios, para cada velocidad al final del cultivo, según lo descrito en los métodos analíticos.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Establecimiento de cultivos de callos y células en suspensión

En las Fotos 1 y 2 pueden observarse las diferentes etapas del establecimiento del cultivo *in vitro* de callos y suspensiones celulares en matraz a agitado, a partir de explantes provenientes del mesocarpo del fruto de arbustos de *Thevetia peruviana*.

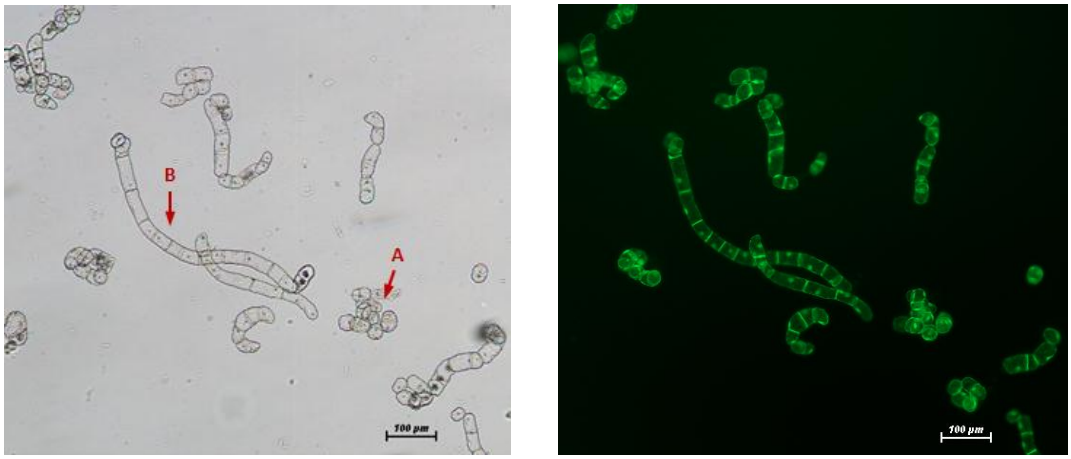
Foto 1. Obtención de callos a partir de explantes de pulpa de frutos de *T. peruviana*.

Foto 2. Cultivo en matraz de células en suspensión de *T. peruviana*

Los callos obtenidos se caracterizan por su alta friabilidad y, al igual que las suspensiones, por tener una coloración beige. La alta friabilidad que presentan los callos garantiza una suspensión celular fina altamente disgregada, favoreciendo el

crecimiento individual de las células o pequeños grupos de éstas (Foto 3a.) con una alta viabilidad celular (Foto 3 b.).

Las células presentes en los cultivos en suspensión, muestran principalmente una morfología alargada, aunque también algunas pocas presentan geometría esférica o isodiamétrica, se observa además que el núcleo se encuentra localizado contra la pared celular (Foto 3). Estas morfologías han sido descritas por Curtis y Emery (1993) y relacionadas con la características reológicas de los medios de cultivo para más de 10 especies vegetales cultivas *in vitro* entre las que se destacan *Nicotiana tabacum* (células alargadas) y *Papaver somniferum* (células esféricas) a escala de matraz agitado.



a. Campo claro 10X **b.** Campo oscuro 10X (Fluorescencia)

Foto 3. Morfología y viabilidad celular de cultivos *in vitro* de *Thevetia peruviana* (A: células esféricas. B: células cilíndricas).

Por otra parte la baja agregación celular observada en los cultivos (del orden de 0.3 – 1 mm), comparable a cultivos de *Anchusa officinalis* y *Nicotiana tabacum* (Yesil y Gurel, 2010), favorece y garantizan una adecuada transferencia de nutrientes a todas las células sin generarse gradientes o limitaciones importantes de estos, a las células internas de los agregados.

6.2 Efecto de la fuente de carbono y tamaño de inóculo

En este experimento se evaluó el efecto de la fuente de carbono y el tamaño del inoculo en el crecimiento celular y la producción de glicósidos, para lo cual se llevo a cabo un diseño experimental mediante superficie de respuesta variando la concentración de fuente de carbono entre 30 y 80 g/l y el tamaño de inoculo entre 1 y 6 g/l.

De acuerdo con la Tabla 4, la mayor concentración final de biomasa, 23,063 g/l, se alcanzó para la unidad experimental 2; sin embargo su rendimiento de 0,414 g biomasa/g sustrato, no fue el mayor. La unidad experimental 8 mostró tanto el mayor rendimiento de sustrato en biomasa (Yxs = 0,652 g biomasa/g sustrato) como el mejor índice de crecimiento (IC = 5,021), indicándonos que se dio un mayor aprovechamiento del sustrato disponible para la producción de biomasa.

Tabla 4. Matriz de resultados – Efecto de la fuente de carbono y tamaño de inoculo. Rendimientos Biomasa/Sustrato (Yxs) y producción de glicósidos a 16 días de cultivo.

	Factores		**Variables respuesta**				
Unidad experimental	**S_0 [g/l]**	**X_0 [g/l]**	**Yxs [g/g]**	**Glicósido**	**S_f [g/l]**	**X_f [g/l]**	**%IC**
1	55	5,554	0,301	---	21,36	15,693	1,826
2	80	5,068	0,414	---	36,595	23,063	3,551
3	55	2,136	0,141	---	30,046	5,671	1,655
4	80	2,046	0,097	---	49,801	4,965	1,427
5	81,952	3,258	0,176	---	51,864	8,553	1,625
6	55	3,312	0,424	---	24,50	16,234	3,902
7	30	1,458	0,257	---	7,46	7,252	3,974
8	28,047	2,432	0,652	---	9,33	14,644	5,021
9	30	3,766	0,406	---	4,16	14,262	2,787
10	55	3,514	0,154	---	23,99	8,297	1,361

En análisis de varianza (Tabla 5), nos indica que ninguna de las variables evaluadas (*valores p* > 0,05) presentan un efecto significativo sobre el rendimiento de biomasa/sustrato. Por otra parte el ajuste del modelo obtenido (estadístico R^2) indica que el modelo solo explica el 64,3095% de la variabilidad en el rendimiento biomasa/sustrato. Estos resultados nos podrían estar indicando que los rangos evaluados no fueron los mejores y que además pueden existir otras variables en el proceso, no identificadas aun, que afecten significativamente los rendimientos del mismo.

Tabla 5. ANOVA Rendimiento biomasa/sustrato (Yxs).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Sacarosa	0,0316082	1	0,0316082	1,32	0,3151
B:Inoculo	0,0227907	1	0,0227907	0,95	0,3849
AA	0,0207514	1	0,0207514	0,86	0,4050
AB	0,0185456	1	0,0185456	0,77	0,4290
BB	0,0187476	1	0,0187476	0,78	0,4267
Error total	0,0959777	4	0,0239944		
Total (corr.)	0,268917	9			

La Figura 4 corresponde a la superficie de respuesta estimada para el rendimiento de biomasa/sustrato.

Aunque el modelo obtenido en este diseño experimental no fue el mejor (R^2 = 64,3095%), se procedió a realizar un proceso de optimización del mismo que permitió determinar las condiciones óptimas (S_0 = 28 g/l; X_0 = 3,095 g/l) para alcanzar el máximo rendimiento biomasa/sustrato (Yxs = 0,518 g/g), y así poder tener nueva información que permita en estudios posteriores refinar las condiciones de cultivo y obtener un mejor modelo que describa adecuadamente el crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios.

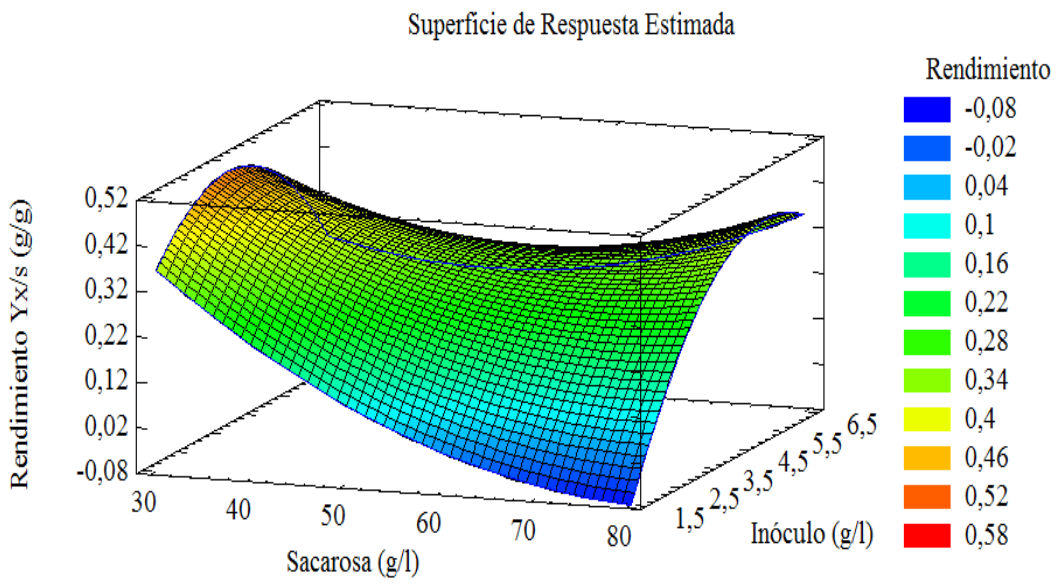


Figura 4. Superficie de respuesta estimada del rendimiento biomasa/sustrato (Yx/s) *vs.* Concentración de Inóculo (X_0) y Concentración Inicial de Sustrato (S_0).

Otros estudios desarrollados por Siwach y colaboradores (2011) encontraron que la mejor concentración de sacarosa para la obtención de callos a partir de segmentos nodales de *Thevetia peruviana* fue de 30 g/l, cercano al valor obtenido en este trabajo para suspensiones celulares (28 g/l); indicándonos así que dicho valor es el correcto para el cultivo *in vitro* de esta especie vegetal independiente de la modalidad de cultivo desarrollado, sólido o en suspensión.

La validación de las condiciones óptimas encontradas se realizo mediante el montaje de una cinética de crecimiento (Figura 5) en medio SH suplementado, pH de 5.8 antes de autoclavar, fotoperiodo natural, temperatura ambiente y 110 rpm con una concentración inicial de biomasa (inóculo) de 2,81 g/l y 28 g/l de sacarosa. Como puede notarse la concentración inicial del inoculo es un poco inferior a la concentración optima reportada, lo cual se debió a limitaciones en la parte metodológica que dificultaron garantizar inóculos 100% homogéneos (debido a microagregados celulares) imposibilitando obtener valor exactos de los inóculos.

A los 16 días de cultivo se alcanzo una concentración de biomasa final de 12,90 g/l, lo cual corresponde a una productividad de 0,63 g/l*día y un rendimiento global biomasa/sustrato de 0,34 g biomasa/g sustrato. El bajo rendimiento obtenido está directamente relacionado con la disminución en el inoculo, además debido a que esta validación se realizo tiempo después al diseño experimental, la variabilidad celular a la cual están sometidos los cultivos (Sajc et al., 2000), puede generar variaciones en los parámetros cinéticos, como en el caso aquí observado del rendimiento.

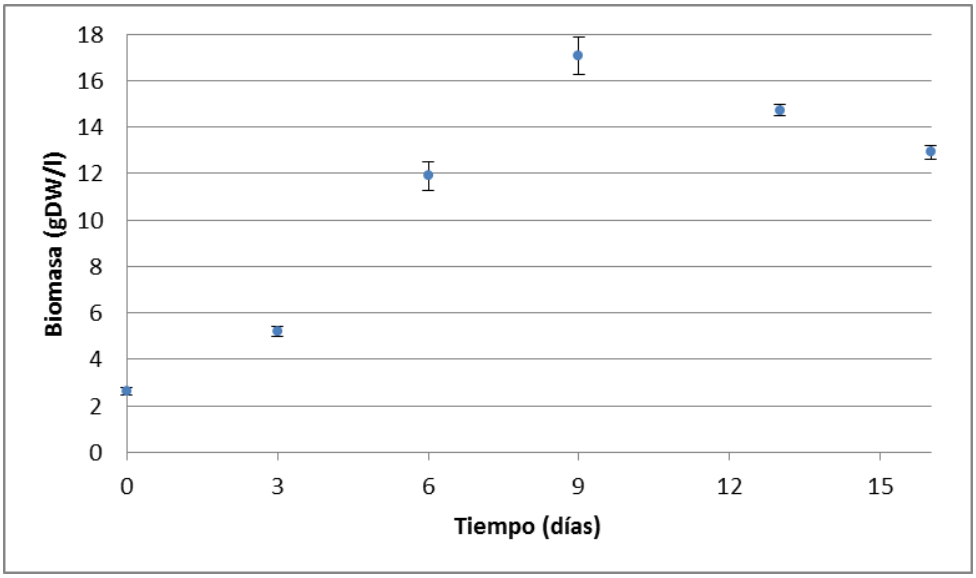


Figura 5. Validación del punto óptimo **(**Xo= 2,61 g/l y So=28 g/l).

El comportamiento cinético de las células mostró una fase de crecimiento exponencial entre los días 0 y 9, seguida por una etapa de muerte celular, no presentando fase de latencia ni estacionaria (Figura 5). La ausencia de fase de latencia en este cultivo puede deberse a que las células utilizadas provenían de cultivos mantenidos bajo las mismas condiciones de cultivo (medio, agitación, iluminación y fotoperiodo) generando así una previa adaptación celular a estas condiciones.

Nótese que ya en el día 9 se alcanzó la máxima concentración de biomasa, 17,07 g/l, correspondiendo a una productividad y rendimiento de 1,607 g/l*día y 0,41 g biomasa/g

sustrato, respectivamente, datos importantes a tener en cuenta al momento de pensar escalar el proceso.

A partir de la Figura 5 se pudieron obtener los siguientes parámetros cinéticos que caracterizan el crecimiento de la biomasa:

- Velocidad específica máxima de crecimiento[2] (μ_{max}): 0,215 d^{-1}
- Tiempo de duplicación[3] (t_d): 3,22 días

Estos valores son comparables con los de otras especies vegetales en cultivos sumergidos, cuyas velocidades específicas de crecimiento se encuentran en el rango de 0,15 a 0,63 d^{-1}, tanto a escala de matraz como de biorreactor de tanque agitado (Tabla 6), lo cual convierte a este cultivo en una plataforma promisoria para un potencial proceso productivo de metabolitos de interés comercial.

Tabla 6. Velocidades específicas máximas de crecimiento en cultivos celulares en suspensión de distintas especies vegetales.

Línea celular	μ_m (d^{-1})	t_d (d)	Volumen (L)	Referencia
Taxus cuspidata	0,05	13,86	20	(Son et al., 2000)
	0,15	4,62	0.25	(Naill y Roberts, 2005)
Lavandula vera	0,16 – 0,11	4,16 – 6,12	3	(Pavlov et al., 2005)
Centella asiatica	0,18	3,85	2	(Rozitama et al., 2006)
H. muticus	0,21	3,30	14	(Ruffoni et al., 2010)
T. peruviana	**0,215**	**3,22**	**0.25**	**Este trabajo**
Vitis vinifera	0,34	2	1	(Eibl y Eibl, 2007)
Arroz transgénico	0,40 – 0,47	1,73 – 1,47	5	(Trexler et al., 2002)
O. affinis	0,50 – 0,48	1,38 – 1,44	0,1 – 1	(Dörnenburg, 2008)
Stevia rebaudiana	0,63	1,10	0.150	(Mathur y Shekhawat, 2012)

[2] μ (fase exponencial) = ln (x/x_0) /$(t-t_0)$, x y x_0 son las concentraciones celulares en la fase exponencial en el tiempo t y t_0, respectivamente. t_0 es el tiempo en el que inicia el crecimiento exponencial. μ se calculó como la pendiente de la recta obtenida en un gráfico de ln (x/x_0) vs. $(t-t_0)$.

[3] Tiempo de Duplicación: td = (ln 2)/ μ.

La cinética de consumo de azúcares (Figura 6) muestra hidrólisis de la sacarosa durante todo el cultivo y un consumo constante y preferencial de la glucosa respecto a la fructosa, comportamiento también observado en cultivos de *Eschscholtzia califórnica* (Taticek et al., 1990) y *A. officinalis* (Su y Arias, 2003) en donde se presento una velocidad de hidrólisis de la sacarosa mayor pero comportamiento similar respecto al consumo de glucosa y fructosa.

El rendimiento observado de 0,41 g biomasa/g sustrato al día 9, es similar y/o ligeramente mayor al de otras especies vegetales reportadas a escala de matraz agitado, como el caso de *Catharantus roseus* (0,40 g/g), *Digitalis lanata* (0,29 – 0,4 g/g), *Nicotiana tabacum* (0,4 g/g) y *Elaeis guineensis* (0,18 g/g) (Taticek et al., 1991, Gorret et al., 2004).

Al comparar la cinética de consumo azucares con la de crecimiento de biomasa (Figura 6), se nota una relación directa entre el cese del crecimiento celular y el consumo casi completo de la fuente de carbono y energía en el día 9, indicándonos que este puede ser el sustrato limitante en el proceso y estableciendo las bases para posteriores cultivos por lotes alimentados con miras a la obtención de mayores concentraciones de biomasa

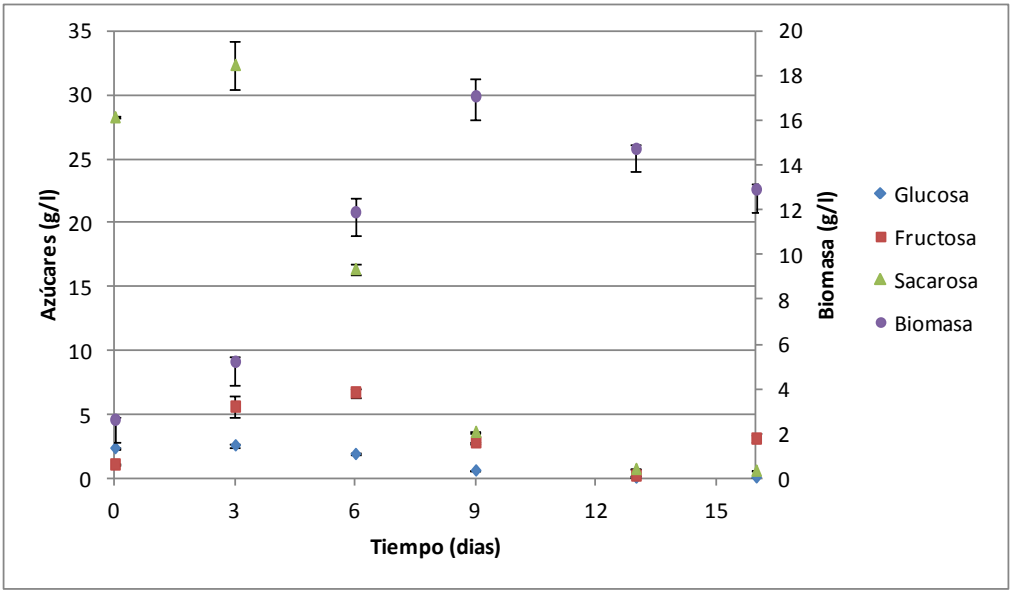


Figura 6. Cinética de consumo de sustrato y biomasa (Xo= 2,61 g/l y So=28 g/l).

Referente a la producción de metabolitos secundarios, no se detectó la presencia de peruvósido o betulina en ninguna de las unidades experimentales evaluadas a los 16 días del cultivo, lo cual puede deberse a las bajas concentraciones del mismo (menor a 10 mg/l límite de detección del método analítico), y/o a una degradación de estos compuestos en el tiempo por parte de las células, ya que estos compuestos generalmente son producidos en momentos específicos como mecanismo de respuesta a condiciones adversas y en caso de no ser usados pueden ser reciclados por las mismas células (Seigler, 1998).

6.3 Efecto del tipo de tapón y la relación área superficial/volumen

Con miras a evaluar por primera vez los requerimientos de oxigeno de las células de *T. peruviana* en suspensión, se analizó el efecto del tipo de tapón (aluminio o algodón) y la relación área superficial/volumen (mediante diferentes volúmenes de trabajo), usados como medida indirecta del suministro de oxígeno a las células, en el crecimiento de biomasa, para lo cual se realizo un estudio empleando un diseño experimental multifactorial categórico (Tabla 7).

Tabla 7. Matriz experimental - Efecto del volumen de trabajo y del tipo de tapón sobre el crecimiento celular.

	Factor A	**Factor B**	
Unidad Experimental	**Volumen (ml)**	**Tapón (tipo)**	**Biomasa (g/l)**
1	10	Aluminio	13,20
2	10	Aluminio	13,10
3	10	Aluminio	12,20
4	10	Algodón	12,80
5	10	Algodón	13,40
6	10	Algodón	10,40
7	20	Aluminio	14,20

8	20	Aluminio	14,85
9	20	Aluminio	13,45
10	20	Algodón	11,45
11	20	Algodón	12,95
12	20	Algodón	13,55
13	30	Aluminio	14,67
14	30	Aluminio	13,90
15	30	Aluminio	14,87
16	30	Algodón	13,13
17	30	Algodón	11,67
18	30	Algodón	13,97

En este ensayo no se detectó presencia de metabolitos secundarios tipo glicósidos cardiotónicos por lo que el análisis estadístico de resultados que se presenta a continuación se centró en el crecimiento celular obtenido a los 16 días de cultivo.

Como puede observarse en el ANOVA (Tabla 8), sólo el tipo de tapón tiene un efecto significativo sobre el crecimiento celular (valor-*p* = 0,0233), siendo mejor el resultado obtenido con el tapón de aluminio que con el tapón de algodón (Figura 7).

Tabla 8. ANOVA: Tipo de tapón - Relación área superficial/volumen

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
Volumen (As/V)	4,56182	2	2,28091	2,24	0,1487
Tipo de Tapón	6,86598	1	6,86598	6,75	0,0233
INTERACCIONES					
AB	0,816249	2	0,408124	0,40	0,6780
RESIDUOS	12,201	12	1,01675		
TOTAL (CORREGIDO)	24,4451	17			

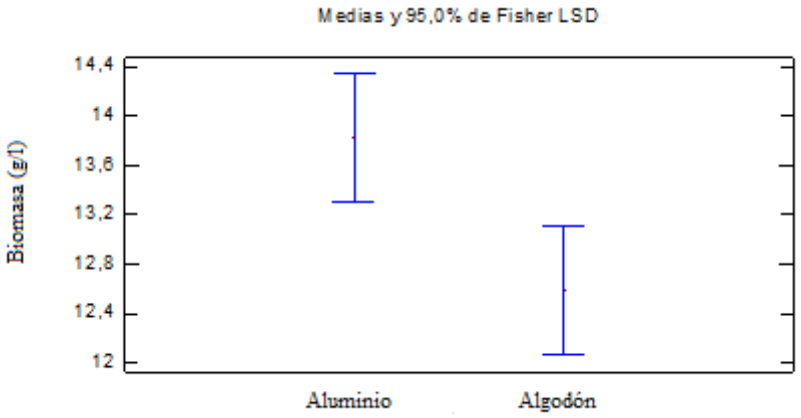


Figura 7. Grafico de medias. Tipo de tapón (Aluminio – Algodón)

Según lo reportado por Marino y colaboradores (1995) el tapón de aluminio es menos permeable a la transferencia de gases tales como el O_2, CO_2 y C_2H_4, lo cual es un primer indicio de que las células de *T. peruviana* en suspensión no presentan una alta demanda de oxígeno en los cultivos sumergidos, la cual si puede ser satisfecha por el tapón de algodón (Ramírez et al., 2010; Marino et al., 1995).

Cultivos de células vegetales de *Uncaria tomentosa* (Trejo et al., 2007), *Beta vulgaris* (Rodríguez y Galindo, 1999) e híbridos de *Prunus pérsica* × *P. amygdalus* (Marino et al., 1995), entre otros, han crecido satisfactoriamente en matraz agitado con tapones de aluminio indicando, que al igual que en nuestro caso, los requerimientos de oxígeno no son tan elevados; caso contrario a lo reportado por Orozco y Monroy (2009) quienes observaron, en cultivos de *Azadirachta indica*, limitación por oxígeno al usar tapones de aluminio afectando el crecimiento de biomasa y contenido de azadiractina.

Por otra parte, el que se haya presentado crecimiento de biomasa en ambas condiciones de oxigenación corrobora lo antes dicho en relación a que el sustrato limitante del proceso, bajo las condiciones aquí trabajadas, es la fuente de carbono y energía y no el oxigeno suministrado, aclarando claro está, que deben realizarse estudios posteriores para determinar los niveles óptimos de suministro de oxigeno de manera tal que no se presente limitación o exceso de este elemento en el cultivo.

6.4 Efecto de la velocidad de agitación en cultivos en biorreactor de tanque agitado

Con el fin de estudiar el comportamiento cinético de las células de *T. peruviana* al ser sometidas por primera vez al cambio de escala y configuración en un biorreactor de tanque agitado, se evaluó el efecto de la velocidad de agitación sobre el crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios.

La mínima velocidad de agitación evaluada fue aquella que garantizo una correcta homogenización del cultivo, 200 rpm, adicionalmente se realizaron cultivos a 300 y 400 rpm con miras a evaluar la resistencia de las células de *T. peruviana* al estrés hidrodinámico generado a estas velocidades de agitación.

Las variables respuesta en cada uno de los cultivos fue el volumen de células sedimentadas durante los 20 días de cultivo, la concentración final de biomasa y producción de metabolitos secundarios.

6.4.1 Velocidad de agitación 200 rpm

6.4.1.1 Efecto sobre el crecimiento celular

Este cultivo se inició con una concentración de biomasa de 1,92 g/l en un fermentador de tanque agitado de 7L con 3L de medio. A los 20 días de cultivo se alcanzó una concentración final de 13,93 g/l, para una productividad de 0,60 g/l*día.

La Foto 4 muestra el incremento en el volumen de células sedimentadas durante el cultivo, pudiéndose observar el crecimiento de la concentración celular.

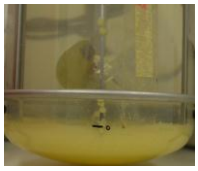
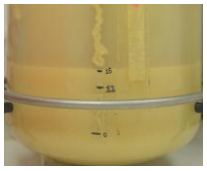
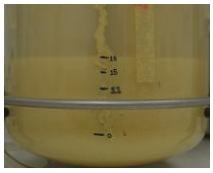
Día 0	Día 12	Día 15	Día 18	Día 20
				

Foto 4. Volumen de células sedimentadas (CVS[4]) cultivo en biorreactor de tanque agitado, 200 rpm.

La cinética de crecimiento de este cultivo, en términos del volumen de células sedimentadas en el tiempo (Figura 8) muestra un comportamiento exponencial durante todo el tiempo del cultivo, presentado ausencia de una fase de latencia, estacionaria o de muerte celular.

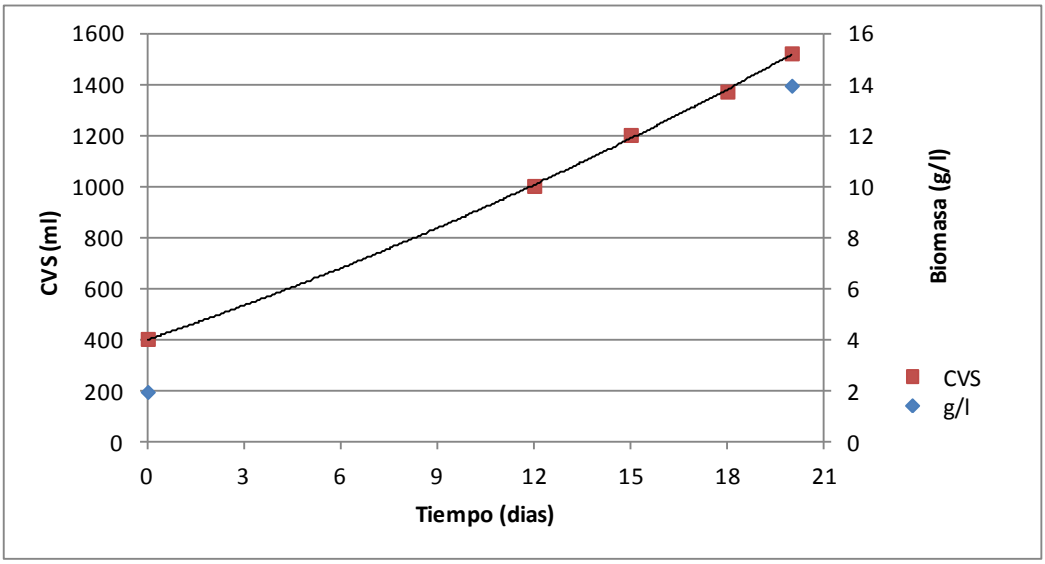
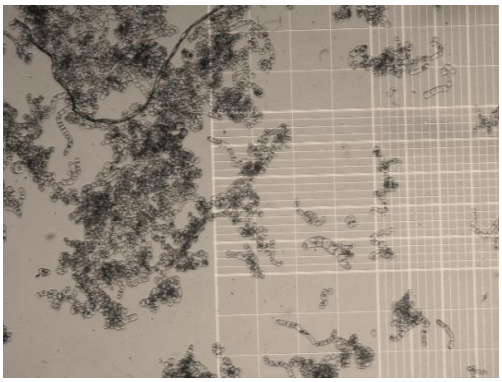


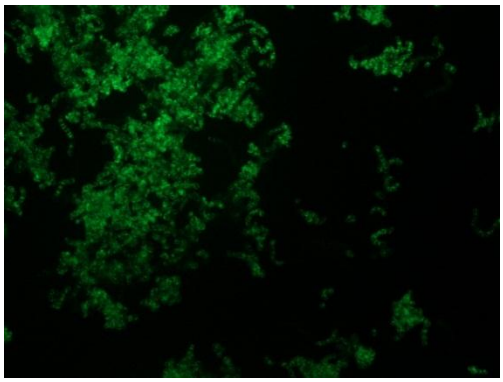
Figura 8. Cinética de crecimiento (CVS *vs* tiempo). Cultivo en biorreactor de tanque agitado, 200 rpm.

[4] CVS: Cell Volumen After Sedimentation (Volumen de células sedimentadas)

La Foto 5 muestra una alta viabilidad de las células a los 20 días de cultivo indicando y corroborando el continuo crecimiento celular observado mediante el volumen de células sedimentadas.



a. Campo claro 4X



b. Campo oscuro 4X (Fluorescencia)

Foto 5. Viabilidad celular al día 20 de cultivo en biorreactor de tanque agitado a 200 rpm.

Al comparar el crecimiento celular obtenido en biorreactor a 200 rpm, con el cultivo a escala de matraz agitado y teniendo en cuenta los tiempos finales de los cultivos, la productividad no se vio muy afectada, pasando tan solo de 0,63 g/l*día (a los 16 días de cultivo) a 0,60 g/l*día (a los 20 días de cultivo) para matraz agitado y biorreactor, respectivamente. Sin embargo si se comparan las productividades de los dos cultivos al día 9, donde se alcanzo la máxima concentración de biomasa en matraz, se observa una gran disminución en este parámetro al pasar de 1,607 g/l*día (matraz) a 0,64 g/l*día[5] (biorreactor).

Por otra parte aunque no son del todo comparables las cinéticas de crecimiento obtenidas en matraz y biorreactor por estar en escalas diferentes (DW *vs.* CVS) si es posible observar que la tendencia en el cultivo en biorreactor es la de un crecimiento más lento, pues hasta el día 20 puede observar que sigue presentándose un incremento

[5] Este valor fue determinado mediante interpolación usando la ecuación polinómica de la línea de tendencia de la figura 7.

en el volumen de células sedimentadas y la concentración de biomasa (13,93 g/L) es inferior a la alcanzada en matraz agitado al día 9 de cultivo (17,07 g/L), lo cual nos indica que el cambio en el sistema de cultivo (de matraz a biorreactor) tiene un efecto negativo en la velocidad de crecimiento celular, comportamiento ampliamente observado en otros cultivos de células vegetales al ser sometidos a cambios de configuración (Rodríguez & Galindo, 2003). Un caso parecido al nuestro es el observado en cultivos de *Eschscholtzia califórnica* en donde se observo una disminución en la velocidad de consumo de la fuente de carbono al pasar de matraz a biorreactor de 1 litro, este cambio de escala causo adicionalmente una disminución en la captura de oxigeno por parte de las células lo que conllevo a disminuciones en los rendimientos del cultivo (Taticek et al., 1990).

6.4.1.2 Efecto sobre el consumo de sustrato

Los resultados de concentración de azúcares obtenidos por HPLC para glucosa, fructosa y sacarosa al día 20 fueron 0.407, 7.149 y 0.144 g/l, respectivamente, indicándonos que se dio un consumo casi completo de sacarosa y glucosa obteniendo así un rendimiento biomasa/sustrato[6] (Yx/s) de 0,43 g biomasa/g sustrato, valor que al ser comparado con el obtenido a escala de matraz al día 9 (0,41 g biomasa/g sustrato) es muy parecido, lo cual nos brinda un primer indicio de que el metabolismo asociado al crecimiento celular aunque es más lento en el biorreactor, pues como se observo en el crecimiento celular se requiere de más tiempo para alcanzar la misma concentración de biomasa, no se está viendo alterado a nivel de flujos ya que se está haciendo uso de la misma cantidad de sustrato para producir un gramo de biomasa en ambos sistemas.

Este comportamiento de disminución del metabolismo celular, generado por el cambio de escala y cambios reológicos en las sistemas de cultivo ya ha sido abordado por otros autores (Trujillo y Valdez, 2006); un caso especifico es el observado por Takeda y colaboradores (1998) quienes al someter cultivos de *Carthamus tinctorius* (Safflower) y Eucalipto a condiciones de estrés hidrodinámico en un biorreactor de tanque agitado

[6] Este parámetro se determinó tomando sacarosa como sustrato

pudieron determinar variaciones en los niveles de ADN, ATP y la actividad respiratoria de las células, viéndose afectado así el metabolismo celular.

6.4.1.3 Efecto sobre la producción de metabolitos

En este cultivo se concentraron por liofilización 550 ml de medio sobrenadante, obteniéndose 1,3 gramos de material, el cual mostró unas características físicas parecidas a una matriz polimérica (Foto 6), lo cual es interesante pues puede indicarnos la posible producción de algún polímero extracelular como respuesta a las condiciones de cultivo que ayude a soportar el estrés hidrodinámico generado en el biorreactor de tanque agitado.

Foto 6. Medio sobrenadante liofilizado-200 rpm.

La producción y liberación de polisacáridos ya ha sido reportada para varios cultivos que se encuentran en las últimas etapas de la fase de crecimiento exponencial (Taticek et al., 1991; Rodríguez y Galindo, 1999; Sims et al., 2000) lo cual claramente conlleva a una alteración en la viscosidad del medio (Kato et al., 1978). Esta característica observada en el medio sobrenadante en el proceso de liofilización se corroboró por la dificultad presentada en el proceso de filtrado al momento de determinar el peso seco de la biomasa.

En este cultivo se detectó mediante pruebas fitoquímicas la presencia escasa de flavonoides y glicósidos cardiotónicos en muestras liofilizadas del medio de cultivo,

siendo esta la primera vez que se detecta la producción de flavonoides en cultivos *in vitro* de células de *Thevetia peruviana* en suspensión, ya que los reportes de la presencia de estos compuestos en la planta se limitan a las hojas (Abe et al., 1995).

Debido al gran interés comercial de estos compuestos (flavonoides), gracias a la actividad farmacológica, antioxidante, anti-inflamatoria, antimicrobial e hipolipidémica, entre otras, que presentan (Julsing et al., 2006; Guoet al., 2013; Tewtrakul et al., 2002), es posible encontrar diversos estudios de su producción a escala de matraz y reactor para otras especies vegetales (Namdeo, 2007). Cultivos de *Glycyrrhiza uralensis* elicitados con metil jasmonato y fenilalanina en reactores tipo balón de 5 litros alcanzaron rendimientos de 55,42 mg/l y 132.36 mg/l (flavonoides totales) para cultivos en *batch* y *fed-batch*, respectivamente (Guo et al., 2013). Por otra parte Zhao y colaboradores (2003) alcanzaron concentraciones de 12,2 mg/g en cultivos de *Saussurea medusa* en biorreactores de tanque agitado de 5 litros observando además que esta producción está directamente relacionada con los tamaños de los agregados celulares.

Por otra parte no se logró identificar mediante HPLC la presencia de glicósidos cardiotónicos en el cultivo. Esta diferencia, en comparación con las pruebas fitoquímicas es explicable al notar que para las pruebas fitoquímicas se trabajó con una muestra altamente concentrada de medio sobrenadante lo cual incrementó la concentración de metabolitos en la muestra a analizar a un nivel tal que fue posible detectarlos colorimétricamente, mientras que las muestras usadas para HPLC correspondían a medio extracelular sin ningún tratamiento.

6.4.2 Velocidad de agitación 300 rpm

6.4.2.1 Efecto sobre el crecimiento celular

Este cultivo se inició con una concentración de biomasa de 1,83 g/l y a los 20 días de cultivo se alcanzó una concentración final de 13,60 g/l, lo cual corresponde a una

productividad de 0,59 g/l*día. La foto 7 muestra el incremento en el volumen de células sedimentadas durante el cultivo, pudiéndose observar el crecimiento celular.

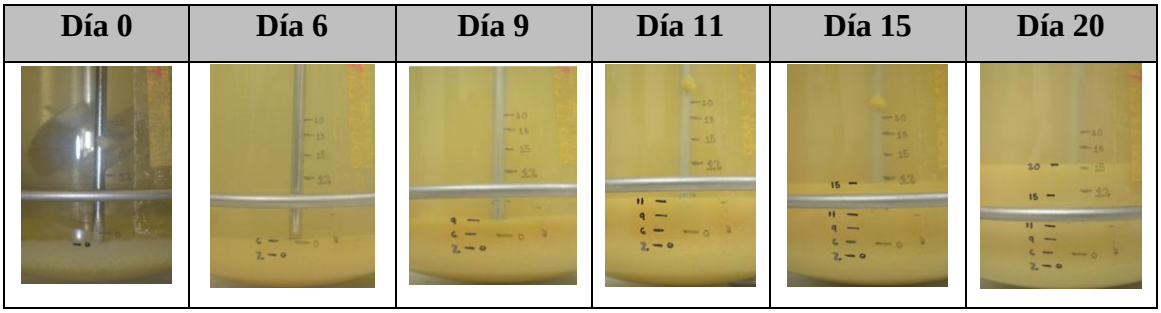


Foto 7. Volumen de células sedimentadas (CVS) – 300 rpm.

En este cultivo se observa una fase de latencia en los primeros 3 días, seguida de una fase de crecimiento exponencial, la cual no se observa que termine a los 20 días de cultivo (Figura 9), tiempo en el cual, al igual que en el cultivo a 200 rpm, se observó una buena viabilidad celular. (Foto 8).

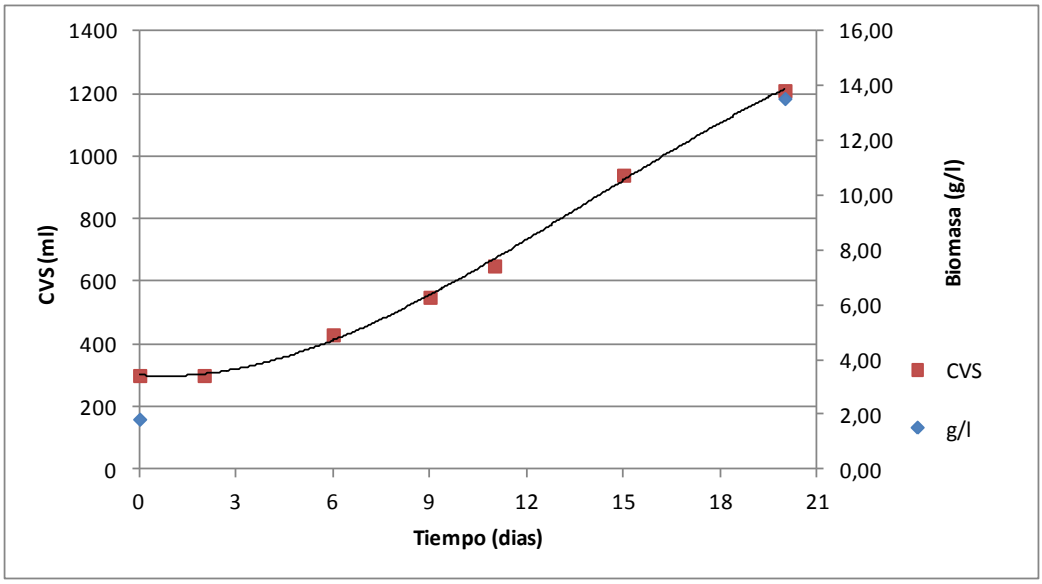
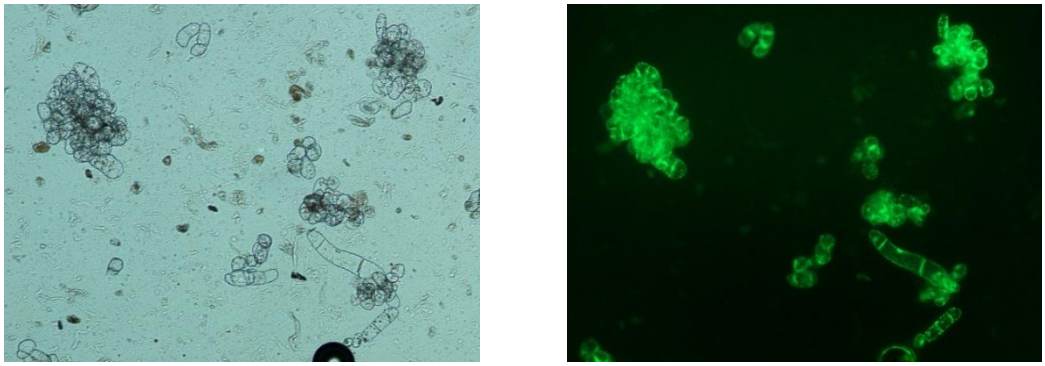


Figura 9. Cinética de crecimiento (CVS *vs* tiempo). Cultivo en biorreactor de tanque agitado 3L, 300 rpm.



a. Campo claro 10X. **b.** Campo oscuro 10X (Fluorescencia).

Foto 8. Viabilidad celular al día 20 de cultivo en biorreactor a 300 rpm.

La aparición de una fase de latencia en los primeros 3 días y el incremento de los residuos celulares "*debris*" al final del cultivo son los primeros indicios de un cambio significativo en las condiciones reológicas de cultivo que hacen que las células deban tomarse un tiempo para adaptarse a este nuevo ambiente y que su resistencia a los esfuerzos de corte generados bajo esta condición de agitación es más baja, contrario a los observado en los cultivos previos (200 rpm y matraz agitado) donde el crecimiento celular inició desde el día 0 y no se observó presencia de *debris* celular.

6.4.2.2 Efecto sobre el consumo de sustrato

Los resultados de azúcares obtenidos por HPLC para glucosa, fructosa y sacarosa al día 20 fueron 1.550, 3.364 y 0.000 g/l, respectivamente, indicándonos que se dio un consumo completo de la fuente de carbono, obteniendo así un rendimiento biomasa/sustrato (Yx/s) de 0,42 g biomasa/g sustrato.

Hasta el momento se observa que los rendimientos biomasa/sustrato de los cultivos en biorreactor no difieren significativamente de los obtenidos a escala de matraz, reiterando que el metabolismo celular asociado al crecimiento no pierde eficiencia aunque si es un poco más lento, lo cual afectaría el proceso en términos de tiempos de producción y por ende en costos del mismo.

6.4.2.3 Efecto sobre la producción de metabolitos

La liofilización de 550 ml de medio sobrenadante, generó 1,09 gramos de material seco. Las características físicas del medio liofilizado (Foto 9) fueron las mismas que para el cultivo a 200 rpm (matriz polimérica); la única variación fue que en este caso se presentó una coloración un poco más amarilla; de igual forma se observó un incremento en la viscosidad de la muestra.

Foto 9. Medio sobrenadante liofilizado-300 rpm

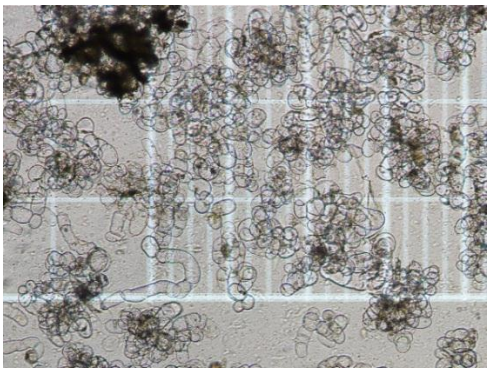
Los resultados fitoquímicos esta vez sólo mostraron ser positivos para flavonoides (en cantidades medias); no se detectó la presencia de glicósidos cardiotónicos, ni de otros compuestos, lo cual se corroboró mediante análisis en HPLC de la muestra concentrada.

La reiterada aparición de presencia de flavonoides en el cultivo en biorreactor indica que hay un estimulo físico, generado posiblemente por los incrementos en los esfuerzos de corte a los que se están viendo sometidos las células en esta configuración, que están induciendo la producción y liberación de estos compuestos al medio de cultivo.

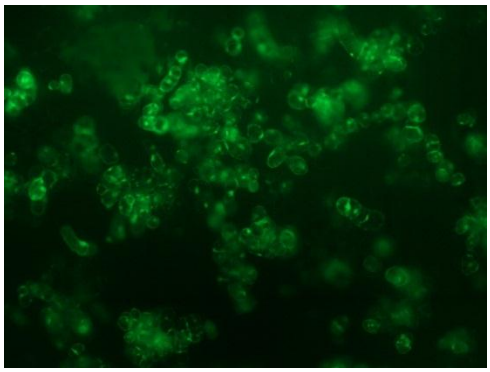
6.4.3 Velocidad de agitación 400 rpm

6.4.3.1 Efecto sobre el crecimiento celular

Este cultivo se inició con una concentración de biomasa de 2,22 g/l y a los 20 días de cultivo se alcanzó una concentración final de 12,84 g/l con buena viabilidad (Foto 11), correspondiendo a una productividad de 0,53 g/l*día.



a. Campo claro 10X.



b. Fluorescencia 10X.

Foto 10. Viabilidad celular día 20 de cultivo en biorreactor de tanque agitado- 400 rpm.

Este crecimiento celular nuevamente es corroborado con el registro fotográfico realizado durante el tiempo de cultivo (Foto 11) en el cual puede observarse el incremento en el volumen de células sedimentadas.

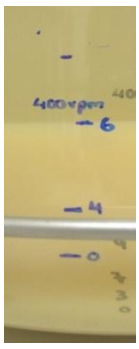
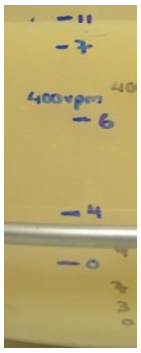
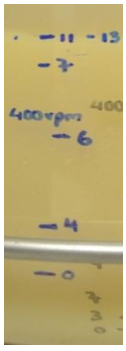
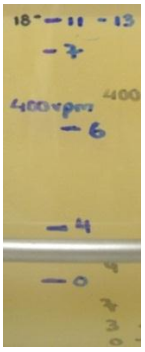
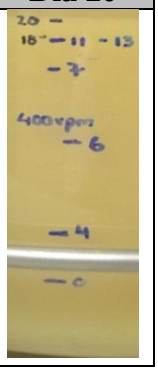
Día 0	Día 4	Día 6	Día 11	Día 13	Día 18	Día 20
						

Foto 11. Volumen aproximado de células sedimentadas (CVS) – 400 rpm.

A diferencia de los cultivos anteriores (200 y 300 rpm) en este caso fue posible observar una clara y clásica cinética de crecimiento (Figura 10) con sus diferentes etapas (latencia, exponencial y estacionaria), con una productividad de biomasa a los 11 días de cultivo de 0,92 g/l*día, tiempo en el que se alcanzó prácticamente la concentración de biomasa máxima.

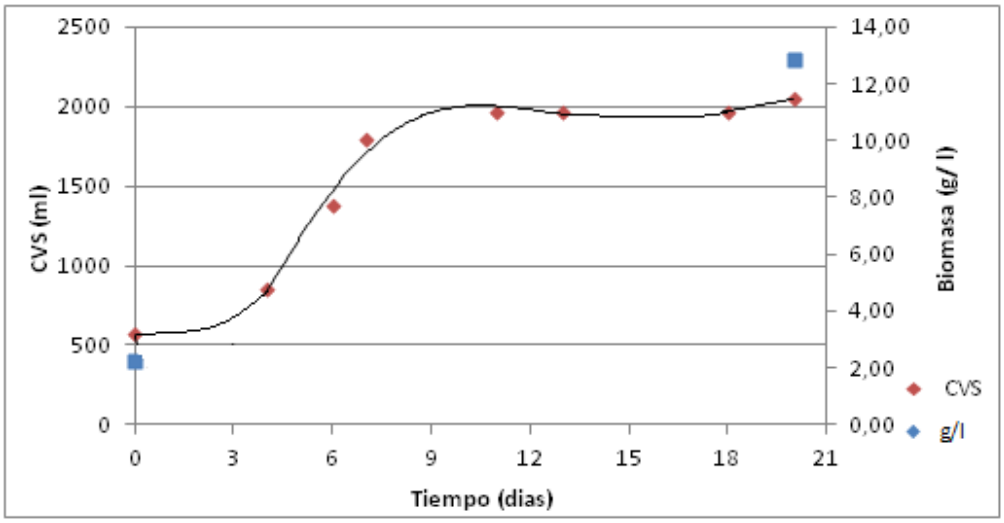


Figura 10. Cinética de crecimiento (CVS *vs* tiempo). Cultivo en biorreactor de tanque agitado 3L, 400 rpm.

A partir de la cinética de crecimiento se pudieron obtener los siguientes parámetros cinéticos que caracterizan el crecimiento de biomasa:

- Velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}): 0,153 d^{-1}
- Tiempo de duplicación (t_d): 4,52 días

Al comparar estos valores con los obtenidos a escala de matraz agitado (μ_{max} = 0,215 d^{-1} y t_d = 3,22 días) notamos que el crecimiento en el biorreactor de tanque agitado es un poco más lento, (corroborado también en los cultivos a 200 y 300 rpm) lo cual puede deberse al cambio en la configuración del sistema de cultivo al pasar de un matraz agitado, donde las células se encuentran sometidas a una agitación de tipo orbital, a un

biorreactor de tanque agitado en donde la agitación es generada por un impulsor. Este comportamiento es de esperarse y se ha observado en cultivos de *Rubia tinctorum* (Busto et al., 2007), *Taxus chinensis* (Pan et al., 2000), entre otros, pues las células requieren un periodo de adaptación a las nuevas condiciones de cultivo, en este caso al sistema de agitación, conllevando a un alargamiento en los tiempos de proceso, entre otras variables del mismo que pueden verse afectadas.

Al comparar los cultivos realizados en términos de biomasa (200, 300 y 400 rpm) a los 20 días (Tabla 9), observamos una ligera disminución en términos de las productividades, al incrementar la velocidad de agitación a 400 rpm, indicándonos que el incremento en la velocidad de agitación, y por ende el incremento de los esfuerzos de corte generados, tiene un efecto en el crecimiento celular. Este comportamiento también se ha reportado en cultivos de *Lavandula vera* (Pavlov et al., 2005) en biorreactor de tanque agitado de 3L, al incrementar la velocidad de agitación de 200 a 300 y 400 rpm. Cultivos de *Stizolobium hassjoo* también mostraron una disminución en la producción de biomasa de 21,5 g/l a 16 g/l al incrementar la velocidad de agitación de 300 a 400 rpm (Chen & Huang, 2000).

Tabla 9. Resumen de resultados de cultivos en biorreactor de tanque agitado.

Agitación (rpm)	Inóculo (g/l)	Biomasa final (g/l)	Tiempo cultivo (d)	Productividad (g/l*día)
200	1,92	13,93	20	0,60
300	1,83	13,60	20	0,59
400	2,22	12,84	20	0,53
			11	0,92

Sin embargo, realizando una comparación gráfica del comportamiento cinético obtenido para las 3 velocidades de agitación (Figura 11) observamos que se presentó una ligera inhibición o disminución en el crecimiento celular al pasar de 200 a 300 rpm, pero se observa completamente lo contrario al pasar a 400 rpm donde se incrementa la

velocidad de crecimiento obteniendo una concentración final de biomasa (12,84 gDW/l) muy parecida a la obtenida a 200 y 300 rpm (13,93 y 13,60 gDW/l, respectivamente) en un menor tiempo de cultivo pasando de 20 a tan sólo 11 días, lo cual tiene un efecto significativo sobre la productividad.

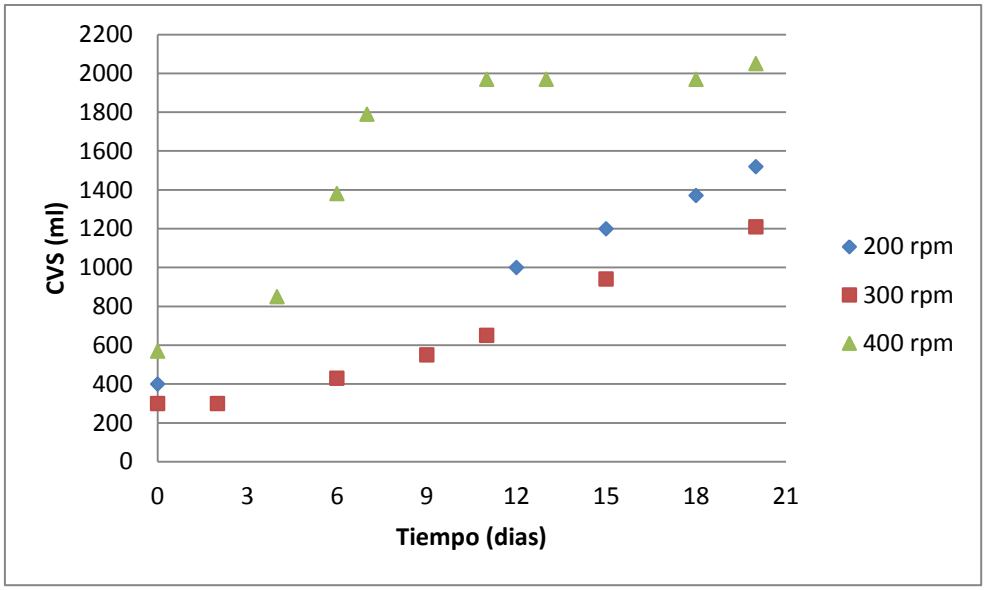


Figura 11. Cinéticas de crecimiento CVS *vs* tiempo. Cultivos en biorreactor 3L. (200, 300 y 400 rpm).

Diversos estudios demuestran que la sensibilidad a los esfuerzos de corte es relativa y muy dependiente de la especie a trabajar (Yesil y Gurel, 2010). Scragg y colaboradores (1988) lograron exitosamente tener cultivos de *Catharanthus roseus* en biorreactor de 3L a 1000 rpm sin observar pérdida de viabilidad luego de 5 horas, al igual que en cultivos de *Helianthus annuus* y *Pricrasma quassiodes* cultivados a 480 y 1000 rpm, mostrando que algunas especies vegetales pueden soportar condiciones semejantes a las usadas para el cultivo de microorganismos. Por otra parte, estudios posteriores corroboraron estos resultados al estudiar el efecto de la agitación (252 y 1002 rpm) sobre el crecimiento de cuatro especies vegetales diferentes, *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum*, *Cinchona robusta* y *Tabernaemontana divaricata*, no obteniendo

diferencias significativas en el crecimiento para *C. roseus* y *N. tabacum*, mientras que para *T. divarcata* y *C. robusta* el crecimiento se vio leve y totalmente afectado, respectivamente. Chen y Huang (2000) observaron que la mejor velocidad de agitación para cultivos de *Stizolobium hassjoo* fue de 300 rpm obteniendo 21,5 Gdw/l, superior a lo obtenida para velocidades de 100, 200, 400 y 500 rpm. Estos casos nos indican claramente que la respuesta celular a condiciones de estrés hidrodinámico es totalmente especie-dependiente y debe ser estudiado para cada especie, sistema y condiciones específicas del cultivo (Meijer et al., 1993).

6.4.3.2 Efecto sobre el consumo de sustrato

Los resultados de azúcares obtenidos por HPLC para glucosa, fructosa y sacarosa a los 20 días de cultivo fueron 0.562, 1.265 y 0.000 g/l, respectivamente, indicándonos que se dio un consumo casi completo de la fuente de carbono, obteniendo así un rendimiento observado biomasa/sacarosa (Yx/s) de 0,38 g biomasa/g sacarosa. En la tabla 10 se muestran comparativamente los rendimientos obtenidos en cada uno de los cultivos.

Tabla 10. Rendimientos (Yx/s) en cultivos a escala de matraz agitado y biorreactor.

Sistema (Condición de cultivo)	Rendimiento Yx/s (g/g) – Tiempo (días)
Matraz agitado	0,41 – 9 días
Biorreactor – 200 rpm	0,43 – 20 días
Biorreactor – 300 rpm	0,42 – 20 días
Biorreactor – 400 rpm	0,38 – 20 días

Nótese que el único rendimiento que difiere un poco es el obtenido en el cultivo en biorreactor a 400 rpm, ya que los demás están por el orden de 0,41 g biomasa / g sustrato; aunque esta diferencia no es mucha, puede ser explicada por la prolongada

etapa estacionaria observada después del día 11 de cultivo, pues en esta etapa se puedo generar un consumo de fuente de carbono dedicada exclusivamente para mantenimiento celular y que claramente disminuyó el rendimiento del proceso en comparación al rendimiento que se hubiera calculado el día 11 si se contara con medición de azucares en este día, dato claramente necesario para conocer a mas profundidad estos comportamientos cinéticos.

6.4.3.3 Efecto sobre la producción de metabolitos

Para este cultivo se liofilizó un volumen de 300 ml de medio sobrenadante, obteniéndose 1,31 gramos de material seco, más compacto que el obtenido en los cultivos pasados (Foto 12), pero de características físicas (matriz polimérica) similar.

Foto 12. Medio sobrenadante liofilizado- 400 rpm

Los resultados fitoquímicos nuevamente mostraron sólo ser positivos para flavonoides en cantidades medias.

Al analizar la producción de metabolitos secundarios en los cultivos en biorreactor de tanque agitado, es de resaltar la producción de flavonoides en los cultivos a 200, 300 y 400 rpm, la cual no había sido reportada en cultivos en suspensión de *Thevetia peruviana*, ya que en los estudios realizados a escala de matraz no se habían detectado este grupo de compuestos.

El incremento en los esfuerzos de corte al cual fueron sometidos los cultivos en biorreactor de tanque agitado pudieron ser los responsables de inducir la producción de estos metabolitos como mecanismo de respuesta ante las nuevas condiciones de estrés y a la misma vez los responsables de la disminución en el crecimiento celular, al comparar con los resultados obtenidos en matraz. Este comportamiento ya ha sido reportado para varias especies vegetales, como es el caso de cultivos celulares de *Taxus chinensis* donde Shi y colaboradores (2003) observaron que al aumentar el esfuerzo de corte se incrementó la actividad PAL, enzima crucial en la ruta metabólica de los fenilpropanoides. Por otra parte en cultivos de *Rubia tinctorum*, al pasar del cultivos en matraz a biorreactor de tanque agitado, Busto et al. (2007) obtuvieron un incremento de 233% en la concentración de antraquinonas.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La optimización de parámetros de cultivo es de suma importancia al momento de dar inicio a las posteriores etapas de escalado de cualquier proceso con miras a la disminución tanto de costos como tiempos de los mismos. En este trabajo observamos que es posible disminuir la fuente de carbono y energía, sacarosa, hasta 28 g/l, siendo este uno de los componentes que más inciden en el costo del proceso; sin embargo, la tendencia observada en el rango evaluado da claros indicios de que dicho valor puede ser aún menor.

En términos de aireación y oxigenación se presentó una diferencia significativa sobre el crecimiento celular según el tipo de tapón utilizado, observándose un mayor crecimiento con el tapón de aluminio, el cual ofrecía una menor transferencia de oxigeno al compararse con el tapón de algodón, lo cual indica de manera preliminar que bajo las condiciones ensayadas el requerimiento de oxígeno por parte de la células no es muy elevado, lo cual es importante tener en cuenta al momento del escalado para no ir a generar posibles condiciones de estrés oxidativo que afecten el crecimiento celular.

Al variar la velocidad de agitación en biorreactor de tanque agitado de 7L, con 3 litros de volumen de trabajo, desde 200 hasta 400 rpm, la viabilidad celular no se vio afectada y adicionalmente la velocidad de crecimiento fue mayor, indicando que estas células no sólo presentan buena tolerancia a los esfuerzos de corte generados por el impulsor, sino que éste estimula el crecimiento celular, disminuyendo significativamente los tiempos del cultivo pasando de 20 a tan sólo 11 días y obteniendo resultados similares en términos de producción de biomasa a los obtenidos a escala de matraz agitado.

Referente a la producción de metabolitos secundarios, a escala de matraz agitado no se encontró ninguna condición de cultivo (tamaño de inóculo, fuente de carbono o, aireación) que tuviera un efecto sobre la producción de estos compuestos. Por otra parte, a escala de biorreactor de tanque agitado fue posible establecer por primera vez la producción de flavonoides en cultivos celulares de *Thevetia peruviana*.

Finalmente tomando en cuentas los resultados obtenidos en la presente tesis, se recomienda para futuras investigaciones el desarrollo de modelos matemáticos que permitan describir de una manera precisa el crecimiento de las células de *Thevetia peruviana* tanto a escala de matraz como biorreactor de tanque agitado en función de variables que sean relevantes en el proceso.

Por otra parte es importante estudiar más a fondo los fenómenos de inducción de los metabolitos secundarios que se produjeron a escala de biorreactor (glicósidos cardiotónicos y flavonoides) con miras a su optimización y posterior extracción.

De igual manera es importante seguir trabajando en la elicitación de estos cultivos mediante otras estrategias, gracias a que según los resultados obtenidos en esta etapa temprana de escalado en términos de producción de biomasa, el proceso podría llevarse satisfactoriamente a mayores escalas con miras a obtener buenas cantidades de los productos.

Al pensar en el escalado del proceso es necesario profundizar en los fenómenos de transferencia de masa (principalmente oxigeno) y estrés hidrodinámico, los cuales pueden ir cobrando importancia al escalar el proceso.

9. BIBLIOGRAFIA

Abe, F., Chen, R., Yamauch, T., & Hq, C. (1996). Dinormonoterpenoids and their apiosylglucosides from *Thevetia peruviana*. *Phytochemistry*. *43*(1), 161–163.

Abe, F., Iwase, Y., & Yamauchi, T. (1995). Flavonol sinapoyl glycosides from leaves of *Thevetia peruviana*. *Phytochemistry*. *40*(2), 577 – 581.

Aguirre, A. (2010). Aporte al estudio de la producción de peruvósido y otros metabolitos secundarios en cultivos de células de *Thevetia peruviana* en suspensión e inmovilizadas. Universidad Nacional de Colombia - Sede Medellín. Tesis de Maestría en Ciencias- Biotecnología.

Akalezi, C., Liu, S., Li, Q. , Yu, J. , & Zhong, J. (1999). Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng*. *Process Biochemistry*. *34*(6-7), 639–642.

Ambang, Z., Bekolo, N., Petga, E., Dooh, J., & Asanga, A. (2007). Effect of crude extracts of *Thevetia peruviana* seeds on development of leaf spot disease of groundnut (*Arachis hypogaea L.*) caused by *Cercospora* sp . *African Crop Science Conference Proceedings*. *8*, 797–800.

Arias, M., Aguirre A., & Angarita, M. (2011). *Cultivo in vitro de celulas vegetales*. (E. A. Española, Ed.) (p. 180).

Arias, M., Angarita, M., Restrepo, J., Caicedo, L., & Perea, M. (2009). Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. *46*(3), 233–238.

Arias, M., Angarita, M., Aguirre, A., Restrepo, J., & Montoya, C. (2009). Strategies for the improvement of secondary metabolites in plant cell cultures. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*. *62*(1), 4881–4895.

Balandrin, M., Klocke, J., Wurtele, E., & Bollinger, W. (1985). Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*. *228*(4704), 1154–60.

Batra, A., & Zibbu, G. (2012). *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum.: A plant with enormous therapeutic potential. *Journal of Pharmacy Research*. *4*(12), 4461–4464.

Bernards, M. (2000). *Plant Secondary Metabolism : A Primer.* Pp. 1–13.

Bisset, N. (1961). Cardiac glycosides. A preliminary paper-chromatographic study of the glycosides from *T. peruviana*. *Annales Bogorienses. 4* (Part 2), 145 – 152.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Science. 161*(5), 839–851.

Busto, V., Rodríguez, J., Giulietti, A. y Merchuk, J. (2007). Effect of shear stress on anthraquinones production by *Rubia tinctorum* suspension cultures. *Biotechnology Progress*, *24*(1), 175–81.

Campos, P. J. A. (2009). *Determinacion de la actividad anticancerígena in vitro de los glicósidos cardiotónicos de los frutos de Thevetia ahouia (Cojón de costa e hojas largas) y Thevetia peruviana (Chilca) Familia Apocynaceae*. Tesis de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad del Salvador.

Chen, S., & Huang, S. (2000). Shear stress effects on cell growth and L -DOPA production by suspension culture of *Stizolobium hassjoo* cells in an agitated bioreactor. *Bioprocess Engineering*. 22, 5-12.

Chiou, S., Su, W., & Su, Y. (2001). Optimizing production of polyunsaturated fatty acids in *Marchantia polymorpha* cell suspension culture. *Journal of Biotechnology*. *85*(3), 247–57.

Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, *6*, 271–278.

Curtis, W. R., & Emery, a H. (1993). Plant cell suspension culture rheology. *Biotechnology and bioengineering*, *42*(4), 520–6.

De la Rosa, C., Torres, R., José, D., López, P., Enrique, M., Martínez, T., Luz, R., et al. (2005). Estudio fitoquímico preliminar y actividad biológica de los extractos de hojas, cortezas y semillas de Thevetia peruviana (Persoon) Schum. *Revista Dugandia*, *1*(1), 119–127.

Dewick, P. (2011). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. (P.M. Dewick, Ed.) (Second Edition., p. 515).

DiCosmo, F., & Misawa, M. (1995). Plant cell and tissue culture: alternatives for metabolite production. *Biotechnology Advances. 13*(3), 425–453.

Dörnenburg, H. (2008). Plant cell culture technology-harnessing a biological approach for competitive cyclotides production. *Biotechnology Letters*. *30*(8), 1311–21.

Eibl, R., & Eibl, D. (2007). Design of bioreactors suitable for plant cell and tissue cultures. *Phytochemistry Reviews*. *7*(3), 593–598.

Gata, L., Nogueira, J., Matos, O., & Bruno de Sousa, R. (2003). Photoactive extracts from *Thevetia peruviana* with antifungal properties against *Cladosporium cucumerinum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. *70*(1), 51–54.

Gorret, N., Bin Rosli, S. K., Oppenheim, S. F., Willis, L. B., Lessard, P. a, Rha, C., & Sinskey, A. J. (2004). Bioreactor culture of oil palm (Elaeis guineensis) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. *Journal of biotechnology*, 108(3), 253–63.

Guo, S., Man, S., Gao, W., & Liu, H. (2013). Production of flavonoids and polysaccharide by adding elicitor in different cellular cultivation processes of *Glycyrrhiza uralensis*. *Acta Physiol. Plant.* 35:679-686.

Hassan, M., & Saha, A. (2011). Studies on the antidiarrhoeal, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanol-extracted leaves of yellow oleander (*Thevetia peruviana*). *Open Veterinary Journal*. *1*, 28–31.

Huang, T. & McDonald, K. (2009). Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures. *Biochemical Engineering Journal*. *45*(3), 168–184.

Julsing, M., Koulman, A., Woerdenbag, H., Quax, W., & Kayser, O. (2006). Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. *Biomolecular Engineering*. *23*(6), 265–79.

Kareru, P., & Keriko, J. (2010). Anti-termite and antimicrobial properties of paint made from *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum. oil extract. *Afr. J. Pharm. 4*(2), 87–89.

Kieran, P., MacLoughlin, P., & Malone, D. (1997). Plant cell suspension cultures: Some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*. *59*(1-2), 39–52.

Kohls, S., Scholz, B., Teske, J., Zark, P., & Rullkötter, J. (2012). Cardiac glycosides from Yellow Oleander (*Thevetia peruviana*) seeds. *Phytochemistry*. *75*, 114–27.

Kohls, S., Scholz, B., Rullkötter, J., & Teske, J. (2012). Method validation of a survey of thevetia cardiac glycosides in serum samples. *Forensic Science International*. *215*(1-3), 146–51.

Loyola, V., & Vásquez, F. (Eds.). (2006). *Plant Cell Culture Protocols.* Second Edition.

Marino, G., Berardi, G., Ancherani, M., Arboree, C., Bologna, U., & Re, V. (1995). The effect of the type of closure on the gas compostion of the headspace and the growth of GF 677 peach×almond rootstock cell suspension cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant*. October, 207–210.

Mathur, S., & Shekhawat, G. (2012). Establishment and characterization of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cell suspension culture: an *in vitro* approach for production of stevioside. *Acta Physiologiae Plantarum*. *35*(3), 931–939.

Meijer, J., Ten Hoopen, H., Luyben, K., & Libbenga, K. (1993). Effects of hydrodynamic stress on cultured plant cells: A literature survey. *Enzyme and Microbial Technology*. *15*(3), 234–238.

Mulabagal, V., & Tsay, H. (2004). Plant cell cultures - An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering.* December, 29–48.

Mustafa, N.R., Winter, W. de., Iren, F., Verpoorte, R. (2011) Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols*. 6, 715-742.

Naill, M., & Roberts, S. (2005). Cell cycle analysis of *Taxus* suspension cultures at the single cell level as an indicator of culture heterogeneity. *Biotechnology and Bioengineering. 90*(4), 491–500.

Namdeo, A. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacognosy reviews*. *1*(1), 69–79.

Newman, R., & Yang, P. (2008). Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Molecular Interventios.* 36–49.

Odhiambo, P., Makobe, M., Boag, H., Muigai, A., & Kiesecker, H. (2010). *In vitro* regeneration of *Thevetia peruviana* Pers.K. Schum, family apocynaceae. *Scientific Conference Proceedings*. 81–91.

Oluwaniyi, O. (2010). Extractability of *Thevetia peruviana* glycosides with alcohol mixture. *African Journal of Biotechnology*. *6.* September, 2166–2170.

Orozco F., Hoyos R., & Arias M. (2002). Cultivo de células vegetales en biorreactores: un sistema potencial para la producción de metabolitos secundarios. *Revista Facultad Nacional de Agronomía. 55*(1), 1473–1495.

Orozco F., & Monroy, M. (2009). Efecto de la oferta de oxígeno sobre el crecimiento y la producción de terpenoides con células de *Azadirachta indica* en un biorreactor. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos, México. Tesis de Doctorado en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos .

Pan, Z., Wang, H., y Zhong, J. (2000). Scale-up study on suspension cultures of *Taxus chinensis* cells for production of taxane diterpene. *Enzyme and Microbial Technology*, *27*(9), 714–723.

Pavlov, A., Georgiev, M., & Ilieva, M. (2005). Production of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension in bioreactor: Effect of dissolved oxygen concentration and agitation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. *21*(4), 389–392.

Pérez, J. , & Sánchez, R. (2010). Efecto de la relación agitación-aireación sobre el crecimiento celular y la producción de Azadiractina en cultivos celulares de *Azadirachta indica* A. Juss. *Revista Facultad Nacional de Agronomía. 63*(1), 5293–5305.

Ramachandra R., & Ravishankar, G. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances. 20*(2), 101–53.

Ramírez, D., Muñoz, S., Atehortua, L., & Michel, F. (2010). Effects of different wavelengths of light on lignin peroxidase production by the white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* grown in submerged cultures. *Bioresource Technology. 101*(23), 9213–20.

Roca, W., & Mroginski, L. (Eds.). (1993). *Cutivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Segunda edición, p. 953).

Rodríguez M., & Galindo, E. (1999). Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture : A comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. *0229*, 687–693.

Rodríguez-Monroy, M., & Galindo, E. (2003). Las células vegetales, ¿frágiles para crecer en biorreactores? *Biotecnología*, *8*(2), 6–17.

Rozitama O., Abdullah, M., Hasan, M., & Rosfarizan, M. (2006). Kinects and modelling of cell growth and substrate uptake in *Centella asiatica* cell culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. *11*(M), 223–229.

Ruffoni, B., Pistelli, L., Bertoli, A., & Pistelli, L. (2010). Plant cell cultures: bioreactors for industrial production. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. *698*, 203–21.

Sajc, L., Grubisic, D., & Vunjak, G. (2000). Bioreactors for plant engineering: An outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*. *4*(2), 89–99.

Sasson, A., Silva, E., & Ratledge, C. (1992). Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: Biotechnological and economic aspects. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires.* 14, 59-74

Scragg, A., Allan, E., & Leckie, F. (1988). Effect of shear on the viability of plant cell suspensions. *Enzyme and Microbial Technology*. 10, 4–10.

Shah, M., Jabeen, M., & Ilahi, I. (2003). *In vitro* callus induction, its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticum aestivum* L.) var. LU-26S. *Pakistan Journal of Botany. 35*(2), 209–217.

Shanks, J. & Morgan, J. (1999). Plant "hairy root" culture. *Current Opinion in Biotechnology. 10*(2), 151–5.

Shi, Z., Yuan, Y., Wu, J., y Shang, G. (2003). Biological responses of suspension cultures of *Taxus chinensis* var. mairei to shear stresses in the short term. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 110*, 61–74.

Sims, I., Middleton, K., Lane, A., Cairns, A., & Bacic, A. (2000). Characterisation of extracellular polysaccharides from suspension cultures of members of the Poaceae. *Planta*. *210*(2), 261–8.

Siwach, P., Grover, K., & Gill, A. (2011). The influence of plant growth regulators, explant nature and sucrose concentration on *in vitro* callus growth of *Thevetia peruviana* schum. *Asian J. Biotechnol*. *3*(3), 280 – 292.

Son, S., Choi, S., Lee, Y., Choi, K., Yun, S., Kim, J., Park, H., et al. (2000). Large-scale growth and taxane production in cell cultures of *Taxus cuspidata* (Japanese yew) using a novel bioreactor. *Plant Cell Reports. 19*(6), 628–633.

Su, W., & Arias, R. (2003). Continuous plant cell perfusion culture: bioreactor characterization and secreted enzyme production. Journal of bioscience and bioengineering, 95(1), 13–20.

Tagbor, T. (2009). The anti-termite properties and basic phytochemicals of eight local plants and the chemical characterisation of *Thevetia peruviana* (pers) K. Schum in Ghana. December, 220.

Taha, H., Farag, S., Shams, K., Abdel, N., & Seif, M. . (2011). *In vivo* and *in vitro* studies on *Thevetia* species growing in Egypt. II. Establishment of *in vitro* tissue culture system and production of cardiac glycosides. *Journal of American Science*. *7*(3).

Takeda, T., Kitagawa, T., Takeuchi, Y., Seki, M., & Furusaki, S. (1998). Metabolic responses of plant cell culture to hydrodynamic stress. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, *76*(2), 267–275.

Taticek, R., Moo-Young, M., & Legge, R. (1990). Effect of bioreactor configuration on substrate uptake by cell suspension cultures of the plant Eschscholtzia californica. *Applied microbiology and Biotechnology* (33), 280–286.

Taticek, R., Moo-Young, M., & Legge, R. (1991). The scale-up of plant cell culture: Engineering considerations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. *24*(2), 139–158.

Tewtrakul, S., Nakamura, N., Hattori, M., Fujiwara, T., & Supavita, T. (2002). Flavanone and flavonol glycosides from the leaves of *Thevetia peruviana* and their HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase inhibitory activities. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. *50*(5), 630–5.

Trejo., G., Sepúlveda, G., Trejo J., Cerda, C., De la Torre, M., Rodríguez, M., & Ramos, A. (2007). Hydrodynamic stress induces monoterpenoid oxindole alkaloid accumulation by *Uncaria tomentosa* (Willd) DC cell suspension cultures via oxidative burst. *Biotechnology and Bioengineering. 98*(1), 230–238.

Trexler, M., McDonald, K., & Jackman, A. (2002). Bioreactor production of human alpha(1)-antitrypsin using metabolically regulated plant cell cultures. *Biotechnology Progress*. *18*(3), 501–8.

Trujillo Roldán, M., & Valdez Cruz, N. (2006). El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, *48*(3-4), 269–280.

Verpoorte, R., & Heijden, R. (1999). Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology*. *21*, 467–479.

Verpoorte, R., & Memelink, J. (2002). Engineering secondary metabolite production in plants. *Current Opinion in Biotechnology. 13*(2), 181–7.

Villa, F., Hormaza, A., & Arias, M. (2011). Thevetin B: glicósido cardiotónico predominante en *Thevetia peruviana*. *Scientia et Technica*, (49), 298–303.

Weathers, P., Towler, M., & Xu, J. (2010). Bench to batch: advances in plant cell culture for producing useful products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. *85*(5), 1339–51.

Yesil, O., & Gurel, A. (2010). Large scale cultivation of plant cell and tissue culture in bioreactors. *Transworld Research*. *661*(2), 1–54.

Zhao, D., Huang, Y., Jin, Z., Qu, W., & Lu, D. (2003). Effect of aggregate size in cell cultures of *Saussurea medusa* on cell growth and jaceosidin production. *Plant Cell Reports*. *21*(11), 1129–33.

Zhong, J., & Yoshida, T. (1995). High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: Effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzyme and Microbial Technology*. *0229* (95), 1073–1079.