



**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**FACULTAT DE FÀRMACIA**



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



**Susana Mangas Alonso  
2009**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE  
PRODUCTES NATURALS, BIOLOGIA VEGETAL I EDAFOLOGIA

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

Susana Mangas Alonso  
2009

**UNIVERSITAT DE BARCELONA**

**FACULTAT DE FARMÀCIA**

**DEPARTAMENT DE  
PRODUCTES NATURALS, BIOLOGIA VEGETAL I EDAFOLOGIA**

**Programa de doctorado: Medicaments, alimentació i salut  
Bienni 2004-2006**

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

**Memoria presentada por Susana Mangas Alonso para optar al título de doctor por la  
Universitat de Barcelona**

**Los directores,**

**La doctoranda,**

**Dr. Javier Palazón  
Barandela  
Facultat de Farmàcia  
Universitat de Barcelona**

**Dra. Mercè Bonfill  
Baldrich  
Facultat de Farmàcia  
Universitat de Barcelona**

**Susana Mangas Alonso**

**Susana Mangas Alonso  
2009**

## ARTÍCULOS y CONGRESOS

En el desarrollo de este trabajo se han logrado diferentes resultados, los cuales han permitido hasta el momento, la obtención de las siguientes publicaciones:

Artículos:

Mangas, S.; Hernández-Vázquez, L.; Palazón, J. y Navarro-Ocaña, A. Valuable phytochemicals with medicinal and bioactive properties: Commercial plants and resins a source of  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina y *epi*-lupeol. *Journal Separation Science*. (2009) (enviado)

Mangas, S.; Moyano, E.; Osuna, L.; Cusidó, R.M.; Bonfill, M. y Palazón, J. Triterpenoid saponin content and the expression level of some related genes in calli of *Centella asiatica*. *Biotechnology Letters*. 2008, vol. 30, núm. 10, p. 1853-1859.

Moyano, E.; Bonfill, M.; Mangas, S.; Cusidó, R.M.; Piñol, M.T.; Palazón, J. Centellosides production and expression level of genes encoding their synthesis in *Centella asiatica in vitro* cultures. *Journal of Biotechnology*. 2007, vol. 131S, p. S45.

Mangas, S.; Bonfill, M.; Osuna, L.; Moyano, E.; Tortoriello, J.; Cusidó, R.M.; Piñol, M.T.; Palazón, J. The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of *Centella asiatica*, *Ruscus aculeatus* and *Galphimia glauca* cultured plants. *Phytochemistry*. 2006, vol. 67, núm. 18, p. 2041-2049.

Bonfill, M.; Mangas, S.; Cusidó, R.M.; Moyano, E.; Osuna, L.; Palazón, J.; Piñol, M.T. Identification of triterpenoid compounds of *Centella asiatica* by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2006, vol. 20, núm. 2, p.151-153.

Capítulo de libro:

Mangas, S.; Moyano, E.; Hernández-Vázquez, L.; Bonfill, M. *Centella asiatica* (L.) Urban: an updated approach. En Palazón, J. y Cusidó R.M. (eds.). *Plant Secondary Terpenoids*. Trivandrum: Research Signpost, 2009.

Los resultados también fueron presentados en los siguientes congresos:

Mangas S.; Bonfill M.; Moyano E.; Palazón J. Biotransformació: d'amirina a centellòsids mitjançant cultius cel·lulars de *Centella asiatica*. Sociedad Catalana de Biología. *VI Jornadas de Fisiología Vegetal. Noves percepcions i estratègies en la Fisiologia Vegetal*. Barcelona, España, 2008.

Mangas, S.; Bonfill, M.; Cusidó, R.M.; Moyano, E.; Piñol, M.T.; Palazón, J. Producción *in vitro* de saponinas triterpénicas de *Centellas asiatica* en cultivos celulares. XVII Reunión de la Sociedad española de Fisiología Vegetal - X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Alcalá de Henares, España, 2007.

Mangas S.; Bonfill M.; Cusidó R.M.; Moyano E.; Palazón J. Cultius de cèl·lules en suspensió de *Centella asiatica*: Elicitació i producció de centellòsids. Sociedad Catalana de Biología. *V Jornadas de Fisiología Vegetal. Noves percepcions i estratègies en la Fisiologia Vegetal*. Barcelona, España, 2007.

Bonfill, M.; Mangas, S.; Cusidó, R.M.; Moyano, E.; Piñol, M.T.; Palazón, J. *In vitro* production of triterpenoid saponines from non-differentiated cells of *Centella asiatica*. 50 Years of the Phytochemical Society of Europe. Cambridge, UK, 2007.

Bonfill, M.; Mangas, S.; Cusido, R.M.; Moyano, E.; Piñol, M.T.; Palazón, J. Ursane saponins of *Centella asiatica*: analytical techniques. 5th Internacional Symposium on Chromatography of Natural Products. Lublin, Poland, 2006.

Mangas S.; Bonfill M.; Moyano E.; Palazón J. Identificació i producció *in vitro* de saponines triterpèniques de *Centella asiatica*. Sociedad Catalana de Biología. *III Jornadas de Fisiología Vegetal: Noves percepcions i estratègies en la Fisiologia Vegetal*. Barcelona, España, 2005

Mangas S.; Bonfill M.; Moyano E.; Palazón J. Biotransformació: d'amirina a centellòsids mitjançant cultius cel·lulars de *Centella asiatica*. Sociedad Catalana de Biología. *VI Jornadas de Fisiología Vegetal. Noves percepcions i estratègies en la Fisiologia Vegetal*. Barcelona, España, 2005.

Mangas, S.; Bonfill, M.; Moyano, E.; Palazón, J. Producción *in vitro* de saponinas triterpénicas de *Centella asiatica*. VI Reunión de la Sociedad Española de Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales. Córdoba, España, 2005.

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis se ha realizado con la financiación del Ministerio de Educación y Ciencia mediante la concesión de los proyectos BIO2002-03614, 2005SGR00545, BIO2005-05583 y actualmente FBG-305118. También, agradecer a la Universitat de Barcelona por su ayuda para la realización de la tesis mediante su programa de becas (*Beca de Recerca i Docència*) en que se favorece la formación de investigadores y el aprendizaje en las tareas docentes del departamento.

Agradecer a mis directores de tesis, Dr. Javier Palazón Barandela y la Dra. Mercè Bonfill Baldrich por aceptar la dirección de este trabajo, por todos los conocimientos aprendidos, por encontrar siempre una solución a los problemas y por su paciencia. También, agradecer a la Dra. María Teresa Piñol Serra, simplemente por aceptarme en el grupo y permitirme entrar en el mundo de las plantas medicinales. A la Dra. Rosa María Cusidó Vidal, solo por ser tan buena persona aunque, alguna que otra vez le hayamos dado algún *mal de cap*, a parte de agradecerle por toda su ayuda delante de cualquier problema que hubiera surgido. A la Dra. Elisabeth Moyano Claramunt por ser una alta y clara voz de la conciencia, y por todos los buenos momentos compartidos.

En el desarrollo de este trabajo, tengo que agradecer la colaboración de la Dra. Lidia Osuna, y Dra. Liliana Hernández Vázquez, sin su ayuda parte de esta tesis nunca se hubiera realizado, y de igual modo, al Dr. Arturo Navarro Ocaña por toda la caracterización realizada que ha dado luz a este trabajo. A parte de dar las gracias a todos ellos, por su fantástica publicidad gastronómica de México, los descubrimientos se resuelven mejor con el estómago lleno de buena comida.

También agradecer a la Dra. Silvia Fornalé por todos los conocimientos aprendidos sobre el fantástico mundo de la RT-PCR. A la Dra. Marta Esther Golemiowski por el tiempo compartido y su presentación de Argentina.

También agradecer al Dr. Ding de la Universidad de Shangai por el material vegetal de *Centella asiatica* cedido, pues sin ellos, literalmente no hubiera existido trabajo.

De igual modo, agradecer a los Servicios Científico-Técnicos del Parc Científic, concretamente al Servicio de Cromatografía líquida y al Servicio de Confocal, sin su ayuda no se hubiera podido acabar la tesis.

Un paréntesis especial a mis compañeros de trabajo, que echando números creo que me he pasado más tiempo con ellos que en casa, y hemos arreglado el mundo y la política exterior

alemana, más veces que nadie. A Òscar Expósito por descubrir que el silencio puede ser un sistema de comunicación y por aguantarme en mis momentos de tedio, a Miriam Onrubia por demostrar que aún quedan personas sensibles en esta vida y por todos los aperitivos que aún nos quedan. A Israel Benítez por los conocimientos de física del billar. Y a todos aquellos que han formado parte de este laboratorio y de los cuales siempre he ganado algo: Sophie, Albert, Hussein, Emilia, las Martas, Maria Luisa, Noelia. También un agradecimiento a nuestros vecinos de al lado (Juan, Joan, Xavi, Karen) y a los de arriba (Edison, Laura, Gloria, Jean) por compartirlo todo.

De forma personal, me gustaría agradecer a mis amigas, a mi gran grupo de biólogas: Teresa, Marta, Mireia, Berta, Irene, Miriam, Anna, Arantxa, Gemma, Sheila, por todo su apoyo y amistad, y por escucharme cuando necesitaba desahogarme. Al fin y al cabo si no tienes con quien compartir las cosas, poco sirve tu trabajo.

Y por último, pero el primero en mi cabeza, a mi familia, lo único que sabes que nunca falla. Por ello, agradecer a mis padres y a mi hermana, por estar ahí, en las cosas buenas y en las malas. Por ayudarme a ser como soy, con mis virtudes y haciendo buenos mis defectos. Sin olvidar nunca, las dotes culinarias de mi madre que han dado energía a este cerebro de hija. Muchas gracias.

En definitiva, agradecer a todas estas buenas (y las que se me olvidan) personas que de manera directa o indirecta me han permitido la realización de este trabajo.

Moltes Gràcies a tots.



Sólo cuando se haya cortado el último árbol, sólo cuando se  
haya contaminado el último río, sólo cuando se haya pescado el  
último pez, sólo entonces te darás cuenta que el dinero no se come.

**Proverbio de los Indios Cris, Canadá**

No pretendamos que las cosas  
cambien, si siempre hacemos lo mismo

**Albert Einstein**

---

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>i</b>
<b>Justificación y objetivos</b> .....	<b>iii</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>9</b>
1.1-. Breve historia de las plantas medicinales.....	9
1.2-. <i>Centella asiatica</i> .....	12
1.2.1-. Descripción botánica.....	14
1.2.2-. Principios activos.....	16
1.2.2.1-. Saponinas.....	17
1.2.2.2-. Biosíntesis de la formación de saponinas triterpénicas.....	19
1.2.3-. Interés farmacológico de <i>C. asiatica</i> .....	26
1.2.3.1-. Acción cicatrizante.....	26
1.2.3.2-. Acción antiulcerante.....	27
1.2.3.3-. Patologías vasculares.....	28
1.2.3.4-. Acción sobre el Sistema Nervioso.....	30
1.2.3.5-.Acción antitumoral.....	31
1.2.3.6-. Otros efectos.....	32
1.2.4-. Mecanismos de acción.....	33
1.2.5-. Farmacocinética.....	35
1.2.6-. Toxicidad.....	35
1.3-. Utilización de los cultivos celulares para la producción de metabolitos secundarios.....	36
1.3.1-. Estrategias para la mejora de los cultivos celulares.....	38
1.3.1.1-. Selección de líneas celulares con elevada producción del metabolito de interés.....	38
1.3.1.2-. Obtención de medios nutritivos de producción y de las condiciones óptimas de cultivo.....	39
1.3.1.3-. Inmovilización celular.....	39
1.3.1.4-. Sistemas de elicitación.....	40
1.3.1.5-. Biotransformación celular.....	40
1.3.1.6-. Escalado de los cultivos celulares a nivel de biorreactores.....	41
1.3.2-. Técnicas de micropropagación de <i>Centella asiatica</i> .....	41
1.3.3-. Cultivos <i>in vitro</i> de <i>Centella asiatica</i> y ensayos de producción biotecnológica.....	43

# Índice

---

<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>49</b>
2.1-. Material vegetal.....	49
2.1.1-. Proceso de esterilización.....	49
2.1.2-. Obtención de plántulas estériles de <i>C. asiatica</i> .....	50
2.1.2.1-. Germinación de semillas naturales <i>in vitro</i> .....	50
2.1.2.2 -. Obtención de semillas artificiales de <i>Centella asiatica</i> .....	52
2.2-. Inducción y cultivo de callo.....	57
2.2.1-. Estudio del curso de crecimiento del callo: determinación del peso fresco y peso seco.....	60
2.3-. Establecimiento de los cultivos de células en suspensión.....	61
2.3.1-. Determinación del crecimiento.....	62
2.3.2-. Determinación de viabilidad.....	62
2.4-. Extracción y determinación de saponinas y esteroides.....	64
2.4.1-. Protocolo de extracción de saponinas triterpénicas y esteroides.....	64
2.4.1.1-. Extracción a partir de material seco.....	65
2.4.1.2-. Extracción a partir de medio líquido.....	66
2.4.2-. Análisis cualitativo: TLC.....	66
2.4.2.1-. Desarrollo cromatográfico.....	66
2.4.2.2-. Identificación por espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	67
2.4.3-. Análisis cuantitativo: HPLC.....	68
2.4.3.1-. Determinación de saponinas triterpénicas.....	69
2.4.3.2-. Determinación de esteroides.....	71
2.4.3.3-. Determinación de amirinas.....	72
2.5-. Experimentos de elicitación de los cultivos.....	73
2.5.1-. Elicitación.....	73
2.5.1.1-. Elicitación de plantas.....	74
2.5.1.2-. Elicitación de suspensiones celulares.....	74
2.6-. Experimentos de biotransformación utilizando células de <i>Centella asiatica</i> .....	75
2.6.1-. Reactivos y equipos.....	76
2.6.2-. Obtención de $\alpha$ - o $\beta$ - amirina de fuentes naturales.....	77
2.6.3-. Análisis cualitativo por cromatografía en capa fina de resinas y plantas.....	77
2.6.4-. Análisis cuantitativo de triterpenos por HPLC de resinas y plantas comerciales.....	78

2.6.5- Aislamiento de $\alpha$ y $\beta$ amirina.....	80
2.6.5.1- Separación de $\alpha$ -amirina del copal blanco de Tepoztlan por cromatografía en capa preparativa .....	80
2.6.5.2- Separación preparativa $\beta$ -amirina .....	80
2.6.6- Administración del sustrato a los cultivos de células en suspensión, usando como codisolvente DMSO.....	81
2.6.7- Administración del sustrato a los cultivos de células en suspensión usando $\beta$ -ciclodextrina, como transportador.....	81
2.6.8- Extracción de triterpenos y análisis por TLC y HPLC .....	83
2.6.8.1- Células en suspensión .....	83
2.7- Análisis de expresión génica.....	83
2.7.1- Obtención del control interno.....	87
2.8- Análisis estadístico .....	87
<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>91</b>
3.1- Obtención de material vegetal.....	91
3.1.1- Semillas naturales .....	91
3.1.2- Germinación <i>in vitro</i> de semillas artificiales .....	93
3.2- Desarrollo de un sistema óptimo para la inducción de tejido de callo .....	97
3.3- Estudio de la producción de biomasa de callo de <i>Centella asiatica</i> .....	101
3.4- Identificación de las saponinas triterpénicas de <i>Centella asiatica</i> por TLC y espectrometría de masas .....	105
3.4.1- Cromatografía en capa fina (TLC) .....	105
3.4.2- Espectrometría de masas .....	107
3.5- Estudios de la producción <i>in vitro</i> de saponinas triterpénicas en callo de <i>Centella asiatica</i> .....	110
3.6- Estudios de la producción en planta: Efecto de la elicitación con jasmonato de metilo .....	117
3.6.1- Cambios morfológicos inducidos por la elicitación.....	119
3.6.2- Curso de producción de centelósidos .....	120
3.6.3- Niveles de fitoesteroles.....	122
3.7- Estudio comparativo de la producción de centelósidos y fitoesteroles en plantas y callos.....	123
3.8- Análisis a nivel génico de la producción saponinas y fitoesteroles .....	125

# Índice

---

3.8.1-. Selección del “housekeeping” .....	125
3.8.2-. Análisis por RT-PCR.....	127
3.9-. Producción de centelósidos en los cultivos de células en suspensión .....	128
3.9.1-. Estudio del crecimiento y la producción de centelósidos, en suspensiones celulares de <i>Centella asiatica</i> .....	129
3.9.2-. Optimización de la producción mediante la utilización de reguladores del crecimiento.....	132
3.9.3-. Elicitación de cultivos celulares.....	134
3.10-. Biotransformación: Estudio de la bioconversión de $\beta$ -amirina en saponinas triterpénicas .....	150
3.10.1.-. Aislamiento y análisis cualitativo de amirinas:.....	153
3.10.2-. Análisis cuantitativo por HPLC de amirinas en resinas y plantas: .....	155
3.10.3-. Aislamiento cuantitativo de $\alpha$ - y $\beta$ -amirina.....	157
3.10.4-. Biotransformación del precursor $\alpha$ -amirina usando acetona como cosolvente. Efecto permeabilizador del DMSO.....	161
3.10.5-. Biotransformación de $\alpha$ -amirina usando $\beta$ -ciclodextrina como transportador .....	168
<b><u>Conclusiones.....</u></b>	<b><u>175</u></b>
<b><u>Bibliografía.....</u></b>	<b><u>181</u></b>
<b><u>Anexo de análisis estadístico .....</u></b>	<b><u>199</u></b>
<b><u>Anexo de publicaciones .....</u></b>	<b><u>217</u></b>

## Abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
4PU-30	N-(2-cloro-4-piridil)-N'-fenilurea
AcOEt	Acetato de etilo
bAS	$\beta$ -amirina sintasa
BA	Bencil adenina
CCP	Cromatografía en capa preparativa
CYS	Cicloartenol sintasa
DAF	Diacetato de fluoresceína
DEPC	Diethyl pirocarbonato
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DMSO	Dimetil sulfoxido
EM	Espectrometría de masas
EtOH	Etanol
FPP	Farnesil difosfato
FPS	Farnesil difosfato sintasa
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GA <sub>3</sub>	Ácido giberelico
HPLC	Cromatografía de líquida de alta resolución
IAA	Ácido indolacético
IBA	Ácido indolbutírico
IP	Ioduro de propidio
KIN	Quinetina
MeJa	Jasmonato de metilo
MeOH	Metanol
MS	Murashige y Skoog
NAA	Ácido naftalenacético
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGR	Reguladores del crecimiento
PF	Peso fresco
PS	Peso seco
RMN	Resonancia magnética nuclear
rRNA	RNA ribosómico
RT	Retrotranscriptasa
SH	Schenck-Hildebrandt
SQS	Escualeno sintasa
TECA	Extracto de planta seca de <i>Centella asiatica</i>
TTFCA	Fracción triterpénica total de <i>Centella asiatica</i>
TLC	Cromatografía en capa fina
$\mu$ M	Micromolar

## Justificación y objetivos

Los terpenos constituyen una de las más amplias familias de compuestos, y presentan a la vez, una gran diversidad estructural y funcional. Todos ellos, comparten un precursor común en su biosíntesis, la molécula de isopentenil difosfato. Dentro de este grupo, se encuentran los triterpenos, compuestos que integran 6 unidades de 5 átomos de carbono derivadas del isopentenil difosfato. Los triterpenos están distribuidos en todos los seres vivos y desempeñan importantes funciones fisiológicas, concretamente, en las plantas, algunos de ellos pueden tener acción hormonal, como los brasinoesteroides, o ser componentes de membranas, como algunos fitoesteroles, actuando en la regulación de la permeabilidad de las mismas y confiriéndoles estabilidad, de igual modo que actúa el colesterol en las membranas animales.

Pero la diversidad metabólica de los vegetales es muy grande, y junto a estos triterpenos y sus derivados de distribución universal en las plantas, también se pueden encontrar otros compuestos, que tienen distribuciones taxonómicas más reducidas, siendo algunos de ellos específicos de determinados géneros y familias. Estos triterpenos, formados por rutas metabólicas secundarias suelen desempeñar funciones de tipo ecológico participando, muchas veces, en los sistemas de defensa del vegetal frente al ataque de patógenos. Este es el caso de las saponinas triterpénicas, que poseen un sistema policíclico-terpenoide con un grupo hidroxilo que se encuentra esterificado, por una corta cadena de azúcares.

Las saponinas son un grupo de metabolitos vegetales de alta significación, no sólo debido a muchas de las funciones ecológicas atribuidas a estas estructuras en plantas, sino también a la acción terapéutica de varios de estos compuestos.

*Centella asiatica* es una planta medicinal usada por la medicina Ayurveda (medicina tradicional india) desde la antigüedad, fundamentalmente para el tratamiento de afecciones de la piel. Actualmente, esta planta ha cobrado un singular interés para la industria farmacéutica y cosmética debido a sus efectos, científicamente demostrados, sobre la síntesis del colágeno, de ahí su papel en la cicatrización de heridas, tratamiento de la dermatitis, celulitis, etc. Problemas de índole geopolíticos, en las zonas del planeta donde es cultivada, así como la situación de riesgo en la que se halla, en su hábitat natural, debido a su recolección indiscriminada durante cientos de años, ha provocado en esta última década, un desabastecimiento del mercado, justo en los momentos en que su demanda se veía incrementada.

En *Centella asiatica*, la droga que se comercializa esta constituida por la parte aérea, fundamentalmente las hojas, que son los órganos que acumulan las mayores cantidades de sus

## Justificación y obtejivos

---

principios activos, los centellósidos, que son mayoritariamente saponinas triterpénicas con el núcleo del ursano. Un anillo pentacíclico, con un grupo hidroxilo en la posición 3, sustituido por una cadena de unos 3 restos de azúcar.

Por todo ello, empresas del sector farmacéutico y cosmético han manifestado su interés por desarrollar procesos biotecnológicos para conseguir la producción *in vitro* de centellósidos. Entre estas empresas se encuentra la multinacional del sector químico-farmacéutico COGNIS SA. que ha actuado como EPO en el proyecto BIO2002-03614 con el que se financiaron inicialmente estas investigaciones y actualmente tiene firmado un proyecto de investigación (FBG-305118) con el grupo de investigación de Biotecnología Vegetal: Producción de Fitofármacos (2005SGR00545), en el seno del cual se ha desarrollado este trabajo.

La producción de fitofármacos en cultivos de células y tejidos vegetales, constituye uno de los principales retos de la biotecnología, aunque la mayoría de los bioprocesos que se han desarrollado hasta el momento no han resultado suficientemente competitivos para su explotación comercial. De igual forma resulta interesante, el desarrollo de procesos de biotransformación basados en los cultivos de células vegetales, dada la diversidad de acciones y alta especificidad de las enzimas de las plantas superiores.

En el ámbito de la producción biotecnológica de fitofármacos, una revisión del tema, indica que la mayoría de los trabajos de I+D realizados en los últimos 10 años son estudios de tipo empírico, en los que únicamente se consideran determinados factores de entrada (medio de cultivo, línea celular, elicitación, etc.) y los factores de salida (crecimiento celular, toma de nutrientes o productividad del sistema), sin tener en cuenta que sucede a nivel celular-molecular en los cultivos. Esto es debido al desconocimiento que se tiene del metabolismo secundario, que es en gran medida el responsable de la biosíntesis de fitofármacos.

En el caso de la producción biotecnológica de centellósidos, aunque se han descrito algunos sistemas basados en el cultivo *in vitro* de *C. asiatica* para su producción, el éxito obtenido hasta el momento ha sido muy limitado. En relación con su biosíntesis, se conocen los pasos comunes que llevan a la formación de escualeno, el precursor universal de todos los triterpenos, pero actualmente se desconocen completamente los pasos específicos de la biosíntesis de las saponinas de *C. asiatica*, al igual que, también es desconocida la regulación de esta vía metabólica.



# Justificación y objetivos

---

Considerando los hechos precedentes y con el propósito de desarrollar un sistema biotecnológico y sostenible, que lleve a la producción *in vitro* de centellósidos, en este trabajo nos hemos planteado como objetivos específicos:

- Desarrollar un sistema de micropropagación vegetal de *C. asiatica* para tener una fuente renovable de material *in vitro*, con el que realizar nuestros estudios y que pueda ser de explotación también, con fines de producción industrial y de repoblación de la especie en sus hábitats naturales.
- Optimizar los protocolos para la obtención de callo friable de esta especie, a partir del cual se puedan obtener líneas celulares.
- Optimizar a nivel *in vitro* las condiciones de cultivo de las líneas celulares de *C. asiatica* para la producción de centellósidos.
- Estudiar en este sistema, la competencia entre las vías de formación de centellósidos y esteroides, puesto que ambas comparten inicialmente los mismos precursores.
- Aportar nueva información a nivel genético-molecular sobre la biosíntesis de centellósidos y fitoesteroides, específicamente de su regulación bajo el control del elicitor jasmonato de metilo.
- Y finalmente, desarrollar un sistema basado en los cultivos celulares de *C. asiatica*, que permita la biotransformación en centellósidos, de otros triterpenos más abundantes en la naturaleza, constituyendo así una fuente alternativa de estos fitofármacos.

Sin duda la información adquirida tras el desarrollo de este estudio puede ser de utilidad para establecer diferentes sistemas biotecnológicos que permitan la producción y/o bioconversión industrial de centellósidos, pero a la vez, puede contribuir a un mejor conocimiento del metabolismo secundario de las plantas y su regulación. Además, los resultados obtenidos de los estudios realizados a nivel genético-molecular, pueden aportar herramientas válidas para abordar esta temática, diseñando nuevas estrategias, basadas en la ingeniería metabólica de terpenos, con el propósito de mejorar la producción biotecnológica concretamente de centellósidos, pero también de otros compuestos pertenecientes al grupo de los triterpenos.