

Producción de aceites esenciales en cultivos *in vitro* de tejidos vegetales

JOSÉ JOBANNY MARTÍNEZ ZAMBRANO*

MARÍA C. CASTELLANOS CORREDOR**

JOSÉ CONSTANTINO PACHECO***

* Q. de A. Grupo de Catálisis UPTC

** Profesora Titular Escuela de Ciencias Químicas UPTC.

*** Profesor Titular Escuela de Ciencias Biológicas UPTC. Director Laboratorio BIOPLASMA-UPTC. jocpach@hotmail.com

Resumen

El uso de técnicas cultivo *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios es una de las áreas emergentes en las ciencias biológicas; con la ayuda de las estrategias básicas, las herramientas genéticas y un entendimiento cada vez mayor de la biosíntesis de algunos compuestos, es posible cultivar tejidos en condiciones fisicoquímicas apropiadas para lograr éxito en la producción *in vitro* de compuestos de interés. El objetivo de esta revisión es abordar algunos temas de investigación importantes para la producción de aceites esenciales a partir de materiales vegetales cultivados *in vitro*, como alternativa a los métodos de producción tradicional. Este campo de trabajo es atractivo si se logran entender los mecanismos para producir efectivamente dichos compuestos olorosos.

Palabras clave: Aceites esenciales, monoterpenos cultivos *in vitro*.
Key words: essential oils, monoterpenes, *in vitro* cultures.

Abstract

Cultures *in vitro* are used for secondary metabolites production, emergent area in the biological sciences; with help of basic strategies, genetic tools and an comprehensive knowledge about biosynthesis of some compounds, under appropriate physicochemical conditions is possible to obtain compounds of particular interest. The objective of this paper is examining some research topics related with essential oils production by *in vitro* cultures as alternative to the traditional production methods. This work area is interesting if are understood the mechanism to achieve with success the production of fragrant compounds.

Introducción

El papel de ciertos compuestos orgánicos extraídos de las plantas para ser utilizados como aditivos alimentarios es indiscutible. Esta amplia clase de compuestos contribuye especialmente a realzar o mejorar las propiedades sensoriales que se han visto afectadas durante el procesamiento de muchos alimentos. Algunas de estas sustancias pueden ser sintetizadas en el laboratorio; sin embargo, no poseen el mismo valor económico que las obtenidas de fuentes naturales y, muchas de éstas, por ser derivadas de mecanismos celulares complejos no pueden ser sintetizadas por las rutas químicas convencionales.

La biotecnología ofrece diversos enfoques para la obtención de tales compuestos, siendo uno de ellos el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (CITV). Algunas de las técnicas CITV se han desarrollado con el fin de cultivar células y permitir su crecimiento en ambientes estériles controlados (medios de cultivo). Las células a cultivar pueden ser obtenidas de embriones, tallos, raíces u otras partes de la planta. Los fines para los cuales se cultivan las células pueden ir desde el mejoramiento y producción de plantas, con características deseadas, hasta los cultivos orientados hacia la industria de bioprocesos, lo cual significa, una producción selectiva de compuestos de interés en las plantas (Meller *et al.*, 1990). Moshy, ha denominado a este campo de la Biotecnología vegetal, Fitoproducción (Moshy, 1985).

La factibilidad técnica para producir metabolitos en cultivos *in vitro*, depende en gran

medida del valor agregado del producto final. Algunas de estos metabolitos ya se producen y son comercializadas con éxito. Por ejemplo, los productos derivados de los cultivos en suspensión del *Panax ginseng* producidos por Nitto Denko Co. en Japón desde 1990, con una venta mundial de \$3 millones de dólares en 1995 (Ushiyama, K. 1996), y de Shikonina, colorante extraído tradicionalmente de las raíces de *Lithospermum erythrorhizon*, el cual para su síntesis química requiere doce pasos para obtener un escaso rendimiento del 0.7%.

1. Generalidades

La denominación de "Cultivo de Tejidos" es usada en un sentido genérico para incluir el cultivo *in vitro* de, virtualmente, cualquier parte de la planta a cualquier nivel de organización incluyendo protoplastos, células, callos, tejidos, órganos y aún plantas enteras; proporcionándole artificialmente, a dichos explantes, las condiciones físicas y químicas apropiadas para que las células expresen sus potenciales intrínsecos o inducidos (Roca y Mroginski, 1991). Entre los tipos de cultivo utilizados para la obtención de ingredientes alimentarios se encuentran los de callos, células en suspensión, tejidos organizados de yemas y raíces transformadas, entre otros.

Por lo general, los cultivos se inician con la siembra estéril de un explante en un medio sólido; si el balance del medio es el adecuado se obtendrá un crecimiento acelerado de células agregadas formando un callo, el cual, dependiendo del contenido de agar, será compacto o friable. El callo puede ser removido desde el explante y subcultivado en medios semisólidos

durante largos periodos de tiempo, o puede subcultivarse en medio líquido agitado para obtener células en suspensión.

Debido a su rápido crecimiento, las células en suspensión son preferidas para el escalamiento de cultivos, similar a los cultivos microbianos, mientras los tejidos organizados se prefieren para procesos que requieran diferenciación celular (Tong Fu Chei, 1998). Los cultivos de pelos radicales y rebrotes de tejidos tumorales ha recibido especial atención para la producción de ingredientes alimentarios debido a que estos cultivos crecen más rápido que los de explantes procedentes de raíces y yemas no transformadas. En muchos casos los cultivos de tales explantes presentan tasas de crecimiento más elevadas que los cultivos en suspensión (Flores *et al.*, 1987), y la producción puede ser igual que en la planta madre, exhibiendo una alta estabilidad genética y bioquímica (Tong Fu Chei, 1998).

2. Aceites esenciales

Unos de los ingredientes alimentarios que han recibido mayor atención para ser obtenidos en cultivos *in vitro* son los aromas. Los más conocidos son los aceites esenciales, ampliamente utilizados en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes). Químicamente pueden ser divididos en dos clases, los mono y los sesquiterpenos (isoprenos C_{10} y C_{15}); en muchos alimentos estos terpenos juegan el papel de quimiotipo (compuesto impactante).

Los monoterpenos son incoloros, lipofílicos y volátiles, y han sido implicados como defensas de una gran variedad de herbívoros y patógenos (Langenheim, 1994); siendo conocidos en especies de Pináceas, Lamiáceas, Rutáceas, Mirtáceas, Asteráceas, y en muchas otras familias (Charlwood and Charlwood, 1991). Su acumulación está a menudo asociada con estructuras complejas tales como tricomas, cavidades secretoriales o ductos resinosos (Fahn, 1979).

Los monoterpenos con grupos hidróxilo tales como el linalool, óxidos de linalool, nerol contribuyen a las notas aromáticas frutales de varias especies vegetales; muchos de estos compuestos se presentan como glucósidos (Duque *et al.*, 1999), algunos de los cuales son inoloros y son considerados como los precursores de estos aromas, los cuales por hidrólisis ácida o enzimática permiten liberar compuestos con alto valor aromático (Osorio *et al.*, 2003), en el momento de la disrupción celular antes de su consumo o procesamiento (Osorio *et al.*, 1995).

También se ha encontrado que las degradaciones fisicoquímicas o enzimáticas de ciertos carotenoides conducen a la formación de muchas moléculas de norisoprenoides C_{13} , progenitores de otros volátiles (Razungles *et al.*, 1993); los norisoprenoides poseen atractivas propiedades sensoriales junto con bajos valores de umbral, siendo atractivos en la industria de aromatizantes.

3. Acumulación de aceites esenciales en cultivos *in vitro*

En algunas especies vegetales la producción de aceites esenciales en cultivos *in vitro* ha sido estudiada con algún detalle. En la revisión de Koch y Schultze además de los aceites esenciales se muestra un amplio rango de componentes volátiles que incluyen aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos, glicósidos, polinas y compuestos que contienen nitrógeno y azufre (Koch & Schultze, 1987). En la revisión de Sahai, se muestra la producción de aromas y de aceites esenciales por cultivos *in vitro*, los aromas investigados, incluyen; manzana, naranja, vainilla, cacao, cebolla, ajo y ají; entre los aceites esenciales investigados se incluyen los de camomila, geranio, jazmín, al igual que el de menta, rosa, eucalipto y anís (Sahai, 1994).

La productividad del cultivo es un punto clave si se quiere llevar esta tecnología a escalamiento (Mulabagal *et al.*, 2004). Siendo los aromas componentes derivados del metabolismo

secundario de los organismos, las estrategias aplicadas para incrementar la producción de metabolitos secundarios y que han logrado tener éxito, han sido aplicables a los componentes volátiles. Estas estrategias han sido descritas en detalle para (Ramachandra y Ravishankar, 2002, Collin, 2001, Sahai, 1994), las cuales son las mismas que para producción de aceites esenciales.

La maximización de la producción y acumulación de aromas requiere por lo tanto: (i) la optimización de factores nutricionales claves, incluyendo las fuentes y concentraciones de los reguladores de crecimiento, carbono, nitrógeno y fósforo al igual que la optimización de los factores ambientales (fuentes e intensidad de iluminación, temperatura y composición de la fase gaseosa) (ii) adición de precursores (iii) selección de líneas celulares de alto rendimiento y (iv) adición de sitios de almacenamiento. Actualmente se aplican estrategias como la manipulación genética y la inmovilización, las cuales no discutiremos en esta revisión.

En la producción de aceites esenciales la regulación de los compuestos del medio de cultivo (nutrientes, hormonas y precursores) se ha aprovechado de diferentes maneras, debido a que las condiciones ricas en nutrientes del medio de cultivo favorecen las enzimas del metabolismo primario inhibiendo la expresión de metabolitos secundarios (Yeoman *et al.*, 1980); por lo tanto, la regulación de la fuente de carbono, relación carbono-nitrógeno, concentración de fósforo y reguladores de crecimiento, tendrá un efecto directo en la producción del compuesto deseado.

La adición de precursores ha sido ampliamente explotada al igual que la adición de elicitors. Cualquier compuesto que sea intermediario en la ruta metabólica de formación de un determinado compuesto, podrá influir en su síntesis y, consecuentemente, en la productividad del cultivo. Pero, en este enfoque, se hace necesario conocer el momento para la adición de tales compuestos, sus condiciones de disponi-

bilidad para las células y su relación con las enzimas involucradas en la producción. (Sahai, 1994). Estos aspectos se conocen en muy pocas especies, y en especies tropicales, como las nuestras, es nulo su conocimiento.

Entre los precursores de mayor interés, para la producción de aceites esenciales, se cuentan los ácidos grasos, los ácidos que influyen en el ciclo del acetiloenzima A y los aminoácidos, posiblemente debido a la similitud estructural de muchos de éstos con los compuestos volátiles.

Un ejemplo claro de la actividad de los ácidos grasos se observa cuando se usa en homogeneatos de callo de manzana, pera, fresa, tomate, los cuales son capaces de producir hexenal, Cis-3-hexenal, trans-2-hexenal, y cis-3-hexanil, a partir de ácido Linolénico (Kangsadan, 2003).

La adición de varios ácidos orgánicos o sus sales que se presentan en la ruta de la acetilcoenzima aunque tienen un profundo efecto en el crecimiento y metabolismo en cultivos celulares *in vitro*, varía considerablemente la composición del aceite esencial obtenido, dependiendo del ácido o sal añadida. Por ejemplo en células de *Pelargonium fragrans* en presencia de acetato, malato y citrato se produjo *p*-Cimeno como el componente mayoritario, mientras que en presencia de aspartato se indujo la formación de sesquiterpenos y de fumarato se acumuló Limoneno (Charlwood *et al.*, 1987).

De manera semejante, los aminoácidos pueden influenciar en el contenido de aromas de cultivos *in vitro*: Suprasanna *et al.*, (1998) encontraron que la adición de L-prolina producía un incremento de compuestos aromáticos en cultivos *in vitro* de arroz Basmati. El mismo grupo confirmó el papel de la prolina como un precursor en la formación del aroma de la variedad *Khao Dawk Mali 105*. Sin embargo, los perfiles aromáticos *in vivo* e *in vitro* son diferentes.

Por otra parte, los callos y suspensiones celulares en de *Nasturtium montanum* y *Cleome chelidonii* después de una hidrólisis previa, produjeron glucosinolatos, los cuales son responsables del sabor amargo y pungente asociado con estos vegetales, y la adición de L-cisteína y L-metionina aumentó cuatro veces más la cantidad de estos compuestos; similares incrementos se encontraron al suplementar con L-triptofano, particularmente en cultivos en suspensión (Songsak & Lockwood, 2004). Este hecho podría deberse a la relación biosintética directa que existe entre el triptofano y los glucosinolatos del indol.

Además de la adición de precursores, tanto la adición como el control que ejercen los reguladores de crecimiento afectan la composición volátil de especies cultivadas *in vitro*. Los reguladores son una de las herramientas más eficaces para la regulación del metabolismo celular (Constabel, 1987). Tanto la fuente como la concentración de reguladores en el medio de cultivo tienen un profundo efecto sobre los productos obtenidos en cultivos *in vitro* (Sahai, 1994); numerosos reportes apoyan una correlación directa entre diferenciación celular y metabolitos (Charlwood, 1987), la cual puede modularse a través de diferentes niveles hormonales.

Un ejemplo claro de tal relación es la acumulación de aceites esenciales en *salvia Officinalis* L., la cual es afectada por el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento (Santos *et al.*, 2003). En células de *Pelargonium fragans* el aumento de la composición volátil de hidrocarburos monoterpénicos se encuentra asociado a la citodiferenciación que puede ser controlada manipulando la relación entre BA y ANA (Charlwood, 1987). Collin y Watts reportaron que las suspensiones derivadas de *Apium* sp. no producen componentes aromáticos bajo condiciones normales de cultivo; sin embargo, el reemplazo de las auxinas 2,4-D o ANA por 3,5-D produjo la formación de agregados celulares de color verde con una síntesis apreciable de phtalidos (Collin y Watts, 1984). Igualmen-

te, la productividad de sesquiterpenos acíclicos y fracciones C_{15} - aldehído, incluyendo compuestos insaturados, es afectada por el uso de reguladores de crecimiento; por ejemplo, el guaiano y otros sesquiterpenoides no están presentes en la planta intactas de *Thymo vulgaris* pero se detectan en cultivos *in vitro* de algunos de sus tejidos (Sugisawa *et al.*, 1987).

4. Diferencia de los perfiles aromáticos en cultivos *in vitro*

Aunque la Biotecnología Vegetal aprovecha la totipotencia celular, es decir, las células en cultivo pueden producir los mismos metabolitos que la planta entera, los perfiles aromáticos de callos y de células en suspensión obtenidos de células *in vitro*, es diferente al perfil que se podría encontrar en las células *in vivo*. Estas diferencias entre los productos formados en cultivo *in vitro* y la planta *in vivo*, pueden ser el resultado de la pérdida de diferenciación, organización celular y la variación genética o epigenética inducida (Tong-Jen Fu, 1998). Igualmente, los niveles de acumulación de esta clase de compuestos, son muy bajos y varían entre 0.001 - 0.4% de producto seco. (Scragg, 1996).

La diferenciación morfológica y celular es necesaria para la expresión de muchos metabolitos secundarios (Collin y Watts, 1984). Siendo el aroma parte del metabolismo secundario su producción en cultivos *in vitro* está asociada a la inducción de diferenciación morfológica o creación de sitios de acumulación artificial para que el producto pueda acumularse y recuperarse luego. La falta de diferenciación celular hace que la célula siga diferentes caminos metabólicos y no existan sitios de almacenamiento de compuestos. Sin embargo, la pérdida de diferenciación de glándulas de síntesis y almacenamiento no siempre es el resultado de un efecto mutacional (Constabel, 1987).

Al no presentarse una diferenciación celular que permita la formación de sitios de almace-

namiento, habrá una rápida metabolización de los monoterpenos, pues, buena parte de estos compuestos son responsables de toxicidad celular. *Brown et al.*, demostraron que los cultivos celulares de *Pelargonium fragrans* toleran monoterpenos en el medio hasta una concentración de 0.1g/L, pero el linalool, la carvona, y b-pineno mostraron ser especialmente tóxicos (*Brown et al.*, 1987). Igualmente *Derek et al.*, hallaron que en cultivos de diferentes especies de rosas, los productos monoterpénicos que se formaban *in vitro* eran rápidamente degradados de forma endógena (*Derek et al.*, 1986).

Los compuestos producidos en CITV son secretados al medio o almacenados intracelularmente (*Wei Zhanga et al.*, 2002); la remoción *in situ* de los productos ayuda aumentar la productividad del cultivo (*Scraggs*, 1996). La extracción o adsorción *in situ* (sólida o líquida) de los productos de interés, involucra la adición de una segunda fase al medio de cultivo, la cual debe tener una especial afinidad con los productos de interés. Dentro de estas fases se pueden mencionar solventes o fases orgánicas, lipofílicas como el miglyol, perfluoroquímicos, parafina líquida, polietilenglicol y fases sólidas como resinas de amberlita, RP-8, o carbón activado (*Scraggs*, 1996).

La desventaja del uso de una segunda fase para acumular compuestos volátiles puede ser su capacidad adicional para remover reguladores de crecimiento del cultivo, pero también ayudaría a evitar la pérdida de dichas sustancias debido a su volatilidad. Como para cualquier metabolito volátil, la acumulación es controlada por el balance entre la tasa de formación y la tasa de pérdida para compuestos volátiles como los monoterpenos, siendo la emisión a la atmósfera una de las causas principales de pérdida.

Las células individuales en estados fisiológicos diferentes responden de manera diferencial al medio que las rodea, lo cual a menudo conlleva

a la variabilidad en la producción de metabolitos. (*Tong-Jen Fu*, 1998). Este comportamiento celular, en vez de ser una dificultad, representa una oportunidad para producir líneas celulares de alto rendimiento del compuesto de interés; la ventaja solo es posible si se logra seleccionar las células a través de métodos analíticos, sencillos y confiables. En el caso de compuestos coloreados, como pigmentos, es fácil su determinación; pero, en el caso de compuestos volátiles las metodologías utilizadas no siempre son sencillas; sin embargo, podrían utilizarse metodologías como la microextracción en fase sólida para tal fin (*Rohloff J*, 1999).

Las células alteran las rutas metabólicas pero su legado genético no cambia. Por ejemplo, en cultivos de callo de *Rosa damascena*, las enzimas claves para la síntesis de monoterpenos se presentan en los cultivos aún cuando no se expresen, es decir, los callos no acumulan monoterpenos y sin embargo los extractos libres de células pueden convertir el isopentenil pirofosfato (IPP) en geraniol y nerol, 300 veces más eficientemente que los extractos de las plantas madres; igualmente convierten el mevalonato (MVA) en IPP (*Derek et al.*, 1983) y metabolizan monoterpenos exógenos, vía caminos oxidativos.

5. Biotransformaciones

A pesar de la diferencia de los perfiles de los productos *in vitro*, su habilidad bioquímica para transformar sustratos exógenos ha conducido que los CITV sean usados para la biotransformación de sustancias. La adición de precursores al medio de cultivo tiene alguna similitud con las biotransformaciones; sin embargo, en la adición de precursores generalmente se cuenta con un compuesto que hace parte de la ruta metabólica de la planta, en las biotransformaciones el sustrato no es necesariamente un compuesto precursor. Los sustratos pueden ser de origen sintético (*Pras et al.*, 1995).

Los sistemas de bioconversión pueden ser usados en combinación con síntesis orgánica (Giri A., 2001) y en comparación con los sistemas microbianos, las plantas al producir un rango limitado de enzimas evita reacciones colaterales, no deseables en la bioconversión; además, las células indiferenciadas pueden tener los mismos tiempos de duplicación que los microorganismos, lo cual presenta ciertas ventajas frente a éstos.

Un caso particular lo constituyen los dos enantiómeros del limoneno, siendo los más abundantes monoterpenos monocíclicos en la naturaleza. El limoneno es un subproducto de la industria de zumos de naranja de un bajo costo (US\$ 1-2/Kg), es un buen material de partida para derivados oxigenados que tienen el mismo esqueleto de carbono y que tienen un precio en el mercado más alto, tales como el α -terpineol, alcohol perílico, carveol, carvona, y mentol; por ejemplo, el mentol y los enantiómeros de la carvona oscilan en el rango de US\$ 30-60/kg (Duetz *et al.*, 2003).

Ambos enantiómeros pueden ser oxidados en la posición 6 a una mezcla racémica de *cis* y *trans*-carveol y carvona por cultivos celulares de *Solanum aviculare* y *Dioscorea deltoidea* (Vanek *et al.*, 1999). Aunque hay algunos microorganismos que llevan a cabo la oxidación del limoneno con alta selectividad (Duetz *et al.*, 2003), muchos otros lo convierten con muy poca selectividad, produciendo un gran número de productos indeseables (Van der Werf, 1996). En el camino de biosíntesis de los isoprenoides se ha identificado claramente el papel que juega la enzima citocromo P-450, la cual hidroliza al limoneno en las posiciones alílicas C3, C6, or C7 y que normalmente está presente en los cultivos *in vitro*. Existen también algunos trabajos en la biotransformación de terpenos y constituyentes no terpénicos por cultivos celulares de *Peganum harmala* (Courtois *et al.*, 1988., Zhu *et al.*, 2000).

Generalmente las reacciones químicas más importantes de los mono y sesquiterpenos-

terpenos son llevadas a cabo por células *in vitro*. La hidroxilación, glucosilación, oxido-reducción, epoxidación, reducciones de grupos carbonilos, reducciones de dobles enlaces, se cuentan entre ellas. Por ejemplo los cultivos en suspensión de *C. roseus* hidroxilan el geraniol, nerol, (+) and (-) carvona a 5 α -hidroxineodihydroxycarveol (Hamada *et al.*, 1997) y, cultivos de *N. tabacum* convierten alcoholes mono y bicíclicos-terpenos enantió-selectivamente. Gil *et al.*, (1995) estudiaron la biotransformación de D2-careno en alcoholes diastereoméricos por callos de *Myrtillocactus geomtrizans* y *N. tabacum*; las células de *Myrtillocactus* oxidaron estos alcoholes a las correspondientes cetonas.

La epoxidación es otra de las más importantes reacciones, muy útil en la modificación de sesquiterpenos citotóxicos. Sakui *et al.*, 1992 describieron la epoxidación de germacróna por cultivos en suspensión de *Curcuma zedoaria*. La biotransformación de (-)-(4R)-isopiperitinona por *Mentha piperita* produjo tres derivados hidroxilados y dos derivados epoxidados incluidos (-)-7-hidroxiisopiperitonon y sus glucosidos (Park and Kim, 1998).

Las biotransformaciones se realizan con células libres o inmovilizadas; éstas últimas presentan la ventaja de un proceso continuo y reuso de las mismas, lo que permite la optimización hacia el producto de interés (Dörnenburg, 2004). Igualmente aumenta el contacto entre células y afecta la fisiología, lo cual podría causar en algunas células la acumulación de una mayor cantidad de metabolitos que en suspensiones celulares. Además, en esta técnica se busca proteger las células del estrés mecánico y facilitar la recuperación del producto. Algunos ingredientes alimentarios se producen haciendo uso de esta tecnología (Knorr *et al.*, 1986).

Los métodos generales para la inmovilización de células de plantas son atrapamiento por gel, por intercambio iónico, precipitación, polimerización, y estructuras preformadas. En

otros casos, por ejemplo en la búsqueda de soportes de inmovilización para la fermentación alcohólica de vinos, ha llevado al uso de la misma piel de las uvas para cumplir los requisitos de grado analítico y obtención de un producto de una alta calidad y aroma (Mallouchos *et al.*, 2003).

Aunque en ciertas especies de plantas con alto contenido de monoterpenos se conoce con algún detalle la enzimología y regulación de la biosíntesis de isoprenoides (Croteau and Venkatachalam, 1986, Kjonaas *et al.*, 1985, Kjonaas *et al.*, 1985), y algunos mecanismos de sintasas involucradas (Karp *et al.*, 1990), muchos de los factores fisiológicos de regulación monoterpénica son escasamente conocidos y aún conociendo las rutas de síntesis, se requiere un poco de suerte para la acumulación de estos compuestos en cultivos *in vitro*.

6. Producción de aceites esenciales en Bioplasma

El Laboratorio de Investigación BIOPLASMA-UPTC ha conducido ensayos preliminares para la obtención de sustancias aromatizantes a partir de cultivos *in vitro* de lulo (*Solanum quitoense* L); se ha logrado la optimización de las condiciones de cultivo para obtener callos friables, se han obtenido algunos extractos usando distintos solventes y se ha logrado determinar que algunos de los compuestos del aroma original están presentes, aunque es cierto que su cantidad es mínima y que la obtención de masas celulares, a través de callos o suspensiones celulares, no conlleva a la acumulación de estos compuestos aromatizantes y saborizantes; es el uso de estrategias combinadas las que permiten incrementar el porcentaje de producto obtenido. Pero las metodologías que permitirían una alta acumulación del producto requieren el conocimiento detallado del metabolismo del producto en la especie estudiada, lo cual es escasamente conocido en especies tropicales.

Aun no se ha estudiado la posibilidad de encontrar en el material vegetal obtenido por Bioplasma, precursores glicosídicos, los cuales pueden ser liberados por hidrólisis ácida o enzimática y pueden contener el aroma escondido de esta fruta.

Otro enfoque para el aprovechamiento de la biotecnología vegetal estaría encaminado en la producción de masas celulares con el fin de buscar enzimas vegetales presentes en estos materiales que puedan ser aplicadas para producción de sustancias deseadas. Como se ha mencionado, el aprovechamiento del potencial bioquímico de masas celulares para biotransformación de sustancias se ha demostrado *in vitro*, logrando transformar sustratos endógenos y exógenos con las características deseadas.

Estos enfoques permitirían superar algunos retos tecnológicos que deben tenerse en cuenta en el escalamiento con las células vegetales, las cuales presentan paredes rígidas, son de mayor tamaño, sus tiempos de duplicación celular son prolongados, tienden por su naturaleza a agregarse lo cual reduce los coeficientes de transferencia de oxígeno. Además, almacenan sus productos en órganos especializados de la célula, razón por la cual es necesario degradarlas por medios físicos o químicos para poder obtener los productos de interés, agregando costos al proceso.

Siendo el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales un procedimiento alternativo del cultivo a gran escala para la producción de metabolitos, también presenta ventajas en el campo de la investigación básica. Teóricamente, es la herramienta ideal para el estudio de rutas biosintéticas que conducen a la formación de los aromas. En el campo alimentario, la elucidación de reacciones enzimáticas responsables o indeseables es la base para controlarlas y mejorar la aceptabilidad del alimento.

Bibliografía

- A. Fahn (1979). *Secretory Tissues in Plants*. Academic Press, London.
- A. Giria, V. Dhirraa, C. Girib, A. Singhc, O. P. Wardc, M. Lakshmi Narasua. (2001). Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology Advances*, 19. 175-199.
- A. Guedes, L. Amorim, A. Vicente, G. Ramos, M. Fernández-Ferreira, (2003). Essential oils from plants and *in vitro* Shoots of *Hypericum androsaemum* L. *J. Agr. Food Chem.*, p. 1399.
- A. Mallouchos, P. Skandamis, P. Loukatos, M. Komaitis, A. Koutinas and M. Kanellaki (2003). Volatile Compounds of wines produced by cell immobilize on grape skins. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3060-3066.
- A.H. Scragg (1996). The production of aromas by plant cell cultures. Vol. 51, p. 47 in *Biotechnology of aroma compounds*.
- B. Kangsadan, M. Kenji, A. Yoshihiko, Y. Norishige and K. Tadahiko (2003). Hydroperoxy-arachidonic acid mediated n-hexanal and (Z)-3- and (E)-2-nonenal formation in *Laminaria angustata*. *Phytochemistry* 63. p. 669.
- B.V. Charlwood, J.T. Brown, C. Moustou, G.S. Morris, K.A. Charlwood (1988). The accumulation of isoprenoid flavour compounds in plant cell cultures. In Scherier, Ed. *Bioflavour*, 87. We de Gruyter. Berlin, p. 303.
- B.V. Charlwood, K.A. Charlwood (1991). Monoterpenoids. In Charlwood BV, Banthorpe DV, Terpenoids. Academic Press, London. p. 43.
- C. Osorio and C. Duque (1995). Volátiles generados por hidrólisis enzimática de glicosidos de hojas de lulo (solanum quitoense l). *Rev Col Quím.* 24 (2). p. 69.
- C. Osorio, C. Duque, F. Batista-Viera (2003). Studies on aroma generation in Lulo (*Solanum quitoense*): Enzymatic hydrolysis of glycosides from leaves. *Food chemistry*, 81. 333-340.
- D. Courtois, D. Yvernel and B. Florin (1988). Conversion of tryptamine to serotonin by cell suspension cultures of *Peganum harmala*. *Phytochem.* 27. p. 3137.
- D. Knorr, S. Miazga and R. Teutonico (1985). Immobilization and permeabilization of cultured plant cells. *Food Technol.* 39 (10). p. 135.
- D. Mc Caskill and R. Croteau. (1996). Prospects for the Bioengineering of isoprenoid biosíntesis. 55, p. 107.
- Duque, Carmenza; Osorio, Coralía and Fujimoto, Yoshinori (1999). C13-Norisoprenoid Glucoconjugates from Lulo (*Solanum quitoense* L.) Leaves. *J. of Agric. Food Chem.* 47, (4). p. 1641.
- F. Bourgaud, A. Gravot, S. Milesi, E. Gontier (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective *Plant Science* 161, 839-851.
- F. Constabel (1987). Cyto differentiation. In Scherier (ed). *Bioflavour*, 87. We de Gruyter. Berlin, p. 303.
- F. Karp, C.A. Mihaliak, J.L. Harris, R. Croteau (1990). Monoterpene biosynthesis: specificity of the hydroxylation of (-)-limonene by enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*), spearmint (*Mentha spicata*) and perilla (*Perilla frutescens*) leaves. *Arch Biochem Biophys* 276. p. 219.

- G. Gil, P. Ferreira Dos Santos, C. Bullard (1995). Biotransformation of D2-carene by callus tissues. *Phytochemistry*, 38. pp. 629-631.
- H. Dörnenburg (2004). Evaluation of immobilisation effects on metabolic activities and productivity in plant cell processes. *Process Biochemistry* 39. p. 1369.
- H. E. Flores, M.W. Hoy, J.J. Pickard (1987). *Trends Biotechnol.*, 5. p. 64.
- H. Hamada, H. Yasumune, Y. Fuchikami, T. Hirata, C. Sattler (1997). Biotransformation of geraniol, nerol and (+/-) and (d)-carvone by suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*;44. p. 615.
- H. Sugisawa, K. Miwa, T. Matsuo, H. Tamura (1988). Volatile compounds produced from the cultured cells of thyme (*Thyme Vulgaris*). In Scherier P (ed). *Bioflavour*, 87. We de Gruyter. Berlin, p. 327.
- H.A. Collin (2001). Secondary product formation in plant tissue cultures, *Plant Growth Regulation*, 34 (1). p. 119.
- H.A. Collin, M. Watts (1984). *Handbook of Plant Cell Culture*; Evans, D. A.; Sharp, W. R.; Ammirato, P. V.; Yamada, Y., Eds.; Macmillan Publishing: New York, Vol.1, Chapt. 24.
- I. Koch-Heitzmann and W. Schultze (1987). Compilation of volatile compounds found in plant cell cultures. In Scherier P (ed). *Bioflavour*, 87. We de Gruyter. Berlin, p. 365.
- J. Rohloff (1999). Monoterpene composition of essential oil from peppermint (*Mentha x piperita* L.) with regard to leaf position using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry analysis. *J Agric Food Chem* 47. p. 3782.
- J.H. Langenheim (1994). Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J Chem Ecol* 20. p. 1223.
- J.T. Brown, P.K. Hegarty, B.V. Charlwood. (1987). The toxicity of monoterpenes to plant cell cultures. 'Mono- and Sesquiterpene Biosynthesis in Plant Cells in Culture' Cell and tissue studies in vitro. *Bioflavour*, 1987.
- J.W. Gramshaw, C.M. Cotton, L.V. Evans (1987). Production of flavour volatiles by callus and suspension cultures of tarragon (*Artemisia dracunculus*). En: Schreier P (ed) *Bioflavour* 87. W. de Gruyter, Berlin. p. 341.
- K. Ushiyama (1996). Presented at the Institute of Food Technologists Annual Meeting, New Orleans, LA, June; paper 45-5.
- M.M. Yeoman, M.B. Miedzybrodza, K. Lindsey and W.R. McLaughlin, (1980). The synthetic potential of cultured plant cells. *Plant cell cultures: results and prospectives*. Elsevier. Amsterdam. p. 3227.
- N. Pras, G.E. Booi, D. Dijkstra, A.S. Horn, T.M. Malingre (1990). Bioconversion of bi- and tri-cyclic monophenols by alginate entrapped cells of *Mucuna pruriens* and by partially purified *Mucuna* phenoloxidase. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 21 p. 9.
- N. Sakui, M. Kuroyanagi, Y. Ishitobi, M. Sato, A. Keno (1992). Biotransformation of sesquiterpenes by cells of *Curcuma zedoaria*. *Phytochemistry*; 31. p. 143.
- O.M. Sahai (1994). Tissue Culture. En: *Bioprocess production of flavour fragrance and color ingredients*. Ed. A. Gabelman, J.Wiley, pp. 239-275.
- P. Meller and R. Riel (1990). *Tecnologías de América del Norte para el procesamiento de alimentos*. IICA. Doc 14.
- P. Santos and F. Fernandez (2003). Essential oils produced by in Vitro Shoots of Sage (*Salvia officinalis* L.) *J. Agric Food Chem*. 51, pp. 2260-2266.
- P. Suprasanna, G. Bharati, T. Ganapathi and V.A. Bapat (1999). Aroma in rice: effects of proline supplementation and immobilization of callus cultures. *Plant Cell Culture Technology Section, Nuclear Agriculture and Biotechnology Division, Bhabha Atomic Research Centre, Trombay, Mumbai 400 085, India*.
- P. Suprasanna, T.R. Ganapathi, N.K. Ramaswamy, K.K. Surendranathan, and P.S. Rao (1998). Aroma synthesis in cell and callus cultures of rice. *Rice Genet. Newsl.* 15. p. 123.
- R. Croteau and K.V. Venkatachalam (1986). Metabolism of monoterpenes: demonstration that (+)-*cis*-isopulegone, not piperitenone, is the key intermediate in the conversion of (-)-isopiperitenone to (+)-pulegone in peppermint (*Mentha piperita*). *Arch Biochem Biophys* 249. p. 306.
- R. Moshy (1985). Impact of biotechnology on food ingredients. *Food Technol.* 39(10). p. 113.
- R.B. Kjonaas, K.V. Venkatachalam, R. Croteau (1985). Metabolism of monoterpenes: oxidation of

isopiperitenol to isopiperitenone, and subsequent isomerization to piperitenone by soluble enzyme preparations from peppermint (*Mentha piperita*) leaves. Arch Biochem Biophys 238. p. 49.

Ramachandra Rao and G.A. Ravishanka (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances. 20 (2). p. 101

S. Lidija, D. Grubisic and G. Vunjak-Novakovic (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. Biochem. Eng. J. 4. p. 89.

S.H. Park, S.U. Kim (1998). Modified monoterpenes from biotransformation of (-)-isopiperitinone by suspension cell culture of *Mentha piperita*. J Nat Prod. 61. p. 354.

T. Songsak, G.B. Lockwood. (2004). Production of two volatile glucosinolate hydrolysis compounds in *Nasturtium montanum* and *Cleome chelidonii* plant cell cultures. Fitoterapia. 75. p. 296.

T. Vanek, I. Valterova, R. Vankova, T. Vaisar (1999). Biotransformation of (α)-limonene using *Solanum aviculare* and *Dioscorea deltoidea* immobilized plant cells. Biotechnol Lett. 21. p. 625.

Tong-Jen Fu (1998). Safety considerations for food ingredients produced by plant cell and tissue culture. Chemtech, 28 (1). p. 40.

V. Derek Banthorpe, J. Thomas Grey, Ian Poots and D. William Fordham (1986). Monoterpene metabolism in cultures of *Rosa* species. Phytochemistry. 25 (10). p. 2321.

V. Derek, C.O. Vincent (1984). Light-dependent monoterpene synthesis in *Pinus radiata* cultures. Phytochemistry. 23 (2). p. 295.

Van der Werf, Mj, de bont, J.A.M., D.J. Leak (1996). Opportunities in microbial biotransformation of monoterpenes. Vol.55, p.147. In, Biotechnology of aroma compounds.

Vanisree Mulabagal and Hsin-Sheng Tsay (2004). Plant Cell Cultures - An Alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int. J. Appl. Scie. Eng. 2 (1). p. 29.

W. Roca, A. Mroginski (1991). Principios básicos, metodologías y técnicas de cultivo de tejidos vegetales. En: Roca W, Mroginski L. (Eds.), Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT, Centro Internacional de Agricultura Tropical. Editorial XYZ, Cali, Colombia. pp. 2-17.

W. Zhanga, C. Curtina, C. Franco (2002). Towards manipulation of post-biosynthetic events in secondary metabolism of plant cell cultures. Enzyme and Microbial Technology 30. p. 688.

W. Zhu, G. Asghari and G.B. Lockwood (2000). Factors affecting volatile terpene and non-terpene biotransformation products in plant cell cultures. Fitoterapia 71. p. 501.

W.A. Duetz, H. Bouwmeester, J.B. Van Beilen (2003). Witholt Biotransformation of limonene by bacteria, fungi, yeasts, and plants Appl Microbiol Biotechnol., 61:269-277.