

INSTITUTO DE ESPAÑA  
REAL ACADEMIA NACIONAL DE FARMACIA

**LA CIENCIA DE LOS PRODUCTOS  
NATURALES EN EL DESCUBRIMIENTO  
DE FÁRMACOS**

DISCURSO DE LA  
EXCMA. SRA. DÑA. M. PILAR GÓMEZ-SERRANILLOS CUADRADO

LEÍDO EN LA SESIÓN DEL DÍA 29 DE SEPTIEMBRE DE 2020  
PARA SU INGRESO COMO ACADÉMICA DE NÚMERO

Y CONTESTACIÓN DEL  
EXCMO. SR. D. ÁNGEL M. VILLAR DEL FRESNO



Madrid, 2020

**ISBN:** 978-84-122587-0-7  
**Depósito Legal:** M-25254-2020

# ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| Prólogo .....   | 5         |
| Elección del tema .....   | 9         |
| <b>La ciencia de los productos naturales en el descubrimiento de fármacos</b> | <b>11</b> |
| I. Milenios de experiencia y tradición. La scientia regia .....               | 11        |
| II. Investigación y desarrollo de fármacos basados en productos naturales     | 23        |
| Retos .....   | 23        |
| Interés científico renovado .....   | 27        |
| Consideraciones sobre la selección del material de partida .....              | 29        |
| III. Genómica, metabolómica y proteómica en la investigación                  |           |
| de compuestos activos en plantas .....  | 35        |
| Genómica en la identificación molecular de especies .....                     | 35        |
| Dna <i>barcoding</i> .....  | 36        |
| Metabolómica en la identificación de compuestos activos .....                 | 41        |
| Proteómica en la validación e identificación de biomarcadores .....           | 44        |
| IV. Ensayos biológicos .....  | 47        |
| Ensayos <i>in vitro</i> .....   | 49        |
| Ensayos en cultivos celulares .....   | 50        |
| Estudios <i>in vivo</i> .....   | 53        |
| V. Biotecnología farmacéutica y síntesis química en la obtención de           |           |
| compuestos de origen natural farmacológicamente activos .....                 | 57        |
| Cultivo de células y tejidos vegetales .....                                  | 58        |
| Producción heteróloga .....   | 62        |
| Síntesis orgánica .....   | 70        |
| VI. Consideraciones finales .....   | 75        |
| VII. Bibliografía .....   | 79        |
| VIII. Contestación del Exmo. Sr. D. Ángel M. Villar del Fresno .....          | 97        |



## PRÓLOGO

Excelentísimo Sr. Presidente  
Excelentísimas Señoras Académicas  
Excelentísimos Señores Académicos  
Señoras y Señores,

“La gratitud, dijo Cicerón, no es solo la mayor de todas las virtudes, sino la madre de todas las demás” (Ciceron, 1471). Y mis primeras palabras, como paso previo a mi discurso, son de sincero y emocionado agradecimiento a esta Real Academia, por la confianza depositada en mi persona, eligiéndome Académico de Número. Es un honor inmenso este que me hacen y les aseguro, desde el más profundo sentido del deber, que trabajaré de forma comprometida para responder a esa confianza con total entrega, apoyando a esta insigne Institución en el cumplimiento de los objetivos que tiene encomendados.

Con emoción agradezco también a quienes pensaron en mí para este fin y avalaron mi candidatura, las Excelentísimas Académicas Dña. Rosa M. Basante Pol y Dña. María Vallet Regí y el Excelentísimo Académico D. Ángel M. Villar del Fresno. Espero ser digna de ello y pondré todo el esfuerzo y el trabajo necesarios para cumplir, a su amparo y junto a ustedes, que son maestros, el papel que me han asignado.

Es obligado, por cortesía y también por justicia, expresar mi agradecimiento a la Junta de Gobierno actual y a todos las excelentísimas y excelentísimos señoras y señores académicos que me eligieron para la Medalla nº 35 y muy especialmente, a su Presidente, el Exmo. Sr. D. Antonio Doadrio Villarejo, amigo desde hace ya muchos años.

No puedo olvidar en estos momentos a mis padres, que fomentaron en mí el sentido del trabajo y la responsabilidad y al Prof. D. Manuel G-Serranillos, que fuera respetado académico de esta Institución, cuyo estímulo hizo posible mi inicio en la tarea investigadora.

Por supuesto, mi gratitud a todos mis profesores y maestros a lo largo de mi carrera docente e investigadora, en particular, al Prof. Villar por los años de colaboración mutua y, especialmente en el día de hoy, por su amabilidad al contestar a este discurso y a la Dra. Carretero, que me transmitió el interés por el apasionante campo de la Farmacognosia. Mi agradecimiento también a mis colaboradores de todos estos años y que han contribuido al trabajo científico que ha hecho posible que los miembros de esta Academia se hayan fijado en mí para ser propuesta como nuevo miembro. Muchos de ellos ocupan cargos importantes en la universidad, en la empresa o en el mundo sanitario, de lo que me siento muy orgullosa.

Finalmente, permítanme que haga una mención muy especial a las personas que son más importantes para mí. A Marcial, mi marido, por su apoyo, por su generosidad para comprender este complicado mundo científico y universitario, por su paciencia infinita ante mi dedicación y por la serenidad que con tanto amor me transmite a lo largo de ya casi toda una vida.

A mis hijas, Raquel y Marta, las personas a las que más tiempo he robado para realizar mi labor universitaria, gracias por llenarme de tanto cariño. A mi yerno, Laurent, que también con tanto cariño se ha incorporado a esta familia y, por supuesto, a la pequeña Alicia.

La tradición se convierte en este caso en placer al pronunciar ante ustedes el recordatorio acostumbrado que el que llega debe hacer del que se va. Al saber a qué académico sucedería en esta medalla número 35, la repuesta me llenó de satisfacción pues hablaré de un hombre de bien, de un profesor tan admirado como querido. Llego a la Academia a recoger la medalla de D. Victor Jiménez Torres, lo que es para mí una responsabilidad y también un honor. Nacido en Socuéllamos (Ciudad Real) y fallecido repentinamente en Valencia, fue profesor adjunto de Química Inorgánica en la Universidad de Santiago de Compostela (1970 a 1974) y posteriormente, catedrático de Biofarmacia y Farmacocinética de la Universidad de Valencia, donde también llevó a cabo su labor asistencial, como jefe de Servicio de Farmacia Hospitalaria del Hospital Universitario Dr. Peset (desde 1974), cargos ambos que ocupaba a su fallecimiento.

En 2007 fue elegido académico de número de la Real Academia Nacional de Farmacia. Presidió la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria de 1985 a 1988. Fue secretario de la Facultad de Farmacia (de 1974 a 1976). Era, además, académico correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia desde 2008 y miembro fundador de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral (SENPE). El Dr. Jiménez Torres fue miembro del Comité Científico de *Journal Of Oncology Pharmacy Practice*, la revista de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria y de Nutrición Hospitalaria, así como de la *Revista de Cuidados Paliativos*. Además de presidir o ser miembro de diversos comités científicos, vocal de la Comisión Nacional de Farmacia Hospitalaria, de la Comisión Nacional de Farmacovigilancia y de la Comisión Nacional de Farmacia Industrial y Galénica, fue Experto de la Agencia Europea de Evaluación de Medicamentos (EMA) y de la Agencia Española del Medicamento y asesor durante años del Ministerio de Industria.

Obtuvo la medalla de oro de la Asociación de Antiguos Alumnos de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela y fue galardonado con el premio “Achievement Award ISOPP 2004” de la *International Society Oncology Pharmacy Practice*. También en 2004 fue seleccionado por la revista *European Journal Hospital Pharmacy* entre los diez farmacéuticos científicos de Europa con más aportaciones realizadas al ámbito de la Farmacia Hospitalaria. Entre sus libros destacan: *Mezclas Intravenosas y Nutrición Artificial*, del que se publicaron cuatro ediciones, la última en 2000, el *Manual de Procedimientos en Farmacocinética Clínica* (1997), *Oncología Farmacéutica* (2006), *Calidad Farmacoterapéutica*, con dos ediciones, la más reciente del año 2008. Coordinó el libro *Criterios de Calidad para la Acreditación de los Servicios de Farmacia Hospitalarios* y la serie *Manuals Conselleria Sanitat*.

Publicó más de 260 trabajos científicos en revistas nacionales e internacionales, en colaboración interdisciplinar, sobre cuatro líneas de investigación. La primera, referente a nutrición artificial, la segunda centrada en el establecimiento de directrices farmacoterapéuticas a través de la farmacocinética clínica y poblacional. La seguridad del paciente, desde la perspectiva de la calidad farmacoterapéutica, se corresponde con la tercera línea y una cuarta línea de investigación se centraba en la mejora de la utilización de fármacos antineoplásicos.

Una trayectoria larga e intensa, que podemos decir estuvo caracterizada por tres coordenadas: talento, compromiso y generosidad. Talento que ha facilitado ese cambio de mirada sobre nuestra profesión, en beneficio de los pacientes. Compromiso, con una auténtica vocación, que le llevó a hacer de su profesión una forma de vida y Generosidad, a través de su labor docente, compartiendo sus conocimientos y experiencia para ayudar a mejorar y crecer.

Aunque suele decirse que “las personas pasan y las instituciones quedan“, existen figuras como el Dr. Víctor Jiménez Torres que las trascienden, las impulsan y las hacen mejores.

## ELECCIÓN DEL TEMA

Paso ya a exponer el tema de este discurso.

Respecto a ello, he de decir que en ningún momento tuve duda en la elección, ya que pensé que, de acuerdo con mi trayectoria docente e investigadora, el núcleo de la lección se debe centrar en la Farmacognosia, como ciencia que contribuye al estudio y desarrollo de un medicamento.

En el contexto altamente competitivo de la investigación farmacéutica contemporánea, los productos naturales proporcionan un elemento único de biodiversidad, diversidad estructural y funcionalidad biológica que es indispensable en el descubrimiento de nuevos fármacos.

Actualmente, las nuevas tecnologías surgidas, como la química combinatoria, el *screening* de alto rendimiento, la bioinformática, la genómica, la metabolómica y la proteómica, que permanecen en continua evolución, se han integrado ampliamente en el campo de la investigación de productos naturales, renovando su interés científico en áreas terapéuticas clave, como la inmunosupresión, el cáncer o las enfermedades metabólicas y neurodegenerativas.

Sin olvidar los estudios químicos, farmacológicos y clínicos de compuestos provenientes de medicinas tradicionales que han sido la base de importantes fármacos como la digitoxina, la quinina o la pilocarpina.

Así, el objetivo de este discurso es describir el empleo de compuestos derivados de recursos naturales en el proceso del descubrimiento de fármacos nuevos y eficaces, ya que la Naturaleza sigue siendo una fuente importante de agentes terapéuticos.

Después de valorar distintos títulos que se adaptasen a estas características, me decidí por el siguiente:

**La ciencia de los productos naturales en el descubrimiento de fármacos**



# LA CIENCIA DE LOS PRODUCTOS NATURALES EN EL DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS

*La mejor ciencia no se aprende en los libros;  
el sabio más grande y mejor maestro es la Naturaleza.*

Galileo Galilei

## I. MILENIOS DE EXPERIENCIA Y TRADICIÓN. LA SCIENTIA REGIA

Hace ahora algo más de 200 años, un aprendiz de farmacéutico alemán, de tan solo 21, llamado Friedrich Setürner aisló de una planta el primer compuesto puro farmacológicamente activo: la morfina, obtenida del látex de las cápsulas de adormidera, *Papaver somniferum* L. Este hecho inició una era en la que los principios activos obtenidos de plantas podrían ser purificados, estudiados y, finalmente, administrados a dosis precisas.

Durante milenios, las plantas medicinales han sido una valiosa fuente de agentes terapéuticos y hoy en día, los principios activos de muchos medicamentos innovadores son productos naturales obtenidos de plantas o sus derivados. Baste decir que de las 1.562 nuevas moléculas aprobadas por la FDA entre 1981 y 2014, sólo el 27 % eran totalmente sintéticas y más de la mitad eran derivadas o inspiradas en compuestos naturales (Newman y Cragg, 2016), la mayoría obtenidas de plantas superiores, entre ellas, importantes agentes anticancerígenos como el paclitaxel y sus derivados (*Taxus* spp), la camptotecina y sus análogos, obtenida de *Camptotheca acuminata* Decne, o la homoharringtonina, de *Cephalotaxus harringtonia* K. Koch; agentes anticolinesterásicos, de utilidad en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, como la galantamina, obtenida de *Galanthus nivalis* L. o el importante agente antimalárico artemisinina, extraído de la especie vegetal utilizada en la medicina tradicional china, *Artemisia annua* L. y cuyo descubrimiento mereció, en 2015, el premio Nobel de Medicina y Fisiología otorgado a la científica china Tu YouYou.

No puedo dejar de mencionar aquellos principios activos que actualmente se encuentran sometidos a ensayos clínicos, como la curcumina, de *Curcuma longa* L., en 26 ensayos, la epigalocatequina 3 galato, de *Camelia sinensis* (L.) Kuntze, en 14 ensayos clínicos o la genisteína, de *Genista tinctoria* L., en 5 ensayos.

Pero para entender el desarrollo de la Farmacognosia, así como su condición actual es necesario retroceder a las primeras épocas de su historia.

Etimológicamente, la palabra Farmacognosia proviene del griego *pharmakon* (engloba los significados de remedio/medicamento y veneno) y *gnosis* (conocimiento). Aparece por primera vez en 1815, siendo A. Seydler quien introdujo el término en un trabajo titulado “*Analecta Pharmacognostica*”. Algo más tarde, en 1836, Walther publicó las denominadas “*Tablas Farmacognósticas*”, en las que ya se habla por separado de la Farmacognosia y la Farmacología.

Son numerosas las definiciones aportadas a lo largo de la historia; en todas ellas aparece un aspecto común: el conocimiento de las *drogas* y sus usos frente a la enfermedad, así como los métodos de conservación y análisis. Podemos indicar que una de las definiciones más acertada es aquella que considera la Farmacognosia como “*el estudio de las materias primas y de las sustancias de origen biológico con fines terapéuticos, es decir, obtenidas a partir de vegetales, de animales o por fermentación de microorganismos*” (Bruneton, 1999). El Consejo de la Unión Europea, define Farmacognosia como “*el estudio de la composición y los efectos de los principios activos y sustancias naturales de origen vegetal y animal*”, recibiendo la parte de la planta que contiene estos compuestos el nombre de “*droga*”.

Sus orígenes, en cuanto a la utilización de las plantas medicinales se refiere, son tan antiguos como la Humanidad. Las primeras evidencias datan de hace aproximadamente 60.000 años, (concretamente, se hallaron huesos humanos Neandertales con restos de polen proveniente de plantas medicinales con actividad estimulante, diurética, astringente y emética).

| COMPUESTO    | ESPECIE VEGETAL                             | USO TERPÁUTICO                                  |
|--------------|---|---|
| morfina      | <i>Papaver somniferum</i> L.                | analgésico                                      |
| salicina     | <i>Salix alba</i> L.                        | analgésico                                      |
| paclitaxel   | <i>Taxus brevifolia</i> Nutt.               | antineoplásico                                  |
| aescina      | <i>Aesculus hippocastanum</i> L.            | antiinflamatorio                                |
| berberina    | <i>Berberis vulgaris</i> L.                 | disentería bacilar                              |
| teofilina    | <i>Camelia sinensis</i> (L.) Kuntze         | broncodilatador                                 |
| cocaína      | <i>Erythroxylum coca</i> Lamk.              | anestésico local                                |
| digitoxina   | <i>Digitalis purpurea</i> L.                | cardiotónico                                    |
| artemisina   | <i>Aremisia annua</i> L.                    | antimalárico                                    |
| quinina      | <i>Chinchona</i> spp.                       | antimalárico                                    |
| vincristina  | <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don      | antineoplásico                                  |
| galantamina  | <i>Galanthus nivalis</i> L.                 | deterioro cognitivo,<br>enfermedad de Alzheimer |
| pilocarpina  | <i>Pilocarpus</i> spp.                      | glaucoma  |
| tubocurarina | <i>Chondodendron tomentosum</i> Ruiz & Pav. | relajante muscular                              |
| camptotecina | <i>Camptotheca acuminata</i> Decne.         | antineoplásico                                  |

Ejemplos representativos de productos naturales utilizados en terapéutica y su fuente.

Antiguas son también las primeras pruebas sobre el cultivo (hace aproximadamente 35.000 años) de plantas como manzanilla, adormidera o valeriana.

Los primeros documentos escritos sobre el uso de plantas que se conservan en la actualidad se encuentra, entre otros, en el Museo Británico y corresponden a tablillas sumerias de arcilla, escritas con caracteres cuneiformes (datan del siglo VI a.C.) y a documentos babilónicos en los que se mencionan drogas como el opio o el beleño. Estos registros escritos informan de la existencia de un sofisticado sistema medicinal en Mesopotamia, que comprendía unos 1000 medicamentos derivados de plantas. Entre las sustancias usadas por el pueblo Mesopotámico se encuentran el aceite de cedro (*Cedrus* spp.) y de ciprés (*Cupressus sempevirens*), especies como el regaliz (*Glycyrrhiza glabra*), la mirra (*Commiphora* spp.) y la adormidera (*Papaver somniferum*), todas ellas en uso actualmente para el tratamiento de diversas enfermedades.

La medicina egipcia se remonta aproximadamente al año 2900 a.C., pero su registro conservado más útil es el Papiro de Ebers, datado aproximadamente en el año 1550 a.C., que contiene más de 700 remedios, principalmente de origen vegetal, citando de forma específica el uso de 160 drogas vegetales e incluyendo formulaciones como gárgaras, cataplasmas, pastillas o pomadas elaboradas con leche, vino o miel como vehículos (Cragg y Newman, 2013; Sneader, 2005; Borchardt, 2002).

La medicina tradicional china (MTC) ha sido ampliamente documentada a lo largo de miles de años (Unschuld, 1986), y la documentación del sistema Ayurveda de la India se remonta al primer milenio a.C. Existe, además, información contrastada del empleo de drogas con propiedades curativas en civilizaciones como la Azteca y la Inca.

El conocimiento sobre la aplicación medicinal de las plantas en el mundo occidental se basa principalmente en la cultura griega y romana. En la Grecia antigua surgió Hipócrates, considerado “padre de la medicina”, Teofrasto, considerado “padre de la Botánica” y Dioscórides, “padre de la Farmacognosia”. Es a partir de esta época cuando se le da un carácter más científico al conocimiento de las drogas vegetales (al igual que a otras facetas de la ciencia), alejándose en gran medida de las concepciones religiosas y mágicas de las civilizaciones anteriores. De particular importancia son los compendios escritos por el médico griego Dioscórides (siglo I d.C.) y por los romanos Plinio el Viejo (siglo I d.C.) y Galeno (siglo II d.C.) (Sneader, 2005). El primero de ellos, Dioscórides, fue el primer gran farmacognosta, si se quiere farmacólogo, pues la Farmacognosia no estaba aún desgajada de su tronco farmacológico. Médico griego de los tiempos de Nerón enrolado en el ejército romano, Pedacius Dioscorides recopiló la información existente sobre medicamentos en un tratado que fue traducido al latín en el s. XV con el nombre “De Materia Medica”; en sus 5 volúmenes se recopilan y describen unas 600 drogas vegetales más algunas minerales y animales de la Flora de Asia Menor, Grecia, Egipto e Italia, clasificadas según las enfermedades que curaban, señalando, además, la forma en que debían emplearse. También indicó métodos físicos y químicos para identificar, conservar y preservar la calidad de las drogas vegetales. Esta obra se extendió entre romanos y árabes, ejerciendo una gran influencia hasta finales de la Edad Media. Fue traducido al español por Andrés Laguna en el s. XVI.

En el s. II surge Galeno, gran conocedor de la Flora Medicinal, señalando la importancia de la procedencia botánica y las adulteraciones.

Tras la caída del Imperio romano, la Europa Occidental atraviesa un período de oscurantismo que perdura hasta el s. XI, en el que la magia y la brujería dominan el uso de las plantas. Desde finales del siglo VII, los eruditos arabo-islámicos desempeñaron un papel esencial como intermediarios en la transferencia de conocimientos entre la antigüedad clásica y la Europa latina. Altamente interesados en la ciencia y la exploración, estos eruditos árabes comenzaron a traducir las obras originales griegas existentes, realizando traducciones también de otros idiomas, como el sirio y, en consecuencia, proporcionaron una base sólida para el desarrollo científico posterior. Sin embargo, esas actividades distaban mucho de ser simples traducciones y copias, puesto que enriquecieron los conocimientos farmacológicos clásicos con los conocimientos tradicionales y empíricos locales, sus propias ideas y experiencias. Al mismo tiempo, los árabes mantenían intensas relaciones comerciales y estaban conectados a las grandes rutas comerciales contemporáneas como la Ruta de la Seda y la Ruta del Incienso. Además, el imperio árabe se expandió al Oriente Medio, Norte de África y Europa occidental, principalmente la Península Ibérica, lo que dio lugar a un intenso contacto con diferentes culturas y a un intercambio de los conocimientos especializados. A través de estas rutas, las plantas medicinales, por ejemplo, las utilizadas en las tradiciones indoiraní, siria, afgana, china e india, se integraron en la Materia médica árabe, incluida la información sobre las indicaciones y aplicaciones medicinales. Análogamente, las plantas medicinales de la Península Ibérica hicieron una importante contribución a la formación ulterior de los conocimientos farmacognósticos medievales. El potencial científico de la Farmacognosia durante el período medieval árabe-islámico se refleja en obras de la literatura médica general como las de Rhazes (865 - 925), Ibn Sina (980 - 1037), también conocido como Avicena, o Averroes, que contienen amplia información sobre las características y el uso de las plantas medicinales.

Fruto de la influencia árabe en el mundo cristiano, destacaron las escuelas de Salerno (creada por Carlomagno) y Montpellier como centros científicos de aprendizaje (Cragg y Newman, 2013).

Destacó, también en esta época, la escuela de Traductores de Toledo.

A partir de entonces, casi hasta el s. XVIII, la alquimia y la magia reinan en casi toda la Europa Occidental, deteniéndose el avance de la medicina.

La invención del tipógrafo por Johannes Gutenberg condujo a la resurrección del conocimiento grecorromano en los siglos XV y XVI, y a la compilación de varios libros de plantas de gran influencia difundidos en Europa, como *The Mainz Herbal* (1484) y *The German Herbal* (1485), ambos editados por el socio de Gutenberg, Peter Schöffer, *Herbarium Vivae Eicones* (Otto Brunfels; 1530), *Kreütter Buch de Hieronymus Bock* (1546), y *De Historia Stirpium* de Leonhart Fuchs que fue publicado en latín en 1542 y también en alemán al año siguiente (Sneader, 2005).

A principios de la época moderna (siglos XVI-XVII) fueron los grandes herbarios los encargados de preservar y transmitir los conocimientos farmacobotánicos. En el contexto de la expansión europea, se trajeron a Europa nuevas drogas exóticas, y el conocimiento farmacológico de estas plantas medicinales se integró en el desarrollo de las tradiciones europeas. Los conocimientos farmacognósticos se hicieron aún más esenciales para identificar las drogas, así como su origen, eficacia, pureza y adulteraciones. Las obras sobre la materia médica y las farmacopeas reflejan las dificultades de la época y los esfuerzos por garantizar los requisitos básicos de calidad. El descubrimiento de las nuevas rutas marítimas de las Indias y América, permitió el conocimiento de nuevas drogas en Europa como el cacao, la quina o la coca.

La figura más atrayente del Renacimiento, en lo que a las ciencias médicas se refiere, es Paracelso, quien estimuló la experimentación química al hablar de la *quintaesencia* (refiriéndose al principio activo de la planta). Además, observó la relación existente entre la cantidad que se administra y la acción que produce.

Durante todo ese tiempo, las plantas medicinales sólo se aplicaban de manera empírica, sin conocimientos sobre los mecanismos de sus actividades farmacológicas o sus componentes activos. Si bien la diferencia-

ción y formación de las ciencias modernas comenzó en los siglos XVI y XVII, en el programa académico del siglo XVI, la Farmacognosia, que en realidad es una de las ciencias más antiguas, siguió siendo inicialmente una asignatura troncal en las Facultades, enseñada primero como *Lectura simplicium* (clases teóricas /conferencia sobre los básicos) acompañada del *Ostensio simplicium* (presentación de los simples/clases prácticas), y después como *Materia Medica* (conferencia sobre drogas medicinales). Sólo en el siglo XVIII la Farmacognosia comenzó a desarrollarse como una disciplina académica definida en la farmacia. En este siglo Anton von Störck, que investigó plantas venenosas como el acónito y el colchico, y William Withering, que estudió la digital para el tratamiento del edema, sentaron las bases para la investigación clínica racional de las plantas medicinales (Sneider, 2005).

También en el s. XVIII nace Linneo, que llevó a cabo una importante modificación de la botánica, estableciendo la nomenclatura binaria. Lavoisier, en el mismo siglo, abordó la concepción científica de la química, creando la nueva nomenclatura. A finales de siglo, Scheele separó los primeros compuestos químicos (ácidos orgánicos) a partir de drogas vegetales.

El estudio de las drogas, tal como la Naturaleza las produce, acostumbró a designarse durante el s. XVIII con el término *Materia Médica*.

Mientras que los médicos, botánicos y farmacéuticos como Johann Adam Schmidt (1759 - 1809), a quien se le atribuye la definición del término “Farmacognosia” en su obra publicada póstumamente *Lehrbuch der Materia Medica* (1811), Theodor Wilhelm Christian Martius (1796-1863), y Matthias Schleiden (1804-1881) allanaron el camino para la diferenciación de la Farmacognosia en una disciplina académica, fue el boticario suizo Friedrich August Flückiger (1828-1894) y finalmente el famoso boticario alemán Alexander Tschirch (1856-1939) quienes, a principios del siglo XX, perfeccionaron la definición y la percepción de la Farmacognosia. Tschirch explicó la Farmacognosia como una sinopsis universal de las drogas medicinales considerando cualquier tipo de conocimiento necesario para la identificación y caracterización, excepto la eficacia fisiológica, y definió las disciplinas especiales que él consideraba esenciales para formar tal conocimiento comprensivo.

Lo que podemos considerar como el descubrimiento racional de medicamentos a partir de plantas comenzó a principios del siglo XIX, cuando el alemán, asistente de farmacéutico, Friedrich Sertürner logró aislar del opio el que sería importante analgésico y agente inductor del sueño, y al que llamó *morphium* (morfina) en honor al dios griego de los sueños, Morfeo. Publicó un extenso artículo sobre su aislamiento, su cristalización, la estructura de los cristales y las propiedades farmacológicas, que estudió primero en perros vagabundos y luego en autoexperimentos (Sertürner, 1817). 100 años después la estructura de la morfina fue elucidada y aún hoy en día se obtiene de los cultivos de *Papaver somniferum*. Esto provocó el estudio de otras plantas medicinales, y durante las siguientes décadas del siglo XIX, muchos productos naturales bioactivos, principalmente alcaloides, pudieron ser aislados de sus fuentes naturales; por ejemplo, la quinina, aislada por Pelletier y Caventou de la corteza de quina, la cafeína, de los frutos de *Coffea arabica*, la nicotina, de las hojas de *Nicotiana tabacum*, la codeína también del opio, atropina aislada por Geise y Hesse de Solanáceas, colchicina de *Colchicum autumnale*, cocaína de la hoja de *E. coca*, o la capsaicina de *Capsicum annuum* (Corson and Crews, 2007; Kruse, 2007; Zenk and Juenger, 2007); todos ellos son compuestos de carácter más o menos básico. También a principios del s. XIX, Leroux separó un compuesto de las cortezas de sauce que no posee carácter ácido ni básico y que constituye el primer heterósido aislado, la salicina.

Durante el siglo XIX la Farmacognosia fue, sin lugar a dudas, la disciplina farmacéutica más importante, la matriz de todas las disciplinas farmacéuticas actuales. Los boticarios que se especializaron en la purificación de los compuestos activos fueron los precursores de las actuales compañías farmacéuticas. El primero fue Heinrich Emanuel Merck, en la ciudad de Darmstadt (Alemania), al sur de Frankfurt, que comenzó a extraer morfina y otros alcaloides en 1826 (Kaiser, 2008). Posteriormente, se realizaron esfuerzos para obtener productos naturales mediante síntesis química para facilitar la producción con mayor calidad y menores costes. El ácido salicílico fue el primer producto natural sintetizado, en 1853. Los primeros signos de que una nueva era comenzaba fueron evidentes con la introducción de un exitoso producto obtenido por síntesis, la aspirina, la cual fue el primer ejemplo de emplear la naturaleza como modelo cabeza de serie para obtener una molécula sintética.

Entre los principales cultivadores de la Farmacognosia del siglo XIX destacan Jonathan Pereira (1804-1853) a quien se debe unos clásicos *The Elements of Materia Medica and Therapeutics* (London, 1839-1840), Daniel Hanbury (1825-1875) coautor, junto a Friedrich August Flückerger (1828-1894) de *Pharmacographia. A History of the principal drugs of vegetable origin met with in Great Britain and British India* (London, 1874) y Alexander W. Tschirch (1865-1939), cuyos trabajos de síntesis de esta materia con los que compuso los siete volúmenes de su obra *Handbuch der Pharmazie* (Leipzig, 1917-1927), suponen la base científica sobre la que esta disciplina conocerá su desarrollo.

En España, los estudios sobre plantas medicinales conocen un período de esplendor en el tránsito del siglo XVIII al XIX, tras el regreso a la metrópoli de los expedicionarios en Perú. Cabe destacar los estudios de Hipólito Ruiz sobre el género *Cinchona*, recogidos en tres textos fundamentales: *Quinología* (Madrid, 1792), *Suplemento a la Quinología* (Madrid, 1801, firmado conjuntamente con J. Pavón) y *Compendio histórico-médico-comercial de las quinas* (inédito hasta 1992).

Tanto los trabajos de los expedicionarios americanos como los manuales de “Materia Médica” publicados en España a comienzos del s. XIX, como *Lecciones de Historia Natural* (Agustín Yáñez y Girona, 1820) o el *Tratado de Materia Farmacéutica* (Manuel Jiménez Murillo, 1838), responden a la concepción clásica de la disciplina.

Con el desarrollo de la Fisiología, a raíz de los trabajos realizados por Magendie y su discípulo Claude Bernard (que ensaya sobre animales de experimentación la actividad de las plantas medicinales, intentando precisar cómo actúan), se estableció la actividad farmacológica de alcaloides aislados, como la emetina, la morfina o la estricnina, empezando a conocerse la forma de actuación o mecanismo de acción de compuestos de origen natural.

Sobre la segunda mitad del s. XIX comienza a generalizarse la caracterización de los materiales farmacéuticos de acuerdo con su actividad fisiológica, siendo el texto que gozó de más aceptación, *Tratado de Materia Farmacéutica Vegetal* (Madrid, 1883), redactado por el profesor Juan Ramón Gómez Pamo, con reediciones en los comienzos del s. XX.

Se ven delimitados, así, los tres aspectos de la Farmacognosia actual: examen botánico de las drogas, estudio de su composición química y estudio de su actividad fisiológica que marcará su empleo en terapéutica. De esta forma, la antigua denominación de Materia Médica dejó paso a la actual de Farmacognosia.

El conocimiento de las drogas permite avanzar, asimismo, en el campo de la Fitoterapia puesto que podemos determinar si la acción se debe a un principio activo o a la asociación de varios, estableciendo que la acción de un principio activo aislado puede ser diferente a la de la droga entera.

Con el descubrimiento de la penicilina (1928), en la década de 1930 se inició una era de descubrimiento de fármacos a partir de fuentes microbianas que, tras la Segunda Guerra Mundial, sentó las bases científicas y económicas de la industria farmacéutica moderna. En ese momento, el uso terapéutico de los extractos y en parte de los productos naturales purificados, fue reemplazado cada vez más por el uso de compuestos puros (Beutler, 2009; David et al., 2015).

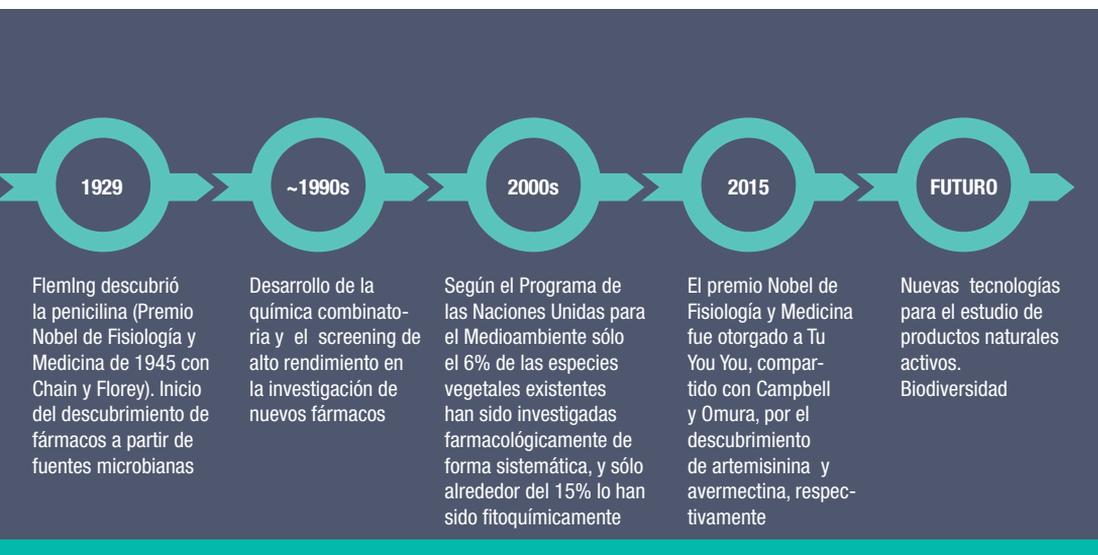
Es a partir de la segunda mitad del s. XX, cuando se observa un incremento del uso terapéutico de los preparados vegetales, situación que se



ha reflejado en la puesta en marcha de acciones a nivel institucional como la creación en 1989 del *European Scientific Cooperative on Phytotherapy* (Federación Europea de las Sociedades Científicas de Fitoterapia de los diferentes países Europeos) (ESCOP), el Programa sobre Medicina Tradicional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la creación en 1997 de un grupo de trabajo sobre medicamentos a base de plantas en el seno de la Agencia Europea del Medicamento (transformado en el Comité sobre medicamentos a base de plantas en 2004); a ello se suma el importante incremento en el trabajo de la Farmacopea Europea sobre monografías relacionadas con drogas vegetales y derivados. Todo ello garantiza el desarrollo de preparados fitoterápicos de calidad, seguros y eficaces, además de garantizar su uso racional.

Así pues, la Farmacognosia actual estudia la droga en sus diversos apartados, comenzando por su procedencia biológica y origen geográfico, condiciones de cultivo, características macro y micromorfológicas, composición química y actividad farmacológica, de la que se deriva su uso terapéutico.

Y lo hace en un momento en el que el impacto económico y social de los productos naturales para el descubrimiento de fármacos sigue siendo muy alto.





## II. INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE FÁRMACOS BASADOS EN PRODUCTOS NATURALES

*Soy de las que piensan que la ciencia  
tiene una gran belleza.  
Un científico en su laboratorio no es solo un  
técnico, es también un niño colocado ante  
fenómenos naturales que le impresionan como un  
cuento de hadas.*

M. Curie

### Retos

Según el Programa de las Naciones Unidas para el Medioambiente, se estima que sólo el 6% de las especies vegetales existentes han sido investigadas farmacológicamente de forma sistemática, y sólo alrededor del 15% lo han sido fitoquímicamente. Aunque el porcentaje de especies caracterizadas es cada vez mayor gracias, entre otros factores, a los continuos esfuerzos en investigación realizados, siguen existiendo un gran número de compuestos de origen vegetal que no han sido investigados desde el punto de vista farmacológico hasta ahora, en las aproximadamente 310.000 especies de plantas descritas (*International Union for Conservation of Nature -IUCN-*, 2015) (Majolo et al., 2019; Cragg y Newman, 2013).

Uno de los principales retos para la obtención de compuestos bioactivos a partir de especies vegetales está relacionado con la accesibilidad al material de partida, concretamente, con cuestiones relacionadas con la recolección de las especies silvestres, debido, por una parte, a la necesidad de proteger los hábitats de las plantas para evitar que desaparezcan por la presión antrópica (David et al., 2015; Verpoorte, 2000), y, por otra, a la variabilidad de la composición química, que depende, entre otros factores, del estadio de crecimiento del vegetal, lo que limita el tiempo para la recolección (por ejemplo, la recolección de flores requiere llevarse a cabo durante la floración y las cortezas en época húmeda).

En el caso del material vegetal importado, existen cuestiones adicionales que pueden afectar a su accesibilidad, por ejemplo, factores sociopolíticos, catástrofes naturales o cambios en la normativa legal sobre exportación.

En muchos casos, cuando una planta se comercializa o cuando uno de sus componentes empieza a ser utilizado como principio activo, sus poblaciones se ven amenazadas, tanto por la explotación masiva como por el empleo de técnicas de cosecha insostenibles (Cordell, 2011). El ejemplo clásico de este problema fue la llamada “crisis de suministro de taxol”, en la cual, la notable eficacia clínica demostrada por este compuesto para el tratamiento del cáncer de ovario, llevó a un incremento exponencial de su demanda. Si consideramos que, en ese momento, el compuesto sólo podía obtenerse a partir de la corteza del tejo (*Taxus brevifolia* L.), el proceso de producción, incluyendo la recolección y secado de la corteza, la extracción y la purificación, era, además de extremadamente largo, muy costoso. A ello se añadía el impacto ecológico de la recolección masiva de la corteza (Kingston, 2011; Cragg et al., 1993). Actualmente el taxol se obtiene por otras rutas alternativas, como posteriormente trataré, pero el problema del suministro sostenible de material vegetal sigue siendo importante para otras especies.

El cultivo es, sin duda, una alternativa más sostenible que la silvicultura; pero a pesar de ello, las dos terceras partes de las 50.000 especies de plantas medicinales que se utilizan en todo el mundo, todavía se recolectan en estado silvestre. Es por ello que organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2003) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA, 2006) han elaborado directrices sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPA) de plantas medicinales a fin de proveer técnicas sostenibles de recolección y minimizar los problemas ecológicos asociados a la recolección de flora espontánea (Che et al., 2019).

Además de la accesibilidad geográfica, formando parte de consideraciones ecológicas y jurídicas, es necesario considerar aspectos relacionados con la distribución de los beneficios, así como cuestiones de patentabilidad de los productos de origen natural. El Convenio sobre la Diversidad Biológica de las Naciones Unidas (CDB; [http:// www.cbd.int/doc/legal/](http://www.cbd.int/doc/legal/)

cbd-en.pdf), firmado en 1992 por la comunidad internacional en Río de Janeiro, Brasil, marcó como objetivos prioritarios: conservar la biodiversidad, utilizar de forma sostenible sus recursos genéticos y compartir los beneficios de su uso de forma justa y equitativa (Soejarto et al., 2004). Como resultado del mismo, los países proveedores, sus gentes y sus representantes se convierten en partes activas que deben ser consideradas en los programas de descubrimiento de medicamentos a partir de recursos naturales y más concretamente, plantas medicinales (Heinrich, 2010). Aunque el tratado proporcionó un marco para que los países regulen y definan la bioprospección, dejó muchas preguntas sin resolver, particularmente en el tema del acceso y el intercambio de beneficios (Cragg et al., 2012; Kingston, 2011). Por un lado, no pudo refutar el escepticismo hacia la bioprospección en muchos países en vías de desarrollo, algunos de los cuales emitieron reglamentos de protección muy estrictos, mientras que otros fueron demasiado lentos en establecer el marco jurídico necesario, además de presentar expectativas, en muchos casos desmesuradas, sobre los posibles beneficios económicos derivados de la explotación de los recursos. Para mejorar esta situación, se publicó en 2011, entrando en vigor en 2014, el Protocolo de Nagoya sobre el acceso a los recursos genéticos y la distribución justa y equitativa de beneficios, surgido del mencionado Convenio sobre la Diversidad Biológica (<http://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-en.pdf>); el protocolo, ratificado por 50 países, es legalmente vinculante y tiene como objetivo aportar claridad a las cuestiones de acceso y de intercambio de beneficios (Burton y Evans-Illidge, 2014; Oliva, 2011).

Junto con la accesibilidad al material vegetal, como segundo aspecto importante a tener en cuenta, mencionaré la calidad. La calidad, definida en gran medida por la composición química final, no sólo depende de la identidad de la especie y del momento de la cosecha o recolección, sino también de la composición del suelo, la altitud, el clima, el procesado y las condiciones de almacenado. Además, durante el proceso de extracción, así como durante los procesos de aislamiento y purificación, puede producirse la transformación y la degradación de los compuestos de interés farmacológico (Bucar et al., 2013). También determina la composición química del material vegetal de partida la presencia de organismos endofitos, como los hongos y las bacterias, de tal forma que los compuestos presentes en el

material vegetal recolectado pueden ser, en algunas ocasiones, metabolitos del organismo endofito, o inducidos como consecuencia de la interacción con este organismo (David et al., 2015).

Los programas de descubrimiento de fármacos a partir de productos naturales requieren también resolver aspectos como la incompatibilidad de los extractos con el *screening* de alto rendimiento (HTS) (Koehn y Carter, 2005) o la identificación y caracterización de los componentes bioactivos, cuya integridad es difícil de mantener debido, entre otros factores, a la gran complejidad de los extractos. Además, es frecuente que éstos contengan compuestos fluorescentes o coloreados que interfieren en las determinaciones en las etapas finales del HTS (Henrich y Beutler, 2013; Gul y Gribbon, 2010). Sin olvidar la presencia de moléculas altamente apolares como las clorofilas o los ácidos grasos, o muy polares, como polifenoles y flavonoides que, en determinados ensayos pueden conducir a resultados falsos positivos o falsos negativos y cuya eliminación o la modificación del ensayo para evitar su detección, requiere de costosos esfuerzos. (Sasiela et al., 2008; Balunas et al., 2006). Además de las moléculas orgánicas, también algunos constituyentes inorgánicos, como los metales, pueden dar lugar a falsos resultados positivos. Por último, algunos compuestos con propiedades citotóxicas podrían también interferir en los ensayos en células, ya que pueden enmascarar la detección de otras bioactividades o la presencia de otros compuestos activos. Las saponinas, por ejemplo, que poseen efectos detergentes, pueden conducir a la lisis celular y, por lo tanto, interferir con los resultados de los ensayos de base celular (Henrich y Beutler, 2013).

Finalmente, la realización de ensayos clínicos rigurosos, necesarios para el registro de productos naturales como medicamentos, representa otro gran reto, debido, principalmente, a las particulares exigencias de patentabilidad asociadas a los productos naturales. En este sentido, las patentes sobre productos naturales se han visto afectadas por las directrices publicadas en 2014 por la Oficina de Patentes y Marcas de Estados Unidos, (*Guidance for Determining Subject Matter Eligibility Of Claims Reciting Or Involving Laws of Nature, Natural Phenomena & Natural Products*), las cuales establecen que una reivindicación de patente debe demostrar una “diferencia marcada” con respecto a un material o fenómeno natural

conocido. Estas directrices fueron consecuencia de dos sentencias del Tribunal Supremo: “La Asociación de Patología Molecular contra Myriad” que dictaminó que el ADN aislado y purificado no es patentable y “Mayo contra Prometeo” que dictaminó que los métodos para la determinación de las dosis óptimas de los medicamentos basados en los niveles de un metabolito natural no son patentables.

Además de las cuestiones relacionadas con patentes de productos naturales, cabe mencionar finalmente que se ha producido un cambio general en el interés en la industria farmacéutica, pasando del interés en medicamentos basados en moléculas pequeñas a la utilización de grandes moléculas biológicas, como, por ejemplo, proteínas o ácidos nucleicos.

## **Interés científico renovado**

En la búsqueda de nuevos medicamentos de origen vegetal existen también factores que influyen positivamente, que paso a mencionar.

El primero de ellos es consecuencia de que los productos naturales se elaboran a partir de organismos vivos y, por lo tanto, poseen propiedades que están optimizadas evolutivamente para ejercer diferentes funciones biológicas (por ejemplo, la unión a proteínas diana específicas u otras biomoléculas) (Appendino et al., 2010; Hunter, 2008). Si analizamos en detalle las diferencias estructurales entre los productos naturales y las moléculas obtenidas por síntesis podemos apreciar que, además de un número mucho más bajo de centros quirales, los compuestos sintéticos tienden a tener un peso molecular más bajo, un número más alto de enlaces de libre rotación, cadenas de mayor longitud, menor número de anillos, menos átomos de oxígeno pero más átomos de nitrógeno, azufre y halógenos, menor número de aceptores y donadores de enlaces de H de tipo Lipinski y un mayor coeficiente de partición octanol-agua (valores cLogP). Otras diferencias a tener en cuenta son la complejidad de las estructuras (anillos) y el grado de saturación de los mismos (Koehn y Carter, 2005). Estas diferencias estructurales, especialmente el menor número de centros quirales, el menor tamaño, y la mayor flexibilidad tienen como resultado una actividad menor y menos específica de los compuestos sintéticos (Feher y Schmi-

dt, 2003). Por el contrario, los compuestos de origen natural suelen tener acciones biológicas selectivas debido a su afinidad de unión a proteínas específicas relevantes, a que poseen una diversidad y complejidad química superior, desarrollada durante la biosíntesis y a que, a menudo, tienen propiedades ADME/T más favorables (Absorción, Distribución, Metabolismo y Eliminación/Toxicidad) (Koehn y Carter, 2005; Clardy y Walsh, 2004).

De hecho, los resultados obtenidos por el HTS a partir de las grandes bibliotecas de compuestos de síntesis introducidas en la década de los 90, no cumplieron con las expectativas. En lugar de aportar un mayor número de fármacos, las tasas de aprobación de nuevos medicamentos disminuyeron, de tal forma que en 1990 fueron aprobados por la FDA 45 nuevos medicamentos, mientras que sólo 21 lo fueron en 2015 (David et al., 2015; Scannell et al., 2012; Kingston, 2011). Las razones de esta tendencia decreciente son complejas, pero un aspecto importante es que las bibliotecas de compuestos sintéticos no suelen abarcar toda la diversidad estructural y seleccionan los compuestos en base a su potencia. Además, debido a las estrategias empleadas en la generación de simulaciones y al elevado número de moléculas recogidas en las diferentes bibliotecas, éstas a menudo se superponen, siendo necesario un proceso de dereplicación (Katiyar et al., 2020).

Otro factor que influye positivamente es el disponer de información etnofarmacológica bien documentada sobre el uso tradicional, lo que puede orientar sobre compuestos terapéuticamente eficaces (Kinghorn et al., 2011; Heinrich, 2010; Heinrich y Gibbons, 2001). En esta línea, un estudio realizado sobre el empleo en terapéutica de 122 compuestos derivados de plantas reveló que el 80% de ellos poseen las mismas indicaciones terapéuticas que los usos etnofarmacológicos para los que se emplean las plantas de que derivan (Fabricant y Farnsworth, 2001; Farnsworth et al., 1985). Se demostró también que muchos productos naturales utilizados para el desarrollo de un medicamento poseen el mismo uso tradicional, aunque esto no se conociera en la fase de desarrollo del fármaco (Heinrich, 2010; Moerman, 1998). En este punto, permítanme señalar que el conocimiento sobre los medicamentos utilizados tradicionalmente está desapareciendo, aún más rápido que la biodiversidad de las especies y con el ritmo actual de la globalización, mucha información valiosa corre el riesgo de perderse para siempre (Che & Zhang, 2019; Appendino et al., 2010).

Este renovado interés científico en el descubrimiento de medicamentos de origen vegetal es simultáneo a los importantes avances científicos y tecnológicos logrados en este campo, entre ellos, una mejor comprensión de la enfermedad y sus causas subyacentes, el número cada vez mayor de dianas disponibles, los avances en las técnicas analíticas, las posibilidades de modificaciones estructurales de compuestos de origen natural y también el incrementado interés por la salud natural y la validación de medicamentos tradicionales (Henrich y Beutler, 2013; Li y Vederas, 2009; Koehn y Carter, 2005).

Como prueba inequívoca del renovado interés, si analizamos indicadores de investigación, se observa un rápido aumento en el número de estudios científicos, según se deriva de las publicaciones de PubMed, con un incremento de hasta  $10^4$  en el número de publicaciones sobre farmacología y química de plantas medicinales desde 1982 hasta el momento actual.

## **Consideraciones sobre la Selección del material de partida**

La selección del material de partida, como aspecto clave en el descubrimiento de nuevos fármacos a partir de plantas, puede abordarse desde distintos planteamientos como son la búsqueda aleatoria, con criterios etnofarmacológicos, quimiosistemáticos, ecológicos o computacionales.

En el enfoque de preselección aleatoria, los extractos de plantas, las fracciones enriquecidas o los compuestos aislados se seleccionan al azar en base a su disponibilidad. Este enfoque puede ser útil en los casos en que las muestras provengan de regiones de alta biodiversidad y endemismo, ya que ésta puede conllevar diversidad estructural (Henrich y Beutler, 2013; Barbosa et al., 2012;). Tiene como ventaja la posible identificación de bioactividades inesperadas que no se podrían haber previsto en base a los conocimientos existentes. Sin embargo, las muestras (extractos, fracciones o compuestos puros) suelen estar disponibles sólo en pequeñas cantidades, lo que limita el número de bioensayos en los que se pueden probar. Por lo tanto, como alternativa a las pruebas aleatorias que intrínsecamente sufren de una baja tasa de éxito, se puede aplicar como estrategia la realización de un número limitado de ensayos farmacológicos cuidadosamente seleccionados previamente.

El enfoque más clásico basado en el conocimiento es el enfoque etnofarmacológico, en el que el uso medicinal tradicional de las plantas constituye la base para la selección del material y del ensayo farmacológico. La etnofarmacología implica la observación, descripción e investigación experimental de los remedios de uso tradicional y sus bioactividades. Representa un concepto transdisciplinario basado en la botánica, la química, la bioquímica y la farmacología, que involucra a muchas disciplinas más allá de las ciencias naturales, como la antropología, la arqueología, la historia y la lingüística (Leonti, 2011; Heinrich, 2010; Fabricant y Farnsworth, 2001;). Algunos ejemplos destacados de fármacos aprobados que fueron descubiertos inicialmente mediante el uso de datos etnofarmacológicos son: la kellina o visammina, furanocromona de *Ammi visnaga* (L.) Lam. que sirvió como compuesto principal para el desarrollo de ácido cromoglicólico, cuya sal sódica se utiliza como estabilizador de mastocitos en la alergia y el asma; galegina de *Galega officinalis* L. que fue la estructura base para la síntesis de la metformina y desencadenó el desarrollo posterior de fármacos antidiabéticos del tipo de la biguanida; papaverina de *Papaver somniferum* L., base para el desarrollo del fármaco antihipertensivo verapamilo; la quinina de la corteza de especies del género *Cinchona*, utilizada en Perú para tratar la malaria e inspiró la síntesis de la cloroquina y mefloquina que sustituyó en gran medida a la quinina a mediados del siglo XX y actualmente declarado medicamento esencial por la OMS para el tratamiento y prevención del paludismo; el fármaco antimalárico artemisinina aislado a partir de planta china *Artemisia annua* L. en 1971 y que ha conducido al desarrollo de derivados, como el artensunato sódico o el artemeter, que hoy en día se utilizan ampliamente para tratar la malaria (White, 2008; Klayman, 1985).

El acceso a los conocimientos etnofarmacológicos es relativamente fácil en medicinas tradicionales bien establecidas, como la Medicina Tradicional China (MTC) o la Ayurveda, ya que poseen documentos escritos que han sido revisados a lo largo de los siglos y que todavía se utilizan hoy en día. No hay que olvidar que la MTC se ha enseñado como ciencia en las facultades de medicina chinas durante más de 2000 años. Sin embargo, los sistemas médicos basados en el uso popular o incluso el chamanismo, carecen de documentos escritos, y las formulaciones a base de plantas utilizadas a menudo son mantenidas en secreto por los practicantes, lo que

hace que sea más difícil acceder a la información (Fabricant y Farnsworth, 2001). Cuando se trata de plantas medicinales, la información se puede adquirir de diferentes fuentes, incluyendo libros de botánica médica, artículos de revisión sobre plantas medicinales utilizadas en una determinada región geográfica o por una cultura étnica, trabajos de campo, y bases de datos de informáticas de diversos tipos.

El descubrimiento de fármacos basado en la etnofarmacología está asociado también a múltiples desafíos, como es que se requiere no sólo de un conocimiento detallado del hábitat de la planta medicinal, su correcta autenticación botánica, saber si están amenazadas o en peligro de extinción, y qué permisos son necesarios para recolectarlas e investigarlas, sino que también hay que considerar los derechos legales del país de origen o de los grupos étnicos en los que se generó originalmente el conocimiento tradicional. Como ya he comentado anteriormente, en este contexto, es necesario respetar los acuerdos determinados en el Convenio sobre la Diversidad Biológica de las Naciones Unidas y en el Protocolo de Nagoya, ya comentados. Estas restricciones hacen que la recolección de plantas sobre una base etnofarmacológica sea más tediosa y lenta que la mera recolección aleatoria, que se considera más sencilla, sobre todo desde la perspectiva de la industria farmacéutica (David et al., 2015; Fabricant y Farnsworth, 2001).

Otra posibilidad de selección de material vegetal para el ensayo farmacológico es el enfoque quimiosistemático o filogenético, que utiliza el conocimiento quimiotaxonómico y la filogenética molecular para seleccionar géneros o familias que se sabe producen compuestos o clases de compuestos asociados con una cierta bioactividad o potencial terapéutico. Estudios filogenéticos y fitoquímicos combinados han demostrado que existe una fuerte señal filogenética en la distribución de metabolitos secundarios en el reino vegetal que puede ser explotada en la búsqueda de nuevos productos naturales. Como ejemplo, se ha utilizado un enfoque filogenético para seleccionar las plantas diana más prometedoras del género *Narcissus* y de la tribu *Galantheae*, de las Amarilidáceas para el descubrimiento de alcaloides inhibidores de la acetilcolinesterasa (Larsen et al., 2010; Rønsted et al., 2008). La combinación de información filogenética con el conocimiento etnobotánico tradicional constituye el campo emergente de la

denominada “botánica filogenética” (Saslis-Lagoudakis et al., 2011). El supuesto básico de este enfoque es que las propiedades medicinales no están distribuidas al azar en todo el reino vegetal, sino que algunos taxones comprenden más especies que otros, y que la selección de especies de estos taxones conduce a mayores tasas de éxito en el descubrimiento de fármacos. En particular, la exploración de los patrones etnomédicos interculturales dentro de un marco filogenético se considera una herramienta muy valiosa para la identificación de especies prometedoras, si tenemos en cuenta que especies de plantas filogenéticamente relacionadas de regiones muy distantes se utilizan para tratar las mismas alteraciones (Saslis-Lagoudakis et al., 2011; 2012).

El enfoque ecológico se basa en la observación de las interacciones entre los organismos y su entorno que pueden conducir a la producción de compuestos naturales bioactivos. La hipótesis que subyace a este enfoque es que los metabolitos secundarios poseen funciones ecológicas que pueden tener también un potencial terapéutico para los humanos. Por ejemplo, los metabolitos implicados en la defensa de la planta contra los patógenos microbianos pueden ser útiles como antimicrobianos en los seres humanos, o los productos secundarios que defienden una planta contra los herbívoros a través de la actividad neurotóxica podrían tener efectos beneficiosos en los seres humanos debido a una supuesta actividad sobre el sistema nervioso central (Barbosa et al., 2012). Esta hipótesis podría justificarse debido a que una alta proporción de la estructura bioquímica es común a todos los organismos vivos; considerando esto, parece razonable que los metabolitos secundarios de organismos tan distantes como plantas, hongos y bacterias sean todos capaces de interactuar con las macromoléculas del cuerpo humano. En un subtipo de este enfoque, esas plantas son seleccionadas e ingeridas por los animales con propósitos de automedicación y para reconstituir la homeostasis fisiológica, por ejemplo, para aliviar infecciones microbianas o parasitarias, para mejorar las tasas de reproducción o para moderar la termorregulación; concepto éste que se denomina zootaxofarmacognosia (Barbosa et al., 2012; Forbey et al., 2009). Por ejemplo, se podrían aislar compuestos con actividad antimalárica y antiprotozoaria de especies de plantas que fueron ingeridas por chimpancés y babuinos en la naturaleza en un comportamiento alimentario inusual, supuestamente para controlar la infección de parásitos intestinales (Obbo et al., 2013).

Finalmente, los métodos computacionales son otro enfoque basado en el conocimiento empleado para seleccionar tanto material vegetal como productos naturales con una alta probabilidad de que presenten actividad farmacológica. Uno de los más empleados son las simulaciones *in silico*, que permiten proponer las características de unión de los ligandos a las proteínas, tanto de moléculas nuevas obtenidas de plantas como recuperadas de la literatura. Los descriptores moleculares de un compuesto pueden ser calculados a partir de su estructura 2D o 3D. Esos descriptores pueden compararse luego con los datos de compuestos activos para reconocer correlaciones y establecer modelos cuantitativos de relación estructura-actividad (QSAR), permitiendo preseleccionar compuestos con mayor probabilidad de actividad frente a un objetivo específico.

Otro método computacional de gran éxito es el cribado virtual basado en farmacóforos, utilizado, por ejemplo, para definir la interacción del magnolol con el sitio de unión del receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma (PPAR). Dependiendo del objetivo, este método puede alcanzar tasas de éxito de entre el 2 y el 30% (Hein et al., 2010). Si se dispone de modelos de farmacóforos para una serie de dianas, se puede utilizar el cribado virtual paralelo, método que puede ser muy útil para la metaidentificación, si se conoce la actividad de un extracto o un compuesto puro.

Un tercer método computacional, el acoplamiento molecular, se utiliza ampliamente para dilucidar el mecanismo de acción y racionalizar la relación estructura-actividad de los productos naturales. El objetivo del acoplamiento es predecir con precisión la unión de un ligando con una proteína, estimando la fuerza de la unión con una puntuación (Waszkowycz et al., 2011). Este método se ha utilizado recientemente con los componentes de *Carthamus tinctorius* L., que mostraron diferentes actividades sobre la indoxil indoleamina 2,3-dioxigenasa (Temml et al., 2013).

Los métodos informáticos también se utilizan para descubrir sitios de unión no descritos anteriormente en estructuras proteicas conocidas, representando valiosas herramientas de filtro en la búsqueda de nuevas actividades para los productos naturales. También se pueden emplear para

predecir las propiedades ADME/T o para encontrar nuevas actividades para medicamentos ya aprobados (lo que se denomina, reordenación del medicamento) (Kaserer et al., 2014).

Entre las bibliotecas virtuales que comprenden colecciones de productos naturales en las que basarse se encuentran la base de datos DIOS, es una colección de 9676 compuestos derivados de la literatura de plantas descritas por Pedacius Dioscorides en su enciclopedia fundamental *De Materia Medica* (siglo I d.C.); la Base de Datos de Productos Naturales (NPD), que recoge más de 122.700 compuestos de fuentes naturales; la base de datos CHM, en la que se recogen 10.216 compuestos de medicinas tradicionales para su selección virtual; el Diccionario de Productos Naturales (DNP) o la base de datos ZINC Natural Product Like (Che et al., 2019; Fakhrudin et al., 2010).

*Poco basta cada día  
si cada día logramos ese poco.*

Santiago Ramón y Cajal.  
Consejos para jóvenes científicos

### **III. GENÓMICA, METABOLÓMICA Y PROTEÓMICA EN LA INVESTIGACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS EN PLANTAS**

#### **Genómica en la identificación molecular de especies**

Dado que muy a menudo las plantas se recolectan directamente de su hábitat natural, la identificación y la nomenclatura correcta son esenciales y la base de todos los pasos siguientes. Para que la identificación sea inequívoca, además de la caracterización morfológica y anatómica, será necesario combinar diferentes métodos, como el análisis genético y el químico. Las continuas modificaciones, que se mantienen en curso sobre la taxonomía de las plantas, así como las cuestiones de sinonimia, se suman a la dificultad de esta tarea. Además, la recolección del material vegetal y su documentación, la identificación botánica, y la preparación de los comprobantes de herbario son tareas que no pueden automatizarse y necesitan especialistas, que cada vez son más raros (Bucar et al., 2013).

Los exámenes macroscópicos y microscópicos de los rasgos morfológicos son los medios clásicos para verificar la identidad de las plantas enteras frescas, así como de partes u órganos. En la mayoría de los casos, estas técnicas también pueden aplicarse al material vegetal seco o procesado. Sin embargo, en muchas circunstancias, los exámenes macroscópicos o microscópicos no serán aplicables cuando una preparación consista en muestras de polvo multicomponentes que han sido procesadas más allá de la capacidad de proporcionar caracterizaciones morfológicas. En estos casos, el uso de técnicas alternativas se hace necesario para identificar y autenticar esas muestras complejas, de forma que la toma de huellas genéticas y la elaboración de perfiles están desarrollando rápidamente enfoques actualizados para la identificación botánica. La utilización de técnicas ba-

sadas en el ADN para identificar organismos comparando una pequeña porción de su secuencia de ADN con una secuencia conocida está bien aceptada en otros campos, entre ellos, los estudios de la diversidad biológica, la autenticidad de los alimentos y la vigilancia del comercio ilegal de animales y productos

## **DNA *Barcoding***

La Farmacognosia moderna presta especial atención al desarrollo de métodos que permitan la identificación de la materia prima a partir de la cual se obtiene el principio activo y que garantiza la calidad del medicamento final. Este proceso tradicionalmente se basa en técnicas de identificación morfológica y fitoquímica que permiten detectar, respectivamente, caracteres morfológicos y compuestos específicos de cada especie. La Farmacopea es la piedra angular del control de calidad de materias primas ya que determina los procedimientos analíticos que deben aplicarse para los ensayos cualitativos y cuantitativos. Actualmente, la Farmacopea Europea contiene monografías con recomendaciones de procedimientos analíticos para más de 200 drogas vegetales y, en algunos casos, incluso para los extractos resultantes.

Los avances en la secuenciación de ADN han impulsado el empleo de código de barras de ADN (*DNA barcoding* y *metabarcoding*) en la identificación y autenticación de plantas medicinales, que posteriormente serán utilizadas en el descubrimiento de fármacos innovadores. Si bien es cierto que la idea de utilizar secuencias de ADN específicas para la identificación rápida de especímenes no es nueva, lo que es innovador del empleo del Código de Barras de ADN es que propone usar información dentro de una misma región génica, en todos los taxones y con condiciones de secuenciación universalmente aceptadas y estandarizadas y a una relación coste-eficiencia relativamente baja. Además, el protocolo destaca la necesidad de relacionar esta información con ejemplares depositados en herbarios (Raclariu et al., 2017; Moritz y Cicero, 2004).

Estos métodos genómicos se basan en la diversidad de secuencias de regiones cortas y estándar de ADN (400-800 pares de bases) que permiten

la identificación precisa y fiable a nivel de especie. El *DNA Barcoding* consiste, pues, en la utilización de una pequeña región de un gen (denominada *DNA Barcode*), elegida por consenso científico, para la identificación molecular de la especie; son secuencias relativamente cortas que se obtienen mediante amplificación utilizando la técnica de reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). En plantas, se ha propuesto la utilización conjunta de dos regiones de ADN: los genes que codifican para la subunidad mayor de la enzima RuBisCo (Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa) (*rbcl*) y para la maturasa K (*matK*), localizados en el genoma del cloroplasto (CBOL *plant working group*, 2009; *Consortium for the Barcode of Life*), si bien, dependiendo de grupo de plantas que se desee identificar, también se emplean otros marcadores, como ITS, *trnH-psbA* o *ycf5* o una combinación de varios de estos cinco. Combina, por tanto, los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con las técnicas de secuenciación del ADN (Chase et al., 2007; Kress et al., 2005).

Para que la técnica sea eficaz y pueda cumplir su objetivo de relacionar una muestra con una especie conocida, es imprescindible contar con bases de datos que incluyan las secuencias de estos marcadores en diferentes especies, lo que permitirá compararlas con las secuencias obtenidas tras la secuenciación y determinar así la especie con la que estamos trabajando. Por esta razón se han creado bibliotecas de libre acceso, siendo las más importantes BOLD (*Barcode of Life Database*), de Universidad de Guelph en Ontario, creadores de la técnica y la Base de Datos Colaborativa Internacional de Secuencia de Nucleótidos (*International Nucleotide Sequence Database Collaborative*), una colaboración entre *GenBank* (Estados Unidos), *Nucleotide Sequence Database* (Europa) y *DNA Data Bank* (Japón). En ambos casos, para el registro de las secuencias obtenidas se deben seguir unas normas acordadas por el CBOL (*Consortium for the Barcode of Life*).

Desde que se estableció la técnica de *DNA Barcoding*, sus aplicaciones han ido en aumento e incluyen la identificación tanto de nuevas especies (Hausmann et al. 2011) como de especies crípticas, es decir, sin diferencias morfológicas entre ellas y, por lo tanto, sin datos evidentes que permitan distinguirlas.

Actualmente esta técnica es utilizada tanto por la comunidad científica como por la industria para la identificación molecular, con el fin de resolver cuestiones relacionadas con taxonomía, filogenia molecular, genética de poblaciones y biogeografía, así como para evitar la recolección y el comercio ilegal de la fauna y flora silvestres (Janjua et al., 2016).

Recientemente, la Farmacopea Británica incluyó el primer método de identificación basado en ADN Barcode utilizando *Ocimum tenuiflorum* L. (F/ Lamiaceae). El método especifica las técnicas que deben ser utilizadas para el muestreo de las plantas, las regiones de los genes del código de barras que deben considerarse, los métodos de extracción, purificación y amplificación del ADN y la base de datos de referencia para comparar las secuencias. La técnica también se ha utilizado para la identificación de especies vegetales registradas en la Farmacopea Japonesa, como *Amaranthus hybridus* L., entre otras, para lo que se han utilizado la región ITS2 o la amplificación de la secuencia psbA-trnH.

Investigaciones que aplicaron ADN *barcoding* encontraron discrepancias por sustitución en el 16% de los productos comercializados de *Ginkgo biloba* y el 25% de los suplementos dietéticos de cimicifuga comprados *on-line* y en tiendas minoristas de Nueva York, en el 7% de los productos de sen y el 50% de los productos de Cassia en la India y el 50% de los productos de ginseng coreano, adquiridos en diversas fuentes comerciales, incluidas las farmacias y los supermercados de Toronto y Nueva York, por citar algunos ejemplos. Además, se encontró que de 78 muestras comercializadas analizadas de *Hypericum perforatum*, sólo el 68% contenía la especie concreta (Little, 2014; Seethapathy et al., 2014; Wallace et al, 2012)

En cuanto a ADN-*Metabarcoding*, su mayor ventaja es su capacidad de identificar cada una de las especies dentro de mezclas complejas de múltiples componentes, en las que la aplicación simple del código de barras del ADN y los métodos analíticos convencionales presenta considerables limitaciones.

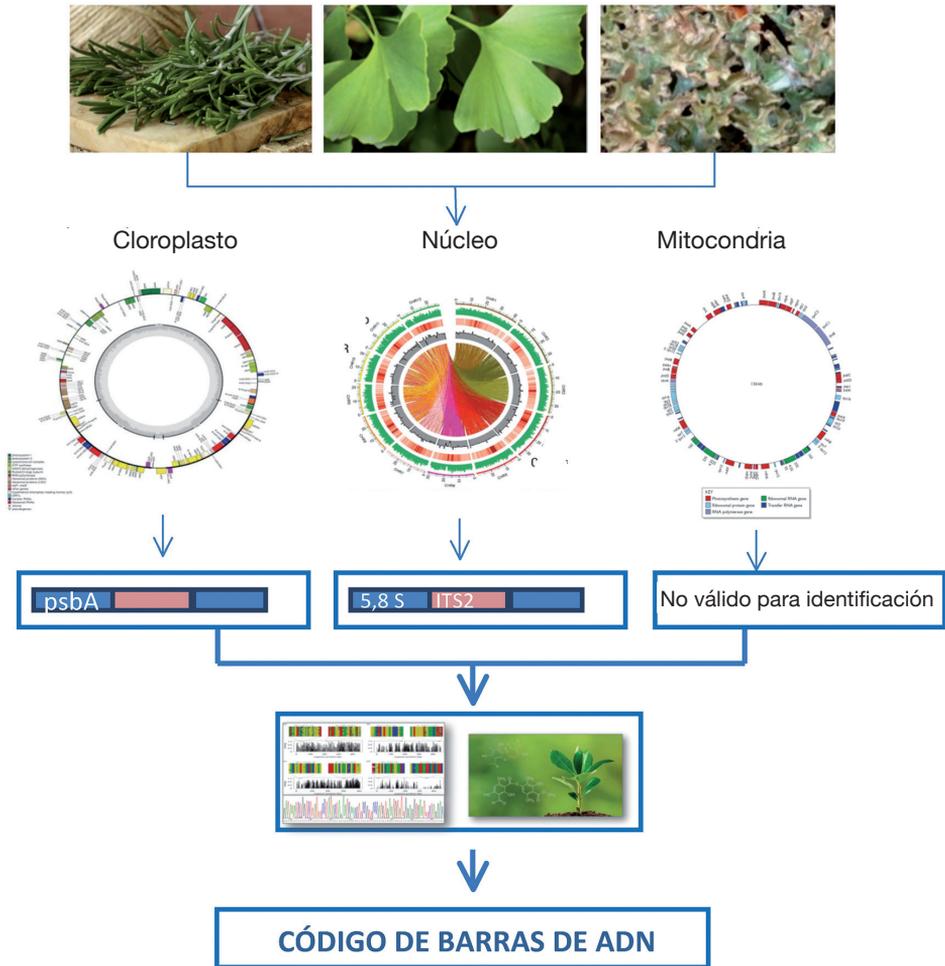
Una vez que la especie vegetal ha sido autenticada mediante el código de barras de ADN, se pueden desarrollar biotecnológicamente chips de ADN en los cuales se incorporarán los marcadores genómicos, propor-

cionando una herramienta eficaz para el genotipado. Esta expresión de los genes mediante el análisis de microarray o chips de ADN es una tecnología transcriptómica (presente en una célula o grupo de células en un momento determinado) innovadora que permite un análisis rápido y eficaz de muchas transcripciones y, por lo tanto, de las variaciones en las expresiones de múltiples genes (el transcriptoma es el conjunto de todas las moléculas de ARN, también llamadas *transcritos*).

Estas tecnologías podrán aplicarse también para descubrir las dianas farmacológicas y dilucidar los mecanismos moleculares de los compuestos y las conexiones biológicas que subyacen a sus acciones farmacológicas y, combinadas con el *screening* de alto rendimiento, y junto con la disponibilidad de enormes bases de datos de compuestos, lograrán acortar el tiempo necesario en el proceso de descubrimiento del fármaco desde su diseño hasta los ensayos clínicos.

Son métodos que también tienen limitaciones, pues, aunque pueden proporcionar una autenticación positiva de las especies vegetales basada en la presencia de cualquier ADN amplificable, puede haber falsos negativos si el ADN se ha degradado durante el procesado posterior a la cosecha. Además, altas concentraciones de ciertos metabolitos secundarios, como polisacáridos, aceites esenciales, compuestos fenólicos, entre ellos los taninos, o alcaloides pueden interferir en la extracción de ADN o la PCR (Raclariu et al., 2017).

Finalmente recordar que, en el contexto del control de calidad de los productos a base de plantas, el ADN *barcoding* y el *metabarcoding* no proporcionan ninguna información cuantitativa ni cualitativa de los metabolitos activos de la materia prima vegetal, por lo que su principal aplicación son los procedimientos de identificación y autenticación. Sin embargo, el uso para identificar y discernir taxones en cualquier etapa de desarrollo o procesamiento de los que se puede extraer el ADN es una ventaja esencial para ambos métodos.



ADN Barcoding. Identificación molecular de especies.

## **Metabolómica en la identificación de compuestos activos**

Un producto natural es un compuesto químico o sustancia producida por un organismo vivo, que se encuentra en la naturaleza y que normalmente tiene una actividad farmacológica o biológica que le hace útil en el descubrimiento y diseño de nuevos fármacos. Puede ser extraído de órganos y tejidos de plantas terrestres, de organismos marinos o por fermentación de microorganismos. Este compuesto se sigue considerando como tal, aunque pueda ser preparado por síntesis total.

En el reino vegetal, la diversidad de estos metabolitos es asombrosa, baste decir que en la base de datos *Dictionary of Natural Products* (base de datos referencial sobre datos químicos, físicos y estructurales de Productos Naturales) se recogen hasta la fecha aproximadamente 300.000 compuestos de los cuales 200.000 son metabolitos secundarios de plantas, agrupados en 170.000 estructuras, si bien se piensa que el número total de metabolitos producidos por las plantas alcanza el millón. Aproximadamente el 15% de los ensayos clínicos recogidos en la base de datos *ClinicalTrials.gov* están relacionadas con compuestos obtenidos de plantas, y alrededor del 60% de los compuestos ensayados provienen de sólo 10 familias taxonómicas. Por tanto, el potencial de la gran mayoría de las especies no ha sido investigado como fuente para el descubrimiento de fármacos.

La metabolómica tiene como objetivo analizar cualitativa y cuantitativamente todos los metabolitos contenidos en un organismo en un momento determinado y en unas condiciones determinadas, elaborando así su denominado perfil metabólico. Sus estrategias actuales dependen principalmente de cuatro enfoques principales: cromatografía de gases (GC-MS), cromatografía líquida (LC-MS), electroforesis capilar (CE-MS), todas ellas acopladas a espectrometría de masas, además de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (NMR), con los recientes avances en sus aplicaciones (Salem et al., 2020).

La aplicación de la metabolómica en la investigación de los productos naturales comenzó casi una década después de haber sido aplicada en biomedicina y agricultura, y para ello fue decisivo la aparición de los detectores de diodo array y de HRFTMS (espectrometría de masas

por transformada de Fourier de alta resolución), los cuales se acoplaron a la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Beyoglu e Idle, 2020).

Para la separación de los metabolitos se suele emplear Cromatografía de Gases o la Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), y desde principios de este siglo, los avances en los enfoques basados en la Espectrometría de Masas (EM) o la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) asociados a las herramientas bioinformáticas han sido decisivos para el diseño y el desarrollo de los estudios de productos naturales. Estos métodos se utilizan para investigar el contenido molecular de los sistemas biológicos con una sensibilidad y precisión sin precedentes. De tal forma que la mayoría de los estudios actuales de perfiles de metabolitos se realizan con herramientas como LC-MS de alta resolución de última generación que combinan la alta resolución de la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) con la MS de alta resolución para la asignación molecular. Si bien la cromatografía suele realizarse mediante la cromatografía de líquidos en fase inversa (RP), otros métodos alternativos se basan en el uso de la cromatografía de líquidos de interacción hidrofílica (HILIC) o la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) para la determinación de los productos naturales muy apolares o lipofílicos.

Para obtener la información precisa final sobre las estructuras que permita la identificación de los compuestos, se emplea la EM acoplada con bases de datos y herramientas informáticas como son *Golm metabolome data base* y *Metlin*, una base de datos MS/SM con 62.000 espectros que recoge más de 12.000 metabolitos.

El empleo de estas técnicas ha permitido la identificación de los compuestos responsables de la actividad farmacológica de especies como *Newbouldia laevis* (P.Beauv.) Seem. y *Cassia abbreviata* Oliv., antimaláricas, *Hyptis suaveolens* (L.) Poit., antiinflamatorias y antioxidantes y *Panax ginseng* C.A. Meyer, concretamente en este caso, la identificación de una nueva saponina con propiedades antitumorales.

La espectrometría de masas de alta resolución (HRFTMS) y la espectroscopia de RMN se están utilizando también para desreplicar y cuanti-

ficar metabolitos conocidos frente a los nuevos productos naturales. La desreplicación combina métodos analíticos que incluyen la espectroscopia ultravioleta, la espectrometría de masas y los datos espectrales de RMN. En cuanto a los datos de ultravioleta sólo pueden utilizarse para el análisis y la desreplicación de los metabolitos que contienen cromóforos, mientras que en la espectrometría de masas existe el riesgo de que haya compuestos pobremente ionizados que sólo sean detectables en una forma de ionización. Por ejemplo, los compuestos fenólicos y antraquinónicos se ionizan mal en la modalidad de iones positivos, pero se ionizan muy bien en la modalidad de iones negativos, mientras que lo contrario puede decirse de los alcaloides.

Estos métodos se han utilizado también en el control de calidad en muestra comerciales como, por ejemplo, para determinar el porcentaje de los diversos componentes de la manzanilla (*Matricaria recutita* L.), determinar el ácido  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinólico (THCA) y el ácido cannabidiólico (CBDA) para discriminar entre las diferentes variedades de *Cannabis sativa* y flavonoides con propiedades antidepresivas de distintos lotes del mismo proveedor de *Hypericum perforatum*. También se ha aplicado la metabolómica para detectar adulteraciones de preparados de especies similares, por ejemplo, medicamentos antimaláricos que contenían *Artemisia afra*, que carece de artemisinina en lugar de *Artemisia annua*, lo que puede ser fácilmente detectado por 1H-NMR. La metabolómica puede utilizarse además para analizar fluidos biológicos de individuos que han sido tratados con productos naturales más o menos complejos (Castilho et al., 2008).

Además, las herramientas de fraccionamiento guiadas por la metabolómica, permiten determinar con precisión los componentes activos durante el fraccionamiento de los extractos, así como predecir qué estructuras podrían ser bioactivas, lo que permitiría identificar las fracciones que se someten a purificación, con el consiguiente ahorro de tiempo y recursos durante el proceso.

También los estudios metabolómicos pueden utilizarse para proponer precursores biosintéticos que aumenten el rendimiento del principio activo. Por ejemplo, para la producción del broncodilatador efedrina, la

elaboración de perfiles metabólicos específicos y los análisis bioquímicos comparativos revelaron que el benzaldehído es un importante precursor de los alcaloides fenilpropilaminicos producidos por *Ephedra* spp. También mediante la elaboración de perfiles metabólicos fue posible investigar la biosíntesis de tanshinonas y aumentar la expresión de una de las enzimas que intervienen en su síntesis en *Salvia miltiorrhiza*, concretamente la SmCPS (copalil difosfato sintasa), aumentando la producción de estos principios activos; una de las tanshinonas activas, la IIA tanshinona, ya se utiliza en terapéutica para tratar la isquemia cerebral, presentando también propiedades antiinflamatorias y antitumorales (Majolo et al., 2019).

A principios de este milenio, surgió la secuenciación genómica de alto rendimiento, lo que permitió pasar de la investigación genética pura al estudio de la función y expresión de los genes. No podemos olvidar que la capacidad de un organismo para producir metabolitos secundarios es un carácter fenotípico. Este enfoque permite el estudio indirecto de la función de los genes y la bioquímica de un organismo. Además, se puede utilizar una combinación de metabolómica y genómica para optimizar una ruta biosintética a fin producir selectivamente metabolitos secundarios biológicamente activos.

## **Proteómica en la validación e identificación de biomarcadores**

Las plantas utilizan sus sistemas metabólicos para la biosíntesis de una amplia variedad de compuestos bioactivos cuya finalidad parece estar relacionada con su capacidad de adaptación a los ecosistemas complejos (Ramakrishna & Ravishankar, 2011). El metabolismo de estos compuestos está influenciado por factores genéticos propios de la planta y también por factores ambientales, lo que supone que la composición y la cantidad de compuestos bioactivos puede dar lugar a una variación intra e interespecie. Los cambios asociados con el crecimiento de la planta o en respuesta a factores ambientales se estudian utilizando técnicas proteómicas (Ghatak et al., 2017; Hashiguchi et al., 2017), así como las proteínas específicamente relevantes para el control de las vías metabólicas que permiten, por ejemplo, acelerar el desarrollo de los cultivos.

Las técnicas proteómicas permiten medir los cambios sistémicos durante el metabolismo celular por lo que una de sus principales utilidades es el estudio de los procesos de síntesis de compuestos bioactivos. Por ejemplo, se ha aplicado proteómica comparativa para identificar las proteínas específicas expresadas en los diferentes tejidos de *Cannabis sativa* L. y que pueden tener actividad en la biosíntesis de los cannabinoides, principales compuestos activos de la planta, con utilidad, entre otras, para tratar el dolor crónico. Con ello se ha podido establecer la influencia de las distintas proteínas en la biosíntesis de los compuestos y su distribución en las distintas partes de la planta, como las glándulas, las flores y las hojas (Raharjo et al., 2004).

También se han aplicado análisis proteómico en estudios de *Panax ginseng*, utilizada para tratar trastornos como la diabetes, las enfermedades cardíacas, el cáncer y la neurodegeneración. Sus principios activos, los ginsenósidos, son saponinas triterpénicas que se encuentran casi exclusivamente en el *Panax* spp. (Leung et al., 2010). Dado que el cultivo del ginseng es difícil debido a su largo ciclo de vida, resulta crucial comprender las vías biosintéticas por las que se originan estos compuestos (Liang et al., 2008). Los análisis proteómicos aplicados a estudios de crecimiento y desarrollo de la planta revelaron que las raíces de ginseng inician la biosíntesis de ginsenósidos cuando la planta alcanza un período de crecimiento lento. Esos cambios en la fisiología de las raíces demuestran la actividad temprana de las enzimas que intervienen en los procesos biosintéticos de ginsenósidos. En línea con esto, el reciente análisis proteómico de un tipo ginseng cultivado que crece más lentamente que el ginseng silvestre, reveló que éste aumenta la biosíntesis de ginsenósidos a medida que la planta envejece. El estudio del perfil metabólico permitió establecer la correlación de los cambios energéticos en el metabolismo con el contenido de ginsenósidos (Liu et al., 2017).

La proteómica también se emplea en estudios relacionados con la actividad, por ejemplo, también en el ginseng, estudios proteómicos han permitido establecer que existe una correlación entre la cantidad de una proteína de la familia de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa y la actividad captadora de radicales libres de muestras de ginseng provenientes de diferentes cultivos (Kim et al., 2016).

Además de los ejemplos mencionados, la proteómica ha sido aplicada a la identificación precisa de las proteínas en diversas plantas medicinales (Ma et al., 2017). Así, utilizada conjuntamente con la secuenciación de ARN, la cuantificación de proteínas (iTRAQ) permitió identificar cuatro proteínas pertenecientes a la subfamilia de enzimas CYP718A en *Anemone flaccida* que resultaron esenciales para la biosíntesis de sus principios activos, saponinas triterpénicas (Hashiguchi et al., 2017).

También el contenido en metabolitos secundarios de *Catharanthus roseus* mejoró gracias a un incremento de la enzima 10-hidroxigeraniol oxidoreductasa, de la 1-deoxi-d-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa y la 5-enol-piruvilshikimato-fosfato sintasa en *Lonicera japónica* tras aplicar estudios proteómicos.

En cuanto a las técnicas empleadas para el análisis proteómico del metabolismo secundario de las plantas medicinales, la purificación de las proteínas poco abundantes mediante la aplicación de bibliotecas combinatorias de ligandos peptídicos (CPLL) o el tratamiento de fraccionamiento de polietilenglicol resultaron ser las más eficaces (Zhang et al., 2014; Zhang et al., 2013).

Los resultados muestran la utilidad de las técnicas proteómicas para descubrir enzimas que son cruciales para actividades biológicas de las plantas medicinales, siendo también eficaces para estudiar las redes del metabolismo secundario y las nuevas enzimas que permanecen inexploradas.

*“Después de todo, ¿qué es un científico entonces?  
Es un hombre curioso que mira a través del ojo  
de una cerradura, la cerradura de la Naturaleza,  
tratando de saber qué es lo que sucede”.*

J. Y. Cousteau

#### IV. ENSAYOS BIOLÓGICOS

El descubrimiento de fármacos a partir de plantas requiere de un enfoque multidisciplinar en el que el éxito dependerá, en gran medida, de la adecuada/correcta elección de los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Esta selección, determinada en primer lugar por los objetivos del estudio, debe combinar de forma óptima la simplicidad del ensayo con una buena sensibilidad y reproducibilidad.

Tradicionalmente, la investigación de los compuestos de origen vegetal se basa en un enfoque farmacológico avanzado que utiliza ensayos *in vivo* en animales y/o modelos de órganos o tejidos, seguido de una investigación *in vitro* de los mecanismos de acción. En las últimas décadas se observa un cambio en el enfoque de esta investigación, que ahora suele comenzar con el cribado de grandes colecciones de compuestos (denominadas “librerías”) frente a proteínas diana con el objetivo de identificar compuestos con una determinada actividad, que luego se estudian más a fondo y se validan en modelos *in vivo* (un enfoque denominado “farmacología inversa”). Tanto el enfoque de la farmacología avanzada como la inversa utilizan una selección de bioensayos que se solapan, pero difieren en la etapa en la que se realizan (Schenone et al., 2013; Zheng et al., 2013; Lee et al., 2012).

La farmacología avanzada, también conocida como clásica o descubrimiento de fármacos fenotípicos, determina en primer lugar la actividad funcional mediante la detección de cambios fenotípicos en sistemas biológicos complejos, para caracterizar posteriormente la diana molecular de los compuestos activos. Esta forma tradicional de descubrimiento de

fármacos se llevó a cabo principalmente en la época anterior al Proyecto Genoma Humano, y especialmente antes del desarrollo de muchas de las técnicas modernas de biología molecular (Wilson et al., 2020).

La farmacología inversa, también conocida como descubrimiento de fármacos basado en objetivos, comienza con la identificación de un objetivo proteico farmacológico específico, frente al que se estudian los compuestos, que posteriormente se validan mediante técnicas *in vivo*. Tanto las bibliotecas de moléculas no sesgadas (aleatorios) como las bibliotecas basadas en el conocimiento pueden servir para la búsqueda de compuestos que se unan con alta afinidad al objetivo. Aunque el enfoque de farmacología inversa tiene la ventaja de reducir los ensayos con animales, su desventaja es que a menudo requiere una gran cantidad de tiempo y esfuerzo para las etapas iniciales, sin una garantía de éxito en la eficacia final *in vivo*.

La importancia de una selección adecuada del ensayo farmacológico inicialmente utilizado se ve subrayada por el hecho de que la falta de eficacia clínica (indicativo de modelos preclínicos inapropiados) es una de las razones más importantes del fracaso de los nuevos medicamentos durante su desarrollo (Wang et al., 2020; Schuster et al., 2005).

En esta sección presentaré una breve visión general de los ensayos utilizados para determinar la/s bioactividad/es de los productos naturales mediante modelos *in vitro* con proteínas purificadas, ensayos fenotípicos u orientados a objetivos basados en células, modelos con tejidos u órganos aislados y ensayos preclínicos *in vivo* en modelos animales. Estos métodos difieren principalmente en su complejidad y capacidad de rendimiento, y presentan algunas ventajas y desventajas. No incluiré los métodos para el ensayo de actividad que se basan en reacciones químicas simples, como algunos métodos ampliamente utilizados para determinar las propiedades antioxidantes *in vitro* (por ejemplo, el ensayo de eliminación de radicales de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)).

## Ensayos *in vitro*

Los ensayos clásicos *in vitro* basados en proteínas se basan en la determinación de la actividad funcional de la proteína diana en presencia del compuesto que se está ensayando, o de la interacción física del compuesto ensayado con la proteína diana. Esta clase de ensayos se pueden realizar normalmente en cualquier laboratorio de uso general sin necesidad de cultivo celular o instalaciones antimicrobianas y son muy adecuados para su aplicación en *screening* de alto rendimiento (HTS). Una evaluación reciente de los fármacos aprobados por la Agencia de Medicamentos y Alimentos del gobierno de Estados Unidos (FDA) durante las últimas tres décadas reveló que el mayor grupo de proteínas diana de los fármacos aprobados hasta el momento son los receptores (193 proteínas diana de 563 fármacos aprobados), seguidos de las enzimas (124 proteínas diana de 234 fármacos), las proteínas transportadoras (67 proteínas diana de 181 fármacos) y otros tipos de dianas (51 tipos, diana de 84 fármacos). Las dianas mejor representadas fueron los receptores acoplados a la proteína G (GPCRs) en el grupo de receptores, las hidrolasas en el grupo de enzimas, y los canales iónicos dependientes de voltaje en el grupo de proteínas transportadoras (Patridge et al., 2016; Rask-Andersen et al., 2011).

Aunque los ensayos con proteínas diana proporcionan inherentemente un mecanismo de acción, no pueden garantizar su funcionalidad en sistemas biológicos más complejos como las células y los organismos multicelulares. De hecho, muchos resultados prometedores no se ven confirmados cuando se prueban en ensayos *in vitro* basados en células o en experimentos animales *in vivo*. Curiosamente, a pesar de que el *screening in vitro* orientado a objetivos es el más utilizado actualmente por la industria farmacéutica, el análisis de las nuevas moléculas aprobadas por la FDA entre 1999 y 2018 reveló que la mayoría de ellas fueron descubiertas utilizando ensayos fenotípicos (28 compuestos frente a 17 identificados por los enfoques basados en objetivos). No obstante, hay que señalar que los ensayos con proteínas purificadas se han empleado en muchas ocasiones con gran éxito en diferentes programas de descubrimiento de fármacos, por ejemplo, en el identificación de inhibidores selectivos de varios receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y quinasas (Bedair & Mansour, 2019; Pridge et al., 2016; Cohen y Alessi, 2013).

El estudio de las interacciones proteína-proteína representa un objetivo importante en el estudio de actividad de productos naturales. Encontramos así, ejemplos de compuestos estabilizadores de la unión proteína-proteína como rapamicina y tacrolimus que se unen a su proteína diana en células de mamífero mTOR y el estabilizador de microtúbulos, paclitaxel. Derivados de la chalcona y compuestos obtenidos de hongos como dehidroal-tenusina, interrumpen la interacción de la proteína supresora de tumores p53 y su proteína reguladora MDM2, con actividad frente a varios tipos de cáncer.

También el gosispol (polifenol derivado de especies del género *Gossypium*) y sus derivados muestran actividad anticancerígena en modelos celulares y animales por inhibir la dimerización de proteínas antiapoptóticas, como BCLXL, con el dominio helicoidal de las proteínas proapoptóticas BAD o BAX; si bien el gosispol racémico carece de actividad, su enantiómero se encuentra actualmente en ensayos clínicos frente a diferentes tipos de cáncer. Estos estudios experimentales con gosispol fueron el punto de partida para el estudio de los inhibidores sintéticos de BCL2, que actualmente se encuentran en ensayos clínicos.

Podemos hablar también de productos naturales inhibidores de la interacción proteína y ARN como la didihidrocortistatina A, derivado del alcaloide cortistatina A obtenido de la esponja marina *Corticium simplex*, que se une específicamente a la proteína Tat del VIH, inhibiendo su unión al mRNA y evitando su transcripción, así, disminuye la replicación y reduce la liberación de partículas virales de las células TCD4.

## Ensayos en cultivos celulares

Los ensayos con cultivos celulares de mamíferos son una alternativa relativamente simple y económica frente a los ensayos *in vivo* para la evaluación inicial de la actividad farmacológica. También son aplicables al aislamiento biodirigido de compuestos de origen natural a partir de extractos de plantas, proporcionando información sobre la bioactividad a nivel celular, a diferencia de los ensayos *in vitro* basados en proteínas. Los ensayos con células se utilizan principalmente en instituciones académicas para el

*screening* de bajo a medio rendimiento, aunque pueden modificarse para su escalado y emplearse en la industria farmacéutica para el cribado de un gran número de compuestos.

La gran variedad de ensayos en células disponibles requiere una selección cuidadosa y significativa de los mismos, dependiendo del objetivo de la investigación y del rendimiento previsto, de tal forma que el tipo de proceso que se estudia, a menudo marca la selección del tipo de célula que debe utilizarse. Por ejemplo, las células endoteliales se seleccionan para estudiar la angiogénesis mientras que las células epiteliales podrían utilizarse para la investigación dermatológica. Además, los ensayos basados en células pueden estar orientados a un objetivo o ser fenotípicos. Los ensayos orientados a objetivos proporcionan información sobre la interferencia de los compuestos investigados con la función de una proteína o vía específica (Atanasov et al., 2013; Orlikova et al., 2013), mientras que los modelos fenotípicos proporcionan información sobre un fenotipo celular alterado con una regulación compleja [por ejemplo, la proliferación celular (Kurin et al., 2012; Schwaiberger et al., 2010)].

Son ensayos que pueden realizarse utilizando células primarias de mamíferos o líneas celulares. Aunque las líneas celulares inmortalizadas son más fáciles de mantener en cultivo, a menudo los resultados obtenidos con ellas son menos relevantes, porque la inmortalización y el mantenimiento *in vitro* prolongado conducen a la acumulación de mutaciones y cambios fenotípicos. Las células o líneas celulares usadas también pueden derivarse de animales genéticamente modificados. Otros enfoques recurren a la ingeniería de células *in vitro* para sobreexpresar o eliminar un gen determinado (Wang et al., 2014). Los parámetros fenotípicos de referencia incluyen cambios en la morfología celular, adhesión y proliferación celular, migración, estado de diferenciación, estado metabólico, estado redox, apoptosis celular o senescencia (Blazevic et al., 2014; Atanasov et al., 2013).

Los cambios en la señalización intracelular o en la expresión génica se caracterizan a menudo por técnicas como la inmunocitoquímica, la PCR en tiempo real, el Western blotting, la inmunoprecipitación o las técnicas “ómicas” (por ejemplo, el análisis de los datos de la célula, genómicas, transcriptómicas, proteómicas y metabolómicas) para la caracterización

de los cambios en la expresión de los genes o en las cantidades de metabolitos (Ziegler et al., 2013).

Además de las células de mamífero, las levaduras también se han empleado para el establecimiento de ensayos fenotípicos, como el cribado funcional de alto rendimiento basado en la activación de caspasas y otras proteasas implicadas en la muerte celular y la inflamación, como herramienta de cribado para la modulación farmacológica de los receptores acoplados a proteínas G, o para comprender el mecanismo de acción de los fármacos o para identificar nuevas dianas (Hoon et al., 2008).

En la interfaz de modelos *in vitro* e *in vivo* se encuentran los métodos *in situ* y *ex vivo* con tejidos u órganos aislados. Estos métodos presentan la ventaja de estar más próximos a los ensayos *in vivo* que a los *in vitro*, pero también las desventajas de un menor rendimiento, más dificultad de reabastecimiento, incluir consideraciones éticas relacionadas con el uso de animales y la corta vida media de los tejidos y órganos aislados. En este grupo de métodos también se incluye la tecnología recientemente descrita Ex Vivo Metrics™ que utiliza órganos humanos intactos donados éticamente para la investigación. Aunque la mayoría de las limitaciones mencionadas de los modelos *ex vivo* son aplicables también a la tecnología Ex Vivo Metrics™, su gran ventaja es que elimina las posibles diferencias entre las especies y ofrece el sistema biológico más próximo al humano, antes de los ensayos clínicos (Curtis et al., 2008).

En resumen, aunque la relevancia de los ensayos *in vitro* es limitada debido a la incapacidad de proporcionar información sobre los factores que influyen en la actividad de los compuestos *in vivo* (como ADME/T), los ensayos *in vitro* siguen representando herramientas muy importantes para identificar y caracterizar los compuestos bioactivos.

Siguiendo el enfoque de la farmacología inversa, los compuestos identificados con una buena actividad *in vitro* necesitan ser ensayados *in vivo* en modelos animales adecuados que puedan proporcionar datos farmacológicos y toxicológicos básicos antes de los posteriores ensayos clínicos en humanos.

## Estudios *in vivo*

En cuanto a los estudios *in vivo*, tradicionalmente se utilizan modelos de ratones y ratas para la evaluación de la actividad de los extractos de plantas o productos naturales aislados, en parte debido a la similitud razonablemente alta entre los genomas y la fisiología de los mamíferos, y al ciclo reproductivo relativamente corto. Estos modelos animales siguen siendo cruciales para la evaluación y validación de medicamentos, ya que proporcionan una respuesta integrada que abarca eficacia, biodisponibilidad, efectos secundarios y toxicidad (parámetros ADME/T) del compuesto en todo un organismo; utilizándose de forma estándar para estudios farmacocinéticos y de seguridad como requisito previo para los ensayos clínicos (Alqahtani et al., 2013).

Un factor adicional que contribuye al amplio uso de roedores como modelos *in vivo* de elección para pruebas farmacológicas es la posibilidad de emplear ratones genéticamente modificados (con un gen *knockout*, *downregulation* –*knockdown*–, o sobreexpresión de una proteína de interés), así como ratas genéticamente modificadas, que proporcionan enfoques adicionales para estudiar los efectos farmacológicos. Estos modelos de roedores genéticamente modificados se emplean con éxito para verificar la eficacia *in vivo* antes de los ensayos con humanos, para el descubrimiento de nuevas dianas farmacológicas, así como en el estudio de los mecanismos de acción (Foster et al., 2014). La generación de modelos animales genéticamente modificados ha evolucionado de forma drástica recientemente con el desarrollo de nuevas metodologías de edición genética entre las que se encuentran las basadas en nucleasas capaces de cortar la doble cadena del DNA de manera específica en un sitio predefinido del genoma, por ejemplo, nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción (TALEN), modificaciones del genoma mediadas por ácidos nucleicos (mutagénesis dirigida por oligonucleótidos), o una combinación de las mismas (técnicas CRISPR/Cas9), que permiten alteraciones específicas y precisas de los genomas (Harrison et al., 2014).

Las especies de mamíferos no roedores, como conejos, perros, cerdos y monos, también se utilizan ampliamente en los estudios farmacológicos y farmacocinéticos (Pellegatti, 2013). Aunque esos modelos de animales

grandes están asociados con limitaciones, como un precio más alto y consideraciones éticas más marcadas, se siguen utilizando, especialmente por la industria farmacéutica, ya que las directrices reglamentarias de la FDA americana, la EMA europea y otras autoridades internacionales y regionales similares suelen exigir pruebas de seguridad en al menos dos especies de mamíferos, incluida una especie no roedora, antes de autorizar los ensayos en seres humanos.

De hecho, las proteínas de roedores y humanas a veces no son igualmente sensibles a los compuestos bioactivos, por lo que se puede obtener un mayor grado de confiabilidad en seguridad y eficacia utilizando varias especies de mamíferos.

Las limitaciones generales asociadas con el uso de roedores u otras especies animales son los costes elevados, la incompatibilidad con el HTS moderno, y las crecientes preocupaciones éticas [que condujeron por ejemplo a la reciente introducción de la Directiva No. 2010/63/UE del Parlamento Europeo que promueve el “principio de las 3R” (Reemplazar, Reducir y Refinar) para el uso de experimentos con animales]. A pesar de estas limitaciones, el ratón y la rata siguen siendo las especies más utilizadas y todavía indispensables en el proceso de descubrimiento de medicamentos.

Cuando se utilizan modelos de animales *in vivo* para estudiar la actividad farmacológica, es necesario considerar una serie de parámetros, como la vía de administración de las sustancias en estudio, la dosis a aplicar, la metodología (que debe ser específica y sensible) y, siempre que sea posible, el empleo de un control positivo.

Los modelos animales no mamíferos, como el nematodo *Caenorhabditis elegans* y el *Danio rerio* o pez cebra tienen la ventaja de que permiten un cribado de medio a alto rendimiento en organismos vivos intactos. El empleo de estas especies se ha visto ampliado con la reciente aplicación de las técnicas de edición genética en nematodos (Wood et al., 2011) y pez cebra (Huang et al., 2011), lo que permite una ingeniería genética rápida y de bajo costo. Para dar un ejemplo de la potencia del modelo de cribado de pez cebra en el contexto de la farmacología de los productos naturales derivados de plantas, *Danio rerio* ha sido recientemente utilizado con éxito

en un modelo de inflamación para el cribado de 2000 compuestos, incluyendo fármacos de actividad conocida, productos naturales en estudio e inhibidores de la inflamación conocidos. Este estudio condujo al IIA de la tanshinona (derivado de la planta medicinal china *Salvia miltiorrhiza* Bunge), que induce de manera potente un efecto antiinflamatorio *in vivo* (Robertson et al., 2014). Es importante destacar que los efectos encontrados en neutrófilos del pez cebra también se observaron en los neutrófilos humanos, lo que apoya la aplicabilidad de este modelo para el cribado de medicamentos destinados a ser utilizados en humanos (Pitchai et al., 2019).



*Todo problema resuelto plantea infinidad de nuevas cuestiones, y el descubrimiento de hoy contiene en germen los descubrimientos de mañana*

S. Ramón y Cajal

## **V. BIOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA Y SÍNTESIS QUÍMICA EN LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL FARMACOLÓGICAMENTE ACTIVOS**

Muchos productos naturales con importante actividad, como el paclitaxel, la podofilotoxina o la vinblastina comparten serias dificultades para satisfacer las demandas del mercado, ya que además de acumularse en cantidades muy bajas en las especies vegetales que los biosintetizan, se obtienen de especies de crecimiento lento o incluso en peligro de extinción.

Las poblaciones naturales de muchas plantas medicinales han soportado la presión de factores principalmente antropogénicos como el daño ambiental, la deforestación y la industrialización, además de fuegos y otros desastres naturales, el cambio climático y, por último, pero no menos importante, la recolección masiva de material vegetal del medio silvestre. De hecho, más del 20% de las especies de plantas medicinales y aromáticas del mundo están amenazadas en diversos grados (Schippmann et al., 2006). Recordar que dos tercios de las 50.000 especies de plantas medicinales que se estima que se utilizan actualmente se recolectan en el medio silvestre, lo que plantea preocupaciones sobre temas como la disminución de las poblaciones, la pérdida de la diversidad genética, la extinción local y la degradación del hábitat. Si bien el aislamiento de los productos naturales directamente de las especies vegetales en las que se producen es aceptable si se necesitan cantidades pequeñas o moderadas (por ejemplo, para el suministro de pequeñas cantidades para el trabajo de laboratorio experimental a pequeña escala), se deben considerar rutas adicionales de reabastecimiento una vez que haya un aumento en la demanda del mercado. En estos casos, los productos naturales pueden reabastecerse mediante la aplicación de cultivos de células y tejidos vegetales, la producción he-

teróloga, la síntesis química total o la semisíntesis a partir de precursores aislados que se encuentran de forma más abundante en la naturaleza, como se discute con mayor detalle en las siguientes subsecciones (Wilson et al., 2020).

## Cultivo de células y tejidos vegetales

El estudio de la biosíntesis y producción de metabolitos secundarios en los cultivos vegetales *in vitro* es uno de los objetivos prioritarios de la biotecnología vegetal. No se refiere únicamente al cultivo de células, tejidos u organismos completos, sino que incluye también las diferentes técnicas que se aplican para mejorar la cantidad y calidad de los metabolitos deseados, siendo una de las principales aplicaciones la obtención de metabolitos secundarios que se emplearán posteriormente en la producción y también el diseño de medicamentos.

El cultivo vegetal *in vitro*, que surge como alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales, permite mantener y desarrollar células vegetales, tejidos, órganos o incluso plantas completas en un medio artificial (sólido o líquido) que contiene factores de crecimiento, en unas condiciones ambientales óptimas para su desarrollo. Implica células con diferente grado de diferenciación, pudiendo cultivarse plantas enteras, semillas, órganos o células no diferenciadas (generalmente propagadas a partir de callos); algunos de estos tipos de cultivos pueden ser interconvertibles mediante el uso de fitohormonas.

La finalidad de estas técnicas es el incremento en la producción de los compuestos de interés o bien la síntesis de los mismos, fines que se encuentran entre los objetivos propios de la biotecnología farmacéutica.

En los cultivos *in vitro*, la diferenciación de callo a órgano favorece, por ejemplo, la formación de alcaloides opiáceos en *Papaver somniferum*, la formación de alcaloides tropánicos en *Datura metel*, de cardenólidos en *Digitalis purpurea* o de rotenona en *Derris elíptica*; si bien también se produce el efecto contrario a veces, como sucede con los cultivos celulares de *Catharanthus roseus*, que disminuyen su contenido en alcaloides.

El cultivo de plantas medicinales, en muchos casos de especies en peligro de extinción, bajo condiciones controladas representa, además, un enfoque protector de la biodiversidad ya que se pueden aplicar las técnicas *in vitro* en diversas etapas del proceso de domesticación de especies silvestres, por ejemplo, en la selección para la mejora genética o el almacenamiento de material vegetal.

El concepto de cultivo vegetal *in vitro* fue introducido por el fisiólogo alemán Gottlieb Haberlandt en 1902; su trabajo no obtuvo muy buenos resultados al emplear células muy diferenciadas, pero permitió comprobar que las células vegetales, a diferencia de las animales, son totipotentes, decir, cultivadas *in vitro* las células diferenciadas tienen la capacidad de dediferenciarse, siendo capaces de generar una nueva planta. Desde entonces los cultivos *in vitro* se han convertido en una disciplina con importantes repercusiones tanto en la investigación básica como en las tecnologías aplicadas. La propagación *in vitro* (micropropagación) de plantas y el cultivo *in vitro* de órganos vegetales (generalmente raíces) representan dos de los métodos más empleados para la obtención de metabolitos secundarios a partir de material vegetal. El cultivo de células vegetales (es decir, el cultivo *in vitro* de células aisladas) se ha considerado durante mucho tiempo una herramienta eficaz para la producción biotecnológica de compuestos de origen vegetal.

La micropropagación o propagación clonal es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro* y se define como la regeneración de plantas *in vitro* a partir de la organogénesis de brotes o la embriogénesis somática. A escala comercial ofrece importantes ventajas con respecto a la propagación convencional, como la producción de grandes cantidades de plantas genéticamente homogéneas, libres de enfermedades y con tasas de multiplicación muy elevadas. Se ha convertido en un método estándar de producción de especies de valor económico, sobre todo en el ámbito agrícola, ornamental y forestal (Debnath et al., 2006). Tiene también un potencial significativo para la producción masiva de plantas medicinales y hasta la fecha se han desarrollado numerosos protocolos para la micropropagación de un gran número de especies de uso medicinal (Sarasan et al., 2011; Debnath et al., 2006).

Los cultivos de células vegetales (células desdiferenciadas suspendidas en un medio nutritivo líquido) se han denominado acertadamente como “fábricas químicas de metabolitos secundarios”. Ofrecen una serie de ventajas sobre el uso convencional de las plantas como fuente de principios activos, como, por ejemplo, la independencia de las variaciones geográficas, estacionales y ambientales; una producción continua, de calidad y con rendimiento uniforme; la evitación de la aplicación de pesticidas y herbicidas; y ciclos de crecimiento comparativamente cortos lo que conduce a una alta calidad de los productos obtenidos (Wang et al., 2020b; Bonfill et al., 2013; Debnath et al., 2006).

El cultivo vegetal *in vitro*, en sus diversas modalidades, ya se emplea en la producción de determinados metabolitos secundarios como el paclitaxel, la escopolamina o la digoxina. En particular el cultivo de raíces en cabellera, obtenido mediante la infección con *Agrobacterium rhizogenes* ha resultado muy prometedor para la producción de metabolitos secundarios a nivel industrial. Incluso los metabolitos secundarios aislados directamente de cultivos *in vitro* pueden presentar una actividad terapéutica mayor que los aislados desde una planta cultivada por métodos tradicionales, como es el caso de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de especies de lavanda (*Lavandula* spp).

Sin embargo, los costes elevados de las técnicas *in vitro* en comparación con la propagación convencional son una desventaja importante y han limitado su uso (Sahu y Sahu, 2013).

| ESPECIE                        | METABOLITO               | TIPO DE CULTIVO                |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| <i>Panax ginseng</i> C.A.Meyer | ginsenósidos, saponinas  | raíces                         |
| <i>Digitalis</i> spp.          | glucósidos cardiotónicos | brotos, suspensiones celulares |
| <i>Mentha spicata</i> L.       | monoterpenos             | planta completa                |
| <i>Ruta graveolens</i> L.      | alcaloides               | brotos                         |
| <i>Hypericum perforatum</i> L. | naftodiantronas          | brotos, suspensiones celulares |
| <i>Atropa belladonna</i> L.    | alcaloides               | raíces                         |
| <i>Taxus chinensis</i> Rehder  | taxoides                 | suspensiones celulares         |

Ejemplos de metabolitos secundarios obtenidos por cultivos *in vitro*

Aunque se han aplicado tecnologías desarrolladas para otros sistemas de cultivo celular, como células de mamíferos o incluso levaduras, en la actualidad sólo se producen comercialmente catorce compuestos a partir de cultivos celulares vegetales; debido principalmente a limitaciones como el crecimiento lento y los bajos y variables rendimientos de los metabolitos, todo ello acompañado de la escasa información de que se dispone sobre la biosíntesis de los metabolitos secundarios en el vegetal y su regulación.

Entre las medidas que permiten mejorar producción *in vitro* se encuentra la modificación del medio nutritivo como los niveles de fosfato y nitrato, el nivel y el tipo de azúcares, los reguladores de crecimiento y la incorporación de precursores. Sin olvidar factores físicos o químicos como la temperatura, la calidad e intensidad de la luz o el pH del medio nutritivo (Murthy et al., 2014).

Dado que algunos metabolitos secundarios solo se producen en estructuras especializadas, la producción de estos compuestos está relacionada con la diferenciación celular; así, por ejemplo, se han utilizado cultivos *in vitro* de diversas plantas productoras para obtener sus principios activos, entre ellos brotes (*Atropa belladonna* para obtener atropina o *Stevia reabudiana* para obtener esteviósidos) y raíces (*Hyosciamus albus* para obtener hiosciamina o *Beta vulgaris* para obtener betalainas).

Entre las estrategias utilizadas actualmente para mejorar la producción de metabolitos secundarios mediante cultivos *in vitro* se encuentra la incorporación de los denominados “elicitores” (Murthy et al., 2014; Dörnenburg y Knorr, 1995), moléculas bióticas (como la pectina o el quitosan) o abióticas (como el ácido salicílico o metales pesados) que provocan una mayor producción de metabolitos secundarios como respuesta de defensa y protección de la planta frente al estrés o al daño ocasionado por los elicitores. Este proceso permite conocer, además, las rutas que dan lugar a la biosíntesis de los metabolitos secundarios.

## Producción heteróloga

La biosíntesis heteróloga de compuestos de origen natural, mediante la reconstrucción de la ruta biosintética en un receptor u hospedante externo, tiene el objetivo de aumentar el rendimiento de los compuestos de interés terapéutico y constituye una alternativa muy interesante a las vías de producción tradicionales de metabolitos secundarios. Este enfoque se ha desarrollado con el fin de transferir la biosíntesis de metabolitos secundarios de sus productores originales, en los que a menudo están en muy pequeñas cantidades y de difícil cultivo, a hospedantes, generalmente microbianos, que son más susceptibles a los procesos de fermentación. Si bien es cierto que los microorganismos han servido principalmente como organismos receptores, sin embargo, la biosíntesis heteróloga de metabolitos secundarios derivados de plantas también se ha implementado en especies de plantas genéticamente más susceptibles que las fuentes nativas, tales como el tabaco o *Arabidopsis* ssp. (Howat et al., 2014).

Tiene la ventaja de ser más respetuosa con el medio ambiente que la síntesis química, ya que evita el uso de disolventes orgánicos, metales pesados y ácidos o bases fuertes y que es fácilmente escalable desde el laboratorio a la industria. Además, especialmente en el caso de los huéspedes microbianos, las rápidas tasas de replicación de los microorganismos permiten tiempos de producción cortos, con materias primas renovables y económicas (Marienhagen y Bott, 2013). Además, los microorganismos recombinantes no suelen poseer vías que compitan con la que se expresa de forma heteróloga, por lo que los productos de interés son químicamente distintos y pueden ser fácilmente purificados (Marienhagen y Bott, 2013).

La reconstrucción exitosa de una ruta biosintética en un huésped heterólogo requiere un conocimiento profundo de las enzimas involucradas y de los genes que las codifican, su regulación y su compartimentación, por lo que uno de los principales obstáculos para realizarlo reside actualmente en el hecho de que, para muchos compuestos de interés en terapéutica, las vías biosintéticas por las cuales se originan en la planta no están completamente dilucidadas y, por lo tanto, se desconocen los genes que codifican las enzimas implicadas en las biosíntesis (Wang et al., 2011b).

Para su producción heteróloga, se necesita el aislamiento de estos genes y su posterior expresión en el receptor heterólogo en una estructura vectorial apropiada. Las estrategias de expresión dependen del organismo hospedante, pero implicarán la introducción de plásmidos que siguen siendo episomales o de estructuras que se integran en el genoma y se convierten en un nuevo *locus* genético (Miralpeix et al., 2013).

En lo que respecta a los hospedadores microbianos, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* son los más empleados. Ambos son microorganismos que han sido ampliamente utilizados para la fermentación industrial y han servido como modelo para la investigación de biología molecular fundamental, lo cual ha dado como resultado un alto nivel de conocimiento sobre su fisiología y genética. *E. coli* es incapaz de realizar modificaciones posteriores a la transferencia, su capacidad intracelular para los compuestos lipofílicos es limitada, y, debido al escaso número de metabolitos secundarios producidos de forma inherente, no proporciona los precursores endógenos necesarios para la biosíntesis de algunos compuestos, por ejemplo, los originados por la vía del mevalonato, necesarios para la biosíntesis de isoprenoides (Miralpeix et al., 2013; Zhang et al., 2008). Además, como procarionte que es, no tiene compartimentos intracelulares, lo que complica la implementación de ciertas enzimas eucariotas, como el citocromo P450s, que incluye varias enzimas clave de la biosíntesis de flavonoides, y que generalmente se encuentran en el retículo endoplásmico de la célula eucariótica (Miralpeix et al., 2013; Wang et al., 2011b). En este sentido, *S. cerevisiae* proporciona varias ventajas sobre *E. coli*: como eucarionte, la levadura tiene compartimentos intracelulares, lo que permite modificaciones posteriores a la transferencia de las proteínas eucariotas, así como la expresión funcional de las enzimas del citocromo P450 unidas a la membrana (Siddiqui et al., 2012; Wang et al., 2011b).

No obstante, a pesar de las limitaciones anteriormente mencionadas, tanto *E. coli* como *S. cerevisiae* se han utilizado como hospedadores en estudios que han permitido desarrollar vías de producción heteróloga de metabolitos, entre ellos, flavonoides. Por ejemplo, el flavonoide bioactivo 7-*O*-metildihidrokaempferol (7-*O*-MeDHK) ha sido aislado de diferentes especies vegetales, pero se utilizó *E. coli* para aumentar su producción a

partir de su precursor, el ácido p-cumarico. Para ello, *E. coli* fue tratada con ácido p-cumarico, logrando la síntesis de un compuesto intermedio, la naringenina (NRN; flavanona relacionada), que enzimáticamente se derivó a 7-*O*-MeDHK. La ruta biosintética de la flavanona se logró reconstruir en *E. coli*, a través de la expresión de 3 enzimas provenientes de tres especies diferentes: 4-cumarato-coenzima A (CoA) ligasa, de *Petroselinum crispum*; chalcona sintasa, de un híbrido de *Petunia*; y chalcona isomerasa, de *Medicago sativa*, el resultado fue un rendimiento de 119 mg NRN por litro de ácido p-cumarico 3 mM. El procedimiento presenta limitaciones ya que *E. coli* produce niveles muy bajos de malonil-CoA intracelular, precursor crucial en la biosíntesis de la flavanona, lo que supone una barrera en el uso de *E. coli* para la producción a escala comercial de flavonoides. Recientemente se ha diseñado una vía intracelular de malonil-CoA en *E. coli* que induce la sobreexpresión de genes de acetil-CoA carboxilasa y acetil-CoA sintetasa de *Nocardia farcinica*; lo que permite elevar 2,3 veces los niveles de malonil-CoA a las 6 horas y, en consecuencia, elevar 2,2 veces la producción de NRN transcurridas 24h de tratamiento con ácido p-cumárico 250  $\mu$ M (Jeon et al., 2009)

Además de hospedadores microbianos, también se han utilizado plantas como plataformas de expresión, incluyendo cultivos de suspensión de células transgénicas, cultivos de raíces en cabellera y plantas enteras. Por ejemplo, un trabajo reciente ha descrito la ruta biosintética de los secoiridoides en *C. roseus* (L.) G. Don y la expresión de la vía completa en el huésped heterólogo *Nicotiana benthamiana* Domin., iniciando así el camino para la producción biotecnológica sostenible de alcaloides de gran interés terapéutico. Entre los ejemplos más destacados de productos secundarios de interés terapéutico, que se producen heterológamente en plantas se encuentra la artemisinina, en el tabaco transgénico, tal como comentaré posteriormente (Miralpeix et al., 2013).

Una vez que la vía biosintética se ha reconstruido con éxito en un huésped heterólogo, aún no se garantiza que el metabolito deseado se produzca en las cantidades necesarias, ya que la misma depende de factores de diversa naturaleza, como la disponibilidad de uno o más precursores de la biosíntesis; en estos casos, la ingeniería metabólica puede aplicarse para, por ejemplo, optimizar las funciones de determinados enzimas del

organismo huésped. Estos procesos de ingeniería metabólica cada vez se apoyan más en las herramientas *in silico*, que permiten no solo la modelización a escala del genoma, sino también el análisis del flujo metabólico y la clasificación de las vías biosintéticas.

Basándose en su origen biogenético, los metabolitos secundarios de las plantas pueden agruparse aproximadamente en tres clases principales: fenilpropanoides o compuestos fenólicos, alcaloides y terpenoides. Dado que el proceso de producción heteróloga de más éxito en la actualidad se ha desarrollado para un isoprenoide, concretamente, para un precursor de la lactona sesquiterpénica artemisinina, me referiré a continuación a los terpenoides.

Con al menos 40.000 estructuras conocidas hasta la fecha, muchas de las cuales son de origen vegetal, los isoprenoides (también conocidos como terpenoides o terpenos) representan la clase más grande de metabolitos secundarios de las plantas. Su biosíntesis se origina a partir de los dos componentes isoprénicos de 5 átomos de Carbono: el isopentenil-pirofosfato (IPP) y el dimetilalil-pirofosfato (DMPP). Se forman en la vía del mevalonato que tiene lugar en plantas superiores en el citosol (primeras etapas), el retículo endoplásmico (con intervención de 3-hidroxi-3 metilglutaril-CoA reductasa) y los peroxisomas (etapas posteriores), o en la vía del 2C-metil-D-eritriol-4-fosfato (MEP) (también conocida como vía del no mevalonato) que está presente en la mayoría de los procariotas, todos los eucariotas, y los cloroplastos de las plantas superiores (Kuzuyama y Seto, 2003). La condensación de las dos unidades isoprénicas conduce a la biosíntesis de monoterpenos (C10, que comprende muchos constituyentes volátiles del aceite esencial), sesquiterpenos (C15, por ejemplo, artemisinina), diterpenos (C20, p. ej., paclitaxel), triterpenos (C30, p. ej., los ginsenósidos) y tetraterpenos (C40, p. ej., los carotenoides). Debido a su importancia terapéutica y a su restringida disponibilidad en las rutas de producción tradicionales, se han invertido grandes esfuerzos para facilitar la producción heteróloga de dos de estos compuestos, artemisinina y paclitaxel (Howat et al., 2014; Li y Pfeifer, 2014).

La artemisinina es una lactona sesquiterpénica con un puente endoperoxídico que se encuentra de forma natural en el ajeno dulce (*A. annua*

L.). Es eficaz frente a las formas graves de malaria y también se estudia actualmente su actividad como anticancerígeno y antiviral. Sin embargo, su disponibilidad es limitada debido a su bajo contenido en la especie y también al bajo rendimiento de la síntesis química total, lo que tiene como consecuencia su elevado precio, que hace que no sea asequible para los países en vías de desarrollo, donde la malaria es más prevalente. Por ello, se han explorado estrategias alternativas para la producción de artemisinina que permita aumentar la oferta y reducir los costes, entre ellas el desarrollo de un proceso de producción heterológica. Puesto que la vía biosintética de la artemisinina, a partir del ácido artemisínico o del ácido dihidroartemisínico, aún no se conoce del todo, el objetivo de las estrategias es la producción heteróloga de sus precursores, como el ácido artemisínico o el ácido dihidroartemisínico, seguido de su transformación semisintética a artemisinina (Kong et al., 2013) con la intervención de la enzima amorfa-4,11-dieno. Estos estudios han llevado al desarrollo de un proceso de producción económicamente viable que permite la producción heteróloga de artemisinina a partir de fuentes de carbono económicas (glucosa, etanol) en una cepa de *S. cerevisiae* diseñada para la producción de ácido artemisínico (con un rendimiento de hasta 25 g/l), y su posterior conversión semisintética a artemisinina mediante un procedimiento de conversión química simple y poco costoso (Paddon et al., 2013). El desarrollo del proceso desde la investigación en el laboratorio a su escalado industrial ha sido financiado por un proyecto de cinco años de la Fundación Bill & Melinda Gates, y ha contado con la participación de la Universidad de Berkeley, California, la empresa Amyris Inc. y la compañía farmacéutica sin ánimo de lucro One World Health, (ahora el Programa de Desarrollo de Medicamentos del Programa para poblaciones vulnerables, PATH) (Paddon y Keasling, 2014). Sanofi utiliza actualmente esta tecnología para la producción a gran escala de artemisinina, habiéndose comprometido a aplicar un modelo de producción que, sin pérdidas, permite mantener un precio bajo para los países en desarrollo.

Como alternativa a este desarrollo exitoso, se han realizado esfuerzos para producir directamente artemisinina en plantas huéspedes heterólogas, ya que, como hemos visto, los huéspedes microbianos solo permitían la producción de precursores (Farhi et al., 2013). Así, se ha logrado transferir la vía biosintética de la artemisinina a las plantas de tabaco, *Nicotiana*

*benthamiana*, utilizando una estructura de mega vectores que consiste en 5 genes derivados de plantas y levaduras implicados en la vía biosintética del mevalonato y que, por lo tanto, da lugar a la artemisinina, todos ellos regulados por distintos promotores. Los genes se dirigieron a diversos compartimentos celulares para aumentar la disponibilidad de precursores. Con este enfoque, si bien se logra la producción del compuesto, el rendimiento oscilaba en torno a 7  $\mu\text{g/g}$  de peso seco, rendimiento que, a día de hoy, resulta demasiado bajo para competir con otras alternativas de producción anteriormente comentadas.

En cuanto al Paclitaxel, un producto natural complejo con estructura diterpénica, fue aislado y elucidado estructuralmente a finales de la década de los 60 a partir de la corteza del tallo del tejo occidental (*T. brevifolia* Nutt.). A finales de los 70, se descubrió que era un agente antimetabólico que actuaba uniéndose a la subunidad beta de la tubulina, ocasionando disfunción en el ensamblaje con los microtúbulos (Schiff y Horwitz, 1980). En la actualidad, el paclitaxel está aprobado para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer y se espera que su aplicación se amplíe, ya que actualmente el compuesto también se estudia para el tratamiento de otras enfermedades no relacionadas con el cáncer. Su precio de mercado es muy alto, 600.000 dólares por kg (Howat et al., 2014). Dado que la extracción de fuentes naturales y la síntesis total han demostrado ser inviables para satisfacer las demandas del mercado, el compuesto se produce actualmente mediante dos enfoques diferentes: en primer lugar, el paclitaxel y sus análogos se producen por semisíntesis utilizando taxanos que se encuentran en mayor cantidad que el paclitaxel en varias especies de tejo, como la bacatina III o la 10-deacetilbacatina III como materiales de partida; en segundo lugar, se utilizan cultivos de células vegetales de *Taxus* para la producción de paclitaxel (Howat et al., 2014).

Con el objetivo de mejorar la producción, también se ha investigado su producción heteróloga. De hecho, el taxadieno, intermedio de paclitaxel producido en la etapa inicial, podría producirse en varios hospedantes microbianos y vegetales de forma heteróloga: mientras que la producción en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. sólo alcanzó niveles de 600 ng por gramo de peso seco, las plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan la taxadieno sintetasa (y carecen de la capacidad de utilizar el geranylge-

ranil difosfato (GGPP) para la biosíntesis de carotenoides), acumularon hasta 160 µg paclitaxel/g de tomates liofilizados, lo cual se acerca a las cantidades obtenidas de la corteza del tejo occidental. Dado que tanto las plantas de *Arabidopsis* transfectadas como las plantas de tomate crecían más lentamente que las plantas de tipo silvestre, Anterola et al. (2009) se ha utilizado también el musgo *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. como plataforma heteróloga de producción de taxadienos, alcanzando niveles de producción de 0.05% del peso fresco, sin que haya retraso en el crecimiento del hospedante (Anterola et al., 2009). En cuanto a los hospedantes microbianos heterólogos, se pudieron alcanzar niveles de taxadieno de 8.7 mg/l en *S. cerevisiae* (Engels et al., 2008) e incluso se podría lograr una producción de hasta 1 g de taxadieno/l en cepas de *E. coli* genéticamente modificadas (Ajikumar et al., 2010). Sin embargo, hay que tener en cuenta que el taxadieno es sólo un intermediario inicial de la ruta biosintética del paclitaxel (Fig. 4), por lo que sería necesario diseñar seis reacciones de hidroxilación más y otros pasos desconocidos hasta ahora para lograr la baccatina III, un precursor directo de la semisíntesis de paclitaxel.

La incorporación de los genes que codifican las enzimas para producir taxa-4(20),11(12)-diene-5 -ol, el taxadieno siguiente intermedio en la vía del paclitaxel, no logró mejorar la productividad (quedando por debajo de 60 mg/l) (Ajikumar et al., 2010). Además, algunas etapas de la vía general no han sido identificadas o confirmadas, por lo que, la producción heteróloga total de paclitaxel no es posible de forma rentable hasta la fecha.

También se ha logrado la sobreexpresión de enzimas codificadoras de genes clave para la biosíntesis de flavonoides o isoflavonoides, concretamente, la enzima isoflavona sintasa de la soja (IFS), se introdujo en plantas como el tabaco, la petunia y la lechuga, que no producen isoflavonoides de forma natural, posibilitando que estas plantas biosinteticen la isoflavona, genisteína. El rendimiento de la genisteína mejoró en el tabaco al suprimir la expresión de flavanona 3-hidroxilasa (F3H), la cual es una dihidroflavonol reductasa que cataliza la síntesis de dihidroflavonoles y antocianinas. La supresión de F3H unida a la introducción de IFS aumentó la producción de genisteína, que también se logra por sobreexpresión de IFS y fenilalanina amoniaco-liasa (PAL) en el tabaco y hojas de lechuga (Cheng et al., 2013).

Finalmente, mencionar que los productos naturales derivados de microorganismos marinos a menudo muestran similitudes importantes, o incluso son idénticos, a los compuestos de esponjas, tunicados u otros invertebrados marinos. Algunos de estos microorganismos (la mayoría de los cuales actualmente no son cultivables) se consideran los verdaderos productores de componentes bioactivos en el medio marino. Los océanos contienen un promedio de 105 a 106 bacterias por mililitro de agua de mar, totalizando un peso bacteriano estimado de 1012 toneladas. El análisis genómico, una vez más, ha sido importante en la explotación tanto de las bacterias como de las esponjas en las que se encuentran. Un ejemplo de productos naturales sintetizados por bacterias asociadas a invertebrados marinos es la manzamina, alcaloide beta-carbolínico con propiedades anti-palúdicas que se aisló originalmente de las esponjas del género *Acanthos-trongylophora*, y más tarde de *Micromonospora*, actinobacteria asociada a la esponja. Otro ejemplo es el grupo de péptidos denominados patellamida, activos frente a líneas celulares de cáncer resistentes a múltiples fármacos; estos péptidos se aislaron por primera vez del tunicado *Lissoclinum rotuliana*, pero posteriormente se descubrió que eran producidos por su simbiote cianobacteriano *Prochloron didemni* (Waters et al., 2014).

La ruta biosintética para el potente agente antitumoral psymberina de la esponja *Psammocinia* aff. *bulbosa* se obtuvo a través de la orientación genética basada en la estructura de los genes biosintéticos de poliquétido sintasa de las bacterias asociadas a la esponja. Sorprendentemente, el análisis del metagenoma de la esponja sugirió que un simbiote bacteriano no cultivado podría ser de hecho el verdadero productor de los compuestos de la esponja, incluidas las politeonamidas. Las politeonamidas son péptidos sintetizados ribosómicamente cuyo estudio ha permitido poner de manifiesto, a través del análisis metagenómico, el potencial biosintético de los sistemas ribosómicos, abriendo nuevas posibilidades para la bioingeniería de péptidos y proteínas (Robinson et al., 2007).

Como se desprende de los ejemplos examinados anteriormente, la producción heteróloga puede servir como una ruta de producción alternativa, especialmente para los compuestos de origen vegetal que se encuentran en mínimas cantidades en sus fuentes naturales o a las limitaciones estructurales que hacen inviable un enfoque sintético. Sin embargo, es evi-

dente que la técnica, a día de hoy, aún no constituye una alternativa a las rutas tradicionales de producción de compuestos naturales ya que el principal obstáculo para el desarrollo de procesos de producción heteróloga actualmente es el desconocimiento detallado de las vías biosintéticas por las que el vegetal elabora muchos compuestos de interés terapéutico. En estos procesos será de gran importancia el estudio del genoma, ya que la secuenciación genómica completa de especies representativas de plantas medicinales permitiría diseñar estrategias de ingeniería metabólica más racionales (Miralpeix et al., 2013), algo que sería posible en un futuro próximo si tenemos en cuenta los importantes avances logrados en las técnicas de secuenciación, ya comentados. En los casos en que la producción totalmente heteróloga de un compuesto natural complejo no sea posible (todavía), la producción de estructuras fácilmente accesibles para la posterior derivatización semisintética también podría ser una opción, como se ha demostrado en el caso de la artemisinina.

La ya comentada limitación del bajo rendimiento de muchos procesos de producción heteróloga, que los hace económicamente inviables o no competitivos, puede mejorarse con acciones como la modificación de enzimas de las vías biosintéticas para mejorar su compatibilidad con los organismos huéspedes, el diseño de sistemas de expresión más estables que permitan que las enzimas heterólogas se expresen de forma simultánea, el aumento de la tolerancia de los microorganismos huéspedes a los metabolitos producidos de forma heteróloga, por ejemplo, mediante estrategias de evolución adaptativa y el desarrollo de algoritmos para programas de diseño basados en modelos *in silico* que permitan la aplicación racional de las herramientas de biología de sistemas a las complejas vías biosintéticas de los metabolitos secundarios de las plantas (Miralpeix et al., 2013).

## **Síntesis orgánica**

A lo largo de casi 200 años, los químicos han logrado realizar un gran número de transformaciones en moléculas, que ha permitido su funcionalización. En los últimos treinta años, se ha logrado la síntesis de importantes compuestos de origen vegetal con interés terapéutico, como (+)-artemisinina, (+)-arglabina, (-)-cannabidiol, capsaicina, (-)-colchicina, drona-

binol ((-)- $\Delta^9$ -trans-tetrahidrocannabinol (THC), (+)-ingenol, masoprocol (ácido meso-nordihidroguayarático, (-)-homoharringtonina, (-)-paclitaxel, y (-)-solamargina. También se ha logrado sintetizar la (-)-galantamina, síntesis particularmente notable por la complejidad de su estructura. No obstante, a pesar del arduo trabajo de muchos grupos de investigación logrando la síntesis total de un gran número de compuestos de origen natural, muchos de ellos originados en plantas, a día de hoy, estos esfuerzos de síntesis no se reflejan en la producción industrial de los productos naturales (Nájera et al., 2020; Nicolaou, 2014).

El desarrollo de compuestos por ingeniería química abarca aspectos como los costes y la viabilidad de los reactivos y catalizadores, las características de las reacciones exotérmicas y criogénicas, la purificación cromatográfica, los solventes, los reactivos usados y los subproductos generados. Las cuestiones del proceso relacionadas con seguridad, salud y medio ambiente condujeron a la formulación de un marco de trabajo que ahora se conoce como Química Verde. Este concepto fue introducido a principios de los años 90 por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 2002). El aspecto clave del mismo se refiere a cómo “diseñar (...) productos y procesos químicos para reducir o eliminar el uso y la generación de sustancias peligrosas” (Horvath y Anastas, 2007). Intenta lograr la sostenibilidad aplicada a moléculas y se aplica a todas las etapas del ciclo de vida de los productos químicos. Incluye los denominados Doce Principios de la Química Verde, que pretenden ser un conjunto coherente de directrices para el diseño de productos y procesos.

A fin de determinar el impacto en la salud y el medio ambiente se han propuesto distintos sistemas de medida de estos principios que incluyen criterios como el rendimiento global, reactivos, catalizadores o disolventes utilizados, los subproductos generados (que variarán según las reacciones y sus mecanismos) y, por supuesto, el factor de impacto ambiental centrado en la producción de residuos y deshechos.

Es importante entender que, si bien ninguna métrica por sí sola reflejará todos los aspectos de eficiencia y seguridad, existen algunos algoritmos métricos que pueden aplicarse a cualquier síntesis compleja, como el creado para comparar planes de síntesis del fármaco antiviral oseltamivir,

cuyas preparaciones iniciales se basaron en la elaboración a partir de ácido quínico (obtenido, por ejemplo, de la corteza de especies del género *Cinchona*) o de ácido sikímico (obtenido de especies del género *Illicium*, como el anís estrellado chino, *Illicium verum*, o japonés, *Illicium anisatum*). Los estudios revelaron que la ruta industrial semisintética del ácido sikímico y un modificación de la misma tenían el mayor rendimiento global (39,0% y 43,8%) para la obtención del antiviral (Carr et al., 2008).

Por lo general, la semisíntesis permite obtener grandes cantidades de una molécula si se dispone de un precursor adecuado. El paclitaxel es un ejemplo de ello. Mientras que más de 1400 toneladas métricas de *T. brevifolia* Nutt. (tejo del Pacífico), recolectadas entre 1991 y 1992 (Cragg, 1998) permitieron suministrar el compuesto sólo para ensayos clínicos, con la consiguiente destrucción de árboles de crecimiento lento, el diterpeno tetracíclico 10-deacetilbaccatin III (que representa la fracción estructuralmente más exigente de paclitaxel) se obtiene fácilmente de las agujas de *Taxus baccata* L. (tejo europeo) en cantidades de 1 g/kg. Este método de obtención a partir de las hojas deja los árboles intactos, y la 10-deacetilbaccatina III se transforma en paclitaxel, en un proceso de alto rendimiento (Guenard et al., 1993). Posteriormente, se desarrolló un proceso quimioenzimático en el que el intermediario quiral necesario para transformar 10-deacetilbaccatin III en paclitaxel se produjo mediante resolución cinética empleando lipasas, y el proceso se escaló hasta 150, dando como resultado un excelente rendimiento, y pureza del compuesto.

Otra estrategia de síntesis consiste en aplicar metodología quimioenzimática para la obtención de compuestos intermedios como punto de partida. Un ejemplo es la dihidroxilación enantioselectiva de bencenos sustituidos mediante tolueno dioxigenasa. Esta transformación logra la desaromatización de los derivados del benceno para dar dihidrodioles de areno, permitiendo rutas sintéticas, que de otra manera no serían factibles. El proceso incluye una fermentación en *E. coli*, proporcionando los dihidrodioles en una escala de 10 a 100 g en tres días, incluido el tiempo necesario para la preparación del precultivo y la inoculación. Los compuestos de este tipo, cuya producción por medios químicos sería un procedimiento prolongado, son estructuras que podrían utilizarse para obtener compuestos como la pancratistatina y la morfina, sus análogos y derivados. Además, la

asociación de procesos de biotransformación y síntesis mejora la métrica final ya que el proceso enzimático en sí mismo cumple la mayoría de los Doce Principios de la Química Verde (Reed y Hudlicky, 2015).

El concepto más reciente relacionado con la síntesis orgánica de productos naturales, estrechamente relacionado con la biomimética o biomímesis, se refiere a la síntesis colectiva/conjunta. Este concepto, que se centra en la generación de productos naturales estructuralmente diversos, se ha aplicado a diferentes alcaloides de los géneros *Strycnos*, *Aspidosperma* y *Kopsia*, al señalar un precursor biosintético común, la preakummicina, que da lugar, entre otros, a la C-Toxiferina, alcaloide indólico dímero presente en curares obtenidos de *Strycnos toxifera* R.H. Schomb. ex Benth. Este enfoque también permite la síntesis de la (-)-estricinina con un rendimiento total del 6,4 % (Ertl y Schuhmann, 2019).

Finalmente, mencionar que muchos compuestos derivados de plantas se sintetizan con métodos de síntesis de flujo continuo, entre ellos alcaloides como oxomaritidina (antiparasitaria), presente en *Zephyranthes citrina* Baker, o sedridina (cicatrizante), alcaloide muy tóxico por vía interna que se emplea como cicatrizante cutáneo, obtenido de *Sedum acre* L.

Una vez lograda la síntesis en laboratorio de un producto natural, es probable que se pueda realizar su escalado industrial si bien, dada la complejidad estructural de los productos naturales, aún no existe consenso sobre si será la química o la biología sintética la principal fuente de su suministro en el futuro, sobre todo teniendo en cuenta los recientes avances de la biología química. Sin olvidar que ambos procesos podrían en un futuro emplearse de forma sinérgica, de manera semejante a lo ya mencionado para la producción quimioenzimática. Se lograría así la producción a escala industrial de complejos productos naturales que se encuentran en la naturaleza en cantidades mínimas.

Como ejemplos destacados de síntesis logradas, podemos mencionar a galantamina e ingenol.

La galantamina es un alcaloide de la F/ Amarilidaceae, cuyo uso principal es aliviar los síntomas de la enfermedad de Alzheimer inhibiendo

la enzima acetilcolinesterasa y contrarrestando así la disminución de los niveles de acetilcolina en el cerebro (Jones et al., 2011). Se puede producir mediante el aislamiento de varias especies del género *Galanthus* (campanilla de invierno), pero estas fuentes no son suficientes para satisfacer la demanda, debido principalmente a las condiciones muy específicas de cultivo requeridas. Se han publicado varias síntesis (Barton y Kirby, 1962) antes de que se desarrollara una ruta a escala de kilogramos que logra la producción química industrial de bromuro de galantamina que consta de 9 pasos (Küenburg et al., 1999).

En cuanto al ingenol es un diterpenoide que se encuentra en especies del género *Euphorbia*, cuyo derivado también natural, el mebutato de ingenol, ha sido recientemente aprobado por la FDA y la EMA como el primer fármaco de su clase para tratar la queratosis actínica (Gras, 2013). El mebutato de ingenol se aísla de *E. peplus* L. en rendimiento de tan sólo 1.1 mg/kg, por lo que actualmente se prepara semisintéticamente a partir del ingenol, análogo estructural y más abundante, obtenido de las semillas de *E. lathyris* L., con un rendimiento de 275 mg/kg.

Si comparamos estructuralmente ambos compuestos, observamos que el ingenol tiene más estereocentros que la galantamina (8 vs. 3), y más carbonos cuaternarios no aromáticos (3 vs. 1), dos de los cuales son contiguos. En cuanto a la síntesis global, las diferencias más aparentes son el número de pasos (14 + 4 vs. 9), y el uso de reactivos químicos sencillos y baratos para la galantamina comparada a la ruta del ingenol. La química es más compleja en el último caso, en parte porque el ingenol es enteramente carbocíclico, requiriendo métodos más elaborados para la formación de enlaces. Aunque las rutas de estos dos compuestos utilizan metodologías bastante diferentes, ambos imitan la biosíntesis que se produce en las fuentes naturales, *Galanthus* y *Euphorbia*, respectivamente (Kirby et al., 2010).

En resumen, la galantamina es un ejemplo de un compuesto natural de origen vegetal que se ha producido sintéticamente a escala industrial durante más de una década. El reciente trabajo sobre el ingenol, el otro ejemplo analizado, destaca porque representa la realización de una ruta sintética concisa, deseable para cualquier producto natural de tan alta complejidad, que se espera que se produzca sintéticamente en el futuro.

*Vivir no es solo existir, sino existir y crear,  
saber gozar y saber sufrir, y no dormir sin soñar*  
G. Marañón

## CONSIDERACIONES FINALES

A partir de este breve panorama histórico y de la breve reseña de algunos aspectos de la investigación actual, podemos asegurar que las plantas medicinales, además de haber sido una valiosa fuente de medicamentos en el pasado, constituyen hoy en día una base importante para la identificación de nuevas moléculas de interés terapéutico. La Farmacognosia ha acompañado durante milenios al ser humano y durante siglos ha desarrollado conocimientos basados en la evidencia proveniente de las distintas culturas. Los estudios químicos, farmacológicos y clínicos de las medicinas tradicionales han sido la base para el desarrollo de los fármacos modernos, como la aspirina, la digitoxina, la morfina o la quinina, estimándose que actualmente los principios activos del 45 % de los medicamentos son productos naturales o sus derivados semisintéticos.

El renovado interés científico en el descubrimiento de medicamentos basados en productos naturales ha llevado a desarrollar y a aplicar nuevos enfoques en la investigación, además de emplear tecnologías innovadoras que permiten la obtención, identificación y posterior estudio de los constituyentes activos.

El desarrollo de esta ciencia ha llevado a dedicar un lugar cada vez más amplio a los constituyentes químicos de las plantas, su descripción y análisis, así como a sus propiedades farmacológicas. Debido al auge de otras ciencias y al avance tecnológico, la Farmacognosia en la actualidad posee un alto grado de perfeccionamiento en los métodos de extracción de los principios activos, así como en los métodos biotecnológicos aplicados a la biosíntesis de sustancias con aplicación terapéutica. El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ha permitido identificar y conseguir principios activos con gran potencial terapéutico e industrial. Sin olvidar los importantes avances en los métodos empleados para estudiar la actividad, entre ellos,

estudios *in vitro* basados en cultivos celulares, métodos *in vivo*, *ex vivo*, estudios de toxicidad y ensayos clínicos.

La producción de los metabolitos secundarios por el vegetal es un proceso complejo en el que trabajan conjuntamente genes, proteínas y procesos metabólicos, y cuya interacción está regulada por la biología de sistemas, que, a su vez, combina genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica. Los estudios farmacognósticos sobre biosíntesis y estructura molecular de los compuestos permiten, además, sintetizar moléculas análogas con mayor actividad biológica y también mayor potencial en terapéutica, proporcionando herramientas firmes para el progreso de otras ciencias.

En el entorno altamente competitivo de la investigación farmacéutica contemporánea, se requiere de una orientación multidisciplinar, de equipos, que permita aprovechar todo el potencial de las especies vegetales y sus principios activos, integrando su diversidad molecular y funcionalidad biológica para el descubrimiento de nuevos fármacos. Ello implica incluir los recursos biológicos sin explotar (entre ellos, la importante información etnofarmacológica existente), los métodos de detección inteligente, la separación robótica con análisis estructural, las tecnologías “ómicas”, principalmente la ingeniería metabolómica, y la biología de sistemas como tecnologías innovadoras; sin olvidar, la secuenciación genética, el conocimiento y regulación de las rutas biosintéticas que conducen a la biosíntesis de los metabolitos secundarios en las distintas especies y las estrategias para la realización de las pruebas farmacológicas más relevantes.

Biodiversidad y genómica son, por tanto, dos palabras clave que rigen la ciencia de los productos naturales del siglo XXI.

La aplicación de estas nuevas tecnologías también requiere un nuevo tipo de farmacéutico y farmacognosta que será un experto en todos los aspectos relacionados con el estudio de los productos naturales.

Milenios de experiencia y tradición, basadas en las evidencias del empleo de plantas medicinales por todas las culturas, esperan para ser analizadas, exploradas y puestas a disposición de la terapia moderna, ya sea

como preparaciones complejas o como compuestos aislados y, por supuesto, basadas en los marcos legales sobre la diversidad biológica.

Es poco probable que el futuro del descubrimiento de fármacos basados en productos naturales sea parecido al pasado, y mientras los Farmacognostas, como científicos especialistas en productos naturales, continúen adaptando creativamente las nuevas tecnologías a sus necesidades, ese futuro será, sin duda, brillante.

HE DICHO



## BIBLIOGRAFÍA

Ajikumar, P.K., Xiao, W.H., Tyo, K.E., Wang, Y., Simeon, F., Leonard, E., et al., 2010. Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science* 330, 70-74.

Alqahtani, S., Mohamed, L.A., Kaddoumi, A., 2013. Experimental models for predicting drug absorption and metabolism. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 9, 1241-1254.

Anterola, A., Shanle, E., Perroud, P.F., Quatrano, R., 2009. Production of taxa-4(5),11(12)-diene by transgenic *Physcomitrella patens*. *Transgenic Res.* 18, 655–660.

Appendino, G., Fontana, G., Pollastro, F., 2010. Natural products drug discovery. In: Liu, H.-W., Mander, L. (Eds.), *Comprehensive Natural Products II*. Elsevier, Oxford, pp. 205-236.

Arora, R., Mathur, A., Mathur, A.K., 2010. Emerging trends in medicinal plant biotechnology. *Medicinal Plant Biotechnology*, pp. 1-12.

Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotech. Adv.* 33, 1582–1614.

Atanasov, A.G., Wang, J.N., Gu, S.P., Bu, J., Kramer, M.P., Atanasov, A.G., Blunder, M., Fakhrudin, N., Liu, X., Noha, S.M., Malainer, C., et al., 2013. Polyacetylenes from *Notopterygium incisum* new selective partial agonists of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *PLoS One* 8, e61755.

Baumgartner, R.R., Steinmann, D., Heiss, E.H., Atanasov, A.G., Ganzera, M., Stuppner, H., et al., 2010. Bioactivity-guided isolation of 1,2,3,4,6-Penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose from *Paeonia lactiflora* roots as a PTP1B inhibitor. *J. Nat. Prod.* 73, 1578–1581.

Baird, L., Swift, S., Lleres, D., Dinkova-Kostova, A.T., 2014. Monitoring Keap1-Nrf2 interactions in single live cells. *Biotechnol. Adv.* 32, 1133-1144.

Balunas, M.J., Su, B., Landini, S., Brueggemeier, R.W., Kinghorn, A.D., 2006. Interference by naturally occurring fatty acids in a non-cellular enzyme-based aromatase bioassay. *J. Nat. Prod.* 69, 700–703.

Barbosa, W.L.R., do Nascimento, M.S., do Nascimento Pinto, L., Maia, F.L.C., Sousa, A.J.A., Silva Júnior, J.O.C., et al., 2012. Selecting Medicinal Plants for Development of Phytomedicine and Use in Primary Health Care, Bioactive Compounds in Phytomedicine. In: Rasooli, Iraj (Ed.) InTech.

Barton, D.H.R., Kirby, G.W., 1962. Phenol oxidation and biosynthesis. V. Synthesis of galanthamine. *J. Chem. Soc.* 42, 806–817.

Bedair, A., Mansour, F.R. 2019. Insights into the **FDA 2018 new drug** approvals. *Curr. Drug. Discov. Technol.* Dec 1.

Beutler, J.A., 2009. Natural products as a foundation for drug discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 46, 1-9.

Beyoglu D, Idle JR. 2020. Metabolomic insights into the mode of action of natural products in the treatment of liver disease. *Biochem Pharmacol.* 22, 180, 114171.

Blazevic, T., Schaible, A.M., Weinhaupl, K., Schachner, D., Nikels, F., Weinigel, C., et al., 2014. Indirubin-3 -monoxime exerts a dual mode of inhibition towards leukotriene- mediated vascular smooth muscle cell migration. *Cardiovasc. Res.* 101, 522–532.

Bonfill, M., Malik, S., Mirjalili, M.H., Goleniowski, M., Cusido, R., Palazón, J., 2013. Production and genetic engineering of terpenoids production in plant cell and organ cultures. In: Ramawat, K.G., MJM (Eds.), Natural Products. Springer, Berlin, pp. 2761–2796.

Bucar, F., Wube, A., Schmid, M., 2013. Natural product isolation.- how to get from biological material to pure compounds. *Nat. Prod. Rep.* 30, 525–545.

Burton, G., Evans-Illidge, E.A., 2014. Emerging R and D law: the Nagoya Protocol and its implications for researchers. *ACS Chem. Biol.* 9, 588–591.

Carr, R., Ciccone, F., Gabel, R., Guinn, M., Johnston, D., Mastriona, J., et al., 2008. Stream-lined process for the esterification and ketalization of shikimic acid enroute to the key precursor for oseltamivir phosphate (Tamiflu). *Green Chem.* 10, 743–745.

Castilho, P.C., Gouveia, S.C., Rodrigues, A.I. 2008. Quantification of Artemisinin in *Artemisia Annu*a Extracts by <sup>1</sup>H-NMR. *Phytochem. Anal.* 19, 329-334.

Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., van den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., et al. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon.* 56 (2), 259-299.

Che, C-T., Zhang, H., Plant Natural Products for Human Health. 2019. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 830-833.

Cheng, H., Wang, J., Chu, S., Yan, H-L., Yu, D., 2013. Diversifying Selection on Flavanone 3-Hydroxylase and Isoflavone Synthase Genes in Cultivated Soybean and Its Wild Progenitors. *PLoS One* 8(1), e54154.

Ciceron, M.T., 1471. Pro Plancio, 54 a.C. Ed. M.T. Ciceron. *Orationes*, Venecia: Chritophorus Valdarfer.

Clardy, J., Walsh, C., 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* 432, 829-837.

Cohen, P., Alessi, D.R., 2013. Kinase drug discovery. - what's next in the field? *ACS Chem. Biol.* 8, 96–104.

Cordell, G.A., 2011. Sustainable medicines and global health care. *Planta Med.* 77, 1129–1138.

Corson, T.W., Crews, C.M., 2007. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials. *Cell* 130, 769-774.

Cragg, G.M., 1998. Paclitaxel (Taxol): a success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. *Med. Res. Rev.* 18, 315-331.

Cragg, G.M., Newman, D.J., 2013. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3670-3695.

Curtis, C.G., Bilyard, K., Stephenson, H., 2008. *Ex Vivo* Metrics, a pre-clinical tool in new drug development. *J. Transl. Med.* 6, 5-8.

David, B., Wolfender, J.L., Dias, D.A., 2015. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochem. Rev.* 14 (2), 299-315.

Debnath, M., Malik, C.P., Bisen, P.S., 2006. Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7, 33-49.

Dörnenburg, H., Knorr, D., 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzym. Microb. Technol.* 17, 674–684.

Engels, B., Dahm, P., Jennewein, S., 2008. Metabolic engineering of taxadiene biosynthesis in yeast as a first step towards Taxol (Paclitaxel) production. *Metab. Eng.* 10, 201–206.

Ertl, P., Schuhmann, T. 2019. A Systematic Cheminformatics Analysis of Functional Groups Occurring in Natural Products. *J. Nat. Prod.* 82(5), 1258-1263.

Fabricant, D.S., Farnsworth, N.R., 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.* 109 (Suppl. 1), 69–75.

Farhi, M., Kozin, M., Duchin, S., Vainstein, A., 2013. Metabolic engineering of plants for artemisinin synthesis. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 29, 135–148.

Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z., 1985. Medicinal plants in therapy. *Bull. World Health Organ.* 63, 965–981.

Forbey, J.S., Harvey, A.L., Huffman, M.A., Provenza, F.D., Sullivan, R., Tasdemir, D., 2009. Exploitation of secondary metabolites by animals: a response to homeostatic challenges. *Integr. Comp. Biol.* 49, 314–328.

Foster, J.R., Lund, G., Sapelnikova, S., Tyrrell, D.L., Kneteman, N.M., 2014. Chimeric rodents with humanized liver: bridging the preclinical/clinical trial gap in ADME/toxicity studies. *Xenobiotica* 44, 109–122.

Ghatak, A., Chaturvedi, P., Weckwerth, W., 2017. Cereal crop proteomics: Systemic analysis of crop drought stress responses towards marker-assisted selection breeding. *Front. Plant Sci.* 8, 757- 759.

Guenard, D., Gueritte-Voegelein, F., Potier, P., 1993. Taxol and taxotere: discovery, chemistry, and structure-activity relationships. *Acc. Chem. Res.* 26, 160–167.

Gul, S., Gribbon, P., 2010. Exemplification of the challenges associated with utilising fluorescence intensity based assays in discovery. *Expert Opin. Drug Discovery* 5, 681-690.

Haberlandt, G., 1902. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math. Nat.* 111, 69-91.

Harrison, C., 2014. Patenting natural products just got harder. *Nat. Biotechnol.* 32, 403-404.

Hashiguchi, A., Komatsu, S., 2017. Proteomics of soybean plant. In *Proteomics in Food Science: From Farm to Fork*; Colgrave, M., Ed.; Elsevier: Amsterdam, Netherlands; Chapter 6; pp. 89–105.

Hashiguchi, A., Tian, J., Komatsu, S., 2017. Proteomic Contributions to Medicinal Plant Research: From Plant Metabolism to Pharmacological Action. *Proteomes*, 5, 35-41.

Hausmann, A., Haszprunar, G., Hebert, P.D.N., 2011. DNA Barcoding the Geometrid Fauna of Bavaria (Lepidoptera): Successes, Surprises, and Questions. *PLoS One* 6(2), e17134.

Hein, M., Zilian, D., Sottriffer, C.A., 2010. Docking compared to 3D-pharmacophores: the scoring function challenge. *Drug Discov. Today Technol.* 7, e229–e236.

Heinrich, M., 2010a. Ethnopharmacology in the 21st century.-grand challenges. *Front. Pharmacol.* 1, 8-11.

Heinrich, M., Gibbons, S., 2001. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *J. Pharm. Pharmacol.* 53, 425-432.

Henrich, C.J., Beutler, J.A., 2013. Matching the power of high throughput screening to the chemical diversity of natural products. *Nat. Prod. Rep.* 30, 1284-1298.

Hoon, S., St Onge, R.P., Giaever, G., Nislow, C., 2008. Yeast chemical genomics and drug discovery: an update. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 499-504.

Horvath, I.T., Anastas, P.T., 2007. Introduction: green chemistry. *Chem. Rev.* 107, 2167–2168.

Howat, S., Park, B., Oh, I.S., Jin, Y.W., Lee, E.K., Loake, G.J., 2014. Paclitaxel: biosynthesis, production and future prospects. *N. Biotechnol.* 31, 242-245.

Huang, P., Xiao, A., Zhou, M., Zhu, Z., Lin, S., Zhang, B., 2011. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat. Biotechnol.* 29, 699-700.

Janjua, S., Fakhar-i-Abbas, William, K., 2016. DNA Mini-barcoding for wildlife trade control: a case study on identification of highly processed animal materials. *Mitochondrial DNA* 27(3), 544-546.

Jayakodi, M., Lee, S.C., Lee, Y.S., Park, H.S., Kim, N.H., Jang, W., et al., 2015. Comprehensive analysis of Panax ginseng root transcriptomes. *BMC Plant Biol.* 15, 138-141.

Jeon, Y.M., Kim, B-G., Ahn, J-H., 2009. Biological Synthesis of 7-O-Methyl Apigenin from Naringenin Using Escherichia coli Expressing Two Genes. *Microb.Biotech.* 19(5), 491-494.

Kaiser, H., 2008. Von der Pflanze zur Chemie.- Die Frühgeschichte der "Rheumamittel". *Z. Rheumatol.* 67, 252-262.

Kaserer, T., Temml, V., Schuster, D., 2014. Polypharmacology and adverse bioactivity profiles predict potential toxicity and drug-related ADRs. In: Wang, J., Urban, L. (Eds.), Predictive ADMET. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, pp. 23-45.

Katiyar, C., Gupta, A., Kanjilal, S., Katiyar, S., 2020. Drug Discovery from plant sources: an integrated approach. *AYU.* 33(1), 10-19.

Kim, S.W., Gupta, R., Lee, S.H., Min, C.W., Agrawal, G.K., Rakwal, R., et al., 2016. An integrated biochemical, proteomics, and metabolomics approach for supporting medicinal value of Panax ginseng fruits. *Front. Plant Sci.* 7, 994-999. Gras, J., 2013. Ingenol mebutate: a new option for actinic keratosis treatment. *Drugs Today (Barc.)* 49, 15-22.

Kinghorn, A.D., Pan, L., Fletcher, J.N., Chai, H., 2011. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. *J. Nat. Prod.* 74, 1539-1555.

Klayman, D.L., Lin, A.J., Acton, N., Scovill, J.P., Hoch, J.M., Milhous, W.K., et al., 1984. Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. *J. Nat. Prod.* 47, 715-717.

Koehn, F.E., Carter, G.T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 206-220.

Kong, J., Yang, Y., Wang, W., Cheng, K., Zhu, P., 2013. Artemisinic acid: a promising molecule potentially suitable for the semi-synthesis of artemisinin. *RSC Adv.* 3, 7622-7641.

Kress, W.J., Erickson, D.L., 2007. A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLoS One* 2(6), e508.

Kruse, P.R., 2007. Geschichte der Pharmazie. Vol. II: Von der Frühen Neuzeit bis zur Gegenwart.- by Rudolf Schmitz. Centaurus 49, 182-183.

Küenburg, B., Czollner, L., Fröhlich, J., Jordis, U., 1999. Development of a pilot scale process for the anti-Alzheimer drug (-)-galanthamine using large-scale phenolic oxidative coupling and crystallisation-induced chiral conversion. *Org. Process Res. Dev.* 3, 425-431.

Kurin, E., Atanasov, A.G., Donath, O., Heiss, E.H., Dirsch, V.M., Nagy, M., 2012. Synergy study of the inhibitory potential of red wine polyphenols on vascular smooth muscle cell proliferation. *Planta Med.* 78, 772-778.

Kuzuyama, T., Seto, H., 2003. Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat. Prod. Rep.* 20, 171-183.

Larsen, M.M., Adersen, A., Davis, A.P., Lledó, M.D., Jäger, A.K., Rønsted, N., 2010. Using a phylogenetic approach to selection of target plants in drug discovery of acetylcholin- esterase inhibiting alkaloids in Amaryllidaceae tribe Galantheae. *Biochem. Syst. Ecol.* 38, 1026–1034.

Lee, J.A., Uhlik, M.T., Moxham, C.M., Tomandl, D., Sall, D.J., 2012. Modern phenotypic drug discovery is a viable, neoclassic pharma strategy. *J. Med. Chem.* 55, 4527–4538.

Leonti, M., 2011. The future is written: impact of scripts on the cognition, selection, knowledge and transmission of medicinal plant use and its implications for ethnobotany and ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 134, 542–555.

Leung, K.W., Wong, A.S. 2010. Pharmacology of ginsenosides: A literature review. *Chin. Med.* 5, 20-31.

Li, Y., Pfeifer, B.A., 2014. Heterologous production of plant-derived isoprenoid products in microbes and the application of metabolic engineering and synthetic biology. *Curr. Opin. Plant Biol.* 19, 8-13.

Li, J.W., Vederas, J.C., 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an end- less frontier?. *Science* 325, 161-165.

Liang, Y.; Zhao, S. 2008. Progress in understanding of ginsenoside biosynthesis. *Plant Biol.* 10, 415–421.

Little, D.P., 2014. Authentication of Ginkgo Biloba Herbal Dietary Supplements Using DNA Barcoding. *Genome.* 57(9), 513-516.

Liu, J., Liu, Y., Wang, Y., Abozeid, A., Zu, Y.G., Tang, Z.H. 2017. The integration of GC-MS and LC-MS to assay the metabolomics profiling in *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* reveals a tissue- and species-specific connectivity of primary metabolites and ginsenosides accumulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 135, 176–185.

Ma, C., Xu, S., Liu, G., Liu, X., Xu, X., Wen, B., Liu, S. 2017. Improvement of peptide identification with considering the abundance of mRNA and peptide. *BMC Bioinform.* 18, 109-112.

Majolo, F., Oliveira, L. K. de, Marmitt, D.J., Bustamante-Filho, I.C., Goettert, M.I. 2019. Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug Discovery. *Phytochem. Letters.* 31, 196-207.

Marienhagen, J., Bott, M., 2013. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products. *J. Biotechnol.* 163, 166–178.

Mashkovsky, M.D., Kruglikova-Lvova, R.P., 1951. On the pharmacology of the new alkaloid galantamine. *Farmacol. Toxicol.* 14, 27–30.

Miralpeix, B., Rischer, H., Hakkinen, S.T., Ritala, A., Seppanen-Laakso, T., Oksman-Caldentey, K.M., et al., 2013. Metabolic engineering of plant secondary products: which way forward? *Curr. Pharm. Des.* 19, 5622–5639.

Mohamed A. Salem, M.A., Perez de Souza, L., Serag, A. Fernie, A.R., Farag, M.A.; Ezzat, S.M; Alseekh, S., 2020. Metabolomics in the Context of Plant Natural Products Research: From Sample Preparation to Metabolite Analysis. *Metabolites* 10(1), 37.

Moritz, C., Cicero, C. 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *PLoS Biol.* 2 (10), e354.

Murthy, H.N., Lee, E.J., Paek, K.Y., 2014. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 118, 1–16.

Nájera, C., Foubelo, F., Sansano, J.M., Yus, M. 2020. Stereodivergent routes in organic synthesis: marine natural products, lactones, other natural products, heterocycles and unnatural compounds. *Org. Biomol. Chem.* 18(7), 1279-1336.

Newman, D.J., Cragg, G.M., 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311–335.

Newman, D.J., Cragg, G.M. 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629-661.

Ngo, L.T., Okogun, J.I., Folk, W.R., 2013. 21st century natural product research and drug development and traditional medicines. *Nat. Prod. Rep.* 30, 584–592.

Nicolaou, K.C., 2014. Organic synthesis: the art and science of replicating the molecules of living nature and creating others like them in the laboratory. *Proc. R. Soc. A* 470, 20130690/1-17.

Obbo, C.J.D., Makanga, B., Mulholland, D.A., Coombes, P.H., Brun, R., 2013. Antiprotozoal activity of *Khaya anthotheca*, (Welv.) C.D.C. a plant used by chimpanzees for self-medication. *J. Ethnopharmacol.* 147, 220–223.

Oliva, M.J., 2011. Sharing the benefits of biodiversity: a new international protocol and its implications for research and development. *Planta Med.* 77, 1221–1227.

Orlikova, B., Schumacher, M., Juncker, T., Yan, C.C., Inayat-Hussain, S.H., Hajjouli, S., et al., 2013. Styryl-lactone goniotalamin inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation. *Food Chem. Toxicol.* 59, 572–578.

Paddon, C.J., Keasling, J.D., 2014. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 355–367.

Paddon, C.J., Westfall, P.J., Pitera, D.J., Benjamin, K., Fisher, K., McPhee, D., et al., 2013. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* 496, 528–532.

Pridge, E., Gareiss, P., Kinch, M.S., Hoyer, D., 2016. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov. Today*. 21(2), 204-207.

Pellegatti, M., 2013. Dogs and monkeys in preclinical drug development: the challenge of reducing and replacing. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 9, 1171–1180.D.

Picker, P., Vogl, S., McKinnon, R., Mihaly-Bison, J., Binder, M., Atanasov, A.G., et al., 2014. Plant extracts in cell-based anti-inflammatory assays.-pitfalls and considerations related to removal of activity masking bulk components. *Phytochem. Lett.* 10, xli-xlvii.

Pitchai, A., Rajaretinam, R.K., Freeman, J.L., 2019. Zebrafish as an Emerging Model for Bioassay-Guided Natural Product Drug Discovery for Neurological Disorders. *Medicines (Basel)*. 6(2), 61.

Raclariu, A.C., Heinrich, M., Ichim, M.C., Boer, H. de, 2017. Benefits and limitations of DNA Barcoding and Metabarcoding in herbal product authentication. *Phytochem. Anal.* 29, 123-128.

Ragupathy, S. et al., 2015. Assessing Product Adulteration in Natural Health Products for Laxative Yielding Plants, Cassia, Senna, and Chamaecrista, in Southern India Using DNA Barcoding. *Int. J. Legal Med.* 129 (4), 693-700.Rask-Andersen, M., Almen, M.S., Schioth, H.B., 2011. Trends in the exploitation of novel *drug targets*. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 579–590.

Raharjo, T.J., Widjaja, I., Roytrakul, S., Verpoorte, R. 2004. Comparative proteomics of Cannabis sativa plant tissues. *J. Biomol. Tech.* 15, 97-106.

Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.* 6, 1720–1731.

Reed, J.W., Hudlicky, T., 2015. The quest for a practical synthesis of morphine alkaloids and their derivatives by chemoenzymatic methods. *Acc. Chem. Res.* 48, 674–687.

Robertson, A.L., Holmes, G.R., Bojarczuk, A.N., Burgon, J., Loynes, C.A., Chimen, M., et al., 2014. A zebrafish compound screen reveals modulation of neutrophil reverse migration as an anti-inflammatory mechanism. *Sci. Transl. Med.* 6, 225-229.

Robinson, S.J., Tenney, K., Yee, D.F., Martinez, L., Media, J.E., Valeriote, F.A., et al., 2007. Probing the bioactive constituents from chemotypes of the sponge *Psammocinia* *Aff. bulbosa*. *J. Nat. Prod.* 70, 1002-1009.

Sahu, J., Sahu, R.K., 2013. A review on low cost methods for *in vitro* micropropagation of plant through tissue culture technique. *UK J. Pharm. Biosci.* 1, 38-41.

Sarasan, V., Kite, G.C., Sileshi, G.W., Stevenson, P.C., 2011. Applications of phytochemical and *in vitro* techniques for reducing over-harvesting of medicinal and pesticidal plants and generating income for the rural poor. *Plant Cell Rep.* 30, 1163-1172.

Sasiela, C.A., Stewart, D.H., Kitagaki, J., Safiran, Y.J., Yang, Y., Weissman, A.M., et al., 2008. Identification of inhibitors for MDM2 ubiquitin ligase activity from natural product extracts by a novel high-throughput electrochemiluminescent screen. *J. Biomol. Screen.* 13, 229-237.

Saslis-Lagoudakis, C.H., Klitgaard, B.B., Forest, F., Francis, L., Savolainen, V., Williamson, E.M., et al., 2011. The use of phylogeny to interpret cross-cultural patterns in plant use and guide medicinal plant discovery: an example from *Pterocarpus* (Leguminosae). *PLoS One* 6, e22275.

Saslis-Lagoudakis, C.H., Savolainen, V., Williamson, E.M., Forest, F., Wagstaff, S.J., Baral, S.R., et al., 2012. Phylogenies reveal predictive power of traditional medicine in bioprospecting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 15835–15840.

Seethapathy, G.S., Ganesh, D., Kumar, J.U.S., Senthilkumar, U., Newmaster, S.G., Scannell, J.W., Blanckley, A., Boldon, H., Warrington, B., 2012. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 191–200.

Schenone, M., Dancik, V., Wagner, B.K., Clemons, P.A., 2013. Target identification and mechanism of action in chemical biology and drug discovery. *Nat. Chem. Biol.* 9, 232–240.

Schiff, P.B., Horwitz, S.B., 1980. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 1561–1565.

Schippmann, U., Leaman, D., Cunningham, A.B., 2006. A comparison of cultivation and wild collection of medicinal and aromatic plants under sustainability aspects. In: Bogers, R.J., Cle, Lange, D. (Eds.), *Medicinal and Aromatic Plants: Agricultural, Commercial, Ecological, Legal, Pharmacological and Social Aspects*. Springer, Dordrecht, pp. 75–95.

Schuster, D., Laggner, C., Langer, T., 2005. Why drugs fail.- a study on side effects in new chemical entities. *Curr. Pharm. Des.* 11, 3545–3559.

Sertürner, F.W., 1817. Über das Morphinum, eine neue salzfähige Grundlage, und die Mekonsäure, als Hauptbestandteile des Opiums. *Ann. Phys.* 25, 56–90.

Siahsar, B., Rahimi, M., Tavassoli, A., Raissi, A., 2011. Application of biotechnology in production of medicinal plants. *Am. Eur. J. Agric. Environ. Sci.* 11, 439–444.

Siddiqui, M.S., Thodey, K., Trenchard, I., Smolke, C.D., 2012. Advancing secondary metabolite biosynthesis in yeast with synthetic biology tools. *FEMS Yeast Res.* 12, 144–170.

Sneader, W., 2005. *Drug Discovery: A History*. Wiley.

Temml, V., Kuehnl, S., Schuster, D., Schwaiger, S., Stuppner, H., Fuchs, D., 2013. Interaction of *Carthamus tinctorius* lignan arctigenin with the binding site of tryptophan- degrading enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase. *FEBS Open Bio.* 3, 450–452.

Unschuld, P.U., 1986. *Medicine in China: A History of Pharmaceutics.* University of California Press.

Verpoorte, R., 2000. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnol- ogy. *J. Pharm. Pharmacol.* 52, 253–262.

Wallace, L., Boilard, S.M.A., Eagle, S.H.C., 2012. DNA barcodes for everyday life: Routine authentication of Natural Health Products. *Food Res. Int.* 49(1):446-452

Wang, T., Wei, J.J., Sabatini, D.M., Lander, E.S., 2014c. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 343, 80-84.

Wang, L., Yu, C., Wang, J., 2020. Development of reporter gene assays to determine the bioactivity of biopharmaceuticals. *Biotechnol Adv.* 39:107466.

Wang, R., Zhao, S., Wang, Z., Koffas, M.A. 2020b. Recent advances in modular co-culture engineering for synthesis of natural products. *Curr. Opin. Biotechnol.* 62, 65-71.

Wilson, B.A.P., Thornburg, C.C., Henrich, C.J., Grkovic, T., O’Keefe, B.R., 2020 Creating and screening natural product libraries. *Nat. Prod. Rep.* 37(7), 893-918.

Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., McPhail, A.T., 1971. Plant antitumor agents.VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2325–2327.

Waszkowycz, B., Clark, D.E., Gancia, E., 2011. Outstanding challenges in protein-ligand docking and structure-based virtual screening. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 1, 229–259.

Waters, A.L., Peraud, O., Kasanah, N., Sims, J.W., Kothalawala, N., Anderson, M.A., 2014. An analysis of the sponge *Acanthostrongylophora igens*' microbiome yields an actinomycete that produces the natural product manzamine A. *Front. Mar. Sci.* 1, 54-49.

White, N.J., 2008. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science* 320, 330–334.

WHO, 2003. WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP).

Wolfender, J.L., Litaudon, M., Touboul, D., Ferreira Queiroz, E. 2019. Innovative omics-based approaches for prioritisation and targeted isolation of natural products - new strategies for drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 36, 855-568

Wood, A.J., Lo, T.W., Zeitler, B., Pickle, C.S., Ralston, E.J., Lee, A.H., et al., 2011. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science* 333, 307-310.

Yun, U.W., Yan, Z., Amir, R., Hong, S., Jin, Y.W., Lee, E.K., et al., 2012. Plant natural products: history, limitations and the potential of cambial meristematic cells. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 28, 47-59.

Zhang, L., Li, X., Zheng, W., Fu, Z., Li, W., Ma, L., et al., 2013. Proteomics analysis of UV-irradiated *Lonicera japonica* Thunb. with bioactive metabolites enhancement. *Proteomics* 13, 3508–3522.

Zhang, L., Zhu, W., Zhang, Y., Yang, B., Fu, Z., Li, X., Tian, J. 2014. Proteomics analysis of *Mahonia bealei* leaves with induction of alkaloids via combinatorial peptide ligand libraries. *J. Proteom.* 110, 59–71.

Zheng, W., Thorne, N., McKew, J.C., 2013. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. *Drug Discov. Today* 18, 1067-1073.

Ziegler, S., Pries, V., Hedberg, C., Waldmann, H., 2013. Target identification for small bioactive molecules: finding the needle in the haystack. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 52, 2744-2792.



**CONTESTACIÓN DEL  
EXCMO. SR. D. ÁNGEL M. VILLAR DEL FRESNO**



Excmo. Sr. Presidente,  
Excmas. y Excmos. Señoras y Señores Académicos,  
Señoras y Señores:

Como miembro de esta Real Academia Nacional de Farmacia del Instituto de España, me cabe el honor y el privilegio, otorgado por la Junta de Gobierno de esta Institución, de ser su portavoz en el solemne acto que hoy celebramos y, por ello, de contestar al discurso de ingreso como Académica de Número de la Dra. Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado, catedrática de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. Es un encargo que me satisface profundamente y agradezco, ya que me permite resaltar ante ustedes los méritos que la avalan y relatar brevemente aquellos aspectos más relevantes de la trayectoria vital y científica de una entrañable discípula en los quehaceres de la investigación y la docencia, que gozó de toda mi confianza durante el periodo que coincidimos en el Departamento, fue Secretaria cuando yo era Director, aunque los logros académicos y científicos de la Dra. Gómez-Serranillos son de sobra conocidos por todos ustedes.

En esta mi intervención debo, es la tradición, trazar el perfil biográfico del beneficiario y comentar el contenido de su interesante discurso. Puesto que para ambas cosas hay extensa materia, la mayor dificultad será ajustar al tiempo que la prudencia aconseja en estos casos.

## **Trayectoria Vital**

La Dra. Gómez-Serranillos nació en 1960 en Talavera de la Reina (Toledo), de raíces también toledanas, donde pasó parte de su infancia y primera juventud. Cursó el bachillerato en el Colegio Compañía de María, con una actitud responsable ante su propio aprendizaje y respeto hacia sí misma y hacia los demás y donde, junto con sus padres, la enseñaron a crear hábitos de reflexión e inquietud por el saber, además de cultivar la iniciativa y la creatividad.

De padre médico, se decantó por cursar los estudios de Farmacia, que concluyó brillantemente en 1985, año en el que también contrajo matrimonio con el que hoy sigue siendo su marido, compañero de viaje y cómplice perfecto, D. Marcial Sánchez Muñoz, de profesión abogado y que ha sido un apoyo en el desarrollo de su carrera científica, docente y profesional. Junto a él ha formado una maravillosa familia con dos hijas, Raquel y Marta, ambas, una abogada y otra farmacéutica, han seguido en la vida el ejemplo laborioso de sus progenitores. Tiene ya un yerno, Laurent, y también una pequeña nieta, Alicia, con la que le encanta ejercer de abuela. Para Pilar su familia es, valga la redundancia, el pilar fundamental de su vida.

Nada más finalizar la carrera, se incorpora al Departamento de Farmacognosia, después se denominaría de Farmacología (Farmacognosia y Farmacología Experimental) y actualmente de Farmacología, Farmacognosia y Botánica, donde realiza la tesina y tesis doctoral bajo la dirección de una excelente maestra, la Dra. Emilia Carretero y posteriormente la tesis doctoral, dirigida por mí con la codirección de la Dra. Carretero.

Pilar es una persona muy discreta y familiar, sincera, leal, amiga de sus amigos, amante de la vida, que disfruta realizando viajes en familia por cualquier rincón de España y del extranjero. Cabe destacar en ella su elevada capacidad de trabajo, permanece horas y horas sin descanso, para enojo muchas veces de su familia. Pero además tiene un gran sentido del humor, educado y a la vez sofisticado, influenciado por el pensamiento científico.

## **Trayectoria científica y docente**

La Dra. Gómez-Serranillos es catedrático de Farmacología en la Facultad de Farmacia desde Julio de 2018 y Académica correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia desde el 2011. Pertenece a la Unidad Docente de Farmacología y Farmacognosia que actualmente forma parte de un Departamento intra-facultativo con la Unidad docente de Botánica, el Departamento de Farmacología, Farmacognosia y Botánica de la UCM, universidad en la que ininterrumpidamente ha ejercido su labor docente e investigadora.

Su trayectoria se desarrolla durante más de 30 años en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la UCM. Desempeñó todos los puestos docentes que contempla la carrera universitaria, iniciada en 1986, nada más terminar su licenciatura: desde becario de investigación, profesor ayudante, profesor asociado, profesor Titular de Universidad y catedrático de universidad. En todos los casos la dedicación ha sido a tiempo completo y con una elevada carga docente, habiendo asumido la coordinación de las asignaturas impartidas e impartiendo docencia en asignaturas troncales y obligatorias de los distintos planes de estudio y ha desarrollado una importante labor docente en Programas de Posgrado, Máster y Doctorado, así como en Programas de Formación continua tanto Universitaria a nivel nacional e internacional como por demanda externa especializada. En estos años de docencia ininterrumpida, la Dra. Gómez-Serranillos ha impartido 14 asignaturas entre licenciatura, grado, postgrado, máster y doctorado, siempre compaginando la labor docente con la investigadora, pues no concibe la docencia separada de la investigación.

Ha sido, además, coordinadora del Máster Interuniversitario e Internacional en Fitoterapia, impartido por las Universidades de Trieste, Cagliari y Complutense.

Como docente, participa también en el Programa de Movilidad Docente “Erasmus Teaching Mobility Programme”, habiéndose desplazado a otras Universidades Europeas para impartir docencia.

Esta capacidad docente e investigadora se refleja también en la dirección de tesis doctorales, un total de 20 dirigidas y defendidas (tres de ellas premio extraordinario), y 5 en dirección en el momento actual, habiendo dirigido a doctorandos de otros países y continentes. A ello se añade la dirección de 34 Trabajos fin de Máster, DEAS y tesinas y 30 Trabajos Fin de Grado. Además de más de 20 trabajos de alumnos de pregrado en ciencias de la salud.

La Dra. Gómez-Serranillos es una gran docente, querida por los alumnos, como queda reflejado en los excelentes resultados de evaluación docente que logra año tras año, tanto del programa DOCENTIA como de evaluaciones emitidas por otros organismos oficiales, y por el hecho de

que es reclamada permanentemente por los alumnos para ejercer como tutora, destacando su función en Tutoría de Becas de excelencia académica de la Comunidad Autónoma de Madrid y becas de colaboración, labor que se extiende a nivel internacional como Tutora de alumnos del Programa “Erasmus Student Mobility”.

La inquietud en el ámbito docente la ha llevado a participar de forma activa en Proyectos de Innovación Docente (un total de 15) así como en programas de formación para la docencia universitaria como ponente y/o asistente en congresos y cursos orientados a la formación docente universitaria. Ha desarrollado un elevado número de materiales docentes y Material multimedia para la docencia: Guías docentes y de prácticas de las asignaturas Farmacognosia I y Farmacognosia II; Programas Modulares de la Universidad Nacional de Educación a distancia, así como Creación de espacios en el Campus Virtual con Materiales y recursos específicos para la docencia y evaluación.

Convencida de la necesidad de adaptar la educación superior a los nuevos tiempos tecnológicos, es gran defensora del Espacio Europeo de Educación Superior desde su origen, prueba de ello son las numerosas publicaciones (42) en editoriales de revistas de prestigio y la elaboración de material docente original, tanto en formato electrónico como en papel, muchas de ellas orientadas a la transformación de la Farmacognosia y la Farmacología a la enseñanza en el entorno europeo de Educación Superior. Como ejemplo cabe mencionar: Aplicación de las nuevas tecnologías a la enseñanza práctica de la Farmacología (2007); Desarrollo de Materiales docentes para el aprendizaje activo de Farmacognosia en el marco EEES (2008); Materiales y recursos específicos en la docencia de Farmacognosia II acorde al EEES (2009), Diseño y desarrollo de materiales para la evaluación formativa de aprendizajes y competencias en Farmacognosia en el marco del EEES (2010).

Es miembro de la red de Expertos de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, y del grupo de expertos del Ministerio de Sanidad, colaborando además activamente en la elaboración de estudios o informes como experto fármaco-toxicológico para la empresa farmacéutica.

## Actividad investigadora

Resumir el *curriculum* investigador de la Dra. Gómez-Serranillos no es tarea fácil, su producción científica ha sido entusiasta y constante desde el inicio de su carrera, incrementándose notablemente en los 15 últimos años; sus publicaciones científicas alcanzan 130 en revistas internacionales indexadas, referentes en el ámbito de conocimiento de los productos naturales. Ha sido autora o coautora de 37 capítulos de libros con editoriales de reconocido prestigio científico y casi 200 comunicaciones a congresos.

Una de las características indicadora de su investigación es que siempre ha estado a la vanguardia de la investigación en productos naturales.

Es directora del grupo de investigación UCM, “Farmacología de productos naturales” desde 2008. Sus líneas de trabajo actuales se han encaminado a la búsqueda de compuestos naturales con actividad neuroprotectora en plantas superiores y líquenes, utilizando modelos experimentales tanto in vivo como in vitro, con objeto de determinar su efecto a nivel molecular y celular. Los resultados más relevantes se refieren a compuestos que potencian los sistemas antioxidantes endógenos, habiendo estudiado las vías de activación y su capacidad de paso de Barrera Hematoencefálica. Además, realiza trabajos enfocados al estudio de la composición química de especies vegetales con interés farmacológico. Sus trabajos han sido publicados en revistas de referencia y de máximo prestigio en su categoría y de la especialidad (Farmacognosia) como son *Phytochemistry*, *Planta Medica*, *Journal of Ethnopharmacology*, *Biomolecules* o *Journal of Chromatography A*.

Entre los libros cabe destacar *Neuroprotective Natural Products. Clinical Aspects and Modes of Action – An Overview; Frontiers in CNS Drug Discovery*, y *Manual de Fitoterapia* que, tiene el mérito de ser el primer manual en español con información concreta sobre plantas medicinales orientado específicamente al profesional sanitario.

Ha participado en más de 30 proyectos competitivos y contratos de investigación tanto en convocatorias del Plan Nacional como de organismos públicos y de innovación tecnológica con Industrias Farmacéuticas de primer orden en el ámbito farmacéutico general y de los productos farmacéu-

ticos de origen natural en particular, así como con Instituciones Públicas. Estos proyectos han facilitado la generación, transferencia de tecnología métodos de estudio farmacológico en la aplicación del conocimiento entre la Universidad y el sector privado productivo.

Como fruto de esta investigación ha recibido numerosos Premios, entre otros de la Real Academia Nacional de Farmacia.

El rigor y la productividad científica de la Dra. Gómez-Serranillos queda patente en otras facetas, como la actividad evaluadora de publicaciones para revistas científicas internacionales, incluidas las más prestigiosas en Farmacognosia y Farmacología, Pertenece a varios consejos editoriales de revistas indexadas, como *Frontiers in Pharmacology of Natural Products* y *Mediterranean Botany* y es, además, evaluadora de proyectos de investigación para diversos organismos oficiales en España y otros países.

Consecuencia de esta actividad investigadora, es el haber participado como profesor invitado en numerosos Cursos, Seminarios, Jornadas o Conferencias por demanda externa especializada, relacionados con su perfil docente/investigador, a instancia de diversos organismos públicos y privados, entre los que podemos mencionar, como ejemplo, el Instituto Nacional de Investigaciones y Tecnología Agraria y Alimentaria-INIA-, Consejerías Autonómicas de Sanidad, la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), la Fundación Biodiversidad y Fondo social Europeo, la Escuela Nacional de Sanidad y diversos Colegios Oficiales de Farmacéuticos.

Mantiene relación con grupos y centros de investigación internacionales punteros en el estudio de productos provenientes de plantas, relación iniciada habitualmente como consecuencia de la estancia en el Departamento de doctorandos, postdoctorandos o profesores visitantes de dichos países y que se ha ido incrementando con el tiempo, entre ellos, el Senckenberg Biodiveristy and Climate Research Centre (Bik-F) (Frankfurt, Alemania), en el grupo de investigación de Adaptación y Clima; en Reino Unido (King's College de Londres dentro del grupo de investigación de Barrera Hematoencefálica) y el Centro de Neurociencia y Biología Celular de Coimbra (Portugal) en el grupo de Mecanismos Moleculares de la Enfermedad, además del National research Centre (El Cairo). Actividad que la profesora ha logrado mantener e incluso incrementar a pesar de la crisis.

## **Experiencia en Gestión y Administración**

La Dra. Gómez-Serranillos posee además una amplia experiencia en Gestión y Administración educativa, científica y tecnológica.

Ha desempeñado y desempeña cargos unipersonales de responsabilidad en gestión universitaria: desde 2014, ha sido Vicedecana de Investigación, Profesorado y Relaciones Internacionales e Institucionales de la Facultad de Farmacia de la UCM, actualmente es Vicedecana de Ordenación académica, profesorado y RR. Institucionales de la misma Facultad, habiendo sido anteriormente Secretaria del Departamento de Farmacología. Es Miembro electo de Órganos Colegiados de la UCM (Claustro y Junta de Facultad) por el sector de Profesores Doctores con vinculación permanente (PDI) desde hace años.

La Dra. Gómez-Serranillos mantiene un alto compromiso con la gestión Universitaria. Desempeña cargos en la Organización-gestión universitaria de organismos autonómicos, presidiendo y/o formando parte de Comisiones y Comités técnicos responsables de la evaluación, la acreditación y la certificación de la calidad en el ámbito universitario en diversas Agencias Autonómicas oficiales, nacionales e internacionales, de la enseñanza superior como la Agencia de calidad del sistema universitario vasco (UNIBASQ); Agencia de calidad y prospectiva Universitaria de Aragón (ACPUA); Agencia Canaria de Calidad Universitaria y Evaluación Educativa (ACCUEE); Agencia de Evaluación de la calidad del sistema universitario Madrileño. (Fundación para el conocimiento Madri+d); Agencia para la Calidad del sistema universitario de Cataluña (AQU Catalunya) y también internacionales, como la Universidad de Andorra.

Es experto Evaluador de Proyectos en Agencias Nacionales Europeas (Polonia National Science Centre; French National Research Agency) y Experto científico en la Comisión Europea. (Expert in the Seventh Research Framework Programme. European Commission).

Se puede deducir, finalmente, que la Trayectoria científica y docente de Pilar presenta una elevada coherencia, manteniéndose toda ella en el ámbito de la Farmacología de productos naturales o Farmacognosia y apre-

ciándose un importante equilibrio entre la labor docente, investigadora y de gestión en el contexto específico en que se ha desarrollado la carrera profesional de la nueva académica.

## **Contestación al discurso**

En su discurso de ingreso, la Dra. Gómez-Serranillos, nos ha mostrado su amplia experiencia y conocimiento en una ciencia farmacológica que estudia las materias primas naturales de uso medicinal, la Farmacognosia, dando, a mi juicio, una opinión certera de cuál va a ser su desarrollo y evolución futura. En definitiva, su contribución al desarrollo de la Farmacología.

En primer lugar, ha hecho un intenso y completo recorrido histórico por la Farmacognosia desde el empirismo hasta llegar al momento actual en el que la Farmacognosia estudia la droga en sus diversos apartados, comenzando por su procedencia biológica y origen geográfico, condiciones de cultivo, características macro y micro morfológicas, composición química y actividad farmacológica, de la que se deriva su uso terapéutico. Y lo hace en un momento en el que el impacto económico y social de los productos naturales para el descubrimiento de fármacos sigue siendo muy alto.

Posteriormente nos introduce en los distintos aspectos de la investigación y desarrollo de fármacos basados en productos naturales; menciona en primer lugar los retos a los que los científicos se enfrentan para la obtención de compuestos bioactivos a partir de especies vegetales, abordando cuestiones relacionadas con la recolección de las especies silvestres, y la necesidad, por una parte de proteger los hábitats de las plantas para evitar que desaparezcan por la presión antrópica, y, por otra, del necesario control de la variabilidad de la composición química, que depende, entre otros factores, del estadio de crecimiento del vegetal, lo que limita el tiempo para la recolección.

En el caso del material vegetal importado, existen cuestiones adicionales que pueden afectar a su accesibilidad, por ejemplo, factores sociopolíticos, catástrofes naturales o cambios en la normativa legal sobre exportación.

Ha mencionado también los factores que influyen positivamente en la búsqueda de nuevos medicamentos de origen vegetal; el primero de ellos es consecuencia de que los productos naturales se elaboran a partir de organismos vivos y, por lo tanto, poseen propiedades que están optimizadas evolutivamente para ejercer diferentes funciones biológicas, por ejemplo, la unión a proteínas diana específicas u otras biomoléculas, además de la complejidad estructural desarrollada durante la biosíntesis de estos compuestos que hace que, a menudo, tienen propiedades ADME/T más favorables.

El renovado interés científico en el descubrimiento de medicamentos de origen vegetal es simultáneo a los importantes avances científicos y tecnológicos logrados en este campo, entre ellos, una mejor comprensión de la enfermedad y sus causas subyacentes, el número cada vez mayor de dianas disponibles, los avances en las técnicas analíticas, las posibilidades de modificaciones estructurales de compuestos de origen natural y también el incrementado interés por la salud natural y la validación de medicamentos tradicionales.

Posteriormente, aborda las tecnologías “ómicas” en la investigación de compuestos activos en plantas, introduciéndonos en la Genómica, Metabolómica y Proteómica como herramientas en el estudio de productos naturales.

En cuanto a la Genómica, dado que muy a menudo las plantas se recolectan directamente de su hábitat natural, la identificación y la nomenclatura correcta son esenciales y la base de todos los pasos siguientes. Para una identificación inequívoca, además de la caracterización morfológica y anatómica, será necesario combinar diferentes métodos, como el análisis genético y el químico. Las continuas modificaciones, que se mantienen en curso sobre la taxonomía de las plantas, así como las cuestiones de sinonimia, se suman a la dificultad de esta tarea. Además, son tareas que no pueden automatizarse y necesitan especialistas, que cada vez son más raros.

Los exámenes macroscópicos y microscópicos de los rasgos morfológicos son los medios clásicos para verificar la identidad de las plantas enteras frescas, así como de partes u órganos. En la mayoría de los casos, estas técnicas también pueden aplicarse al material vegetal seco o procesado. Sin embargo, en muchas circunstancias, estos exámenes no serán

aplicables cuando una preparación consista en multicomponentes procesados más allá de la posibilidad de identificarlos morfológicamente. En estos casos, el uso de técnicas alternativas se hace necesario para identificar y autenticar esas muestras complejas, de forma que la toma de huellas genéticas y la elaboración de perfiles están desarrollándose rápidamente, son enfoques actualizados para la identificación botánica. La utilización de técnicas basadas en el ADN para identificar organismos comparando una pequeña porción de su secuencia de ADN con una secuencia conocida se emplea con éxito en otros campos, entre ellos, los estudios de la diversidad biológica, la autenticidad de los alimentos y la vigilancia del comercio ilegal de animales y productos

Actualmente la Farmacognosia utiliza métodos genómicos basados en ADN, técnica utilizada tanto por la comunidad científica como por la industria para la identificación molecular, con el fin de resolver cuestiones relacionadas con taxonomía, la filogenia molecular, la genética de poblaciones y la biogeografía, así como para evitar la recolección y el comercio ilegal de la fauna y flora silvestres. Son métodos que también tienen limitaciones, pues, aunque pueden proporcionar una autenticación positiva de las especies vegetales basada en la presencia de cualquier ADN amplificable, puede haber falsos negativos si el ADN se ha degradado o perdido durante el procesado posterior a la cosecha. Además, altas concentraciones de ciertos metabolitos secundarios, como polisacáridos, aceites esenciales, compuestos fenólicos, entre ellos los taninos, o alcaloides pueden interferir en la extracción de ADN o la PCR.

Por lo tanto, la Genómica puede ser de gran utilidad en los complejos procesos de identificación de un material siempre difícil y se tiende a utilizar el DNA como verdadero código de barras de identificación, para lo que será necesario construir verdaderas bases de datos que incluyan esta información. Son técnicas de futuro que serán empleadas tanto por la comunidad científica como por la industria para la identificación molecular.

Hace mención de la Metabolómica que puede ser de gran ayuda para el conocimiento de los metabolitos secundarios que con sus estructuras pueden ser de posible utilidad en la búsqueda de nuevas moléculas con interés farmacológico y terapéutico.

Al mismo tiempo la Proteómica puede ser un arma importante para la validación e identificación de biomarcadores.

En la última parte de su discurso, la Dra. G-serranillos aborda un aspecto tan importante como lo es la obtención de compuestos de origen natural farmacológicamente activos mediante el empleo de métodos biotecnológicos y síntesis química. Así, el reabastecimiento de los productos naturales mediante la aplicación de biotecnología, la semisíntesis a partir de precursores aislados o la síntesis química total son los más empleados.

Nos habla por ultimo de la producción heteróloga y la síntesis orgánica, con ejemplos relevantes de importantes compuestos de origen vegetal con interés terapéutico que se han logrado sintetizar, como artemisinina, cannabidiol, capsaicina, colchicina, ingenol, homoharringtonina, paclitaxel, etc.

Ha dado una amplia visión de las bases científicas para el conocimiento integral de plantas medicinales a través del trabajo multidisciplinario en Farmacología, Fitoquímica, Tecnología Farmacéutica y Biotecnología. La profesora G-Serranillos en su disertación ha profundizado sobre estos temas de indudable futuro.

Asimismo, en su visión de futuro es muy positivo su acercamiento a la Biotecnología farmacéutica y a la síntesis química en la obtención de compuestos naturales, en la que podríamos denominar una verdadera integración de las Ciencias Farmacéuticas.

Enhorabuena Académica Gómez-Serranillos por su magnífico trabajo y espléndida disertación.

Excma. Sra. D<sup>a</sup> M. Pilar Gómez-Serranillos Cuadrado, felicidades, enhorabuena y bienvenida a nuestra Corporación.





