

Obtención de Cultivos de Células Vegetales *in vitro* de *Thevetia neriifolia* Juss. y Presencia de Compuestos Cardiotónicos *

Ana Maria DANTAS BARROS **, ¹ y Anne JACQUIN-DUBREUIL ²

¹ Laboratorio de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia,

Univ. Federal de Minas Gerais, Avenida Olegario Maciel 2360, Belo Horizonte, MG, Brasil.

² Laboratoire de Pharmacognosie et Phytotechnologie, Faculté de Pharmacie, Amiens, France.

RESUMEN. Seis nuevos cultivos de células vegetales *in vitro* fueron obtenidos a partir de la especie *Thevetia neriifolia* Juss. bajo diversas condiciones de cultivo. Se comprobó que estos cultivos fueron capaces de sintetizar compuestos cardiotónicos aún después de dos años de subcultivo. Las concentraciones de estos compuestos variaron de acuerdo con el origen de los explantos y siempre fueron inferiores a los valores verificados en las semillas de la planta de origen. Un estudio cinético de la presencia de estos compuestos durante un ciclo de cultivo demostró ser variable y diferente para cada uno de los cultivos en suspensión.

SUMMARY. "Obtention of *in vitro* Cultures of Plant Cells from *Thevetia neriifolia* Juss. and Presence of Cardenolides". Six cell suspension cultures established from different organs of *Thevetia neriifolia* were initiated under various growth conditions. Even after two years of subculture, cardenolides proved to be present in all the strains. The cardenolide content varied from one strain to another according to the nature of the original explant and was always lower in comparison with that of the seeds of the original plant. Kinetic studies showed that the cardenolide content varied over a complete culture cycle.

INTRODUCCION

La idea de cultivar células vegetales *in vitro* fue propuesta inicialmente por Haberlandt ¹ en 1902, pero recién en 1954 Muir *et al.* ² demostraron la posibilidad de cultivar células vegetales en suspensión. Es apenas a partir de 1975, a partir de los trabajos de Zenk ³, que se constató por primera vez que células cultivadas *in vitro* eran capaces de biosintetizar metabolitos secundarios.

Un cultivo celular se establece aleatoriamente y de esta forma pueden obtenerse, a partir de un "explanto", numerosas fuentes celulares, cada una con un fe-

PALABRAS CLAVE: *Thevetia neriifolia*, Cultivo celular vegetal, Cardiotónicos.

KEY WORDS: *Thevetia neriifolia*, Plant cell culture, Cardenolides.

* Trabajo presentado en el Primer Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana y II Congreso de Ciencias Farmacéuticas del Cono Sur, Montevideo, Uruguay, 4 al 7 de noviembre de 1993

** Autor a quien dirigir la correspondencia

notipo particular ⁴. La variabilidad espontánea que ocurre cuando se establece un cultivo permite esperar una producción de metabolitos secundarios variables en calidad y cantidad. En algún caso, un cultivo puede producir metabolitos secundarios en cantidades superiores a los de la planta de origen, lo que ocurre raramente, o -más frecuentemente- un cultivo no produce o produce muy poco de dichos metabolitos. En otros casos, un cultivo puede producir nuevas moléculas.

En el caso de compuestos cardiotónicos, cultivos de tejidos establecidos a partir de diferentes plantas mostraron apenas trazas o ninguna producción de estos compuestos. En el presente trabajo se establecieron seis nuevos cultivos *in vitro* de células vegetales a partir de diferentes órganos de *Thevetia neritifolia*, denominados Th4, Th5, Th6, Th7, Th12 y Th13, y se estimó el contenido en cardiotónicos durante un ciclo de cultivo, después de dos años de subcultivo de las suspensiones obtenidas.

MATERIALES Y METODOS

Establecimiento de suspensiones

Semillas de *T. neritifolia* coleccionadas en Belo Horizonte fueron esterilizadas con etanol al 70% (v/v) durante un minuto, seguido de una inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 48% (p/v) durante 30 min. Las semillas esterilizadas fueron lavadas con agua destilada y transferidas a tubos de ensayo sobre algodón saturado con agua. Después de 14 días se obtuvieron plántulas de 10 cm de altura. Los callos fueron inducidos a partir de varios fragmentos de plántulas (cotiledones, hojas, raíz y tallo) y cultivados en el medio de cultivo de Gamborg ⁵, suplementado con 4% de sacarosa, ácido naftalenacético (1 mg/l) y benciladenina (1 mg/l), solidificado con agar (0,8%), e incubados a 25 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 horas (2500 erg cm² s⁻¹). Las suspensiones se obtuvieron transfiriendo los callos al mismo medio líquido (sin adicionar agar) e incubadas con agitación mecánica (100 rpm) a 25 ± 2 °C, con subcultivos cada 14 días, adicionando 5 g de células colectadas por filtración del cultivo anterior y transferidas a un frasco conteniendo 100 ml de medio nuevo.

Presencia de cardiotónicos en las suspensiones

Recolección de material

Las seis suspensiones de *T. neritifolia* fueron colectadas entre el 7º y 14º día del ciclo de cultivo. Fueron separadas por filtración a través de malla de nylon en medio de cultivo (M) y células (C) y sometidas de inmediato al procedimiento de extracción descrito a continuación.

Método de extracción

Se empleó el método indicado en *Farmacopea Francesa* 6: las células (50 g) fueron congeladas y homogeneizadas con ayuda de un equipo Sonifer-B-30 en presencia de 100 ml de etanol al 50% (v/v) durante 3 min. El filtrado obtenido, después de purificado con acetato de plomo al 15% y eliminado el exceso de reactivo con fosfato disódico al 4%, fue dividido en dos partes: a) una parte fue sometida a hidrólisis ácida (HCl 15%, 80 °C, 1 h) y en seguida extraída con dicloro-

metano; b) la otra parte fue extraída directamente con diclorometano y luego con acetato de etilo. Los medios de cultivo, después de diluirlos con igual volumen de etanol, fueron sometidos a los mismos procedimientos de extracción y purificación.

Método de detección de compuestos cardiotónicos

Los extractos así purificados y un extracto equivalente de semillas de *T. nertifolia* fueron sometidos a cromatografía en capa fina en cromatoplasmas de sílica-gel (Merck 60 F₂₅₄), utilizando dos sistemas de solventes: a) cloroformo-acetona-metanol-agua (64:20:14:2) y b) ciclohexano-acetona-ácido acético (49:49:2). Como reveladores se utilizaron el reactivo de Kedde y cloramina ^{7,8}.

Determinación cuantitativa de cardiotónicos y estudio cinético

Las suspensiones fueron colectadas en los días 3^o, 6^o, 9^o, 12^o y 14^o del ciclo de cultivo durante el estudio cuantitativo y cinético de producción de cardiotónicos.

Los compuestos cardiotónicos fueron determinados en las células y en el medio de cultivo por el método colorimétrico, utilizando el reactivo de Kedde (*Farmacopea Francesa*, 1982). La absorción fue medida con el auxilio de un espectofotómetro Uvikon 930 a 540 nm, 5 min después de la adición de hidróxido de potasio. La concentración en cardiotónico fue estimada en equivalentes de digitoxigenina (curva patrón: 0,05-0,20 mg/ml).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los cultivos obtenidos fueron iniciados a partir de cotiledones, hojas y fragmentos de ápices de plántulas de *Thevetia nertifolia*. Para la inducción de los callos, cada fragmento fue cultivado en varios medios de cultivo, incluyendo distintas combinaciones hormonales y diferentes concentraciones, en condiciones de iluminación variadas. Finalmente, en el medio de cultivo Gamborg, suplementado con 4% de sacarosa, 1 mg/ml de ácido naftalenacético, 1 mg/ml de benciladenina, mantenidos a 25 ± 2 °C, con un fotoperíodo de 16 h, los cultivos se encontraron en óptimas condiciones de crecimiento.

Las células verdes de los callos celulares obtenidas a partir de los cotiledones se mostraron heterogéneas durante los primeros subcultivos, observándose también algunas áreas parduzcas. Estas últimas fueron separadas y dieron origen a Th4, Th5 y Th6, en tanto que Th7 provino de las áreas verdes. Los callos celulares obtenidos a partir de las hojas mostraron color parduzco y dieron origen a Th12 y los callos celulares de ápices a Th13. Estos resultados difieren de los obtenidos por Sen y Data ⁹, cuyas suspensiones de *Thevetia peruviana* fueron obtenidas sólo a partir de cotiledones y utilizando un medio de cultivo conteniendo 40 g/l de sacarosa y 2,5 mg/l de ácido naftalenacético.

Después de pasar los callos celulares a medio líquido se obtuvieron las seis suspensiones mencionadas. Todas presentaron coloraciones blanco-amarillentas después de ser subcultivadas. A los 14 días (esto es, después de un ciclo de cultivo completo) se observó que la biomasa de la suspensión de Th4 y Th6 se incremen-

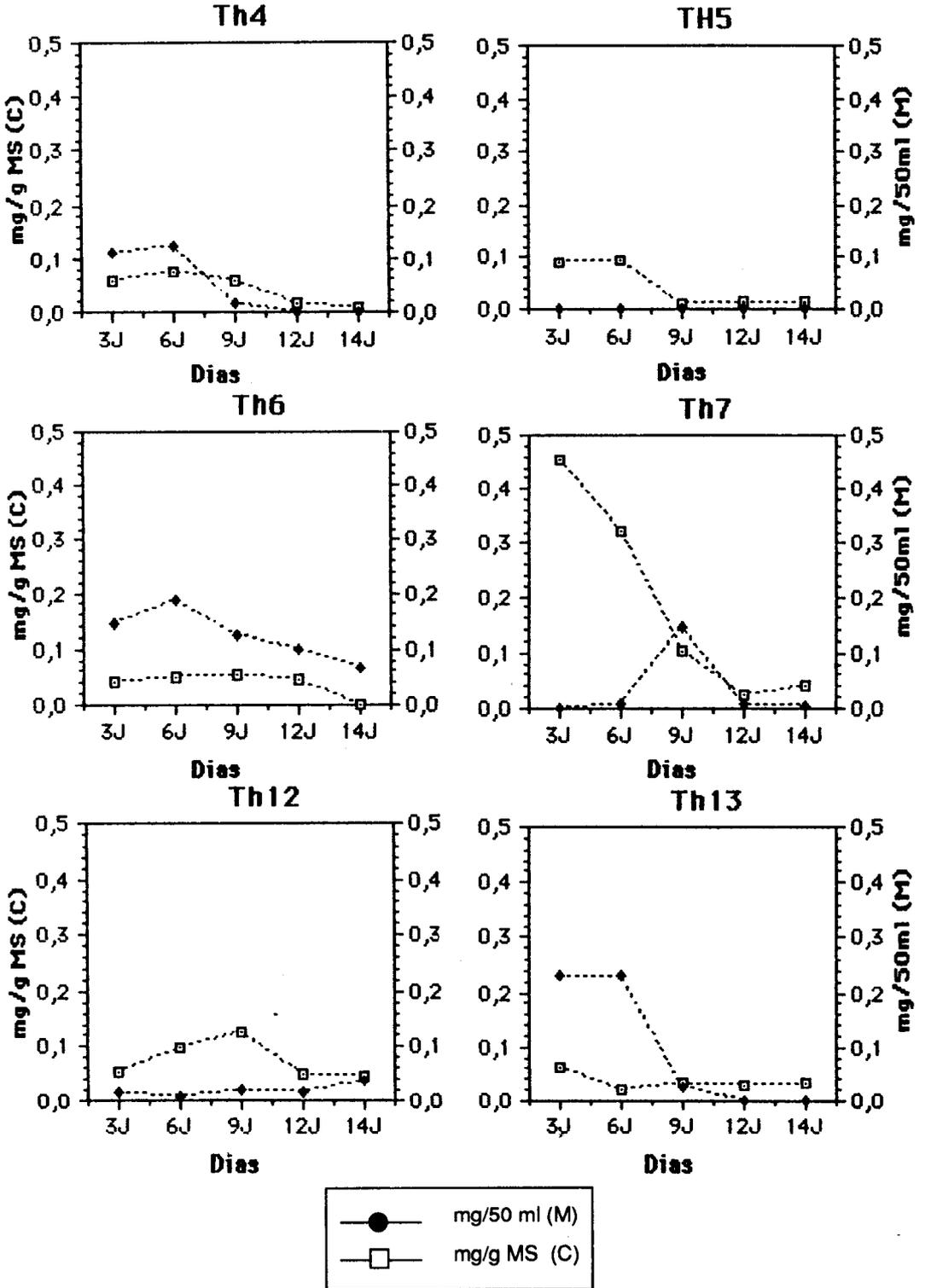


Figura 1. Estudio cinético de la presencia de los compuestos cardiotónicos en diferentes cultivos en suspensión, durante un ciclo de cultivo de 14 días.

taba 4,5 veces en promedio, en tanto que Th5 y Th13 lo hacía 5,5 veces y Th7 6,5 veces.

La presencia de cardiotónicos fue detectada en los medios de cultivo (M) y en las células (C) de las seis suspensiones mencionadas (Th4, Th5, Th6, Th7, Th12 y Th13) por cromatografía en capa fina, con el auxilio de los reveladores indicados. Algunas manchas presentaron los mismos valores de Rf observados en el extracto de semillas. La presencia de cardiotónicos fue variable, dependiendo de la suspensión.

La Figura 1 muestra el estudio cinético durante todo el ciclo de cultivo de las diversas suspensiones. Se observa en todos los casos una variación durante el ciclo y un decaimiento al final. El valor máximo obtenido fue de 0,45 mg/g de materia seca en las células (C) de Th7 en el tercer día de cultivo. El valor máximo en medios de cultivo (M) correspondió a Th13, con 0,23 mg/50 ml, al 6º día de cultivo. Las concentraciones observadas son comparables a las de la literatura para diversas especies vegetales que contienen cardiotónicos: 0,1 mg/g de materia seca para células de tejidos de *Digitalis lanata*¹⁰ y 0,11 mg/g de materia seca para suspensiones embriogénicas de la misma especie¹¹. Por el contrario, resulta excepcional la presencia de cardiotónicos en cultivos celulares de *Thevetia neritifolia* aún después de dos años de subcultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Haberlandt, G. (1902) *Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien* **50**: 151-8
2. Muir, W., A.C. Hilderbrandt y A.J. Ricker (1954) *Science* **119**: 877-8
3. Zenk, M.H., H. El-Shagi y V. Schulte (1975) "Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*", *Planta Med.* Suppl. 79-101
4. Rideau, M. (1988) "Stratégies d'obtention de souches végétales à haute capacité de production de métabolites". Colloque A.P.T.C.- A.P.R.I.A. Bioproduction de métabolites par cultures de cellules végétales. Paris.
5. Gamborg, D.L., R.A. Miller y M. Ojima (1968) *Exptl. Cell Res.* **50**: 151-8
6. Pharmacopée Française (1982) X^e éd., Ministère de la Santé, France
7. Kirchner, J.G (1978) "Thin-layer chromatography", en "*Techniques of chemistry*", vol. XIV (A. Weissbergers, ed.), Berlín, págs. 198-249
8. Wagner, H., S. Bladt y E.M. Zgainski (1984) "*Plant drugs analysis*", Springer-Verlag, Berlín, págs. 205-17
9. Sen, G y P.C. Data (1981) *Planta Med.* **41**: 415-7
10. Lui, J.H.C. y E.J. Staba (1981) *Planta Med.* **41**: 90-5
11. Seide, S. y E. Reinhard (1987) *Planta Med.* **3**: 308-9