

CUANTIFICACION DE TAXOL Y BACCATIN III EN CALLOS DE *Taxus baccata* POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

RESUMEN

Callos de *Taxus baccata* fueron inducidos a partir de segmentos de agujas y tallos en el medio de cultivo TM5 suplementado con diferentes concentraciones de picloram en combinación con ácido giberélico (GA₃) y kinetina. Los segmentos de tallo produjeron callos con tasas de crecimiento más altas que las obtenidas a partir de las agujas. Los mejores medios para la inducción de callos fueron TM5 suplementados con 1 o 6 mg/L de picloram en combinación con 0,1 mg/L de GA₃ y 0,1 mg/L de kinetina respectivamente.

El análisis por HPLC de los extractos metanólicos de los callos determinó que el rango de concentración de Taxol estuvo entre 1,90–8,75 mg/L y el de Baccatin III entre 4,55–18,90 mg/L.

PALABRAS CLAVE: Anticáncer, cultivo *in-vitro*, extracción en fase sólida, productos naturales, taxanos.

ABSTRACT

Callus of Taxus baccata were induced from needles and stem explants in the culture media TM5 supplemented with different picloram concentrations in combination with GA₃ and kinetin. Stem segments gave the highest growth rate than those obtained from the needles. The best media for callus induction were the TM5 with 1 mg/L or 6 mg/L of picloram, plus 0.1 mg/L of GA₃ and 0.1 mg/L of kinetin, respectively.

The HPLC analysis of the different callus methanolic extracts showed a concentration range between 1.90–8.75 mg/L for Taxol and between 4.55–18.9 mg/L for Baccatin III.

KEYWORDS: Anticancer, culture *in-vitro*, natural products, solid phase extraction, taxanes,

1. Introducción

Los constituyentes fitoquímicos de diferentes especies de *Taxus* han sido estudiados durante varias décadas y se han encontrado fitocompuestos como: taxano-alcaloides, diterpenos con esqueleto taxano, lignanos, biflavonoides, esteroides y diterpenos con esqueleto del tropano. Entre ellos los taxanos antitumorales y diterpenos antineoplásicos han generado gran interés farmacológico, [1, 2]. Destacándose el diterpeno tetracíclico altamente funcionalizado denominado Taxol aislado por Wani *et al.* del *Taxus brevifolia* Nutt. [3, 4]

Paclitaxel y otros diterpenos relacionados pertenecientes al grupo de los taxoides han sido aislados de diferentes partes de la planta y únicamente en especies de este género (*Taxus baccata*, *T. cuspidata*, *T. canadensis*, *T. wallichiana*, *T. yunnanensis* y *T. x media*) así como de hongos endofíticos asociados con las diferentes

variedades de tejo [5]. Aproximadamente cien taxanos de diferentes especies de *Taxus* fueron descubiertos antes de 1992 [6] y más de 250 nuevos taxanoditerpenos fueron aislados entre 1992 y 1999 [7].

El Taxol es una de las drogas más efectivas en el tratamiento de cáncer de ovario, mama, pulmón [3] y carcinoma gástrico [8]. El desarrollo del Taxol como droga ha presentado dificultades, entre las que se destacan los problemas asociados con su extracción y aislamiento. Por lo cual, la producción sintética a partir de fuentes primarias de Taxol y sus análogos, o por medio de cultivo *in-vitro* ha acaparado la atención de muchos investigadores, con el propósito de obtener por estas vías Taxol o compuestos relacionados.

Experimentalmente se han logrado establecer cultivos celulares con buen crecimiento y alta producción de Taxol, utilizando diferentes explantes de *Taxus spp.*, tales como: corteza, semillas, embriones, tallo, agujas, entre

YANED M. CORREA

Química
Profesora Catedrática
Universidad Tecnológica de Pereira
yamico@utp.edu.co

JAIME NIÑO

Lic Bgía-Qca, Ph.D.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de Pereira
janino@utp.edu.co

OSCAR M. MOSQUERA

Químico, M.Sc.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de Pereira
omosquer@utp.edu.co

Grupo de Biotecnología-Productos Naturales

otros y empleando varios medios basales como: Gamborg (B5) [9], Murashige y Skoog (MS) [10], los cuales en algunos casos han sido suplementados con mezclas complejas de vitaminas como las de Kao y Michayluk (KM) [11] y las de Nitsch y Nitsch (NN) [12]. Así se reporta la obtención de callos y suspensiones celulares en *T. canadensis* y *T. cuspidata* [13], callos de *T. baccata* y *T. x media* [14] y suspensiones celulares en *T. baccata* [15, 16, 17], *T. wallichiana* [18] y *T. x media* [19].

2. Materiales y métodos

2.1 Reactivos

Todas las sales empleadas para la preparación de los medios de cultivo fueron grado analítico, marca Merck (Darmstadt, Germany), J.T Baker (Phillipsburg, NJ, USA) o Carlo Erba (Rodano, MI, Italia) y los fitoreguladores de crecimiento así como “*Phytigel*” fueron Sigma (St Louis, MO, USA). Los solventes empleados en el proceso extractivo fueron grado analítico marca Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, USA) y los utilizados en la cuantificación por HPLC fueron UltimAR Mallinckrodt. Los patrones de Taxol y de Baccatin III fueron Sigma. Los cartuchos fueron marca J.T Baker (Bakerbond C₁₈) (Phillipsburg, NJ, USA) y Supelco (Supelclean LC-18) (Bellefonte, PA, USA). Las membranas y filtros fueron Millipore (Billerica, MA, USA).

2.2 Material vegetal

Ramas de *Taxus baccata* fueron recolectadas en Valencia (España). Segmentos de 5 cm de longitud fueron desinfectados al lavarlos durante media hora con 5% de detergente comercial mas 0,5% de Extran® y enjuagadas con abundante agua. Seguidamente, los materiales vegetales se trataron durante cinco minutos con alcohol al 70%, luego se expusieron a Glutarex® durante 12 horas y finalmente se trataron con hipoclorito de sodio al 30% por 30 minutos; después de cada una de las etapas anteriores los materiales se enjuagaron con abundante agua destilada estéril.

2.3 Inducción e iniciación del cultivo de callos

El medio basal empleado para la inducción de callos en este trabajo fue el TM5 reportado por Ketchum *et al.* [13]. Las diferentes combinaciones y concentraciones de los reguladores de crecimiento utilizadas, se presentan en la tabla 1.

Código	Picloram (mg/L)	Kinetina (mg/L)
TM5	0,0	0,0
TM5-1	0,1	0,1
TM5-2	1,0	0,1
TM5-3	2,0	0,1
TM5-4	3,0	0,1
TM5-5	4,0	0,1
TM5-6	6,0	0,1

Tabla 1. Combinaciones y concentraciones de los reguladores de crecimiento empleadas para la inducción de callos de *Taxus baccata*.

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5,5 con HCl 1N o NaOH 1N; como agente gelificante se empleó “*Phytigel*” al 0,3%. Los medios de cultivo se sirvieron en porciones de 12 mL en frascos de 125 mL de capacidad, los cuales fueron tapados con papel aluminio y esterilizados a 121 °C y 15 psi durante 20 min.

Se utilizaron dos tipos diferentes de explantes: segmentos de tallo y agujas (hojas) sembradas por las partes adaxial y abaxial respectivamente; todos los explantes fueron de aproximadamente 5 mm de longitud. Por cada medio se sembraron 72 explantes los cuales se incubaron en la oscuridad a una humedad relativa del 85% y una temperatura de 23 ± 3 °C. Los callos fueron subcultivados con una frecuencia de 30 días.

2.4 Cuantificación de Taxol y Baccatin III

Una alícuota de los callos recolectados se secó en estufa a 50 °C para obtener su peso en base seca. Luego 20 g de callo fresco se extrajeron con 60 mL de metanol en un equipo de ultrasonido (Elma, Darmstadt, Germany) durante 2 horas y posteriormente el mismo material vegetal se agitó a 125 rpm por 1 hora con metanol. Este procedimiento se realizó dos veces, los extractos se combinaron y se concentraron en rota-evaporador a 40 °C.

Los extractos metanólicos de las diferentes muestras de callo se sometieron a extracción en fase sólida (EFS). Para esto, 1 g del respectivo extracto metanólico crudo se solubilizó en 10 mL de una solución metanol-agua (1:1) y 50 µL de esta solución fueron transferidos a los respectivos cartuchos, las etapas posteriores fueron realizadas según lo descrito por Theodoris *et al.* [20]. Para verificar la eficiencia de los cartuchos en la extracción de Taxol y Baccatin III, se emplearon dos cartuchos diferentes: Bakerbond C₁₈ y Supelclean LC-18, ambos con una capacidad de 100 mg de muestra. Finalmente, el extracto precedente de cada cartucho se concentró en rota-evaporador a 40 °C. Previo a la inyección en el equipo de HPLC, los extractos de las muestras se reconstituyeron en acetonitrilo y se filtraron a través de filtros Millex-GN Millipore de 0,2 µm de poro.

Para el análisis de los taxoides por HPLC se utilizó un HPLC Hewlett Packard 1100 provisto del Software Chemstation versión A-0.6-0.1 y las condiciones cromatográficas para la determinación fueron las siguientes: Columna Hypersil ODS 5 µm, 125 x 4 mm, el eluente fue acetonitrilo-H₂O (40:60), el flujo 0,8 mL/min, se utilizó un detector de arreglo de diodos a 227 nm y se inyectaron 20 µL de cada muestra. Tanto los extractos de callos, como los patrones de Taxol y de Baccatin III fueron inyectados por triplicado.

La cuantificación de Taxol y de Baccatin III se realizó por el método del estándar externo a través de dos etapas: a) se realizó una curva de calibración para Taxol con cinco patrones desde 1 ppm hasta 8 ppm y otra para Baccatin III

con cinco patrones desde 1 ppm hasta 20 ppm y b) se inyectaron las muestras procedentes de los callos para así interpolar los resultados obtenidos en las respectivas curvas.

2.5 Análisis de datos

Los materiales vegetales *in vitro* fueron evaluados cada veinte días. Los resultados obtenidos en la inducción de los

callos fueron analizados estadísticamente a través del programa SPSS versión 8.0, se realizó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis y se hizo una comparación de grupos de dos a dos mediante la prueba paramétrica de "U" de Mann-Whitney; las comparaciones múltiples se consideraron significativas para una probabilidad asociada de $p < 0.05$.

3. Resultados y discusión

3.1 Inducción e iniciación del cultivo de callos

La metodología empleada para la desinfección del material vegetal fue eficiente, la contaminación observada para cada tipo de explante en los diferentes medios de cultivo fue inferior al 3,6%. Sin embargo, los segmentos de aguja y de tallo presentaron un alto nivel de oxidación sin liberación de pigmentos al medio. Por ello en este trabajo, para prevenir la oxidación se adicionó glicina, ácido aspártico y arginina a los medios de cultivo.

A pesar de la oxidación, en algunos medios de cultivo los segmentos de tallo generaron callos friables de color amarillo translúcido y de aproximadamente 3 mm de diámetro después de veinte días de iniciados los experimentos. Los callos obtenidos crecieron rápidamente durante los primeros 40 días, tiempo en el cual se realizó un subcultivo sin separar el callo del explante inicial. El análisis de varianza de Kruskal-Wallis indicó que los mejores medios fueron el TM5-2 y TM5-6, la prueba de pares mostró que no existían diferencias significativas entre esta pareja de medios.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fetto-Neto *et al.* [21] y Banerjee *et al.* [22] quienes concluyeron que los mejores explantes para la inducción de callos en el medio B5 fueron secciones de tallo joven y dieron como razón para el bajo crecimiento de los callos en las agujas, la poca cantidad relativa de meristemo y de parénquima. Posteriormente, cuando el material subcultivado fue separado del explante inicial, los callos tuvieron un periodo de crecimiento de 30 días y la tasa de sobrevivencia fue mayor del 89%.

La rata de crecimiento de los callos declinó después del segundo subcultivo y el porcentaje de sobrevivencia fue muy bajo. La mayoría de los callos se tornaron de color café rojizo y segregaron un pigmento rojo al medio. Esto concuerda con los resultados obtenidos por

Wickremesinhe y Arteca [23] quienes reportaron que en presencia de las mejores combinaciones de fitoreguladores, del 21 al 42% de los callos se tornaron de color "café-rojizo" y exudaron un pigmento al medio antes de fenecer.

3.2 Cuantificación de Taxol y Baccatin III

La curva de calibración del Taxol tuvo un coeficiente de correlación de 0,996 mientras que la de Baccatin III fue de 0,992.

Los cromatogramas obtenidos presentaron muchas interferencias, lo cual fue similar a lo encontrado por Khosroushahi *et al.* [17] y Theodoris *et al.* [20] quienes reportaron altas concentraciones de taxanos desconocidos y otros contaminantes en los extractos de las suspensiones de *T. baccata*. La mayor dificultad la originaron los picos que eluyeron entre 0 y 2 minutos, los cuales mostraron absorbancias muy grandes cuando el cartucho empleado fue el de Supelco y menores con el de J.T. Baker; esto no permitió la cuantificación fácil y directa de Taxol y de Baccatin III presentes en los extractos metanólicos de callos analizados. Por tanto, utilizando una herramienta del software Chemstation se obtuvo el cromatograma entre 2,5 y 20 minutos para poder observar los picos de Taxol cuyo tiempo de retención (t_R) fue $17,35 \pm 5$ % y el de Baccatin III fue $3,75 \pm 5$ % minutos.

En la tabla 2 se muestran las cantidades de Taxol y de Baccatin III determinadas en el presente trabajo. De ésta se deduce que en la muestra 1, la cantidad obtenida de Taxol con el cartucho Bakerbond C₁₈ fue dos veces superior a la obtenida por el cartucho Supelclean LC-18; con la muestra 2 nuevamente el cartucho Bakerbond C₁₈ fue el mas eficiente. En el caso del Baccatin III, el cartucho Bakerbond C₁₈ presentó el doble de la eficiencia en la extracción de este taxano frente al cartucho Supelclean LC-18 y con la muestra 2 el cartucho Bakerbond C₁₈ fue casi cinco veces superior al Supelclean LC-18.

Muestra	Cartucho	Concentración (mg/L Base seca)	
		Taxol	Baccatin III
1	Supelclean LC-18	3,26	4,55
1	Bakerbond C ₁₈	8,75	9,80
2	Supelclean LC-18	1,90	4,74
2	Bakerbond C ₁₈	5,17	18,90

Tabla 2. Cantidad de Taxol y Baccatin III determinada en los extractos metanólicos de callos de *T. baccata* por HPLC

Al comparar los resultados alcanzados en este trabajo con los reportados en otras investigaciones se deduce que la cantidad de Taxol hallada fue significativa. La cual fue superior a la encontrada por Gibson *et al.* [24] y Banerjee *et al.* [22] quienes no detectaron Taxol en callos de *T.*

brevifolia y *T. wallichiana* respectivamente. Además, estas concentraciones se enmarcaron en el rango de la reportada por Hirasuna *et al.* [15] en suspensiones celulares de *T. cuspidata* (0,1–13 mg/L) y la determinada por Ketchum *et al.* [25] en suspensiones celulares de *T. canadensis* (5,95 mg/L) y *T. cuspidata* (14,78 mg/L); así como la reportada por Cusidó *et al.* [26] en las líneas de callos obtenidas a partir de suspensiones celulares.

4. CONCLUSIONES

El rango de Taxol (1,9-8,75 mg/L) y de Baccatin III (4,55-18,9 mg/L) en esta investigación fue significativo, lo cual comprobó que los callos produjeron taxanos de interés y que deben subcultivarse para estabilizar su producción.

El protocolo empleado para la inducción de callos fue exitoso, al permitir la obtención de callos en los diferentes medios de cultivo empleados a partir de los explantes de tallo tiernos. Los mejores medios fueron el TM5 suplementado con 1 mg/L o 6 mg/L de picloram mas 0,1 mg/L de GA₃ y 0,1 mg/L de kinetina respectivamente.

Para la extracción y posterior cuantificación del Taxol y del Baccatin III a partir de los callos, el cartucho Bakerbond C₁₈ fue superior al Supelclean LC-18.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Parmar VS, Jha A, Bisht KS, Taneja P, Singh SK, Kumar A, Poonam T, Jain R, Olsen CE. 1999. Constituents of the yew trees. *Phytochemistry* 50: 1267-1304.
- [2] Ballero M, Loi M C, van Rozendaal ELM, van Beek TA, van de Haar C, Poli F, Appendino G. 2003. Analysis of pharmaceutical relevant taxoids in wild yew trees from Sardinia. *Fitoterapia* 74: 34-39.
- [3] Suffness M, Wall ME. 1995. Discovery and development of Taxol. En: Suffness M. (ed.). *Taxol: Science and applications*. CRC Press: Boca Ratón, FL. 3-25.
- [4] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. 1971. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal American Chemical Society* 93:2325-2327.
- [5] Stierle A, Strobel G, Stierle D. 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. *Science* 260: 214-217.
- [6] Kingston DGI, Molinero AA, Rimoldi JM. 1993. The taxane diterpenoids. En: Herz W, Kirby GW, Tamm C. (eds). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer-Verlag: New York, Vol 62: pp 1-188.
- [7] Baloglu E, Kingston DGI. 1999. The taxane diterpenoids. *Journal of Natural Products* 62: 1448-1472.
- [8] Ajani JA, Pazdur R, Dumas P, Fairweather J. 1998. Phase II study of prolonged infusion of Taxol in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Investigation New Drugs* 16: 175-177.
- [9] Gamborg OL, Miller A, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151-158.
- [10] Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- [11] Kao KN, Michayluk MR. 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hojastana* cells and protoplast plate at a very low population density in liquid medium. *Planta* 126: 2519-2530.
- [12] Nitsch JP, Nitsch C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
- [13] Ketchum REB, Gibson DM, Gallo G. 1995. Media optimization for maximum biomass production in cell cultures of pacific yew. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42: 185-193.
- [14] Parc G, Canaguier A, Landré P, Hocquemiller R, Chriqui D, Meyer M. 2002. Production of taxoids with biological activity by plants and callus culture from selected *Taxus* genotypes. *Phytochemistry* 59: 725-730.
- [15] Hirasuna TJ, Pestchanker LJ, Srinivasan V, Shuler ML. 1996. Taxol production in suspension cultures of *Taxus baccata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 95-102.
- [16] Navia-Osorio A, Garden H, Cusidó RM, Palazón J, Alfermann AW, Piñol MT. 2002. Taxol and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in an airlift bioreactor. *Journal of Plant Physiology* 159: 97-102.
- [17] Khosroushahi AY, Valizadeh M, Ghasempour A, Khosrowshahli M, Naghdibadi H, Dadpour MR, Omidi Y. 2006. Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology Internacional* 30: 262-269.
- [18] Agrawal S, Banerjee S, Chattopadhyay SK, Kulshrestha M, Madhusudanan K P, Mehta V K, Kumar S. 2000. Isolation of taxoids from cell suspension cultures of *Taxus wallichiana*. *Planta Medica* 66: 773-775.
- [19] Yukimune Y, Hara Y, Nomura E, Seto H, Yoshida S. 2000. The configuration of methyl jasmonate affects paclitaxel and Baccatin III production in *Taxus* cells. *Phytochemistry* 54: 13-17.
- [20] Theodoridis G, Jong de CF, Laskaris G, Verpoorte R. 1998. Application of SPE for the HPLC Analysis of Taxanes from *Taxus* Cell Cultures. *Chromatographia* 47: 25-34.
- [21] Fett-Neto AG, DiCosmo F, Reynolds WF, Sakata K. 1992. Cell culture of *Taxus* as a source of the

antineoplastic drug Taxol and related taxanes. *Biotechnology* 10: 1572-1575.

[22] Banerjee S, Upadhyay N, Kukreja AK, Ahuja PS, Kumar S, Saha GC, Sharma RP, Chattopadhyay SK. 1996. Taxanes from *in vitro* cultures of the Himalayan yew *Taxus wallichiana*. *Planta Medica* 62: 329-331.

[23] Wickremesinhe RM, Arteca RN. 1993. *Taxus* callus cultures: Initiation, growth optimization, characterization and Taxol production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 35: 181-193.

[24] Gibson DM, Ketchum REB, Vance NC, Christen AA. 1993. Initiation and growth of cell lines of *Taxus brevifolia* (Pacific yew). *Plant Cell Reports* 12: 479-482.

[25] Ketchum REB, Gibson, DM. 1996. Paclitaxel production in suspension cell culture of *Taxus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46: 9-16.

[26] Cusidó RM, Palazón J, Navia-Osorio A, Mallo A, Bonfill, M, Morales C, Piñol MT. 1999. Production of Taxol and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. *Plant Science* 146: 101-107.

6. AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Tecnológica de Pereira por el apoyo financiero para la realización de este trabajo.