

CUANTIFICACION DE LICORINA EN CALLOS Y RAICES CULTIVADOS *IN-VITRO* DE *Crinum x powelli* “album” (Amaryllidaceae) POR CROMATOLOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

RESUMEN

La familia Amaryllidaceae ha sido estudiada ampliamente por la importancia de sus alcaloides. En el género *Crinum* perteneciente a esta importante familia se destaca la licorina por su abundancia y marcada actividad citotóxica contra varias líneas celulares de tumores humanos.

Para la realización de este trabajo se utilizaron bulbos de *Crinum x powelli* “album” los cuales fueron desinfectados y expuestos a diferentes medios de cultivo para la inducción de callos y raíces en condiciones *in-vitro*; el medio de cultivo donde se presentó mejor crecimiento de callos friables fue el Murashige y Skoog (MS) suplementado con 4 mg/L de Picloram y los mejores callos nodulares crecieron en los medios MS complementados con 2 y 4 mg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Así mismo, se determinó que los medios suplementados con bencilaminopurina (BAP) y kinetina generaron raíces, mientras que el ácido abscísico (ABA) fue tóxico a todas las concentraciones evaluadas.

La licorina fue extraída de callos y raíces normales obtenidas *in-vitro* y posteriormente se cuantificó mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) por el método de estándar externo. Las raíces cultivadas en el medio de cultivo MS suplementado con 1 mg/L de kinetina produjeron la mayor cantidad de licorina (0.0116 %) en base seca.

PALABRAS CLAVES: Alcaloides, Amaryllidaceae, Biodiversidad, HPLC, Metabolitos secundarios, Organogénesis

ABSTRACT

The Amaryllidaceae family has been widely studied due to the importance of their alkaloids, in the genus Crinum belonging to this important plant family, lycorine has a predominant place because of its abundance and strong cytotoxic activity against several human tumor cell lines.

In this work were used Crinum x powelli “album” bulbs which were disinfected and exposed to several culture media for the calli and roots induction under in-vitro conditions; the best media for the growth of friable calli were the Murashige and Skoog (MS) supplemented with 4 mg/L of Picloram and the best nodular calli were grown in the media MS supplemented with 2 or 4 mg/L of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). By the same way, it was determined that the media supplemented with bencilaminopurine (BAP) and kinetin developed roots, while abscisic acid (ABA) was toxic to all the concentrations tested.

Lycorine was extracted from both calli and normal roots obtained under in-vitro conditions and then they were quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) through the external standard method. The roots cultured in the MS media supplement with kinetin 1 mg/L gave the higher lycorine yield (0.0116 %) on dry base.

KEY WORDS: Alkaloids, Amaryllidaceae, Biodiversity, HPLC, Secondary metabolites, Organogenesis

JAIME NIÑO O.

Lic. B. y Qca, MSc, PhD.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de Pereira
janino@utp.edu.co

YANED MILENA CORREA N.

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

OSCAR MARINO MOSQUERA M.

Químico MSc.
Profesor Titular
Universidad Tecnológica de Pereira
omosquer@utp.edu.co

LUZ ADRINA RAMIREZ Q.

Tecnóloga Química
Universidad Tecnológica de Pereira
lbpn@utp.edu.co

**Grupo de Investigación
Biotecnología – Productos
Naturales (GB-PN)
Escuela de Tecnología Química
Universidad Tecnológica de
Pereira**

1. INTRODUCCION

Una amplia variedad de drogas usadas en la medicina moderna han sido aisladas directamente de plantas o son obtenidas mediante transformaciones químicas de compuestos de origen natural. En la actualidad se considera que los extractos de plantas terrestres o de organismos marinos son las fuentes mayoritarias para la obtención de medicamentos nuevos y de moléculas bioactivas con aplicaciones agroindustriales [1].

Sin embargo, la obtención de metabolitos secundarios de interés no siempre es viable a partir de las fuentes naturales. Por esto, se han estudiado muchas estrategias para vencer estas barreras, una de ellas y en la que se ha puesto mucho énfasis es el cultivo *in-vitro* de células vegetales. Esta técnica es una herramienta que permite la obtención de callos, embriones, raíces, plántulas, entre otros, con poca variabilidad genética y con producción estable del metabolito de interés [2].

En la familia Amaryllidaceae se ha reportado la obtención en condiciones *in-vitro* y su posterior extracción y cuantificación de los alcaloides: galantamina, n-formilnorgalantamina, haemantina, tazetina y pancratistatina [3], [4].

En *Crinum x powelli* "album" se ha aislado licorina, alcaloide para el cual se han reportado varias actividades biológicas tales como: anticancerígena [5], anti-*Entamoeba histolytica* (Cepa HK9 en estado de trofozoito) [6]; antimalárica (*Plasmodium falciparum* cepas: NF54, estado IEF, D10 y FAE8) [7], [8]. Así mismo, homolicorina y O-metil-licorina son agentes citotóxicos contra las células LMTK del fibroblasto [9].

Crinum x powelli "album" es un híbrido estéril y su reproducción se realiza vegetativamente a través de sus bulbos, con lo cual la recolección del material tendiente a la extracción del fitocompuesto de interés tiene una espera prolongada. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue obtener callos y raíces normales *in-vitro* a partir de segmentos axénicos de bulbos de *Crinum x powelli* "album" y evaluar la producción de licorina en ambos materiales.

2. MATERIALES Y METODOS

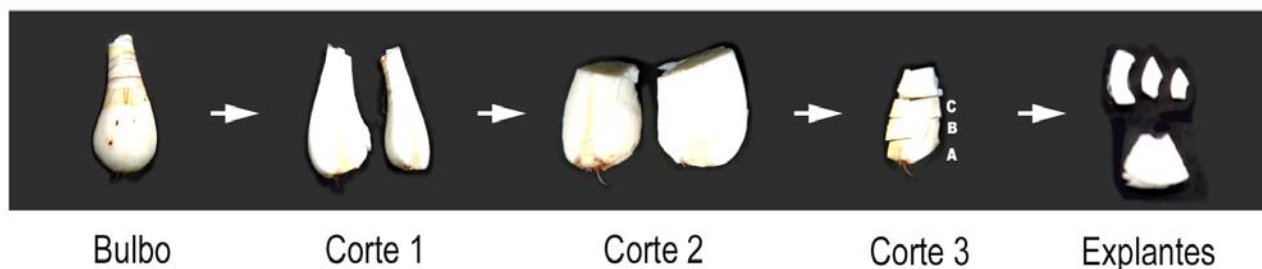


Figura 1. Obtención de explantes del bulbo de *Crinum x powelli* "album" para inducción de callos.

Reactivos

Todas las sales empleadas para la preparación de los medios de cultivo fueron grado analítico (Merck, J.T. Baker o Carlo Erba); el ácido cítrico (Carlo Erba) y los reguladores de crecimiento, así como el Phytigel (Sigma). El conservante de plantas P820 (PhytoTechnology Laboratories). Los solventes empleados en el proceso extractivo fueron grado analítico (Mallinckrodt) y los utilizados en la cuantificación por HPLC fueron UltiMAR (Mallinckrodt). Las membranas de nylon de 0.25 μm y filtros de PTFE de 0.25 μm (Millipore). La licorina usada como estándar fue aislada, purificada e identificada previamente por el grupo de investigación Biotecnología - Productos Naturales de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Material vegetal

Los bulbos de *C. x powelli* "album" fueron recolectados en el Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira en Pereira (Risaralda, Colombia) y clasificada por el profesor F. J. Roldán, un voucher con el número 137.806 fue depositado en el Herbario de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia).

Los bulbos de *C. x powelli* "album" fueron lavados durante media hora con detergente comercial (5 %) y enjuagados con abundante agua. Seguidamente, los materiales fueron llevados al interior de una cabina de flujo laminar donde se trataron durante tres minutos con alcohol (70 %), luego el material se expuso a una solución de hipoclorito de sodio (30 %) y Extran® (0.5 %) por 20 minutos. Finalmente se trataron con una solución constituida por Glutarex®, Extran® (0.5 %), conservante de plantas (1 %) y ácido cítrico (0.2 %) durante 12 horas; después de cada una de las etapas anteriores el material vegetal se enjuagó con una solución estéril de ácido cítrico (1 %) y abundante agua destilada estéril.

Para la siembra se obtuvieron tres tipos de explantes de aproximadamente 5 x 5 mm, designados como: A, a la parte inferior, B a la parte media y C a la parte superior, del segmento inferior del bulbo, como se muestra en la figura 1.

Inducción e iniciación del cultivo de callos

El medio basal empleado para la inducción de callos en esta investigación fue el de Murashige y Skoog, (MS) [10]. Las diferentes combinaciones y concentraciones de los reguladores de crecimiento utilizados se presentan en la tabla 1.

MEDIO	AUXINAS (mg/L)		
	ANA	PICLORAM	2,4 - D
M1	0.5	0.0	0.0
M2	1.0	0.0	0.0
M3	2.0	0.0	0.0
M4	4.0	0.0	0.0
M5	0.0	0.5	0.0
M6	0.0	1.0	0.0
M7	0.0	2.0	0.0
M8	0.0	4.0	0.0
M9	0.0	0.0	0.5
M10	0.0	0.0	1.0
M11	0.0	0.0	2.0
M12	0.0	0.0	4.0
M13	0.0	0.0	0.0

ANA = Acido naftalenacético

2,4-D = Acido 2,4-diclorofenoxiacético

Tabla 1. Composición hormonal de los medios utilizados para la inducción de callos *in-vitro* de *Crinum x powelli* "album".

El pH de todos los medios de cultivo utilizados se ajustó a 5.8; 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, se taparon con papel aluminio y se esterilizaron a 121 °C y 15 psi durante 20 minutos.

Para la realización de los experimentos se sembraron 48 explantes del tipo A en 8 frascos. De igual manera se procedió con los explantes tipo B y C por cada medio de cultivo ensayado de la tabla 1.

Los materiales se incubaron a temperatura ambiente con una humedad relativa del 80 % y en condiciones de oscuridad; posteriormente, cada veinticinco días el material fue subcultivado bajo las mismas condiciones iniciales de asepsia.

Inducción y mantenimiento de las raíces

La inducción de raíces se llevó a cabo a partir de explantes de callos nodulares y friables en el medio MS [10] utilizando los reguladores de crecimiento y las combinaciones que se muestran en la tabla 2.

Se sembraron 66 explantes de callo por cada medio de la tabla 2, los cuales fueron sometidos a las mismas condiciones referidas anteriormente por un periodo de cuarenta días.

MEDIO	REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/L)		
	KINETINA	BAP	ABA
M14	0.0	0.0	0.0
M15	0.5	0.0	0.0
M16	1.0	0.0	0.0
M17	2.0	0.0	0.0
M18	0.0	0.5	0.0
M19	0.0	1.0	0.0
M20	0.0	2.0	0.0
M21	0.0	0.0	0.5
M22	0.0	0.0	1.0
M23	0.0	0.0	2.0

BAP = Bencilaminopurina

ABA = Acido abscísico

Tabla 2. Medios de cultivo empleados para la obtención y mantenimiento de raíces *in-vitro* de *Crinum x powelli* "album"

Extracción y cuantificación de licorina en callos y raíces *in-vitro* de *Crinum x powelli* "album"

Los callos y las raíces *in-vitro* se recolectaron, se pesaron en base húmeda, se secaron a 50 °C y se molieron. Posteriormente 10 g de cada material *in-vitro* se extrajeron con 100 mL de metanol en un equipo de ultrasonido durante 20 minutos y seguidamente se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. Se separó el sobrenadante del residuo y este se re-extrajo dos veces mas de la misma manera. Los extractos similares se combinaron y concentraron al vacío en rota-evaporador a 40 °C para así obtener la mezcla de alcaloides crudos [4].

En la cuantificación de la licorina por HPLC se utilizó un equipo HPLC Hewlett Packard 1100 provisto del Software Chemstation versión A-0.6-0.1. Las condiciones cromatográficas para la evaluación fueron las siguientes: Columna Hypersil ODS 5 µm, 125 x 4 mm, el eluyente fue MeOH - H₂O (30 : 70 con (Et)₂NH 0.005 M), el flujo fue de 1.2 mL/min, se utilizó un detector de arreglo de diodos (DAD) a 280 nm y se inyectaron 20 µL de cada muestra. La metodología que se siguió para el análisis de licorina en *Crinum x powelli* "album" fue una modificación de la propuesta por Ingkaninan et al., [11] quienes emplearon como eluyente MeOH - H₂O (30:70 con CH₃COONH₄⁺ 0.01M). Los extractos de callos, de raíces y los patrones de licorina fueron inyectados por triplicado.

La cuantificación de licorina se llevó a cabo por el método de patrón externo, mediante una curva de calibración con patrones desde 5 ppm hasta 40 ppm; posteriormente se inyectaron las muestras procedentes de los callos y de las raíces para así interpolar los resultados obtenidos en la curva y determinar el contenido de licorina en estos materiales.

Análisis de resultados

Los materiales vegetales *in-vitro* fueron evaluados cada veinte días. Los resultados obtenidos en la inducción de los callos y raíces fueron analizados mediante estadística descriptiva con el programa Excel (versión XP).

3. RESULTADOS

A pesar de que los bulbos de *C. x powelli* "album" requirieron un proceso exhaustivo de desinfección, la contaminación y la oxidación fueron relativamente bajas, del 14 % y 20 % respectivamente; el empleo del conservante de plantas en combinación con el ácido cítrico (1 %) fueron apropiados y se puede considerar que el proceso de desinfección fue eficiente.

Los explantes generaron callos friables a los veinte días de iniciados los experimentos, principalmente en los medios suplementados con 2,4-D, estos fueron de color crema y de aproximadamente 3 mm de diámetro. Los diferentes explantes fueron subcultivados cada veinticinco días y la evaluación de estos se continuó por noventa días. A los setenta días de iniciado el experimento se observó que el explante A fue el que más callos generó. En los tres tipos de explantes usados, el medio de cultivo MS complementado con 4 mg/L de Picloram fue el que más callos friables indujo; así mismo, los medios de cultivo MS suplementados con 2 o 4 mg/L de 2,4-D fueron los de mayor producción de callos nodulares (ver figura 2).

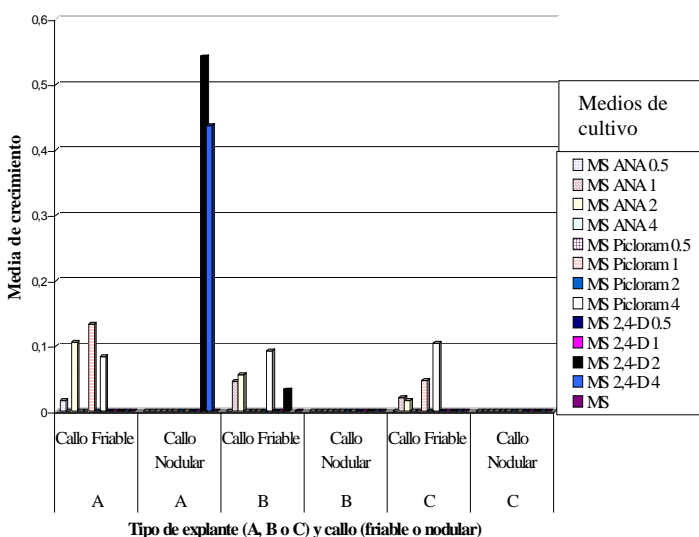


Figura 2. Media de crecimiento de callos friables y nodulares a los 70 días

Los resultados obtenidos en esta investigación concuerdan con lo reportado por Sellés et al., [4] en la inducción de callos de *Narcissus confusus* (Amaryllidaceae), quienes determinaron que los mejores medios fueron los que contenían 2 o 4 mg/L de 2,4-D y/o

4 mg/L de Picloram. Con lo que se observa que los explantes de *Narcissus confusus* y de *Crinum x powellii* "album" respondieron de manera muy similar a la presencia de estas auxinas en los cultivos *in-vitro*. Además, se presentó similitud con los resultados obtenidos por Cheng et al., [12] en *Lilium speciosum* Thumb. Var. *Gloriosoides* (Liliaceae) quienes obtuvieron los mejores callos nodulares en el medio MS suplementado con 3 mg/L de 2,4-D mas 0.25 mg/L de BAP.

Adicionalmente, Kim et al., [13] encontraron que 2,4-D fue más efectivo que ANA para la inducción de callos a partir de raíces de *Allium sativum* L. (Liliaceae), lo cual correlaciona con los resultados encontrados en este trabajo, dado que ANA en *Crinum x powellii* "album", a las concentraciones ensayadas indujo la formación de callos en menor proporción en comparación con 2,4-D o Picloram, como se muestra en la figura 2.

Inducción de raíces

Los medios suplementados con kinetina y BAP generaron raíces; sin embargo, a los ochenta días de iniciados los experimentos no se observaron diferencias estadísticamente significativas (datos no mostrados). Estos resultados son similares a los reportados por Sellés et al., [4] para *Narcissus confusus* (Amaryllidaceae), quienes indicaron que los callos transferidos a medios suplementados con las citoquininas: kinetina o BAP en un rango de concentraciones de 0.5 – 1.0 mg/L desarrollaron raíces, raíces adventicias y bulbilos con raíces y hojas.

Además, se determinó que los callos nodulares produjeron mayor cantidad de raíces que los callos friables y que ABA fue tóxico para los explantes a todas las concentraciones utilizadas en el experimento, produciendo necrosis en los mismos.

Cuantificación de licorina

En la figura 3 se muestra un cromatograma de HPLC de la muestra de raíz inducida en el medio MS suplementado con 0.5 mg/L de kinetina (M15), en este se observa el pico de licorina a un tiempo de retención (t_R) de 3.897 minutos, el cual fue reproducible en todos los ensayos. Además, se observa que bajo las condiciones cromatográficas de este trabajo, la licorina presentó una separación óptima (Figura 3).

La curva de calibración de licorina fue lineal, presentó un factor de correlación de 0.9863 y se determinó que el límite de detección para la licorina en las condiciones empleadas fue de 1.5 mg/L.

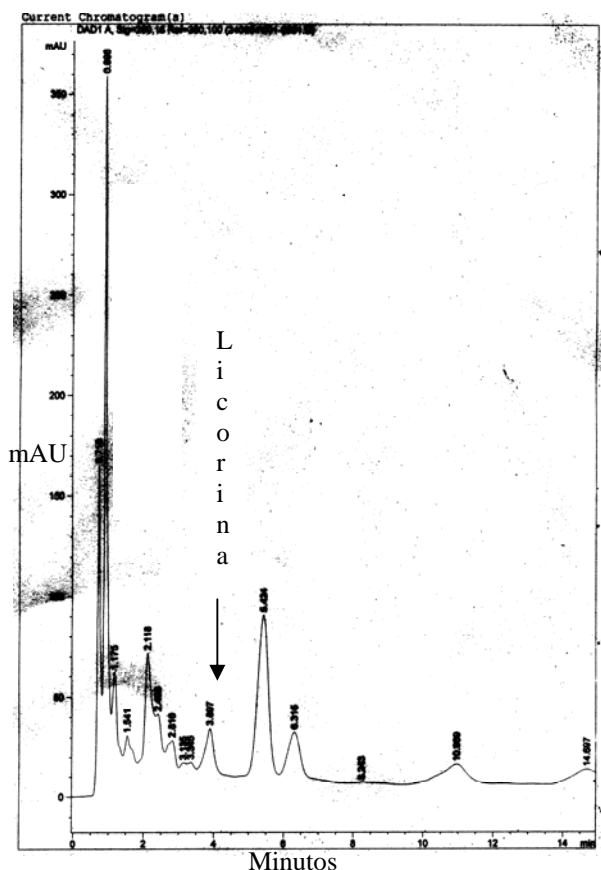


Figura 3. Cromatograma de un extracto obtenido de raíces normales de *C. x powelli* "album" cultivadas *in-vitro*

Con objeto de determinar si el pico evaluado era realmente licorina, se realizó una mezcla de partes iguales del patrón de licorina de 50 ppm y la muestra de raíz del medio MS suplementado con 1 mg/L de kinetina (M16). Se comprobó que el pico evaluado era realmente licorina debido a que solo se observó mayor absorbancia en los picos de t_R 0.905 y 3.986 minutos, correspondiente a los solventes empleados y a la licorina respectivamente.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de licorina en callos y raíces normales *in-vitro* por HPLC se presentan en la figura 4. De esta se deduce que las raíces del medio de cultivo MS suplementado con 1 mg/L de kinetina (M16) (Tabla 2) fueron las que produjeron más licorina (0.0116 %), la cual fue superior a la encontrada en los demás materiales evaluados. En general, se deduce que la cantidad de licorina presente en las raíces *in-vitro*, fue mayor en los medios MS suplementados con kinetina que en aquellos con BAP.

Senner et al., [14] reportaron los porcentajes de licorina en los bulbos de cuatro especies de Amaryllidaceae: *Galanthus elwesii* (0.011 %), *Galanthus ikariae* (0.043 %), *Leucojum aestivum* (0.078 %) y en *Narcissus tazetta* sp. *Tazetta* (0.089 %). Aunque el porcentaje de licorina obtenido en este trabajo en las raíces y en los callos fue bajo, se obtuvo una línea de raíces normales *in-vitro* que

produjo un contenido similar de licorina al reportado en los bulbos de *Galanthus elwesii*.

Es de resaltar que en las raíces se obtuvo más licorina que en los callos (ver figura 4), esto concuerda con lo descrito por Toivonen et al., [15] quienes afirmaron que la producción de los metabolitos secundarios, por lo general es baja e inestable en callos y suspensiones celulares; en contraste, las raíces son capaces de acumular una cantidad considerable de ellos, lo cual refleja su alta capacidad biosintética y destaca el hecho de que la producción de fitocompuestos está relacionada con el grado de organización de los tejidos vegetales utilizados.

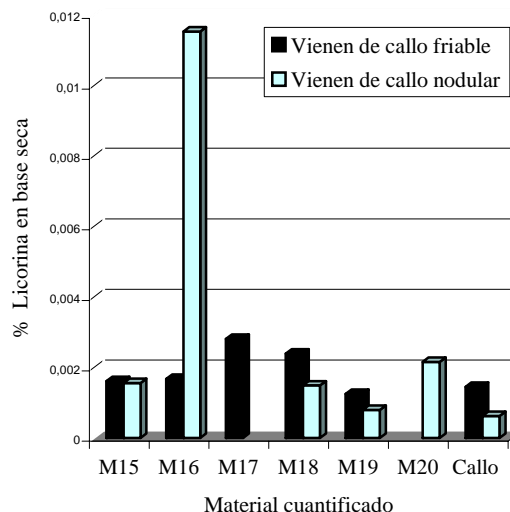


Figura 4. Porcentaje de licorina en base seca de raíces y callos cultivados *in-vitro* de bulbos de *Crinum x powelli* "album"

4. CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo adecuado de desinfección para los bulbos de *Crinum x powelli* "album", que permitió obtener bajos niveles de oxidación y contaminación permitiendo así la masificación del material vegetal en condiciones *in-vitro* y su posterior evaluación.

Las mejores respuestas de los explantes en la inducción de callos se presentaron en los medios de cultivo suplementados con las auxinas 2,4-D y picloram a concentraciones de 1 y 4 mg/L respectivamente.

La mayor producción de licorina se obtuvo en las raíces normales cultivadas *in-vitro* en el medio MS suplementado con 1 mg/L de kinetina provenientes de callos nodulares.

5. AGRADECIMIENTOS

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

6. BIBLIOGRAFIA

[1] Vanisree, M., Lee, C-Y., Lo, S-F., Nalawade, S.M., Lin, C.Y., and Tsay, H-S. (2004). Studies on the production of some important secondary from medicinal plants by plant cell cultures. *Bot Bull Acad Sin.* 45: 1 – 22.

[2] Verpoorte, R., Contin, A., and Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Review.* 1: 13 – 25.

[3] Backhaus, R.A., Pettit, G.R., Huang, D.S., Groszek, G., Odgers, J.C., Ho, J., and Meerow, A. (1992). Biosynthesis of the antineoplastic pancratistatin following tissue culture of *Hymenocallis littoralis* (Amaryllidaceae). *Acta Hort.* 320: 364 - 366.

[4] Sellés, M., Viladomat, F., Bastida, J., and Codina, C. (1999). Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids. *Plant Cell Rep* 18: 646 – 651.

[5] Hua, D.H., Saha, S., and Takemoto, D.J. (1997). Anticancer Activities of 2,5,8,9 hexahydrofenantridines on Multi-Drug Resistant Phenotype Cells. *Anticancer Res.* 17: 2435 – 2441.

[6] Machocho, A., Chhabra, S.C., Viladomat, F., Codina, C., and Batista, J. (1998). Alkaloids from *Crinum stuhlmannii*. *Planta Med.* 64: 679 – 680.

[7] Nair, J.J., Machocho, A.K., Campbell, W.E., Brun, R., Viladomat, F., Codina, C., and Bastida, J. (2000). Alkaloids from *Crinum macowanii*. *Phytochemistry.* 54: 945 – 950.

[8] Campbell, W.E., Nair, J.J., Gammon, D.W., Codina, C., Bastida, J., Viladomat, F., Smith, P.J., and Albrecht, C. F. (2000). Bioactive Compounds from *Brunsvigia radulosa*. *Phytochemistry.* 53: 587 – 591.

[9] Labraña, J., Choy, G., Solans, X., Font-Bardia, M., De la Fuente, G., Viladomat, F., Codina, C., and Bastida, J. (1999). Alkaloids from *Narcissus bujei* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry.* 50: 183 – 188.

[10] Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497.

[11] Ingkaninan K., Hazekamp, A., Best, C.M., Irth H., Tjaden, U.R., van der Heijden, R., van der Greef, J., and Verpoorte, R. (2000). The application of HPLC with on-line coupled UV / MS – biochemical detection for isolation of an acetylcholinesterase inhibitor from *Narcissus* ‘Sir Winston Churchill’. *J Nat Prod.* 63: 803 – 806.

[12] Cheng, C., Chang-Tesrn C., Yu-Ching T., and Wei-Chin C. (2000). A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. Var. *gloriosoides* Baker. *Bot Bull Acad Sin.* 41: 139 – 142.

[13] Kim, S., Guo, D., Jung, D., and Kwon, S. (2003). Multiple shoots regeneration and in vitro bulblet formation from *Garlic* callus. *Plant Biotechnol.* 5: 95 – 99.

[14] Senner, B., Koyuncu, M., Bingol, F. and Muhtar, F. (1998). Production of bioactive alkaloids from Turkish Geophytes. IUPAC (<http://www.iupac.org/symposia/proceedings/phuket97/sener.html>). 70: p6.

[15] Toivonen, L., Ojala, M., and Kuppinen, V. (1991). Studies on the optimization of growth and indole alkaloids production by hairy root cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnol Bioeng.* 37: 673 – 680.