

Producción de glicósidos cardiotónicos en *Digitalis purpurea* mediante el uso de sistemas de inmersión temporal

Naivy Pérez^{1*}, Elio Jiménez¹, Dirk Wilken², André Gerth², Annett Jähn³, Horst-Michael Nitzsche³, Gerhard Kerns⁴. *Autor para correspondencia.

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuaní Km5,5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: naivy@ibp.co.cu

² BioPlanta GmbH. Deutscher Platz 5. 04103 Leipzig, Germany.

³ Instituto de Química no Clásica. Universidad de Leipzig. Permosestraße 5, Leipzig, Germany.

⁴ Instituto de Sajonia para la Biotecnología Aplicada. Universidad de Leipzig. Permosestraße 5, Leipzig, Germany.

RESUMEN

Digitalis purpurea, es un ejemplo de droga cardiotónica. La digoxina y digitoxina son glicósidos producidos por esta planta, los cuales ejercen una acción muy eficaz en músculos cardíacos y han sido usados ampliamente en tratamientos del corazón. El propósito de esta investigación fue estudiar el efecto de la aplicación de los sistemas de inmersión temporal en la producción de biomasa así como la acumulación de digitoxina y digoxina como metabolitos secundarios de gran interés en la industria farmacéutica, determinados mediante HPLC. La producción de biomasa se vio favorecida a medida que se incrementó la frecuencia de inmersiones. Los mayores valores de peso fresco (106.2 g) y brotes con menor porcentaje de hiperhidricidad (27%) se obtuvieron cuando se empelaron inmersiones de 2 minutos cada 4 horas. El contenido de digoxina fue siempre menor que el de digitoxina. No obstante, la concentración de este metabolito aumentó con el empleo de 6 y 8 inmersiones por día, mientras la producción de digitoxina fue muy estable en todos los tratamientos evaluados. El gaseado entre inmersiones no incrementó la biomasa y la concentración de digoxina fue nula, sin embargo la concentración de digitoxina se incrementó hasta 111 µg/g de masa seca. El efecto de la inmersión temporal en la formación de glicósidos en brotes de *Digitalis purpurea* no ha sido presentado anteriormente en la literatura especializada.

Palabras clave: digitoxina, digoxina, inmersión temporal, metabolitos secundarios

ABSTRACT

Digitalis purpurea, is an example of cardiotonic drug. Digoxin and digitoxin are glycosides produced by this plant which are cardiac stimulants with a wide use in the treatment of heart problems. The objective of this investigation was to study the effect of temporary immersion on biomass production and the content of cardiotonic glycosides (digitoxin and digoxin), determined by Liquid Chromatography. Biomass production was favoured by increasing the frequency of immersions. The highest value of fresh weight (106.2 g) and lower percentage of hyperhydricity (27 %) were obtained with immersions of 2 minutes every 4 hours. The content of digoxin was always lower than digitoxin. However, the concentration of digoxin increases with 6 and 8 immersions per day, while the accumulation of digitoxin was stable in all treatments. The aeration rates did not increase the biomass and the concentration of digoxine was nule, nevertheless the concentration of digitoxine increased up to 111µg g.DW. The effect of temporary immersion on glycosides accumulation in shoots of *Digitalis purpurea* presented in this paper has not been described in the literature till now.

Keywords: digitoxin, digoxin, secondary metabolites, temporary immersion

Digitalis purpurea L. es una de las fuentes naturales más comunes de glicósidos cardiotónicos, que tiene la habilidad de ejercer una acción específica y potente sobre el músculo cardíaco. La obtención de compuestos activos obtenidos de plantas utilizados en la industria farmacéutica mediante procesos tradicionales es ineficiente, debido a las variaciones climáticas, dificultades de conservación y transporte así como falta de homogeneidad del producto obtenido

(Bourgaud *et al.*, 2001). Ante estos inconvenientes, el uso de las técnicas de cultivo *in vitro* para la producción de sustancias activas se ha incrementado ampliamente (Verpoorte *et al.*, 2002; Vanisree y Tsay, 2004). Varios ejemplos corroboran esta afirmación: alcaloides (Zhao *et al.*, 2000); antocianinos, carotenoides (Miyanaga *et al.*, 2000); coumarinas (Massot *et al.*, 2000); ácido rosmarínico (Kim *et al.*, 2001) paclitaxel (Navia-Osorio *et al.*, 2002); flavonoides (Kim *et al.*, 2005).

Diferentes estrategias han sido empleadas para mejorar el rendimiento de metabolitos secundarios en el cultivo *in vitro* que incluyen cambios en la composición nutricional y condiciones físicas de los medios de cultivo, así como técnicas novedosas que incrementan la productividad y disminuyen costos de producción. Los sistemas de inmersión temporal por su relación costo-beneficio y por la posibilidad de cultivar tejidos diferenciados con probada capacidad para la síntesis de metabolitos secundarios, pueden ser empleados para la producción de compuestos de interés farmacéutico y constituye una técnica novedosa con muy pocos ejemplos sobre su empleo con este fin (Gontier *et al*, 2005; Wilken *et al*, 2005).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la aplicación de los sistemas de inmersión temporal sobre la producción de biomasa de *Digitalis purpurea* y la acumulación de digitoxina y digoxina como metabolitos secundarios de gran interés en la industria farmacéutica.

El material vegetal empleado fueron plantas *in vitro* obtenidas a partir de semillas de *Digitalis purpurea* var. Berggold procedentes de la Empresa Farmasaat GmbH (Alemania). Se utilizaron sistemas de inmersión temporal (SIT) según describen Jiménez *et al* (1999) y se evaluaron diferentes frecuencias de inmersión (dos, cuatro, seis, ocho y doce inmersiones diarias de dos minutos) y al mejor tratamiento fueron aplicadas inyecciones de aire cada dos horas. Se determinó el incremento del peso fresco por frasco (g) y el peso seco (g). Para la determinación del contenido de digoxina y digitoxina en la masa seca ($\mu\text{g g.Ms}$) se utilizó el protocolo de extracción propuesto por Wichtl (1982). La detección se realizó en un HPLC (Agilent 1100) con un detector diodo array y columna Inertsil ODS-3 (150x4.6 mm, 5 μm). Una mezcla de acetonitrilo y agua (25:75) con flujo de 1.5 ml/min fue utilizada como solvente. Los glicósidos fueron detectados a 220 nm. La concentración de

El procesamiento de los datos se realizó mediante un análisis de varianza simple empleando el paquete estadístico SPSS para Windows version 13.0. Para la prueba de medias entre tratamientos se utilizó la prueba según Bonferroni $p < 0.05$.

La producción de biomasa se vio favorecida a medida que se incrementó el número de inmersiones por día. Se obtuvieron los mejores resultados cuando se emplearon seis inmersiones de dos minutos de duración, con 106.2 g de peso fresco. La calidad de los brotes fue también superior en dicho tratamiento, se observó un 27%

de brotes hiperhídricos, mientras que en el tratamiento con 12 inmersiones este valor se elevó a 60% y provocó la disminución del peso seco, variable que influye en la productividad y eficiencia del proceso.

El contenido de digoxina fue siempre menor que el de digitoxina, no obstante, la concentración de este metabolito aumentó con el empleo de seis y ocho inmersiones con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos (Figura 1), mientras la producción de digitoxina fue muy estable en todos los tratamientos evaluados.

La producción neta de digoxina y digitoxina por frasco de cultivo mediante la inmersión temporal fue calculada y se observó el mayor valor de los glicósidos cuando se emplearon seis y ocho inmersiones (119.9 y 135.4 μg de digoxina y 138.5 y 173 μg de digitoxina respectivamente). La aplicación de inyecciones de aire entre inmersiones fue evaluada como otro de los parámetros de gran importancia a tener presente en procesos desarrollados en sistemas de inmersión temporal, que pudieran mejorar la producción de biomasa así como la acumulación de metabolitos secundarios. El número de inyecciones evaluadas (dos minutos cada dos horas) no favoreció el peso fresco producido por frasco y no se produjo digoxina, sin embargo se alcanzó la mayor producción de digitoxina (111 $\mu\text{g g.Ms}$). El efecto positivo o negativo causado por el dióxido de carbono, oxígeno y etileno en la producción de biomasa y metabolitos secundarios ha sido descrito por autores como Hohe *et al*. (2003). Los parámetros estudiados en el presente trabajo provocan cambios en la atmósfera gaseosa *in vitro* así como variaciones considerables en el metabolismo secundario de la planta. Además es posible detectar compuestos no identificados hasta el momento que no son producidos por la planta en condiciones naturales.

La aplicación de los sistemas de inmersión temporal es una alternativa para la producción de digoxina y digitoxina. Es posible incrementar las concentraciones de dichos metabolitos que se producen en bajas cantidades y sólo bajo determinadas condiciones mediante la variación de parámetros como la frecuencia de inmersión y número de inyecciones de aire. Hasta el momento no había sido empleada esta técnica para la producción de glicósidos cardiotónicos.

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer al Ministerio de Educación y Ciencia de Alemania y a la Unión Europea por el financiamiento económico del programa de Formación Académica, ALFA.

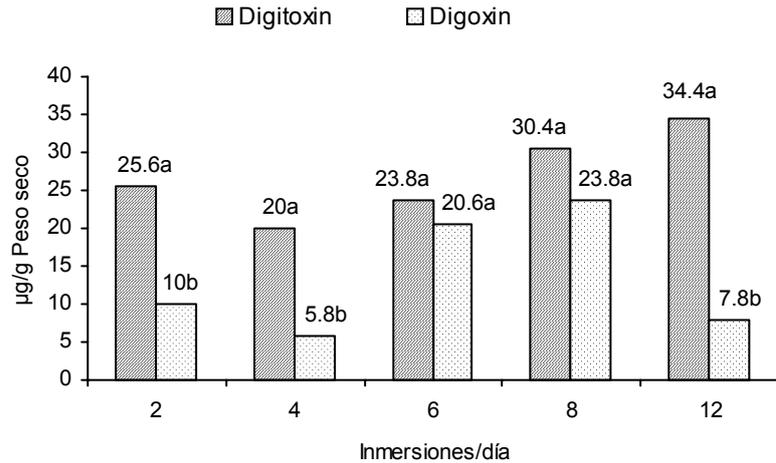


Figura 1. Contenidos de digitoxina y digoxina en brotes de *Digitalis purpurea* cultivados en SIT empleando diferentes frecuencias de inmersión.

REFERENCIAS

- Bourgaud, F, Grivot A, Milesi S y Gontier E (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science* 161: 839-851
- Gontier, E, Piutti S, Grivot A, Milesi S, Grabner A, Massot B, Lievre K, Tran M, Goergen J y Bourgaud F (2005) Development and validation of an efficient low cost bioreactor for furanocoumarin production with *Ruta graveolens* shoot cultures. En: *Liquid systems for in vitro mass propagation of plants*. Ed por T. Hvos-Elf y W. Preil. Kluwer Academic Publishers. Netherlands
- Hohe, A, Gerth A, Jiménez E, Jordan M, Gomez R, Schmeda G y Wilken D (2003) Production of Active Substances Applying Temporary Immersion Systems. En: T. Hvos-Elf y W. Preil (eds) *Liquid systems for in vitro mass propagation of plants*, Kluwer Academic Publishers. Netherlands
- Jiménez, E, Pérez N, de Fera M, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quiala E y Pérez JC (1999) Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 59: 19-23
- Kim, H, Oh S-R, Lee H y Huh H (2001) Benzothiadiazol enhances the elicitation of rosmarinic acid production in a suspension culture of *Agastache rugosa* O. Kuntze. *Biotechnol. Lett.* 23:55-60
- Kim, MJ, Kim DH, Na H, Oh T, Shi C y Surh P (2005) Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia* plants, induces apoptosis in human gastric cancer cells. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 24(4): 261-269
- Massot, B, Milesi S, Gontier E, Bourgaud F y Guckert A (2000) Optimized culture conditions for the production of furanocoumarins by micropropagated shoots of *Ruta graveolens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 62: 11-19
- Miyanaga, K, Seki M y Furusaki S (2000) Analysis of pigmentation in individual cultured plant cells using an image processing system. *Biotechnol. Lett.* 22:977-981
- Navia-Osorio, A, Garden H, Cusidó R, Palazón J, Alfermann A y Piñol M (2002) Production of paclitaxel and baccatin III in a 20L airlift bioreactor by cell suspension of *Taxus wallichiana*. *Planta Medica* 68: 336-340
- Vanisree, M y Tsay S (2004) Plant Cell Cultures- An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 2,1:29-48
- Verpoorte, R, Coutin A y Memelink J (2002) Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry reviews* 1: 13-25
- Wilken, D, Jiménez E, Hohe A, Jordan M, Gómez R, Schmeda G y Gerth A (2003) Production of plant active compounds applying temporary immersion systems. En: T. Hvos-Elf y W. Preil (eds). *Liquid systems for in vitro mass propagation of plants*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands
- Zhao, J, Zhu W, Hu Q y He X (2000) Improved alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures by various chemicals. *Biotechnology Letters* 22: 1221-1226