

DEPÓSITO LEGAL ppi 201502ZU4666

*Esta publicación científica en formato digital
es continuidad de la revista impresa*

ISSN 0041-8811

DEPÓSITO LEGAL pp 76-654

Revista de la Universidad del Zulia



Fundada en 1947
por el Dr. Jesús Enrique Lossada

Ciencias
Exactas
Naturales
y de la
Salud

Año 5 N° 12

Mayo - Agosto 2014

Tercera Época

Maracaibo - Venezuela

Efecto de diferentes concentraciones de NaCl y CoCl₂ sobre la producción de aloína en hojas de plantas de *Aloe vera* (L.) Burm. F. regeneradas *in vitro*

Rosyflor Tablante¹

Ángela Matos Acurero²

RESUMEN

La adición de NaCl 100 mM y 300 mM al medio de cultivo Murashige y Skoog durante 60 días permitió la obtención de 18,94 y 16,79 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomasa seca de aloína, es decir, incrementó la producción en 230 y 204%, respectivamente, con respecto a los testigos. Estos resultados demostraron que este compuesto, a esas concentraciones, se comportó como elicitador y, asimismo, que los cultivos *in vitro* son una plataforma útil para incrementar la producción de metabolitos secundarios de importancia económica y medicinal en *A. vera*.

PALABRAS CLAVE: *Aloe vera*, elicitores, NaCl, CoCl₂, metabolitos secundarios.

¹ Laboratorios Marinos S.A (LAMARSA). Piedras Negras- Falcón. Venezuela.

E-Mail: rosyflor21@gmail.com

²Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Citogenética Vegetal.

Effect of different concentrations of NaCl and CoCl₂ on the production of aloin in regenerated in vitro leaves of aloe vera

ABSTRACT

The addition of 100Mm and 300Mm of NaCl in the Murashige and Skoog culture medium during 60 days allowed the obtaining of 18,94 and 16,79 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry biomass of aloin, which means that compared to the controls, the production was increased in 230 and 204% respectively. These results demonstrated that the compound *NaCl*, with those concentrations, acted as an elicitor; and also that the *in vitro* cultures are a useful platform to increase the production of secondary metabolites in *A. vera*, of economic and medicinal importance.

KEYWORDS: *Aloe vera*, elicitors, NaCl, CoCl₂, secondary metabolites.

Introducción

La zábila o *Aloe vera* ha sido usada como medicina tradicional desde la antigüedad. Los metabolitos secundarios producidos por esta planta, especialmente la aloína, son ampliamente utilizados debido a sus propiedades medicinales, cosméticas y alimentarias (Fox et al., 2014, Epifano et al., 2014, Ramírez et al., 2012, Domínguez-Fernández et al., 2012, Harlev et al., 2012). En la actualidad, el cultivo *in vitro* representa una de las herramientas más importantes para la producción de metabolitos secundarios a partir de las plantas (Plazas Ávila, 2015; Shilpa et al., 2010), convirtiéndose en herramienta fundamental para las empresas que comercializan los metabolitos obtenidos a partir de diferentes especies de plantas

Una de las limitaciones para la producción de metabolitos secundarios a través de cultivos *in vitro* es el bajo rendimiento de dichos compuestos, pudiendo incrementarse con la manipulación de los cultivos y el uso de elicitores (Ruiz-García et al., 2014; Pérez-Alonso et al., 2014). En este sentido, los elicitores son agentes, bióticos y abióticos (extractos biológicos, polisacáridos, microorganismos, radiación UV, temperaturas extremas, fungicidas, antibióticos, metales pesados y altas concentraciones de sales), usados para incrementar la productividad de ciertos compuestos de interés en los cultivos (Praveen et al., 2014; Zhu et al., 2014; Mendhulkar y Ali Vakil,

2013). El uso de elicitores en los cultivos *in vitro* es una de las estrategias empleadas en los últimos años para mejorar la producción de metabolitos secundarios.

Por tal razón, debido a la gran demanda actual de compuestos producidos por las plantas de *A. vera*, se hace necesario desarrollar estudios para incrementar la producción de algunos metabolitos de interés, ya que a pesar de las grandes aplicaciones y usos que tienen estas plantas, pocas especies del género *Aloe* han sido sometidas a la acción de elicitores para inducir mayor producción de metabolitos secundarios o para el desarrollo de programas de mejoramiento. Por ello se evaluó el efecto del NaCl y CoCl_2 sobre la producción de aloína en hojas de plantas de *A. vera* regeneradas *in vitro* con el fin de presentar una vía alternativa para la producción de dicho compuesto.

1. Materiales y Métodos

Para el establecimiento de los cultivos, se siguió la metodología de Matos (2007), seleccionando plantas silvestres sanas, de 10 cm de longitud, colectadas y mantenidas bajo condiciones naturales en los jardines del Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias de la Universidad del Zulia (Maracaibo-Venezuela), para aislar y obtener las yemas apicales que fueron utilizadas como explantes. Estas yemas se desinfectaron bajo condiciones asépticas en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 6%, durante 20 min en constante agitación. Posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril.

Estas yemas provenientes de las plantas silvestres se cultivaron y multiplicaron en medios de cultivo constituidos por las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962), 3% de sacarosa, 100 mg.L^{-1} de ácido ascórbico, 1 mg.L^{-1} de Kinetina y 1 mg.L^{-1} de BA (Benciladenina) y 0,9% de agar. El pH del medio se ajustó a 5,7- 5,8 y se esterilizó en un autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura y 1 atm de presión por 20 min. Las yemas se sembraron en frascos de vidrio cerrados y se colocaron en un cuarto de cultivo a una temperatura de $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ bajo luz continua fluorescente de $40 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Las plantas obtenidas a partir de las yemas anteriores se sembraron en medios controles compuestos de sales de Murashige y Skoog más 1 mg.L^{-1} de Kinetina y 1 mg.L^{-1} de BA (benciladenina) y en medios de cultivo modificados añadiendo distintas concentraciones de NaCl a 100, 200 y 300 mM y CoCl_2 a 10, 20 y 50 μM . Se sembraron 3 plantas de aproximadamente 3 cm de longitud por cada frasco, por día, por tratamiento, con controles para cada día, tanto con NaCl como con CoCl_2 , para un total de 72 plantas analizadas, con subcultivos cada 30 días hasta el momento de la toma de las muestras. Para ello, se recolectaron hojas de plantas que habían sido cultivadas *in*

vitro durante 30, 60 y 90 días para los análisis de contenido de aloína. Se recolectaron las hojas más largas, de aproximadamente la misma longitud. Todos los análisis se hicieron por triplicado.

El proceso de extracción y análisis del contenido de aloína se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Park et al. (1998) en las muestras (por triplicado), tanto de hojas de plantas silvestres como en las hojas de los plantas regeneradas *in vitro*.

El análisis de los extractos etanólicos del compuesto estándar y de las muestras se llevó a cabo mediante separación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), en un sistema Agilent 1100, del Laboratorio de Tecnología de Alimentos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-Zulia.

Los resultados se analizaron con el programa SPSS v.19, mediante análisis de varianza (ANOVA) y las diferencias entre medias se estimaron empleando la prueba del test de Tukey para $p \leq 0,05$.

2. Resultados

La curva de calibración fue lineal, con límite de detección para la aloína de 0,05 mg.ml⁻¹ con un tiempo de retención de 42,494 min (Figura 1A). Dado que la aloína se presenta en sus dos isoformas: aloína A y aloína B, tal como se ha descrito con anterioridad (Manitto et al., 1990), para su cuantificación se sumaron los resultados obtenidos para cada pico, obteniéndose el valor total de aloína presente en el extracto. En la Figura 1B puede observarse el cromatograma de la solución del compuesto estándar de aloína (Sigma, 97%). Los picos 1a. y 1b. corresponden a los de la aloína A y B respectivamente.

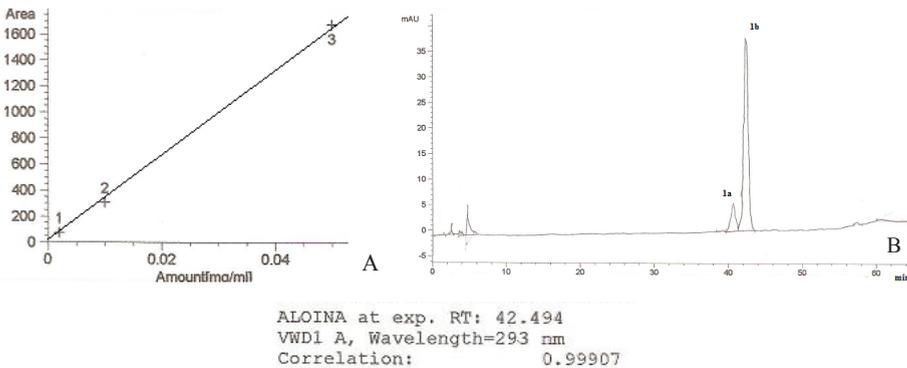


FIGURA 1. A. Curva de calibración del estándar de aloína. B. Cromatograma de la solución del compuesto estándar de aloína (Sigma, 97%). 1a: aloína A, 1b: aloína B.

2.1. Efecto de diferentes concentraciones de CoCl_2 (10 μM , 20 μM y 50 μM) sobre la producción de aloína en hojas de plantas regeneradas *in vitro*.

Para llevar a cabo el presente estudio, los medios de cultivo se suplementaron con dos compuestos (NaCl y CoCl_2) para determinar el efecto elicitor de cada uno de ellos. En el caso del CoCl_2 se utilizaron medios de cultivo con concentraciones de 10, 20 y 50 μM , aumentando, en cada caso, las concentraciones de CoCl_2 , ya que las sales MS tienen dentro de su composición este metal.

Como se observa en la Figura 2, entre las concentraciones de CoCl_2 utilizadas la que obtuvo mayor producción de aloína fue 20 μM (3,72 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasa seca), seguido de 10 μM (0,63 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasa seca) y 50 μM (0,36 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasa seca), todas observadas al día 90 de tratamiento y por último en el control del día 30 (0,83 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasa seca). Para el resto de los días no se detectó aloína. El contenido de aloína obtenido con 20 μM de CoCl_2 para el día 90 fue mayor al encontrado en el control.

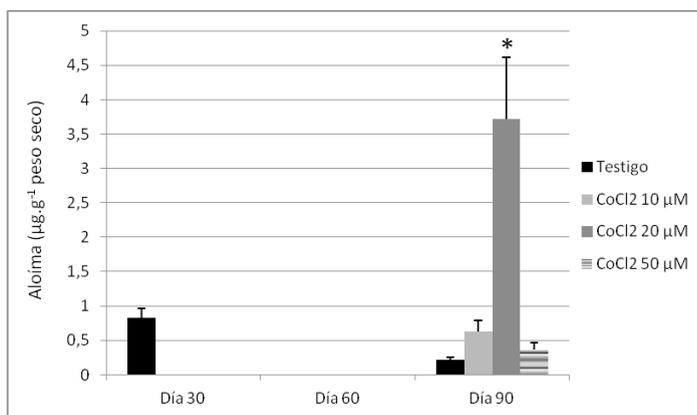


FIGURA 2. Producción de aloína en hojas de plantas de *Aloe vera* regeneradas *in vitro* con diferentes concentraciones de CoCl_2 (10 μM , 20 μM y 50 μM) durante 90 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas de los promedios más sus desviaciones estándar (Tukey, $p \leq 0,05$).

2.2. Efecto de diferentes concentraciones de NaCl (100mM, 200mM y 300mM) sobre la producción de aloína en hojas de plantas regeneradas *in vitro*.

En la Figura 3 se observan los resultados de las plantas mantenidas en tratamiento con NaCl . Para el día 30 el control tuvo una producción de

1,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomasa seca, con 100mM, 200 mM y 300 mM no se detectó producción de aloína.

A los 60 días de tratamiento, la producción de aloína en las hojas de las plantas sembradas en el medio control fue de 8,22 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomasa seca; con 100 mM fue de 18,94 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasa seca siendo ésta la concentración y el día en el cual hubo mayor producción de este metabolito. Para 200 mM no se detectó aloína. Con 300 mM la producción fue de 16,79 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomasa seca.

Durante el día 90, no se detectó aloína en el medio testigo, con NaCl 100 mM hubo una producción de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomasa seca y de 0,87 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasa seca con 200 mM. El NaCl 300 mM aparentemente inhibió la síntesis de aloína o la cantidad es sumamente baja como para ser detectada.

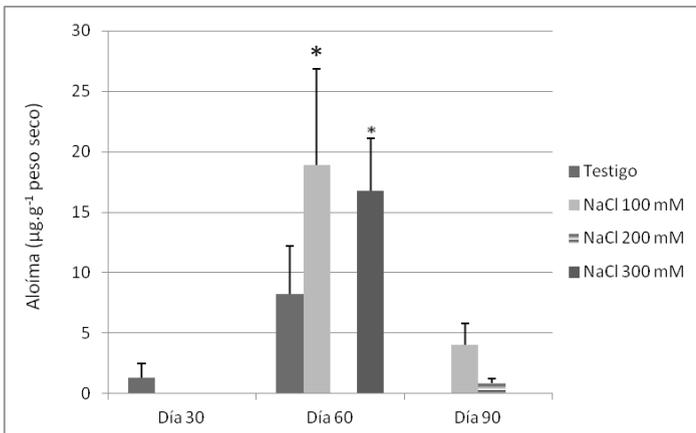


FIGURA 3. Producción de aloína en hojas de plantas de *Aloe vera* regeneradas *in vitro* con diferentes concentraciones de NaCl (100 mM, 200 mM y 300 mM) durante 90 días. Los asteriscos (*) representan diferencias significativas de los promedios más sus desviaciones estándar (Tukey, $p \leq 0,05$).

3. Discusión

Los tratamientos con NaCl 100 Mm y 300 Mm al día 60 y CoCl₂ 20 μM al día 90, promovieron la mayor producción de aloína de los medios utilizados. En ambos casos, la producción de aloína fue mayor a la observada en los testigos. Estudios anteriores han demostrado que la adición de metales pesados y sales pueden causar un incremento en la producción de metabolitos secundarios (Hussain et al., 2012; Matos, 2005).

En cultivos de raíces de *Panax ginseng* se observaron incrementos de 1,15 y 1,13 veces en el contenido y productividad de saponina de ginseng al agregar 0,1% w/v de NaCl, (Jeong y Park, 2007). En el presente trabajo, la producción de aloína fue muy variable con este compuesto, observándose sin embargo que para el día 60 la producción de aloína con 100 y 300 mM de NaCl fue mayor con respecto al testigo. Esto indicó que hubo diferencias en cuanto a las concentraciones de NaCl utilizadas siendo la de 100 mM la concentración óptima para la producción de aloína. Este hecho podría estar relacionado con que el estrés abiótico ocasionado por el NaCl puede activar la cascada de señales de las protein kinasas en las plantas (Zhu, 2002). Además, se ha descrito que la exposición a altas concentraciones de NaCl en cultivos *in vitro* puede ocasionar un incremento de la tolerancia a la salinidad de ciertas plantas, como ha ocurrido en híbridos de maíz (Pesqueira et al., 2003), lo cual puede constituir un mecanismo fisiológico de defensa frente al estrés ocasionado por el NaCl, hecho que debe considerarse en futuros estudios de selección de plantas con tolerancia a la salinidad, altamente productoras de compuestos de interés, como la aloína en *A. vera*.

Por otro lado, el tratamiento con CoCl_2 20 μM durante 90 días ocasionó un ligero incremento en el contenido de aloína. Estos resultados coincidieron con los de Matos (2005) quien observó que al añadir 50 μM de CoCl_2 se incrementó la producción de aloína en suspensiones celulares de *A. vera*.

Considerando que la producción de aloína no siguió un patrón general para los días y compuestos utilizados, observándose incluso ausencia de producción en algunos casos, hay que resaltar que debido a su condición de metabolitos secundarios, los compuestos fenólicos como la aloína, son un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista metabólico y la producción de estos compuestos dependerá en gran medida de la composición del medio de cultivo; así como también de factores ambientales, tales como la intensidad luminosa y el estadio de desarrollo de la planta. Todos estos factores pueden causar variaciones cualitativas y cuantitativas en la producción de dichos compuestos por lo que el uso exitoso de elicitores requiere una intensa estandarización con el objeto de lograr una perfecta combinación de medio de cultivo y el tipo correcto de elicitor y su concentración (Baenas et al., 2014; Cai et al., 2011), factores importantes para superar las limitaciones de la producción de metabolitos secundarios incluyendo la estandarización de parámetros físicos y químicos (Shilpa et al., 2010).

Otra posible explicación de por qué en algunos casos no fue posible la detección de aloína podría estar relacionada con el hecho de que se ha observado que la aloína se oxida en los cultivos *in vitro* para dar lugar a la aloe-emodina (Manitto et al., 1990; Matos, 2005, Matos, 2008; Lozano et al., 2011). Además, las células *in vitro* presentan un estado de desarrollo y diferenciación distintos a los de la planta adulta, lo que podría conducir a la expresión o represión de una determinada ruta metabólica y por tanto,

es posible que determinados compuestos no sean observados o lo hagan en menor número y/o cantidad en los materiales *in vitro*. Es igualmente posible que dichas diferencias se deban a condiciones endógenas, ya que a pesar de la homogeneidad del sistema *in vitro*, persisten fuentes de variación difíciles de controlar. En las plantas, la diferenciación consiste en el conjunto de procesos moleculares, bioquímicos y fisiológicos mediante los cuales una célula meristemática adquiere propiedades metabólicas, estructurales y/o funcionales diferentes a las de la célula progenitora, lo que proporciona a los cultivos características propias y únicas, aun cuando estos provengan de una misma planta.

Conclusión

Este estudio demuestra que el contenido de aloína en hojas de plantas de *Aloe vera* regeneradas *in vitro* aumenta considerablemente al añadir NaCl 100 mM y 300 mM durante 60 días al medio de cultivo, es decir, que este compuesto se comporta como un elicitador y, asimismo, que los cultivos *in vitro* son una plataforma útil para incrementar la producción de metabolitos secundarios de importancia económica y medicinal en *A. vera* por lo cual son necesarios nuevos trabajos para el desarrollo de técnicas más rápidas y económicamente viables para la obtención de compuestos de interés como la aloína.

Referencias

- Baenas, N., García-Viguera, C., Moreno, D. (2014). Elicitation: A Tool for Enriching the Bioactive Composition of Foods. *Molecules* 19: 13541-13563.
- Cai, Z., Riedel, H., Thaw Saw, N.M., Mewis, I., Reineke, K., Knorr, D., Smetanska, I. (2011). Effects of elicitors and high hydrostatic pressure on secondary metabolism of *Vitis vinifera* suspension culture. *Process Biochemistry* 46: 1411-1416.
- Domínguez-Fernández, R.N., Arzate-Vázquez, I., Chanona-Pérez, J.J., Welte-Chanes, J.S., Alvarado-González, J.S., Calderón-Domínguez, G., Garibay-Febles, V., Gutiérrez-López, G.F. (2012). El gel de *Aloe vera*: Estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11(1): 23-43.
- Epifano, F., Fiorito, S., Locatelli, M., Taddeo, V.A., Genovese, S. (2014). Screening for some sources of prenyloxanthraquinones: *Senna alexandrina* Mill. and *Aloe vera* (L.) Burm. F. *Natural Product Research* 29 (2): 180-184. doi: 10.1080/14786419.2014.971792.
- Fox, L.T., du Plessis, J., Gerber, M., van Zyl, S., Boneschans, B., Hamman, J. (2014). *In vivo* skin hydration and anti-erythema effects of *Aloe vera*, *Aloe ferox* and *Aloe*

- marlothii* gel materials after single and multiple applications. *Pharmacognosy Magazine* 10(38): 392-403.
- Harlev, E., Nevo, E., Lansky, E.P., Ofir, R., Bishayee, A. (2012). Anticancer Potential of Aloes: Antioxidant, antiproliferative, and immunostimulatory attributes. *Planta Med.* 78: 843-852.
- Hussain, S, Fareed, S., Ansari, S., Rahman, A., Ahmad, I.Z., Saeed, M. (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J. Pharm. Biomed. Sci.* 4(1): 10-20.
- Jeong, G.A., Park, D.H. (2007). Enhanced secondary metabolite biosynthesis by elicitation in transformed plant root system. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 130: 436-446.
- Lozano, L., Nova, C., Mejía, L. (2011). Estabilización del gel de *Aloe barbadensis* Miller y disminución de su concentración por adsorción en columna con carbón activado. *Revista ION, Bucaramanga* (Colombia) 24(1): 61-67.
- Manitto, P., Monti, D., Speranza, G. (1990). I principali costituenti dell'Aloe di interesse farmaceutico e cosmetico. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*: 1297.
- Matos A. (2005). Producción de aloesina, aloína A y B y aloe-emodina en cultivos *in vitro* de *Aloe vera* L. Tesis de Doctorado. Universidad de Santiago de Compostela. España. Departamento de Fisiología Vegetal. 233p.
- Matos, A. (2007). Optimización de un protocolo de cultivo *in vitro* para la micropropagación de *Aloe vera* L. *Ciencia*, 15 (3): 319-330.
- Matos, A. (2008). Aloesin, aloin and aloe-emodin production in *Aloe vera* L. calli. *Ciencia* 16(4): 389-395.
- Mendhulkar, V.D., Ali Vakil, M.M. (2013). Elicitation of flavonoids by salicylic acid and *Penicillium expansum* in *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Nees. cell culture. *Research in Biotechnology* 4(2): 01-09.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Park, M.K., Park, J.H., Kim, N.Y., Shin, Y.G., Choi, Y.S., Lee, J.G., Kim, K.H., Lee, S.K. (1998). Analysis of 13 phenolic compounds in aloe species by high performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* 9(4): 186-191.
- Pérez-Alonso, N.L., Arana, F., Capote, A., Pérez, A., Sosa R., Mollineda, A., Jiménez, E. (2014). Estimulación de cardenólidos en brotes de *Digitalis purpurea* L. cultivados *in vitro* mediante elicitores. *Rev. Colomb. Biotecnol.* XVI(1): 51-61.
- Pesqueira, J., García, M.D., Molina, M.C. (2003). NaCl tolerance in maize (*Zea mays* ssp. *mays*) x *Trypsacum dactyloides* L. hybrid calli and regenerated plants. *Spanish Journal of Agricultural Research* 1(2): 59-63.
- Plazas Ávila, MDLO. (2015). Caracterización y mejora genética de la berenjena (*Solanum melongena*) para compuestos bioactivos. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València. doi:10.4995/Thesis/10251/48563. <http://hdl.handle.net/10251/48563>
- Praveen, N., Thiruvengadam, M., Yang, Y.S., Kim, S.H., Murthy, H.N., Chung, I.M. (2014). Production of gymnemic acid from hairy root cultures of *Gymnema*

- sylvestre* R. Br. as influenced by polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and their antioxidant activity. *Industrial Crops and Products* 54: 54-61.
- Ramírez, L.G., Morón de Salim, A., Catinella, R., Castillo, L. (2012). Efecto bacteriostático y/o bactericida del extracto de gel de *Aloe vera* sobre cultivos de *Listeria monocytogenes*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 62(1): 73-78.
- Ruiz-García, Y., López-Roca, J.M., Bautista-Ortín, A.B., Gil-Muñoz, R., Gómez-Plaza, E. (2014). Effect of combined use of benzothiadiazole and methyl jasmonate on volatile compounds of Monastrell wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 65(2): 238-243; doi: 10.5344/ajev.2014.13119
- Shilpa K., K. Varun, B.S, Lakshmi. (2010). An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *J. of Plant Sciences* 5(3): 222-247.
- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:247-273.
- Zhu, C., Miao, G., Guo, J., Huo, Y., Zhang, X., Xie, J., Feng, J. (2014). Establishment of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. hairy root culture and optimization of its culture conditions for the production of triptolide and wilforine. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24(6): 823-834. <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1402.02045>.