

## INFLUENCIA DEL SULFATO DE BERBERINA EN PROCESOS FISIOLÓGICOS DE *SCENEDESMUS OBLIQUUS* (TURP.) KUTZING<sup>1</sup>

POR JAIME RAUL JATIMLIANSKY<sup>2</sup> Y ENRIQUE M. SIVORI<sup>3</sup>

### ABSTRACT

It has been studied the effects of berberine sulphate on autotrophic growth and respiration of *Scenedesmus obliquus* in ARNON medium with and without glucose addition.

Berberine at 10  $\mu$ M and 100  $\mu$ M inhibited the algae growth 49,7 % and 99 % respectively.

Similar influence was observed on  $O_2$  and  $CO_2$  exchanges in darkness. Algal number variation with a constant berberine concentration had not influence on  $O_2$  consumed, although higher inhibition was found when alkaloid amount was increased.

Glucose uptake and  $O_2$  consumption were affected by all the berberine concentrations used.

However, as apparent photosynthesis was slightly affected by berberine (unpublished) it is doubtful to explain the total inhibition of *Scenedesmus* growth by this mechanism.

It is considered that berberine probably affects algae growth by other processes.

La posible acción tóxica de sustancias excretadas por los vegetales ya fue propuesta por De Candolle y sostenida más tarde por Whitney y Cameron (cit. por Demolon, 1965) Whittaker y Feeny (1971) incluyen a los alcaloides entre las sustancias que afectan el "crecimiento, comportamiento o biología" de una planta y que son segregadas por otros vegetales. Las denominan sustancias aleloquímicas.

Estudiando la actividad de varios alcaloides sobre *S. obliquus* se ha encontrado que algunos de ellos manifiestan un efecto inhibitorio (Sívori y Jatimliansky: 1965, 1970) (Jatimliansky y Sívori, 1969). Varios autores han determinado la influencia de la berberina en la síntesis de RNA y de proteínas, trabajando con células KB, bacterias, hongos o protozoarios

<sup>1</sup> Trabajo realizado en el Instituto de Fisiología Vegetal de la Universidad Nacional de La Plata.

<sup>2</sup> Jefe de T. P. de la Fac. de Ciencias Naturales y Museo. U. Nac. de La Plata. Miembro de la Carrera del Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

<sup>3</sup> Director del Instituto de Fisiología Vegetal. Univ. Nac. de La Plata.

(Subbaiah, 1967; Mollov, 1968; Amin, 1969); la actividad bactericida y fungicida (Amin, 1969; Modak, 1970) o en la formación de complejos con DNA (Krey, 1969).

Dicho alcaloide ha sido aislado por diversos investigadores en corteza de especies del género *Berberis* (*B. darwinii* Hook, etc.) en rizomas de *Coptis quinque*, en el látex de *Argemone mexicana*, etc.

Con el objeto de obtener mayor información sobre el mecanismo por el cual actúa sobre el alga, se estudiaron algunos procesos fisiológicos.

Se analizó el efecto que ejerce sobre el crecimiento autotrófico, y sobre la respiración de las algas en un medio inorgánico, al que luego se le incorporó glucosa.

#### MATERIAL Y METODOS

Las algas clonales empleadas se cultivaron axénicamente sobre agar-DETMER<sup>1</sup>. Una suspensión masiva se lavó 4 veces con solución ARNON (1955)<sup>2</sup> y se cultivó asépticamente en este medio durante 48 hs antes de comenzar los ensayos, en tubos de 24 x 160 mm, con un volumen total de 30 ml. Las condiciones se detallan en la figura 1.

Para realizar la experiencia, las algas sometidas previamente a una iluminación de aproximadamente 5 horas, fueron lavadas nuevamente cuatro veces con solución de ARNON, empleándose en el ensayo una suspensión de número o volumen de algas conocido.

El cultivo se efectuó en tubos de ensayo de 15 x 150 mm según la metodología empleada anteriormente (10). Los tratamientos se realizaron por duplicado y los testigos por cuadruplicado.

Se midió la actividad respiratoria manométricamente (Umbreit et al., 1959) utilizando un respirómetro tipo Warburg sistema W. Möhle DBP con una capacidad útil de 9 vasos incluyendo el termobarómetro, empleándose 72 agitaciones/min con una amplitud de 4 cm. El alcaloide (como sulfato) se disolvió en el medio de ARNON. La glucosa fue disuelta en este mismo medio, y se la colocó en la expansión del frasco. En primer lugar se midió la respiración sin glucosa ("respiración endógena") y luego de poner en contacto el glúcido con las algas, la respiración con glucosa. Dado el fuerte consumo de O<sub>2</sub>, cuya magnitud era superior a la capacidad de medida del manómetro, cada 60 min se abrió la rama cerrada, se equilibró el sistema y se prosiguió con la operación durante un tiempo de consumo de glucosa de aproximadamente 3 horas. Alcanzando el mismo se

<sup>1</sup> Constituido por: (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Ca 1 g; PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> 0,25 g; SO<sub>4</sub>Mg 0,25 g; ClK 0,25 g; FeEDTA 30,7 mg; Bacto-agar 15 g en 1 litro; pH 7,0.

<sup>2</sup> Medio de ARNON, contiene por litro: NO<sub>3</sub>K 2022,1 mg; SO<sub>4</sub>Mg 120,4 mg; Cl<sub>2</sub>Ca 55,5 mg; FeEDTA 30,7 mg-13 % Fe; PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K 136,1 mg; PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> 174,2 mg; y micronutrientes, 1 ml de una solución que contiene BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub> 2,864 mg; Cl<sub>2</sub>Mn.4 H<sub>2</sub>O 1,804 mg; SO<sub>4</sub>Zn. 7 H<sub>2</sub>O 0,22 mg; SO<sub>4</sub>Cu. 5 H<sub>2</sub>O 0,078 mg; VO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub> 0,011 mg; y Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> 4 H<sub>2</sub>O 0,171 mg; pH 6,7.

extrajo 0,5 ml de la suspensión de las algas, se "desproteinizó", se filtró por papel y se dosaron las sustancias reductoras según el método de Somogyi-Nelson (1944), efectuándose las lecturas a 640 nm en un Spectronic<sub>20</sub>.

En algunos casos se determinó solamente el consumo de O<sub>2</sub> para realizar un mayor número de repeticiones o de variables por ensayo. Se utilizaron distintas concentraciones del alcaloide y/o también, variaciones en el número de algas.

Para medir el volumen de algas a sembrar se empleó una centrífuga Clay Adams (para microhematocrito) y tubos capilares de 1,5 × 75 mm. Estos, se llenaron con la suspensión de las algas y se cerraron a la llama en un extremo. Se efectuaron 2 centrifugaciones sucesivas de 5 min cada una, rotando el capilar al finalizar la primera. Se midió la longitud del volumen ocupado por las algas con una lupa con ocular micrométrico calibrado ("Wild"). Se calculó el volumen de las algas en % del volumen total de la suspensión empleada al relacionar la longitud del volumen ocupado por las algas expresado en mm con la longitud de la suspensión original en mm (volumen de las algas en % o "algotrito"). A partir de este valor se determinó el volumen a sembrar de la suspensión con algas.

El tiempo de contacto entre las algas y el alcaloide, previo a las mediciones, fue en todos los casos mayor de 60 min.

## RESULTADOS

Los resultados del crecimiento autotrófico, de la actividad respiratoria, de la glucosa consumida y del consumo de O<sub>2</sub> de las algas, se exponen en las tablas y en las figuras correspondientes.

Es evidente el efecto inhibitorio de la berberina sobre el crecimiento de las algas que se aproximó prácticamente al 100 % entre las concentraciones 50 y 60  $\mu$ M, dando por resultado una curva exponencial (figura 1).

Los efectos inhibitorios tanto para el O<sub>2</sub> captado como para el CO<sub>2</sub> desprendido son semejantes cuando se expresan en % de los testigos (Tabla 1). Una segunda experiencia dio valores similares, con 50,1 % para el O<sub>2</sub> y 39 % para el CO<sub>2</sub>.

Como puede observarse, con 400  $\mu$ M solo se alcanzó aproximadamente el 50 % de inhibición de la actividad respiratoria. Este valor se obtuvo con 10  $\mu$ M en lo que respecta al crecimiento (figura 1).

El consumo de O<sub>2</sub> tanto en las condiciones de "respiración endógena" (antes del agregado de glucosa) como con el agregado del glúcido fue también afectado por el alcaloide (figura 2). Se puede apreciar que lo es en forma independiente del volumen de algas empleado. A su vez, no hay mayor diferencia en el grado de inhibición antes que después de su agregado. Es de mencionar que todos los valores tienen una variación

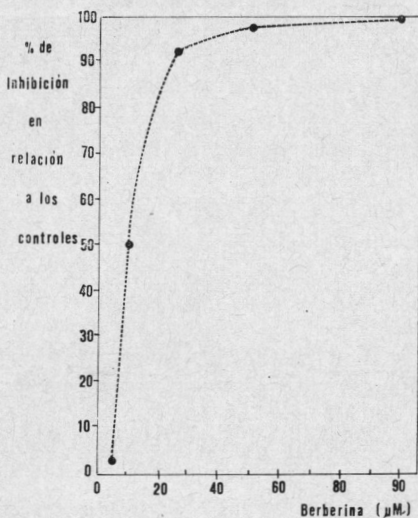


Fig. 1. — Acción inhibitoria de la Berberina sobre el crecimiento de *Scenedesmus obliquus*. Lecturas efectuadas con un hemocitómetro tipo Neubauer (Hawksley) al tercer día de comenzar el ensayo. Temperatura: 28°C. Fuente de luz: lámpara con filamento de tungsteno de 100 W. Iluminación: 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Intensidad de luz: 4.200 lux. Inóculo: 580 algas/mm<sup>3</sup>; Medio de cultivo según Arnon, aireado continuamente. Volumen total: 10 ml en tubos de 15 × 150 mm colocados en un baño de agua. Cada concentración por duplicado, los testigos por cuadruplicado. (En la línea de las abscisas donde dice 90 léase 100)

TABLA 1

Efecto de la berberina en la actividad respiratoria de « S. obliquus » en medio Arnon

|                                    | Control | Alcaloide | Inhibición % |
|------------------------------------|---------|-----------|--------------|
| CO <sub>2</sub> emitido . . . . .  | 48,0    | 24,9      | 48,1         |
| O <sub>2</sub> absorbido . . . . . | 64,9    | 32,0      | 50,7         |

Los valores indican µl de gas intercambiados por las algas en 60 min a 28° C. Concentración de algas empleadas: 92.600/mm<sup>3</sup>. Volumen de medio nutriente: 4 ml. Berberina 400 µM. En la parte central de los vasos se colocó 0,2 ml de agua destilada o de solución de HOK al 20% y un papel Whatman N° 1 de 16 × 22 mm plegado. Los valores son promedios de 2 vasos.

$$\text{Inhibición \%} = \mu\text{l de gas intercambiados} \frac{(\text{Test.} - \text{Trat.})}{\text{Testigo}} \cdot 100$$

bastante amplia pero, en general, no siguen una tendencia definida. En otra experiencia se obtuvo 69 % de inhibición como valor máximo.

En la figura 3 se representó la influencia sobre el consumo de O<sub>2</sub> empleando tres concentraciones del alcaloide con un mismo volumen de algas. Puede observarse que la inhibición es mayor al ser más altas las

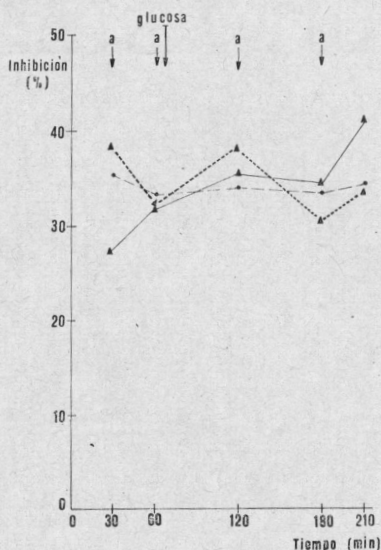


Fig. 2. — Influencia de la Berberina sobre el consumo de O<sub>2</sub> con distintos volúmenes algales (sin y con agregado de glucosa). Condiciones experimentales: temperatura 28°C; berberina 50 µM; medio nutriente según Arnon; volumen 4 ml; vol. de algas incorporado en (—●—) 110,8 µl; en (---●---) 94,2 µl y en (---▲---) 55,4 µl; glucosa, agregada a los 60 min de comenzar el ensayo, 5.33 mM; vaso central con 0,2 ml de solución de HOK al 20 % y un papel de filtro plegado: aire en la fase gaseosa. A los tiempos indicados (α) se abrió la rama cerrada, se equilibró el sistema y se prosiguió con la operación.

concentraciones de la berberina, pero pasados los 120 min los valores tienden a estabilizarse en determinados niveles.

Cuando se estudió el consumo de glucosa y se empleó una concentración de alcaloide, variando el volumen de algas utilizadas, se observó una tendencia a incrementar el consumo de glucosa en ambos casos. Se debe hacer notar que en todos los tratamientos se consumió menos glucosa que en los respectivos controles. Excepto en dos casos (ensayo 1: 111,6 µl; ensayo 3: 110,8 µl) en los demás los % de inhibición fluctuaron entre 26,9 y 39,4 % (Tabla 2). Puede observarse, que en el ensayo 2 con 63,8 µl de algas se ha obtenido un consumo de 22,2 mg % mientras que

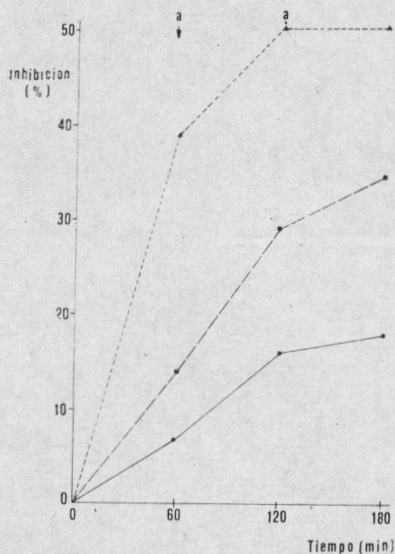


Fig. 3. — Inhibición del consumo de  $O_2$  con distintas concentraciones de alcaloide expresado en % de los testigos (con glucosa). Condiciones experimentales: ver figura 2. A los tiempos indicados (a) se reiniciaba la operación según se indica en dicha figura. Berberina (—●—) 13.2  $\mu$ M, (—◻—) 33  $\mu$ M, (—▲—) 66  $\mu$ M. Glucosa 5,75 mM. Vol. de algas incorporado 68  $\mu$ l/4 ml.

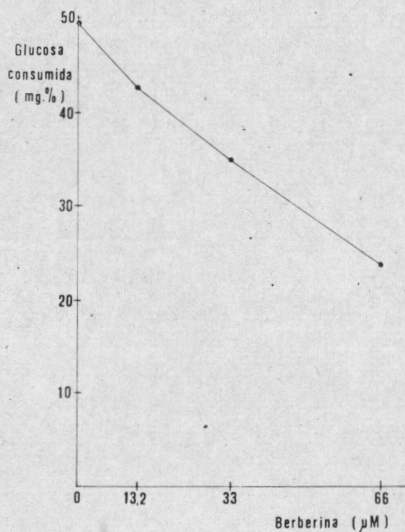


Fig. 4. — Relación entre la glucosa consumida y distintas concentraciones del alcaloide. Condiciones experimentales: ver figura 2. Algas 68  $\mu$ l/4ml. Glucosa inicial 5,75 mM. Duración del ensayo 3 h 26 min. Cada variable se realizó por duplicado.

TABLA 2

Efecto de la berberina sobre el consumo de glucosa con diferentes volúmenes algales

| Experiencia<br>Nº | Glucosa consumida<br>(mg/100 ml medio) |             | Inhibición<br>(%) | Volumen<br>de las algas<br>( $\mu$ l) |
|-------------------|--|-------------|-------------------|---------------------------------------|
|                   | Testigo                                | Tratamiento |                   |                                       |
| 1 .....           | 14,4                                   | 10,5        | 26,9              | 37,2                                  |
|                   | 38,9                                   | 26,6        | 31,6              | 74,4                                  |
|                   | 57,7                                   | 26,2        | 54,6              | 111,6                                 |
|                   | 69,1                                   | 41,9        | 39,4              | 148,8                                 |
| 2 .....           | 22,2                                   | 13,5        | 39,2              | 63,8                                  |
|                   | 36,4                                   | 25,5        | 29,9              | 95,7                                  |
|                   | 53,7                                   | 32,9        | 38,7              | 127,6                                 |
|                   | 59,1                                   | 42,6        | 27,9              | 130,2                                 |
| 3 .....           | 32,2                                   | 22,0        | 31,7              | 55,4                                  |
|                   | 35,8                                   | 23,5        | 34,4              | 77,6                                  |
|                   | 36,8                                   | 25,0        | 32,1              | 94,2                                  |
|                   | 50,2                                   | 25,2        | 49,8              | 110,8                                 |

Condiciones experimentales: ver figura 2. Berberina 50  $\mu$ M. Glucosa inicial: 5,06; 5,32 y 5,33 mM en exp. 1, 2 y 3, respectivamente. La glucosa consumida se determinó a las 3 horas de comenzados los experimentos.

en el ensayo 3 con 55,4  $\mu$ l el consumo fue de 32,2 mg %. Estas diferencias entre ensayos pueden atribuirse a distintos estados fisiológicos de las algas.

El incremento de la concentración del alcaloide provocó una inhibición creciente en el consumo de glucosa (figura 4).

## DISCUSION

Es evidente la inhibición de la división celular por berberina en *S. obliquus* que da por resultado una representación de tipo exponencial del proceso (fig. 1).

Hasta el momento se desconoce el mecanismo bioquímico de la reacción. Con xilopina se inhibió la fotosíntesis aparente lo que podría explicar en ese caso la anulación del crecimiento (11). Con berberina no ocurrió así ya que solo se inhibió un 10-20 % respecto a los controles (no publicados); el consumo de  $O_2$  alcanzó como máximo un 69 %, pero los valores de inhibición frecuentes oscilaron entre 30 y 50 %.

Dado que la actividad fotosintética se traduce en una mayor o menor abundancia del sustrato respiratorio, un agregado exógeno de glucosa permite prolongar el tiempo de medida del consumo de  $O_2$  pudiendo hacer más evidente el efecto de la berberina. Bajo estas condiciones la actividad del alcaloide fue más estable en el tiempo a una determinada concentración. Por ejemplo (fig. 3, -▲-) entre los 60 y 120 min inhibió aproximadamente el 50 %. Este valor se repitió entre los 120 y 180 min. Una relación semejante se obtuvo con las tres concentraciones empleadas en la experiencia.

El tiempo transcurrido hasta alcanzar la inhibición máxima varió entre ensayo y ensayo (ver fig. 2 y 3) lo cual, dadas las condiciones experimentales similares, debe depender de distintas condiciones fisiológicas del alga, como ser: historia previa de la misma, número de algas en el cultivo, volumen celular, época del año, etc (Kylin, 1972).

Los resultados obtenidos indican que además de los efectos en los procesos estudiados debe existir otro (u otros) mecanismo fisiológico por medio del cual la berberina inhibe el crecimiento en *S. obliquus*.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Prof. S. M. Albónico (U.B.A.) por la gentil donación del sulfato de berberina y al Sr. M. Nicolet por la ayuda prestada en el calibrado del ocular micrométrico.

BIBLIOGRAFIA

1. AMIN, A. H., SUBBAIAH, T. V. and ABBASI, K. M., 1969. Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay and mode of action. *Can J. Microbiol.*, 15 (9): 1067-1076, 7 fig.
2. ARNON, D. I., ICHIOKA, P., WESSEL, G., FUJIWARA, A. and WOOLLEY, J., 1955. Molybdenum in relation to nitrogen metabolism. I Assimilation of nitrate nitrogen by *Scenedesmus*. *Physiol. Plant.* 8 (3): 538-551, 9 fig.
3. DEMOLON, A., 1965. Principios de Agronomía. I: 428. Ed. Omega, 527 pág. Barcelona.
4. JATIMLIANSKY, J. R. y SÍVORI, E. M., 1969. Inhibición del crecimiento de *Scenedesmus obliquus* por alcaloides. *Anales Soc. Cient. Arg.*, 187 (3-4): 49-57, 1 fig.
5. KREY, A. K. and HAHN, F. E., 1969. Berberine: complex with DNA. *Science*, 166 (3906): 755-757, 2 fig.
6. KYLIN, A., SUNDBERG, I. and TILLBERG, J. E., 1972. Titration with 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU) as evidence for several photophosphorylation sites in *Scenedesmus*. *Physiol. Plant.* 27 (3): 376-383, 5 fig.
7. MODAK, S., MODAK, M. J. and VENKATRAMAN, A., 1970. Mechanism of action of berberine on *Vibrio cholerae* and *V. cholerae* biotype el Tor. *Indian J. Med. Res.*, 58 (11): 1510-1522. *Cit. Chem. Abs.*, 74 (17): 137 (1971).
8. MOLLOV, N. M., DUCHEVSKA, K. B., SILYANOVSKA, K. and STOICHEV, S., 1968. Cytotoxic effect of alkaloids from *Tbhalictrum minus elatum* and their derivatives. *C. R. Acad. Bulg. Sci.*, 21 (6): 605-608, 1 tabla.
9. NELSON, N., 1944. A photometric adaptation of the SOMOGYI method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153 (2): 375-380, 1 fig.
10. SÍVORI, E. M. y JATIMLIANSKY, J. R., 1965. Inhibidores del crecimiento de *Scenedesmus obliquus* en *Laurus nobilis* L. Actas 1er. Coloq. Latinoamer. Biol. Suelo. B. Blanca (Arg.) 715 pág UNESCO.
11. SÍVORI, E. M. and JATIMLIANSKY, J. R., 1970. Effects of xylopine on physiological activities of *Scenedesmus obliquus*. *Plant. & Cell. Physiol.*, 11 (6): 921-926, 4 fig.
12. SUBBAIAH, T. V. and AMIN, A. H., 1967. Effect of berberine sulphate on *Entamoeba histolytica*. *Nature* 215 (5100): 527-528.
13. UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. and STAUFFER, J. F., 1959. Manometric techniques and tissue metabolism. *Burgess Pub. Co.* 338 pág. Minneapolis.
14. WHITTAKER, R. H. and FEENY, P. P., 1971. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science*, 171 (3973): 757-770, 6 fig.