



---

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE YUCATAN  
FACULTAD DE QUIMICA**

**"ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE ALCALOIDES  
TOTALES EN UNA LINEA TUMORAL EN  
SUSPENSION DE *Catharanthus roseus*, POR  
EFECTO DE UN INDUCTOR FUNGAL"**

**T E S I S**

PRESENTADA POR:

*Maritza Evelyn de Jesús Molina Pérez*

EN SU EXAMEN PROFESIONAL  
EN OPCION AL TITULO DE

**QUIMICO BIOLOGO BROMATOLOGO**

MERIDA, YUCATAN, MEXICO.

1991

BIBLIOTECA **CICY**

# INDICE GENERAL

|  | PAGINA |
|--|--------|
| INTRODUCCION   | 1      |
| CAPITULO I. ANTECEDENTES.  |        |
| 1.1. DESCRIPCION BOTANICA DE <u>Catharanthus roseus</u> .  | 3      |
| 1.1.1. DESCRIPCION GEOGRAFICA.   | 3      |
| 1.1.2. IMPORTANCIA Y NOMENCLATURA DE LA PLANTA.  | 4      |
| 1.2. CULTIVO DE TEJIDOS: TERMINOLOGIA.   | 5      |
| 1.2.1. CULTIVO DE CALLOS.  | 5      |
| 1.2.2. CULTIVO DE TUMORES.   | 6      |
| 1.2.3. CULTIVO DE CELULAS EN SUSPENSION.   | 6      |
| 1.2.3.1. Ventajas esperadas para un cultivo de<br>células sobre uno convencional de<br>plantas.                        | 7      |
| 1.3. METABOLISMO SECUNDARIO.   | 8      |
| 1.3.1. ALCALOIDES.   | 8      |
| 1.3.1.1. Propiedades físicas.  | 10     |
| 1.3.1.2. Propiedades químicas.   | 10     |
| 1.3.1.3. Clasificación.  | 10     |
| 1.3.2. METABOLITOS SECUNDARIOS DE CULTIVOS EN<br>SUSPENSION DE <u>C. roseus</u> .                                      | 10     |
| 1.3.3. INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES EN<br>LA ACUMULACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS<br>EN <u>C. roseus</u> . | 12     |
| 1.3.3.1. Medio.  | 12     |
| 1.3.3.2. Carbohidratos.  | 12     |
| 1.3.3.3. Nitrógeno.  | 13     |
| 1.3.3.4. Fosfatos.   | 13     |
| 1.3.3.5. Minerales y vitaminas.  | 14     |
| 1.3.3.6. Fitorreguladores.   | 14     |

|  |    |
|--|----|
| 1.3.4. OTROS FACTORES QUE INFLUYEN EN EL METABOLISMO SECUNDARIO.                                     | 15 |
| 1.3.4.1. Luz.  | 15 |
| 1.3.4.2. Temperatura.  | 15 |
| 1.3.4.3. pH del medio de cultivo.  | 15 |
| 1.3.4.4. Estrés osmótico.  | 16 |
| 1.3.5. ADITIVOS PARA EL MEDIO DE CULTIVO CON EL OBJETIVO DE INCREMENTAR EL RENDIMIENTO DEL PRODUCTO. | 16 |
| 1.3.5.1. Adición de precursores.   | 16 |
| 1.3.5.2. Inductores.   | 16 |
| 1.4.1. INDUCTORES Y SU MODO DE ACCION.   | 18 |
| 1.4.2. CRITERIOS IMPORTANTES SOBRE LA METODOLOGIA DE INDUCCION.                                      | 20 |
| 1.4.2.1. Selección del microorganismo.   | 20 |
| 1.4.2.2. Cultivo.  | 20 |
| 1.4.2.3. Inductores y preparación del homogenado.  | 21 |
| 1.4.3. FACTORES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA DE LA CELULA AL INDUCTOR.                               | 22 |
| 1.4.3.1. Especificidad del inductor.   | 22 |
| 1.4.3.2. Concentración del inductor.   | 23 |
| 1.4.3.3. Tiempo de contacto del inductor.  | 23 |
| 1.4.3.4. Importancia de la línea celular.  | 23 |
| 1.4.3.5. Curso temporal de la inducción.   | 24 |
| 1.4.3.6. Estadio de crecimiento del cultivo de células.  | 25 |
| 1.4.3.7. Influencia de los reguladores de crecimiento.   | 25 |
| 1.5. GRUPO <u>Aspergillus fumigatus</u> .  | 26 |
| 1.5.1. CARACTERISTICAS SOBRESALIENTES.   | 26 |
| 1.5.2. CONSIDERACIONES GENERALES.  | 26 |

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 1.6. OBJETIVO GENERAL.         | 27 |
| 1.6.1. OBJETIVOS PARTICULARES. | 27 |
| 1.6.2. HIPOTESIS.              | 27 |

## CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS.

|  |    |
|--|----|
| 2.1. REACTIVOS.  | 29 |
| 2.2. MATERIAL BIOLOGICO.   | 29 |
| 2.3. EQUIPOS.  | 29 |
| 2.4. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES CONCENTRADAS<br>DEL MEDIO DE CULTIVO DE PHILLIPS Y COLLINS. | 30 |
| 2.5. PREPARACION DEL MEDIO PHILLIPS Y COLLINS.   | 31 |
| 2.6. PROPAGACION DEL CULTIVO EN SUSPENSION DE<br><u>C. roseus</u> (LBA1).                      | 31 |
| 2.7. CURVA DE CRECIMIENTO.   | 31 |
| 2.7.1. VIABILIDAD.   | 31 |
| 2.7.2. NUMERO DE CELULAS.  | 32 |
| 2.7.3. PAQUETE CELULAR.  | 32 |
| 2.7.4. PESO FRESCO.  | 32 |
| 2.7.5. PESO SECO.  | 32 |
| 2.8. MANTENIMIENTO DEL HONGO.  | 33 |
| 2.8.1. CRECIMIENTO DEL HONGO.  | 33 |
| 2.8.2. PREPARACION DEL HOMOGENADO DEL HONGO<br>(COSECHA).                                      | 33 |
| 2.8.2.1. AZUCARES TOTALES. FENOL-SULFURICO.  | 33 |
| 2.9. INDUCCION CON EL HOMOGENADO DEL HONGO.  | 34 |
| 2.10. EXTRACCION Y CUANTIFICACION DE ALCALOIDES<br>TOTALES.                                    | 34 |
| 2.10.1. ANALISIS DE LOS ALCALOIDES POR CROMATO-<br>GRAFIA DE CAPA DELGADA (TLC).               | 34 |

## CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION.

|   |    |
|---|----|
| 3.1. CARACTERIZACION DE LA LINEA TUMORAL LBA1 DE <u>C. roseus</u> .   | 36 |
| 3.1.1. CRECIMIENTO.   | 36 |
| 3.1.1.1. Viabilidad.  | 36 |
| 3.1.1.2. Número de células.   | 38 |
| 3.1.1.3. Paquete celular.   | 39 |
| 3.1.1.4. Peso fresco y peso seco.   | 39 |
| 3.1.2. PRODUCCION DE ALCALOIDES.  | 42 |
| 3.1.2.1. Análisis de los alcaloides por TLC.  | 45 |
| 3.2. EFECTO DEL HOMOGENADO DE <u>A. fumigatus</u> SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE ALCALOIDES DE LA LINEA TUMORAL LBA1. | 46 |
| 3.2.1. CUANTIFICACION DE AZUCARES TOTALES DEL HOMOGENADO.   | 46 |
| 3.2.2. EFECTO DEL HOMOGENADO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL CULTIVO TUMORAL.  | 47 |
| 3.2.3. PRODUCTIVIDAD DE ALCALOIDES TOTALES.   | 49 |
| 3.2.3.1. Células.   | 50 |
| 3.2.3.2. Medio líquido.   | 50 |
| 3.2.3.3. Células + medio (productividad total).   | 52 |
| 3.2.3.4. Análisis de los alcaloides totales por TLC.  | 54 |
| CONCLUSIONES.   | 59 |
| Apéndice I. Composición del medio de Phillips y Collins.  | 61 |
| Apéndice II. Curva estándar para la determinación de carbohidratos totales. Se utilizó glucosa como estándar.               | 62 |
| BIBLIOGRAFIA.   | 63 |

## RESUMEN

El presente trabajo comprende el estudio de la producción de alcaloides totales en un cultivo tumoral en suspensión de *Catharanthus roseus* (LBA1), bajo efecto de un homogenado de *Aspergillus fumigatus*, como inductor.

Para esto se consideraron 2 parámetros importantes: la edad del cultivo tumoral y la concentración del inductor.

La inducción se realizó en cultivos de 5, 9 y 15 días de edad, con una incubación de 72 horas.

Las concentraciones del homogenado fúngico empleadas fueron 0.6, 1.2 y 1.8 mg/ml. Este homogenado fue seleccionado en base a investigaciones previas realizadas en el CICY.

Los resultados muestran que el patrón de alcaloides de la línea tumoral LBA1 cambió con los diferentes tratamientos del homogenado y que la producción de los mismos, aumentó ligeramente durante la fase estacionaria (día 9) y a una concentración específica del homogenado (1.2 mg/ml).