

ÍNDICE

	Página
Resumen	i
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Características de los bacilos de la tuberculosis.....	3
2.2. Importancia de la tuberculosis en el mundo.....	4
2.3. Antibióticos utilizados contra <i>M. tuberculosis</i>	4
2.4. Productos encontrados en hongos con actividad antimicobacteriana.....	5
2.5. Leishmaniosis.....	7
2.6. Características generales.....	7
2.7. Distribución geográfica e incidencia de la Leishmania en el mundo.....	9
2.8. Fármacos utilizados contra las Leishmaniosis.....	10
2.9. Importancia de los hongos.....	11
2.10. Hongos microscópicos del sureste Mexicano con propiedades antimicobacterianas y antiprotozoarias.....	11
2.11. Características físicas de las cepas en medio PDA.....	12
2.12. Género <i>Fusarium</i>	14
2.12.1 <i>Fusarium incarnatum</i>	14
2.13. Género <i>Veticillium</i>	15
3. Objetivos.....	16
3.1 Objetivo general.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4. Hipótesis.....	16
5. Materiales y Métodos.....	17
5.1. Parte microbiológica.....	17
5.2. Cromatografía de capa delgada (CCD).....	20
5.3. Cromatografía de gases espectrometría de masas (CG-EM) de los extractos en arroz fermentado y Czapek-Dox Extracto de levadura....	21
5.4. Bioensayo antimicobacteriano.....	22
5.5. Bioensayo leishmanicida.....	24
6. Resultados y discusión.....	25
7. Conclusión y recomendaciones.....	33
8. Referencias Bibliográficas.....	34
9. Anexo.....	38

RESUMEN

La capacidad de las bacterias y de otros microorganismos patógenos para desarrollar mecanismos de resistencia a varios medicamentos, ha motivado la búsqueda de nuevos y más potentes antibióticos en el tratamiento de las enfermedades. Entre estas se encuentra la tuberculosis (TB) ocasionada por *Mycobacterium tuberculosis*, una enfermedad reemergente de nuestro siglo, así como la leishmaniosis enfermedad típica en las zonas tropicales causada por el protozoario del género *Leishmania*.

Para contribuir a la búsqueda de nuevas alternativas para combatir a los patógenos de estas enfermedades, en el Centro de Investigación Científica de Yucatán en la unidad de Biotecnología se está desarrollando un proyecto exploratorio encaminado a la detección de actividad biológica en hongos microscópicos aislados de regiones tropicales y subtropicales del sureste de México.

En estudios previos se evaluaron 56 extractos fúngicos contra *M. tuberculosis* así como 85 contra la *Leishmania mexicana* cabe mencionar que estos extractos pertenecían a cultivos realizados en arroz fermentado y extraídos con acetato de etilo (AcOEt). Los resultados señalaron siete cepas con mayor actividad (TZA54, TZA50, TZH23, TZH28, MRH41, 2TZA2 y XHH1Ga) las cuales se sometieron a cultivo en medio líquido de Czapek-Dox extracto de levadura (CDE) así como también en medio sólido arroz fermentado (AF). Al final del crecimiento en el medio CDE, la masa micelial se separó por filtración y tanto el filtrado como el micelio se liofilizaron. El micelio se extrajo con AcOEt y metanol, ambos extractos así como el filtrado liofilizado se evaluaron contra *M. tuberculosis* y *L. mexicana*. Los rendimientos de los extractos obtenidos de cultivo en CDE y AF se compararon observando que los mayores rendimientos se obtienen en los extractos de AcOEt de los cultivos realizados en AF. Por otra parte los bioensayos realizados de la actividad antiprotozoaria y antimicobacteriana señalaron a dos extractos como los mas activos, los correspondientes a las cepas MRH41 y TZH28 con MIC's de 4.40 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *M. tuberculosis* respectivamente; 12.5 y 7.62 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente contra la *L. mexicana*.

INDICE

LISTA DE CUADROS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS	V
INTRODUCCION	1
I. ANTECEDENTES	2
1.1 LAS PLANTAS	2
1.1.1 USOS TRADICIONALES DE LAS PLANTAS	2
1.2. TIPOS Y FUNCION DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	4
1.2.1. CLASIFICACION DE LOS COMPUESTOS SECUNDARIOS	4
1.2.2 FUNCION DE ALGUNOS METABOLITOS SECUNDARIOS	6
1.2.3. TEORIAS ACERCA DEL ORIGEN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	6
1.3. TAXONOMIA DEL GENERO <i>Catharanthus</i>	7
1.3.1. DESCRIPCION TAXONOMICA DE <i>Catharanthus roseus</i>	7
1.3.2. DESCRIPCION Y DISTRIBUCION DEL GENERO <i>Catharanthus</i>	9
1.3.3. EMPLEOS MEDICINALES DE <i>C. roseus</i>	10
1.4. LOS ALCALOIDES	11
1.4.1 FAMILIAS IMPORTANTES PRODUCTORAS DE ALCALOIDES	11
1.4.2. CLASIFICACION DE LOS ALCALOIDES	15
1.4.3. ALCALOIDES INDOLICOS	16
1.4.4. ALCALOIDES DE EMPLEO FARMACOLOGICO Y FORMAS DE ACCION.....	17
1.4.5. BIOSINTESIS DE LOS ALCALOIDES INDOLICOS	18
1.5. MEDIOS DE CULTIVO	19
1.5.1. COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO	19
1.5.2. TIPOS DE CULTIVOS	26
1.5.2. A) CULTIVO DE ORGANOS	26
1.5.2. B) CULTIVO DE TEJIDOS	27
1.5.2. C) CULTIVOS EN SUSPENSION	27
1.5.2. D) CULTIVO DE PROTOPLASTOS	28
1.5.3. APLICACIONES DE LOS CULTIVOS <i>in vitro</i>	28
1.5.4. CULTIVOS DE <i>C. roseus</i>	28
II. OBJETIVOS	30
III. JUSTIFICACION	31
IV. METODOLOGIA	32

4.1 OBTENCION DE MATERIAL BIOLOGICO	32
4.2 INDUCCION DE CULTIVOS	33
4.3 EVALUACION DE LA CONCENTRACION DE NUTRIENTES EN LOS MEDIOS	35
4.4 EVALUACION DEL EFECTO DE LA VELOCIDAD DE AGITACION	35
4.5 PROPAGACION DE LINEAS OBTENIDAS	36
4.6 SELECCION DE LAS LINEAS CARACTERIZADAS	36
4.7 CARACTERIZACION DE LAS LINEAS	36
4.8 EXTRACCION DE ALCALOIDES EN EL TEJIDO Y EN EL MEDIO DE CULTIVO	37
4.9 CUANTIFICACION DE ALCALOIDES TOTALES	37
4.9.1 ANALISIS POR CROMATOGRAFIA	38
A) CUANTIFICACION DE SERPENTINA	38
B) CUANTIFICACION DE AJMALICINA	38
V. RESULTADOS	40
5.1 OBTENCION DE MATERIAL BIOLOGICO	40
5.2 INDUCCION DE LOS CULTIVOS DE RAICES	40
5.2.1 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE AUXINAS Y DEL MEDIO DE CULTIVO	40
5.2.2 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE AUXINAS Y CITOCININAS	43
5.3 EFECTO DE LA FUERZA DEL MEDIO DE CULTIVO	45
5.4 EFECTO DE LA VELOCIDAD DE AGITACION	46
5.5 PROPAGACION DE LAS LINEAS	46
5.6 SELECCION DE LINEAS	46
5.7 CURVA DE CALIBRACION DE ESTANDARES	47
5.8 CARACTERIZACION DE LAS DIFERENTES LINEAS	48
5.9 CUANTIFICACION DE ALCALOIDES EN OTRAS LINEAS	57
VI. DISCUSION	58
6.1 INDUCCION DE LOS CULTIVOS	58
6.1.1 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AUXINAS Y EL MEDIO DE CULTIVO	58
6.1.2 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE AUXINAS Y CITOCININAS	60
6.1.3 EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL ACIDO NAFTALENACETICO	61
6.1.4 EFECTO DE LA VELOCIDAD DE AGITACION	61
6.1.5 EFECTO DE LA FUERZA DEL MEDIO DE CULTIVO	62
6.2 CARACTERIZACION DE LAS LINEAS	62
6.3 CUANTIFICACION DE LOS ALCALOIDES EN LAS OTRAS LINEAS	67
VII. CONCLUSIONES	69
APENDICES	71
VIII. BIBLIOGRAFIA	75

INTRODUCCION

Las plantas comprenden cerca del 99% de la biomasa de nuestro planeta y reciclan una cantidad cercana al 0.1% del carbono total disponible en la biosfera cada año, son la fuente de muchas de nuestras medicinas e influyen sobre el estado del tiempo, cambiando temperaturas, evaporando el agua y produciendo grandes cantidades de diversos productos químicos volátiles (Bidwell, 1987). En casi cualquier forma, la humanidad depende de ellas.

Sin embargo, las actividades de las plantas no se limitan a la producción de compuestos primarios, sino que producen una gran cantidad de compuestos que empleamos como colorantes, saborizantes, fármacos y antibióticos, los cuales se agrupan bajo la categoría general de metabolitos secundarios.

Por ser difícil obtener de las plantas, en grandes cantidades, los compuestos mencionados, una opción para aumentar su producción es el cultivo de tejidos vegetales, ya que estos cultivos pueden ser manipulados con cierta facilidad, su estadio fisiológico es uniforme e independiente del medio. Por otro lado, las técnicas del cultivo de tejidos vegetales son en la actualidad una de las innovaciones tecnológicas logradas por el hombre en la búsqueda constante de su bienestar.

En el presente trabajo se dan a conocer los resultados obtenidos en el cultivo de raíces normales de la especie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don así como la producción de un grupo de metabolitos importantes a nivel farmacológico, los alcaloides. También se presentan una evaluación de la productividad lograda por las líneas establecidas y se bosqueja una perspectiva general de los alcances logrados con este trabajo en el campo de la investigación.