

870127 2  
307

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA**  
**INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**



EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA in vitro DE LAS  
CACTACEAS: Leuchtenbergia principis, Escobaria missouriensis, Coryphanta  
sp. y Stenocereus queretaroensis.

**TESIS PROFESIONAL**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
MARIA LORENZA SALINAS BARCENA  
A S E S O R :  
Q.F.B. ROSA MARIA MUÑOZ SAUCEDA  
GUADALAJARA, JALISCO. 1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

CAPITULO I .....	1 - 12
------------------	--------

### INTRODUCCION

#### 1.1 Generalidades

- 1.1.1 Biotecnología
- 1.1.2 Cultivo de Tejidos
- 1.1.3 Aplicaciones
- 1.1.4 Metabolitos Secundarios
- 1.1.5 Cactaceas
- 1.1.6 Bacterias

CAPITULO II .....	13 - 20
-------------------	---------

### REVISION DE LITERATURA Y OBJETIVOS

#### 2.1 Antecedentes

- 2.1.1 Breve Historia del Cultivo de Tejidos.
- 2.2.2 Micropropagación de Cactáceas.
- 2.2.3 Propiedades bactericidas de las plantas en cultivo de Tejidos vegetales.

#### 2.2 Objetivos

MATERIALES Y METODOS

3.1 Material y Reactivos.

3.1.1 Material Biológico

3.1.2 Equipo de Laboratorio

3.1.3 Material de Laboratorio

3.1.4 Sustancias y Reactivos

3.2 Metodología

3.2.1 Micropropagación de Cactaceas

3.2.2 Identificación de los constituyentes de las plantas.

3.2.3 Estandarización del inóculo.

3.2.4 Obtención de extractos a partir de cullos y brotes en las diferentes especies de Cactaceas cultivadas in vitro.

3.2.5 Medición de la actividad bactericida de brotes y cullos de las diferentes especies de Cactáceas cultivadas in vitro.

3.2.6 Medición de la actividad bactericida de los antibióticos comerciales y las soluciones utilizadas para hacer los extractos.

RESULTADOS

CAPITULO V ..... 62 - 64

DISCUSION

CAPITULO VI ..... 65 - 66

CONCLUSIONES

RESUMEN ..... 67

CAPITULO VII ..... 68 - 70

APENDICE

CAPITULO VIII ..... 71 - 76

BIBLIOGRAFIA

## CAPITULO I

### INTRODUCCION

Una de las más antiguas actividades humanas ha sido el estudio de plantas y animales, particularmente como fuente de alimento y salud. Desde los primeros tiempos el hombre tuvo la necesidad de distinguir entre aquellas plantas que eran venenosas y las que no lo eran; de esta forma se fueron desarrollando los conocimientos de las drogas de origen natural, los que se fueron transmitiendo, verbalmente en un comienzo y posteriormente en forma escrita, como en los papiros, tablas de barro cocido, tratados de plantas, farmacopeas y otros trabajos.

Indudablemente, el reino vegetal posee muchas especies de plantas que contienen sustancias de valor medicinal que están aún por descubrirse, y gran número de ellas son sujeto de ensayos constantes respecto a su posible valor farmacológico (particularmente por sus propiedades hipotensoras, citotóxicas, antibióticas, antiparkinsonianas, etc.).

Un fascinante campo de investigación es el estudio de plantas usadas como medicinales, narcóticas y para otros fines por los grupos indígenas.

Entre los grupos vegetales que caracterizan a las zonas áridas de México se tiene a los magueyes, los mezquites, las yucas y la familia Cactaceae, las cuales son autóctonas del continente americano. México por su topografía, latitud y clima es un país con gran cantidad de ellas.

Las cactáceas por sus caracteres de organización, presentan hábitos y estructuras anatómicas de adaptación altamente especializadas que les imparten una fisonomía particular.

Presentan un complicado proceso metabólico en el que es necesario el  $CO_2$ ,  $O_2$  y otras sustancias minerales que dan origen a la formación de muy diversos compuestos orgánicos.

Como resultado de los modernos procedimientos biotecnológicos de aislamiento y experimentación farmacológica, nuevas drogas vegetales encuentran su camino hacia la medicina, en estado de sustancias purificadas, más que en forma de antiguas preparaciones galénicas (Trease y Charlet, 1982).

Al utilizar las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales in vitro se puede tener una propagación de plantas basándose en el principio de totipotencia, obteniendo así sustancias de un alto valor económico, ejemplo de ello son los alcaloides, alérgenos, aminoácidos, agentes antimicrobianos, azúcares, condimentos, emulsificantes, flavonoides, fragancias, insecticidas, aceites comerciales, ácidos orgánicos, vitaminas, etc.

Estos descubrimientos dentro de las ciencias biológicas constituyen uno de los mayores logros científicos del siglo XX. Su importancia radica no sólo en la comprensión de las estructuras y los fenómenos en que se sustenta la vida, sino también en el hecho de que estos nuevos conocimientos, al ser aplicados pueden contribuir a resolver algunos de los problemas más graves a que se enfrenta la humanidad.

Como se sabe los extractos de plantas han sido usados con propósitos medicinales por el hombre durante cientos de años por lo cual nos despierta el interés de comprobar si ciertas especies de la familia Cactacea ( Coryphanta sp., Escobaria missouriensis, Leuchtenbergia principis y Stenocereus queretaroensis ) puedan ser fuentes naturales de sustancias bactericidas aprovechando las ventajas que presenta el uso de cultivo de tejidos vegetales in vitro para ser explorada la producción de principios antimicrobianos de interés médico.

## 1.1. GENERALIDADES

### 1.1.1. BIOTECNOLOGIA

La biotecnología, que puede definirse como "la transformación industrial de materias primas mediante la acción de microorganismos y otros agentes biológicos a fin de producir bienes y servicios útiles", es una rama tecnológica tan antigua como el hombre mismo. Así, el término "biotecnología" hace referencia a las aplicaciones de las ciencias biológicas en la medicina, la farmacología, la agronomía y la ingeniería química.

La aplicación práctica de los descubrimientos científicos ha venido propiciando el desarrollo mundial de un nuevo sector industrial que utiliza sustratos naturales como materia prima básica y que adopta modelos biológicos de producción que imitan los procesos de la vida (Michel, 1986).

### 1.1.2. CULTIVO DE TEJIDOS.

Al cultivo de tejidos vegetales se le define como al conjunto de técnicas para cultivar, en condiciones asépticas y controladas, cualquier tipo de célula, tejido u órgano vegetal. Cualquiera parte de una planta (hoja, tallo, meristemo, embrión, etc.), separada de ésta y desinfectada mediante un tratamiento leve para eliminar a los microorganismos que se encuentran en su superficie, es un "explante" del que se puede iniciar un cultivo. Dependiendo de las condiciones físicas (luz, temperatura, cultivo líquido o semisólido, etc.), y químicas (sales minerales, vitaminas, reguladores del crecimiento, etc.), el explante puede dar lugar a uno u otro tipo de cultivo: puede "desdiferenciarse" en una masa amorfa de células denominada callo, la cual, dependiendo siempre de las condiciones utilizadas para el medio de cultivo, puede continuar proliferando como callo o disgregarse



en células aisladas, o bien dividirse organizadamente para dar lugar a tallos y raíces (organogénesis).

Es importante señalar que las células aisladas (células en suspensión y protoplastos), pueden dividirse para formar nuevos callos, órganos o embriones y, eventualmente, dar lugar a nuevas plantas completas, idénticas a la planta de la que se tomaron los explantes; esta propiedad de regenerar nuevos individuos a partir de células proporciona la base potencial del cultivo in vitro, fenómeno que se conoce con el nombre de totipotencia.

### 1.1.3. APLICACIONES DEL CULTIVO DE CELULAS VEGETALES

Las principales aplicaciones del cultivo de células vegetales se encuentran en 5 áreas fundamentales:

- a. Micropropagación
- b. Preservación del germoplasma
- c. Mejoramiento genético
- d. Biosíntesis de metabolitos
- e. Investigación básica.

Actualmente, el empleo de cultivos de células aisladas como medio de investigar las rutas biosintéticas de los compuestos, muestra una gran pujanza, pues se trata de una técnica de valor potencial considerable, que será efectiva cuando se haya realizado un trabajo básico suficiente para poder asegurar las condiciones óptimas para la reproducción y el crecimiento de las células esta técnica ofrece la posibilidad de disponer de un material absolutamente uniforme, asequible en todo tiempo, susceptible de ser manejado bajo condiciones reguladas y reproducibles, factores que raramente pueden ser posibles de conjuntar en el trabajo con plantas vivas enteras.

Por otra parte, en México se llevan a cabo investigaciones sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios tales como: alcaloides indólicos con actividad antileucémica en cultivos de Catharantus roseus, esteroides (ejemplo diosgenina), en cultivos de Dioscorea

composita, cardiotónicos (digoxina), en células de Digitalis purpurea, hipotensores en tallos de Casimiroa edulis, etc.

En relación a la micropropagación, ya se encuentra comercializada en México la producción de plantas ornamentales tales como claveles, rosas, crisantemos, orquídeas, violetas y otras más. Dentro del marco de la agricultura se tiene el cultivo de la papa y hongos comestibles (Quintero, 1985).

#### 1.1.4. METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios son sustancias que se producen a consecuencia de una cadena de oxidaciones y reducciones en las rutas biosintéticas tanto de animales como de plantas.

Existen cuatro categorías principales de metabolitos secundarios: aceites esenciales, glicósidos, alcaloides y enzimas.

##### a. Aceites esenciales

Son una mezcla de terpenoides que se usan como saborizantes, perfumes y solventes.

##### b. Glicósidos.

Se entiende por glicósidos a los acetales en los cuales el hidroxilo del azúcar es condensado con un grupo hidroxilo del componente no azucarado y el hidroxilo secundario es condensado dentro de la molécula misma de azúcar para formar un anillo de óxido; el componente sin azúcar se conoce como aglicona y el que contiene azúcar se le llama glicona; incluyen: flavonoides, saponinas y glicósidos cianogénicos.

### c. Alcaloides.

Los alcaloides constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas, que contienen en la mayor parte de sus moléculas uno o varios anillos cíclicos nitrogenados de reacción más o menos básica, con una fuerte actividad fisiológica farmacodinámica.

Estos compuestos generalmente son muy activos fisiológicamente en los humanos, y por consiguiente son de gran interés para la producción de fármacos, por ejemplo: morfina, cocaína y atropina.

### d. Enzimas.

Son proteínas especializadas en catalizar reacciones biológicas. Entre las enzimas están principalmente las hidrolasas (proteasas, amilasas y ribonucleasas) (Robert y Loyola, 1985).

## 1.1.5. LAS CACTACEAS.

### a. ORIGEN.

Las cactáceas son originarias del continente americano y se consideran entre las plantas más notables que caracterizan las zonas áridas y semiáridas con fuerte insolación, sin embargo, las hay propias de bosques y selvas tropicales donde crecen en lugares húmedos y sombreados (Soltero, 1990).

Desde las épocas prehispánicas este grupo de plantas ha sido un valioso recurso alimenticio, ritual y medicinal para los mexicanos. Una de las primeras drogas estudiada química y fisiológicamente fue la extraída del peyote, (Lophophora williamsii) conocida actualmente como mezcalina. El mayor atractivo de muchas cactáceas para la mayoría de la gente ha sido los brillantes colores magenta, rojo, anaranjado, rosa, morado y amarillo de sus flores y frutos. Los colores y compuestos antes

mencionados son referidos por algunos botánicos como metabolitos secundarios (López y Lozoya, en prensa).

Poco tiempo después del descubrimiento de América, las cactáceas ya eran conocidas en Europa, y a principios del siglo XIX se consideraban plantas de colección que alcanzaban precios muy elevados. En nuestros días siguen siendo codiciadas como plantas ornamentales. Las modificaciones de forma y color que se presentan en esta familia, han sido explotadas con este fin.

La riqueza con que cuenta nuestro país en materia de cactáceas es indiscutible, existe una gran cantidad de especies susceptibles de explotación como plantas ornamentales, comestibles y medicinales (Soltero, 1990).

#### b. TAXONOMIA.

Un moderno sistema de clasificación para las cactáceas fue descrito por Hunt en 1967 del herbario de Kew. Hunt separó las cactáceas en tres tribus mayores: Cacteeae, Opuntieae y Pereskiaeae. De estas tres tribus, la Cacteeae contiene los cactos más diversos e importantes económicamente. Dentro de esta tribu, existen dos subtribus, la Cactinae y la Cereinae, de la cual la más importante económicamente es la Cactinae, sin olvidar a la tribu Opuntiae que también es económicamente importante (Clayton, 1987).

Las cactáceas mexicanas están representadas por cerca de 740 especies, cifra que supera a la de cualquier otro país, de las cuales aproximadamente el 73% son endémicas, lo que convierte definitivamente a México en el país con la mayor riqueza cactoflorística, pero también se ha convertido en el país con el mayor índice (40%) de su cactoflora con algún grado de peligro de extinción según la IUCN (Internacional Union for the Conservation of Nature) (Arias-Montes, 1990).

c. DESCRIPCION Y LOCALIZACION DE LAS ESPECIES UTILIZADAS.

i. Coryphanta sp.

Plantas simples o cespitosas, de tamaño medio hasta pequeñas. Tallo globoso hasta cortamente columnar, tuberculado; tubérculos dispuestos en series espiraladas, aréolas monomorfas, la región espinifera en el ápice de los tubérculos, la florifera se extiende por el lado adaxial del tubérculo en un surco que llega a la mitad del tubérculo o hasta cerca de la axila. Flores dispuestas en la base del surco de los tubérculos jóvenes cercanos al ápice, infundibuliformes; segmentos del perianto numerosos, de color amarillo limón, rosado o púrpúreo; estambres numerosos. Fruto desnudo o con 1 ó 2 escamitas, jugoso, verdoso.

La mayoría de las especies que integran este género crece en México, en donde tiene una distribución muy amplia, especialmente en los estados del centro y del Norte de la República, desde donde se extienden hasta el Sur de los Estados Unidos de América (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

ii. Leuchtenbergia principis.

Plantas pequeñas, simples o cespitosas, de 25 cm de altura y 15 cm de diámetro, llegando a medir hasta 50 cm de altura, con tubérculos muy largos, por lo que adquieren aspecto agavoideo. Tallo cilíndrico, corto, carnoso de unos 5 a 7 cm de diámetro, mas o menos lenoso y superoso, tuberculado, las partes viejas sin tubérculos. Tubérculos dispuestos en 8 y 13 series espiraladas, muy largos y delgados, de 5 a 12.5 cm de longitud 1 a 1.5 cm. de espesor en la base, de color verde-azulado con tinte rojizo, ascendentes. Aréolas situadas en el ápice de los tubérculos, en la porción truncada, sustentadas por una escama pequeña, cuando

jovenes lanosas. Axilas lanosas. Espinas largas, delgadas y suaves. Flores una en cada aréola, de 5 a 6 cm de diámetro.

Se le encuentra en los estados de San Luis Potosí, Nuevo León, Zacatecas y Coahuila. Fue relativamente abundante en la Sierra de Parras y Sierra de La Paila, Coahuila, así como entre Matehuala y Saltillo (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

### iii. Stenocereus queretaroensis.

Planta arborecente candelabroforme, con tronco bien definido, de 5 a 6 m de alto o más. Tronco leñoso, como de 1 m de alto y 35 cm. de diámetro o más. Ramas como de 15 cm. de diámetro, de color verde, a veces con tinte rojizo; el conjunto de ramas forma una copa muy amplia, a veces como de 4 m de diámetro. Costillas 6 a 8, prominentes, separadas por amplios intervalos. Areólas distantes entre sí como 1 cm, con fieltro café oscuro casi negro, granulosas. Fruto globoso. Se cultiva por su fruto comestible muy agradable que se conoce con el nombre de "pitayas." Existen variedades, horticolas que producen frutos de colores diversos.

De esta especie se han aislado algunos triterpenos, entre ellos uno denominado ácido queretaróico.

Se distribuye en los estados de Querétaro, Guanajuato, Jalisco, Colima y Michoacán. De Jalisco se ha señalado en los alrededores de Guadalajara, Chapala, Zapotlán, Sayula, Villa de la Playa; de Guanajuato en León; de Querétaro en las cercanías de la ciudad del mismo nombre y en Michoacán cerca de Jiquilpan (Bravo-Hollis, 1978).

iv. Escobaria sp.

Son plantas pequeñas, casi siempre cespitosas; tubérculos con un surco que se extiende desde el ápice hasta la axila; espinas radiales y centrales aciculares; flores brotando de la base del surco de los tubérculos jóvenes; pericarpelo desnudo o con algunas pequeñas escamas; segmentos exteriores del perianto ciliados; estambre y estilo cortos; fruto de color verde hasta rojizo; semillas semiorbiculares hasta ovoides; testa foveolada negra o hasta de color café oscuro; hilo subbasal relativamente pequeño; poro micropilar cerca del hilo; embrión curvo; perisperma grande.

d. USOS.

Son múltiples: como antiséptico, en la alimentación humana y animal, en la protección y mejoramiento de suelos, como combustible en el campo, en la construcción de techos y paredes de casas rústicas, para la fabricación de artesanías, en la formación de setos vivos, como fuente de azúcar, alcohol, vinagre, mucílagos, gomas y pectinas, para la fabricación de papel y materiales aislantes, en la obtención de colorantes, para la industria cosmética y como plantas de ornato (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

### 1.1.6. BACTERIAS UTILIZADAS.

En el trabajo de investigación para probar las propiedades bactericidas de algunos cactus se utilizaron las siguientes bacterias:

- a. Escherichia coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae y su nombre se deriva de la raíz griega colon (intestino largo).

Los procesos patológicos producidos con mayor frecuencia por esta bacteria en el hombre son los que afectan al tracto urinario y a los riñones por vía hematogena o linfática, aunque con mayor frecuencia, sigue las vías ascendentes desde la uretra y a través de la vejiga hasta alcanzar los uréteres y el riñón.

E. coli es un microorganismo que interviene con frecuencia en las peritonitis, en las apendicitis, en las infecciones de la vesícula biliar y las vías biliares, en conjunción con otras bacterias entéricas. También suele hallarse en la piel del perineo y en los genitales, infectando con frecuencia pequeñas heridas que se contaminan con orina o con heces. Siendo el más frecuentemente detectado en los procesos sépticos gramnegativos que dan lugar a una bacteremia. La mayor frecuencia de esta enfermedad se ha encontrado principalmente en niños de corta edad y en individuos superiores a los 60 años, las intervenciones quirúrgicas o las exploraciones instrumentales del conducto intestinal biliar o del tracto genitourinario pueden favorecer la aparición de este tipo de sepsis (Davis, et al 1979).

- b. Agrobacterium rhizogenes pertenece a la familia Methylomonadaceae y su nombre deriva de las raíces griegas agrus (un campo) bakterion (un pequeño bacilo) rhiza (una raíz) y gennalo (productor).

Esta bacteria gramnegativa, es causante de que se formen raíces velludas y con deformaciones en forma de una masa entrelazada y



fibrosa. Puede ser hùésped cuando existe una previa lesi3n en el tejido de las plantas (Buchanan and Gibbson, 1984).

- c. Staphylococcus aureus pertenece a la familia Microcaceae y su nombre se deriva de la raiz griega staphyle (racimo de uva) (Buchanan and Gibbson, 1984).

Es una bacteria grampositiva, que causa gran variedad de procesos supurativos en el hombre, tales como furúnculos, ántrax, osteomelitis, abscesos, infecciones de las heridas, neumonía, empiema, pericarditis, meningitis y artritis purulenta.

Ciertas cepas elaboran una enterotoxina que produce intoxicaciones alimentarias. Puesto que los estafilococos originan con frecuencia mutantes resistentes a los antibióticos, han pasado a ocupar durante la actual era de la quimioterapia antibacteriana una posición de especial significado en la patogenia (Davis., et al 1979).

## CAPITULO II

### REVISION DE LITERATURA

#### 2.1 ANTECEDENTES

##### 2.1.1 BREVE HISTORIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

Desde hace 120 años aproximadamente, en las investigaciones de fisiología vegetal se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos, órganos y células vegetales, que consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen (Street, 1977).

Los primeros intentos en esta técnica fueron realizados por Sacks en 1860 y Knops en 1861, quienes observaron que los principales nutrientes de las plantas superiores eran sustancias inorgánicas y prepararon una solución nutritiva que las contenía, la cual ha sido utilizada por muchos investigadores desde entonces (Hurtado y Merino, 1988).

Robbins (1922) enriquece el medio de cultivo con glucosa, agar y sales inorgánicas para el cultivo de ápices radiculares de varias especies. Los progresos logrados en los 30 años siguientes a los experimentos fueron muy pocos. Sin embargo, el trabajo pionero fue el de White (1934) con cultivo de ápices de raíz de tomate (Lycopersicon esculentum) en un medio líquido conteniendo sales inorgánicas, extracto de levadura y sacarosa, en donde obtuvo un crecimiento activo. Robbins en 1937 estudió el efecto de los microelementos inorgánicos y señaló que el zinc, manganeso y boro son necesarios para el cultivo de ápices radiculares (Hurtado y Merino, 1988).

En 1937 Went y Thimann descubren la auxina AIA (ácido indolacético).

Nobecourt y Gautheret en Francia, al igual que White en Estados Unidos en 1939 reportaron un crecimiento indefinido en tejido de raíz donde se observa la formación de callosidades sembradas en un medio semisólido, al transferir porciones de esos callos a medio fresco, en intervalos de 4 a 6 semanas, los tejidos siguieron proliferando indefinidamente. Morel y Martin en 1952 son los primeros investigadores que lograron obtener plantas libres de virus en dalia a partir de meristemos apicales en tallo (Hurtado y Merino, 1988). Muir, Hidebrandt y Riker (1954) transfirieron segmentos de tejido de callo a medio líquido en agitación y tuvieron éxito al obtener cultivos en suspensión conteniendo células aisladas y pequeños terrones o agrupaciones celulares.

Skoog (1955) identifica la 6-furfurilaminopurina (cinetina) observando la habilidad de este regulador del crecimiento vegetal para iniciar la división celular. Incluyendo citocinas en los medios de cultivo se hizo posible la proliferación de células y la formación de callos de un gran número de especies vegetales, induciendo, además, la formación de estructuras organizadas de algunas de esas especies.

Skoog y Miller (1957) usando combinaciones de auxinas y cinetina, controlaron más detalladamente la formación de brotes y raíces en cultivo de callos de tabaco. Por tanto es posible inducir la formación de raíces decrementando el porcentaje de cinetina en relación con auxina, mientras que invirtiéndolo se induce la formación de yemas que se desarrollan más tarde como brotes.

Murashige y Skoog (1962) desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco. En la actualidad, las sales inorgánicas de este medio de cultivo se usan con bastante éxito en casi todas las especies.

En esta breve reseña histórica acerca de la aplicación de la técnica de cultivos vegetales en diferentes áreas de la investigación, se puede observar que desde los primeros ensayos, tentativas, avances y logros en la obtención de los componentes más adecuados del medio de cultivo, condiciones ambientales y respuesta de los tejidos inoculados para la propagación de una determinada especie, se enfocó especialmente a la obtención de plantas libres de patógenos y enfermedades, propagación masiva de algunas especies de interés económico y biológico, cultivo de diversos órganos y tejidos, como meristemas, callo, óvulos, ovarios, anteras y protoplastos, así como la fusión de los últimos y la regeneración de plantas a partir de estos lo cual nos permite realizar estudios de diferentes fenómenos morfogénéticos y la obtención de productos secundarios con valor comercial que por otros medios sería más difícil de realizar (Hurtado y Merino, 1988).

### 2.2.2. MICROPROPAGACION DE CACTACEAS

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han mostrado ser un importante procedimiento en la multiplicación, el mejoramiento y la conservación de las plantas útiles al hombre. La micropropagación, propagación por cultivo de tejidos y propagación in vitro son sinónimos de un procedimiento para incrementar el número de individuos en condiciones artificiales y asépticas, con nutrición, luminosidad y temperatura controladas. Generalmente es la multiplicación asexual de propágulos pequeños. La micropropagación ha demostrado su utilidad práctica en especies de multiplicación deficiente o relativamente lenta (orquídeas, espárrago, fresa, cactáceas, etc.). Además, la utilización sistemática de esta técnica para fines comerciales también se enfoca a la uniformidad genética del material de siembra cuando el inóculo asexual está ya diferenciado (Robert y Loyola, 1985).

El primer investigador que sugirió el valor del uso de la técnica de cultivos vegetales para la propagación de los cactus fue Mauseth en 1977. Ya que las técnicas son simples, y la materia es disponible, el desarrollo de dichos métodos de propagación para estas especies podría ayudar a la preservación y disseminación de especies en peligro de extinción (Clayton, 1987).

Starling (1985) publica que Leuchtenbergia principis da razonables tasas de producción de brotes en medio basal MS con alta concentración de citocininas y baja concentración de auxinas.

Ault y Blackman (1987) reportaron un exitoso sistema in vitro para la inducción, proliferación y enraizamiento de yemas axiliares en Ferocactus acanthodes, siendo estas plántulas traspasadas exitosamente a condiciones de invernadero.

Clayton, y colaboradores. (1990) publicaron su evaluación sobre la composición y requerimientos de concentraciones de diferentes tipos de hormonas para la proliferación de brotes auxiliares de 11 especies de cactáceas entre ellas se encuentra Escobaria missourensis.

Rodríguez-Garay, y su grupo de investigadores en 1990 lograron la micropropagación de E. missourensis, D. erinacea, L. principis, S. queretaroensis y Coryphantha sp. entre otras, en el Laboratorio de cultivo de tejidos del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (Rodríguez-Garay, 1990).

Rodríguez-Garay y colaboradores. (1992) reportaron por primera vez la producción de raíces en L. principis por medio de la bacteria M. rhizogenes a través de transformación genética.

Rodríguez-Garay y Rubluo. (1992) realizaron experimentos con explantes de Aztekium ritteri logrando que 2 brotes de los 60 utilizados enraizaran en un medio suplementado con IBA (Ac. 3, Indol butírico. Una de estas plantas se encuentra en el invernadero del CIATEJ.

### 2.2.3 PROPIEDADES BACTERICIDAS DE LAS PLANTAS EN CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

Las propiedades medicinales de varios materiales y extractos de plantas han sido reconocidas desde principios del siglo V antes de Cristo. Esta información aunada a los resultados de las investigaciones realizadas a fines del siglo XIX y principios del XX y los descubrimientos de la penicilina y otros antibióticos incrementaron el interés por la investigación de varios tipos de plantas tanto en su medio natural como in vitro en busca de sustancias bactericidas. Numerosas investigaciones con resultados positivos conducen a aumentar el interés en buscar estos materiales antimicrobianos que actualmente están en estudio por parte de muchos investigadores (Trease y Charlet, 1982).

Carlson y Douglas (1947) analizaron 5 diferentes tipos de extractos en 14 diferentes plantas que contenían sustancias antimicrobianas para E. coli y S. aureus.

Carlson y colaboradores. (1947) colectaron 550 plantas, de ellas fueron preparados los extractos y probados, encontrándose sustancias activas las cuales inhibieron el crecimiento de los microorganismos E. coli y S. aureus in vitro.

McCleary y colaboradores. (1960) en un estudio preliminar presuntivo de un extracto etanólico de peyote (Lophophora williamsii) encontraron la presencia de un agente antimicrobiano llamado peyocactina que inhibe el crecimiento bacteriano tanto de bacterias gramnegativas como grampositivas encontrándose entre ellas: S. aureus USDA 209, Streptococcus pyogenes, Neisseria catarrhalis, Agrobacterium tumefaciens, Bacillus subtilis USDA 220 y Sarcina lutea USDA 1001.

Mathes (1963) realizó experimentos con tejidos de fresno cultivados in vitro durante 3 semanas en agar, obteniendo sustancias con propiedades bactericidas las cuales produjeron diferentes zonas de inhibición utilizando cepas de: Bacillus subtilis, Bacillus cereus, y S. aureus entre otros.

Campbell y cols. (1965) obtuvieron principios antimicrobianos a partir de extractos con éter-etanol de el medio donde fueron cultivadas las plantas de lechuga y coliflor in vitro. La fracción insoluble al alcohol tuvo una alta actividad inhibitoria para S. aureus.

Kanna y Staba (1968), estudiaron la actividad antimicrobiana de 24 tejidos de plantas in vitro tanto en cultivos sólidos como en suspensión, la mayoría de los extractos de callos mostraron una actividad bactericida mayor para S. aureus que para E. coli. Los metabolitos secretados en el medio de cultivo contenian sustancias bactericidas más activas para las bacterias gramnegativas y los tejidos de las plantas para las Gram positivas.

Kanna y colaboradores (1971), reportaron que tanto en el medio de cultivo que contiene agar así como el de los extractos de callo de 10 especies de plantas encontraron propiedades antimicrobianas contra E. coli, S. aureus, Salmonella typhosa, y Cándida albicans in vitro.

Agurell y colaboradores (1971), reportaron los alcaloides presentes en 14 especies del género Trichocereus, detectados mediante métodos cromatográficos.

Veliky y Genest (1972) observaron una actividad significativa antimicrobiana en extractos de células de un cultivo en suspensión. Una fuerte actividad bactericida fue observada para la cepa Bacillus megaterium # 9076, siendo también efectivo en S. aureus # 15005 y E. coli # 2014, en los experimentos realizados in vitro.

Veliky y Lata (1974) observaron la presencia de principios antimicrobianos en las células o tejidos in vitro y en el medio de cultivo donde crecieron diferentes especies encontrando que los extractos de Lactuca sativa, Cannabis sativa e Ipomoea sp. tuvieron principios más activos que otras plantas.

Viramontes (1991), llevó a cabo la cuantificación preliminar del efecto bactericida de un extracto semipurificado de peyote (Lophophora williamsii). Determinó que la concentración mínima inhibitoria se encuentra en el rango de 40 a 200 mg/ml para bacterias gramnegativas y positivas obtenidas de pacientes hospitalizados en el Hospital Civil de Guadalajara, Jalisco.

Los resultados sugieren que después de haber observado el crecimiento de los cultivos de plantas in vitro, el uso de estos deberá ser explorado para la producción de principios antimicrobianos de interés médico.



## 2.2 OBJETIVOS

La presente tesis tiene como objetivo, determinar la acción bactericida de las siguientes Cactaceas:

Coryphanta sp.,  
Stenocereus queretaroensis,  
Esdcoberia missouriensis y  
Leuchtenbergia principis.

Y de esta forma plantear las bases para nuevos trabajos de investigación tendientes tanto a su comprobación como a su medición cuantitativa.

En términos específicos la Tesis tiende a:

- La medición de la actividad bactericida de los brotes en 4 diferentes especies de Cactaceas cultivadas in vitro.

- Medición de la actividad bactericida en 4 callos de las diferentes especies de Cactaceas cultivadas in vitro.

- Realizar un análisis cualitativo de la composición química en callos y brotes de las cactáceas empleadas.

Los objetivos que se pretenden alcanzar mediante este trabajo de investigación se basan en el planteamiento de la siguiente hipótesis: " Los brotes y callos de las Cactaceas, seleccionadas y propagadas in vitro, contienen sustancias bactericidas.

## CAPITULO III

### MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

##### 3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Cepas:

Escherichia coli, AST B-046

Staphylococcus aureus, AST B-047

Agrobacterium rhizogenes, LBA 9402

Provenientes del cepario del Departamento de Microbiología y Fermentaciones del CIATEJ.

Brotos y callos de la siguientes plantas:

Leuchtenbergia principis.

Stenocereus queretaroensis.

Escobaria missouriensis.

Coryphanta sp.

Provenientes del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del CIATEJ.

### 3.1.2. EQUIPO DE LABORATORIO

Espectrofotómetro UV - Vis (Perkin Elmer)  
Agitador orbital (New Brunswick Scientific)  
Parrilla-agitador magnético (Corning)  
Potenciómetro digital (Beckman)  
Refrigerador a 4° C.  
Horno de incubación (Ríos Rocha)  
Balanza analítica (Ohaus)  
Balanza granataria (Sartorius)  
Autoclave horizontal (Market Forge)  
Campana de flujo laminar (Veco)

### 3.1.3. MATERIAL DE LABORATORIO

Bisturi  
Mechero Bunsen  
Pinzas de disección  
Fascos para alimento infantil con tapa de polipropileno  
Cajas Petri desechables 90 x 15 mm  
Cajas Petri de vidrio 100 x 20 mm  
Pizeta  
Cristaleria  
HSA bacteriológica  
Micropipetas de 1000, 100 y 20 microlitros  
Agitador de vidrio

Tubos de ensayo 15 x 2.5 cm  
Tubos de ensayo con rosca  
Mortero  
Agitadores magnéticos  
Papel aluminio  
Bolsa negra de plástico 25 x 35 cm  
Papel filtro M1 Merck  
Discos de papel de 7 mm de diámetro  
Penicilindros de vidrio de 8 x 10 mm  
Termómetro de laboratorio (-10 a 200)° C.  
Probetas  
Película plástica transparente adherible  
Isopos  
Frascos ámbar de 250 ml  
Gradilla  
Goteros  
Cápsula de porcelana

### 3.1.4. SUSTANCIAS Y REACTIVOS

#### A) MEDIOS DE CULTIVO.

Medio de Cultivo YMB (véase formulación en el apéndice 7.3).

Medio de Cultivo Tripticasa Soya Agar. (TSA Marca Bioxon).

Medio básico de Murashige y Skoog (MS) adicionado con 0.2 mg/lt de ANA (Ac. indolacético) y 5 mg/lt de KIN (6-furfurilaminopurina) (véase formulación en el apéndice 7.1)

Medio básico de Murashige y Skoog (MS) adicionado con 3 mg/lt de 2,4-D (Ac. 2,4-Diclorofenoxiacético), 2 mg/lt de ANA (Ac. indolacético) y 2 mg/lt de KIN. (véase formulación en el apéndice 7.2).

## B) REACTIVOS.

### a. Reactivo de Mayer.

1.36 gr de  $HgCl_2$  en 60 mls. de agua y 5 gr de KI en 10 ml de agua. Juntar las dos soluciones y aforar a 100 ml.

### b. Reactivo de Kedde.

2 gr de ácido 3,5-dinitrobenzónico en 100 ml de etanol.

### c. Reactivo de Bush y Taylor o Kedde modificado.

1% de ácido 3,5-dinitrobenzónico en 0.5N de KOH en alcohol metílico al 5%.

### d. Reactivo de cloruro férrico.

Se mezcló 0.3 ml de solución al 10 % de  $FeCl_3$  con 50 ml de ácido acético glacial.

e. Reactivo de Bials.

1.0 gr de orcinol en 500 ml de HCl al 30% y 25 gotas de solución de  $\text{FeCl}_3$  al 10%.

C) SOLUCIONES.

a. Solución reguladora pH=4.0

Preparación:

A = 0.2M solución de ácido acético (11.55 ml en 1000 ml).

B = 0.2M solución de acetato de sodio (16.4 gr. en 1000 ml).

Se midieron de manera exacta y se mezclaron 41.0 ml de A y 9.0 ml de B (González y Peñaloza, 1981).

b. Solución reguladora pH=9.0

Preparación:

A = 0.2 M solución de carbonato de sodio anhidro (21.2 g en 1000 ml).

B = 0.2 M solución de bicarbonato de sodio (16.8 gr en 1000 ml).

Se midieron de manera exacta y se mezclaron 4 ml de A y 46.0 ml de B (González y Peñaloza, 1981).

c. Solución de picrato de sodio.

Preparación:

1 gr. de  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  y 100 mg de ácido picrico aforando con agua hasta 10 ml. Secarlo de (30 a 35)° C. durante 3 horas.

d. Solución de alfa-naftol.

Preparación:

20 gr. de alfa-naftol en 100 ml de alcohol.

e. Solución de Benedict.

Preparación:

Se disolvieron 173 gr de citrato de sodio y 100 gr de carbonato de sodio anhidro en 800 ml de agua. Se calentó hasta completa disolución y se filtró. Se disolvieron 17.3 gr de sulfato cúprico en 100 ml de agua. Esta solución se agregó despacio y con agitación continua a la solución de carbonato-citrato.

f. Solución de cloruro de sodio al 0.9%.

g. Solución de hidróxido de sodio 0.1N.

h. Acido sulfúrico al 1.5%.

i. Eter de petróleo

- j. Acido clorhidrico concentrado
- k. Granallas de magnesio
- l. Octil-alcohol
- m. Benceno
- n. Amoniaco
- ñ. Eter etilico
- o. Alcohol etilico
- p. Carbón activado
- q. Acido sulfúrico concentrado
- r. Acido nitrico concentrado
- s. Solución de KOH 0.5 N



## 3.2 METODOLOGIA

### 3.2.1. MICROPROPAGACION DE CACTACEAS

#### OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

El material vegetal empleado que se utilizó fueron brotes de las siguientes especies:

1. Leuchtenbergia principis
2. Escobaria missouriensis
3. Coryphantha sp.
4. Stenocereus queretaroensis

Cultivadas in vitro en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de las instalaciones del CIATEJ.

#### a. Micropropagación de los brotes.

Se sembraron los brotes de cada especie en 10 frascos de alimento infatil, conteniendo 25 ml. del medio básico Murashige, Skoog (1962) adicionado con las vitaminas L<sub>2</sub> (Phillips and Collins, 1979), y con la presencia de dos reguladores de crecimiento ANA (Ácido naftalenacético), y KIN (6-furfuril aminopurina), utilizados para la regeneración de brotes (Clayton et al, 1990).

Las resiembras se efectuaron cada 4 semanas en medio de cultivo fresco.

## b. Iniciación del cultivo de callo.

Los brotes, de las especies Stenocereus queretaroensis, Escobaria missouriensis y Coryphanta sp. se fragmentaron en pequeños segmentos sobre una caja petri con la ayuda del bisturí y pinzas. Durante esta etapa todas las manipulaciones se llevaron a cabo en condiciones asépticas y se realizaron bajo una campana de flujo laminar.

### 1. Inducción del callo.

Para la inducción del callo de las especies mencionadas fueron realizados los siguientes pasos:

- Se preparó el medio de cultivo básico Murashige y Skoog, adicionado con las vitaminas L-2.

- Al medio de cultivo básico se le adicionaron los siguientes reguladores de crecimiento:

2,4-D (Acido 2,4-Diclorofenoxiacético)

ANA (Acido naftalenacético)

KIN (6-furfuril aminopurina).

-El medio de cultivo antes descrito fue distribuido en cinco frascos de alimento infantil con tapa de polipropileno, por cada una de las cuatro especies de cactus.

- Se separaron aproximadamente 150 mg. de segmentos visiblemente sanos de los brotes previamente fragmentados (sin contaminación por hongos, ni bacterias, ni necrosis, etc.).

- Con la ayuda de pinzas estériles fueron transferidos al medio de cultivo preparado.

- Los callos de la especie Leuchtenbergia principis (disponibles en el Laboratorio del CIATEJ, AC), fueron solamente traspasados al medio antes mencionado.

Se esperó a que transcurrieran 4 semanas para que el

Se esperó a que transcurrieran 4 semanas para que el cultivo cumpliera la fase de inducción (en la cual las células del inóculo inicial hubieran comenzado su crecimiento, tanto en número como en tamaño), y se alcanzara la fase de proliferación celular; durante esta fase el tejido calloso aumenta su masa celular al máximo, para después ser utilizados en las siguientes pruebas.

c. Condiciones ambientales de incubación para callos y brotes.

Se colocaron todos los frascos inoculados con brotes y callos, en una cámara de incubación a  $27 \pm 2^\circ \text{C}$ . con un fotoperiodo de 16 horas de luz por 8 de obscuridad y con una intensidad luminosa de 1500 lux.

### 3.2.2 IDENTIFICACION DE LOS CONSTITUYENTES EN PLANTAS

PRUEBAS PRELIMINARES QUIMICAS PRIMARIAS (Dominguez, 1988; Welcher, 1966).

#### ENSAYOS PARA ALCALOIDES.

-Se colocó una pequeña cantidad de cada uno de los brotes o callos en un tubo de ensayo.

-Se agregaron algunas gotas de agua, una gota de HCL diluido 1:1, y se agitó suavemente para disolver. Después se agregó una gota de reactivo de Mayer.

-Un precipitado blanco lechoso indicaría la presencia de alcaloides.

#### PRUEBA PARA GLICOSIDOS.

##### a. Glicósidos cianogénicos.

-Se colocó 0.1 g de cada uno de los brotes o callos en un matraz Erlenmeyer y se le agregaron 10 ml de agua, para obtener una solución.

-Se tomaron 0.2 ml de la solución anterior y se la colocó en un matraz, insertándole una pequeña pieza de papel impregnado con picrato de sodio, de tal manera que la orilla más baja del papel estuviera aproximadamente a una pulgada del nivel superior de la solución.

-Se dobló la tira de papel sobre el borde del matraz para que el papel colgara libremente. Se tapó el matraz, dejándolo así durante una hora para posteriormente observar el cambio del color.

Una prueba positiva para HCN resultaría en un cambio de color del papel de amarillo a rojo.

b. Glicósidos cardiacos.

-Se preparó un extracto etanólico de la siguiente manera:

Se maceraron los brotes o callos, de cada especie utilizada se agregó alcohol etílico en una proporción 1:1 v/v; esta mezcla fue dejada en refrigeración durante 24 horas.

El extracto obtenido proporcionó la base para la determinación de lactonas insaturadas y 2-desoxiazúcares.

PRESENCIA DE LACTONAS INSATURADAS.

Procedimiento A: Reacción de Kedde.

- En una cápsula de evaporación se colocaron 5 ml. del extracto etanólico, obtenido tal como se describe en el apartado inmediatamente anterior.

- Al extracto etanólico se le agregaron 5 ml. del reactivo de Kedde y se mezclaron muy bien con un agitador de cristal.

- Se adicionaron y mezclaron 2 ml. de NaOH 1 N.

Se observa el desarrollo del color. Un color púrpura indicaría positivamente la presencia de un anillo de lactona insaturada.

Procedimiento B: Prueba de Bush y Taylor o de Kedde modificada.

-Un trozo de papel filtro se impregnó con 0.1 ml del extracto etanólico antes obtenido, el que se sumergió en una caja petri que contenía el reactivo modificado de Kedde.

-Se extrajo inmediatamente el papel y se dejó secar a temperatura ambiente.

Una coloración púrpura indicaría una respuesta positiva, de la existencia de algún anillo de lactona insaturada.

#### PRESENCIA DE 2- DESOXIAZUCARES.

-En una cápsula de porcelana se colocaron 10 ml. del extracto etanólico antes señalado, dejándolo a baño de vapor hasta sequedad.

-Se agregaron 3 ml del reactivo de  $FeCl_3$ , se agitó; la mezcla se pasó a un tubo de ensayo pequeño, el que fué colocado en una posición correspondiente a un ángulo de  $45^\circ$ .

-Al tubo de ensayo así inclinado se le deslizó por sus paredes internas 1 ml de  $H_2SO_4$  concentrado.

La presencia de un anillo en la interfase indicaría la presencia de 2-desoxiazúcares y/o glicósidos unidos a 2-desoxiazúcares.

#### PRUEBA PARA TANINOS Y COMPUESTOS FENOLICOS.

-En un tubo de ensayo se colocó una pequeña cantidad de callos o brotes, se agregó agua para disolver y después unas gotas de solución de  $FeCl_3$ .

Al no haber reacción con la solución de  $FeCl_3$ , indicaría que la planta no contiene taninos ni compuestos fenólicos.

Un color azul-verdoso o negro-verdoso, después de la adición del reactivo  $FeCl_3$  sería indicativo de la presencia de taninos del tipo catecol.

Un color negro-azulado, después de la adición del reactivo  $FeCl_3$  indicaría la presencia de taninos del tipo pirogalol.

#### PRUEBA PARA ACEITES VOLATILES.

-En un vaso de precipitado se colocaron segmentos de brotes o callos. Se calentó a ebullición y se aspiraron los vapores. Si se apreciara un olor aromático, indicaría la presencia de aceites volátiles.

#### PRUEBA DE AZUFRE.

-En un tubo de ensayo se colocó una pequeña cantidad de brotes o callos y se le añadieron 2 ml de  $\text{HNO}_3$ ; se calentó a ebullición. Si se percibiera un olor desagradable indicaría la presencia de azufre.

#### PRUEBA PARA AZUCARES.

##### Procedimiento A:

-Se colocó una pequeña cantidad de brotes o callos en un tubo de ensayo y se le agregaron 10 gotas de agua destilada y directamente (no sobre las paredes del tubo de ensayo), 2 gotas de una solución fresca de alfa-naftol.

-Después de haberse mezclado, se agregaron 5 ml. de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  vaciandos por la pared interna del tubo.

La formación de un anillo violeta indicaría la presencia de carbohidratos.

##### Procedimiento B:

-- A una pequeña cantidad de brotes o callos colocados en un tubo de ensayo, se le agregaron 5 ml de reactivo de Bials.

-Se calentó la mezcla a ebullición y luego se dejó enfriar.

Un precipitado verde floclento, indicaría la presencia de una pentosa.

#### Procedimiento C:

Una pequeña cantidad de la planta se disolvió en 2 ml. de agua destilada, se agregaron 5 ml. de solución de Benedict y se llevó a ebullición por 2 minutos.

La formación de un precipitado verde amarillento, que cambia luego a color rojo ladrillo indicaría la presencia de un azúcar reductor.

#### PRUEBA PARA FLAVONAS

-Se colocó una pequeña cantidad de brotes o callos en un tubo de ensayo al que se agregaron 15 ml. de éter de petróleo; se sometió a calentamiento hasta 60°C, filtrar, el residuo fue tratado con volúmenes adicionales de éter de petróleo, y sometido nuevamente a calentamiento.

-Se combinaron los filtrados etéreos y se evaporaron a sequedad. Se disolvió el residuo desengrasado en 30 ml de etanol al 50%, fue filtrado y distribuido en dos tubos de ensayo conteniendo cada uno de ellos 2 ml del filtrado.

-A un primer tubo de ensayo se le agregaron 0.5 ml. de HCl concentrado para ser calentado a baño de vapor durante 5 minutos.

El desarrollo de color rojo-violeta sería indicativo de la presencia de leucoantocianinas.

-Al segundo tubo de ensayo se le agregaron 0.5 ml de HCl concentrado y 4 granallas de magnesio.

El cambio de coloración dentro de 10 minutos, indicaría la presencia de flavanoles.

En el caso de que definitivamente ocurriera un cambio de color, enfriar y diluir con un volumen igual de agua y agregar 1.0 ml. de octil-alcohol. Se agita y se forman dos capas.

El color violeta de la capa de octil-alcohol se debería a las gliconas, mientras que el color en la capa acuosa sería atribuible a la presencia de glicósidos.



## PRUEBA DE ANTRAQUINONAS

### Procedimiento A:

-Se colocaron brotes o callos en un vaso de precipitado al que se le añadió agua para disolver; después se agregaron 10 ml. de benceno, se agitó para mezclar bien y permitir que se separaran las dos fases (bencénica y acuosa).

-Se traspasó la capa bencénica a un tubo de ensayo, al que se le agregaron 5 ml. de solución reactivo de amoniaco .

Un color rojo indicaría la presencia de antraquinonas.

### Procedimiento B:

-Sobre una placa de porcelana con cavidades se colocaron brotes o callos; se agregaron unas cuantas gotas de KOH 0.5 N.

Un cambio en color a rojo indicaría la presencia de antraquinonas.

### 3.2.3. ESTANDARIZACION DE INOCULO

-En cajas petri conteniendo el medio de cultivo TSA se sembraron cada una de las bacterias E. coli y S. aureus, para ser incubadas a 27° C durante 24 horas.

-En una caja petri conteniendo el medio de cultivo YMB se sembró la bacteria A. rhizogenes para ser incubada a 27° C. durante 48 horas.

-En condiciones asépticas y bajo la campana de flujo laminar, con una asa, se removieron y homogeneizaron cada una de las bacterias utilizando 10 ml del medio de cultivo líquido de crecimiento correspondiente a cada bacteria.

-Cada una de las suspensiones formadas fue traspasada a un vaso de precipitado en donde se hizo la dilución conveniente para que el inóculo tuviera una absorbancia entre 0.1 y 0.2. Estas lecturas fueron tomadas en el espectrofotómetro utilizando como blanco el medio de cultivo líquido de cada una de las bacteria. Las mediciones se realizaron a una densidad óptica de 600 nm.

-En un matraz Erlenmeyer conteniendo 90 ml de medio de cultivo líquido correspondiente se inocularon 10 ml de cada una de las suspensiones bacterianas. El crecimiento bacteriano se llevó a cabo en un agitador orbital, con una agitación de 150 rpm y a una temperatura de 27° C.

Se tomaron lecturas en el espectrofotómetro cada hora. Se realizaron las gráficas y sus análisis correspondientes.

### 3.2.4. OBTENCION DE EXTRACTOS A PARTIR DE CALLOS Y BROTES EN LAS DIFERENTES ESPECIES DE CACTACEAS CULTIVADAS in vitro.

-Los brotes o callos obtenidos de cada especie fueron macerados en un mortero para tener un volumen de 10 ml, al cual se le agregaron 5 ml. de una solución de cloruro de sodio al 0.9% (esterilizada en autoclave durante 15 minutos a 120 Lbs/plg<sup>2</sup>). Cada una de las suspensiones se mantuvieron en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Volúmenes de 2 ml. fueron puestos en 6 tubos de ensayo.

-Al tubo No. 1 se le agregaron 2 ml. de solución salina al 0.9%.

-Al tubo No. 2 se le agregaron 2 ml. de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1.5%.

-Al tubo No. 3 se le agregaron 2 ml. de solución reguladora pH 4.0

-Al tubo No. 4 se le agregaron 2 ml. de solución reguladora pH 9.0

-Al tubo No. 5 se le agregaron 4 ml. de éter etílico.

-Al tubo No. 6 se le agregaron 2 ml. de alcohol etílico.

-El contenido de cada tubo de ensayo fue mezclado en el agitador magnético durante medio minuto y sellado con una película de plástico adherible para después ser guardados en una bolsa de plástico oscura en el refrigerador durante 24 horas (Carlson y Douglas, 1947).

### 3.2.5. MEDICION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE BROTES Y CALLOS DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE CACTACEAS CULTIVADAS in vitro.

-Las bacterias Escherichia coli y Staphylococcus aureus fueron sembradas en el medio TSA e incubadas a 27° C durante 24 horas. La bacteria Agrobacterium rhizogenes fué sembrada en el medio YMB e incubada durante 48 horas a 27° C.

-Con material estéril y en la campana de flujo laminar, las bacterias fueron removidas con ayuda de un asa, utilizando el mismo medio de cultivo en estado líquido en que fueron sembradas. Se vaciaron a un frasco estéril y a partir de allí se hizo una dilución utilizando como diluyente su propio medio de cultivo en forma líquida para cada bacteria.

-En Escherichia coli se utilizó la dilución 1:10 con una densidad óptica de 1.550

-En Staphylococcus aureus se utilizó la dilución 1:12 con una densidad óptica de 1.400.

-En Agrobacterium rhizogenes se utilizó la dilución 1:3 con una densidad óptica de 0.400.

-Las densidades ópticas fueron leídas en un espectro de absorción Perkin Elmer a una longitud de onda de 600 nm. utilizando como blanco el propio medio de cultivo líquido donde creció cada bacteria.

-Cada una de las bacterias fue sembrada en una caja petri que contenía una placa de agar específico para cada una de ellas, con la ayuda de un isopo se desechó el isopo y se esperaron unos 3 minutos antes de colocar los penicilindros fabricados en vidrio según medidas de la ADAC (Official Method of Analysis of the Association Official Analytical Chemist).

-Se distribuyeron los 4 penicilindros, en cada uno de los vértices imaginarios de un cuadrado sobre la placa del agar.

-Inmediatamente antes de probar la actividad bactericida, el extracto del tubo número 2 (véase 3.2.4), que contenía ácido sulfúrico al 1.5 % fue neutralizado con una solución de NaOH 0.1 N.

-Con una micropipeta se depositaron 225 microlitros de los extractos contenidos en los tubos números 1,2,3 y 4 en los penicilindros, de acuerdo con el procedimiento que se indicó en la sección anterior.

-Se removió la clorofila del tubo número 5 donde estaba el extracto etéreo por medio del carbón activado, utilizando el 2% en relación al volumen ocupado por el extracto dejándolo reposar 1 hora a temperatura ambiente. Se apartó un volumen de 1 ml. antes de ser filtrado utilizando papel Wathman para quitar el carbón. El extracto etéreo se probó antes y después de haberle agregado el carbón activado.

-Los contenidos de los tubos números 5 y 6, etéreo y etílico respectivamente, fueron probados utilizando un disco de papel Wathman de 6 mm., los que habían sido previamente impregnados con ellos.

-Las cajas petri que contenían las bacterias E. coli y S. aureus, con los penicilindros, tal como se indicó anteriormente, se incubaron a 27° C. durante 24 horas; la caja petri que contenía la bacteria A. rhizogenes se incubó durante 48 horas. Cada uno de los experimentos se realizó con su respectiva réplica.

Se observaron y anotaron los diámetros en milímetros de los halos de las zonas en donde se presentó inhibición.

### 3.2.6. MEDICION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS ANTIBIOTICOS COMERCIALES Y LAS SOLUCIONES UTILIZADAS PARA HACER LOS EXTRACTOS.

Utilizando las mismas técnicas para medir la actividad bactericida, se probó las soluciones reguladoras pH=4 y pH=9, la solución salina y solución de ácido sulfúrico al 1.5% e hidróxido de sodio con un pH=7, éter etílico, alcohol etílico y carbón activado con las bacterias empleadas en este estudio. También fueron probados los antibióticos comerciales Gentamicina BO, Amoxil y Claforán.

Reportandose los diámetros en milímetros los halos de las zonas en donde se presentó inhibición.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS

#### 4. MICROPROPAGACION DE CACTACEAS

##### 4.1 OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO

###### a. Micropropagación de los brotes.

Se micropropagaron los brotes de las especies: Coryphanta sp., Stenocereus queretaroensis, Escobaria missouriensis y Leuchtenbergia principis. Se mantuvieron libres de contaminación hasta el momento de ser utilizadas.

###### b. Iniciación del cultivo de callos.

La proliferación celular de los callos se obtuvo en los siguientes tiempos:

Coryphanta sp. en 5 semanas.

Stenocereus queretaroensis en 6 semanas.

Escobaria missouriensis en 5 semanas.

Manteniéndose libres de contaminación en el medio anteriormente descrito en la sección 3.1.4 hasta el momento de ser utilizadas.

## 4.2 IDENTIFICACION DE LOS CONSTITUYENTES EN LAS PLANTAS

Pruebas químicas preliminares realizadas en brotes y callos de las Cactáceas cultivadas in vitro.

1. En los brotes de Coryphantha sp. se encontraron presentes: alcaloides, 2-desoxiazúcares y/o glicósidos unidos a 2-desoxiazúcares, taninos y compuestos fenólicos tipo catecol, carbohidratos, pentosas y azúcares reductores.

Y en los callos de esta especie se encontraron: alcaloides 2-desoxiazúcares y/o glicósidos unidos a 2-desoxiazúcares, taninos y compuestos fenólicos tipo catecol, carbohidratos y pentosas.

2. En los brotes de Escobaria missouriensis se encontraron presentes:

2-desoxiazúcares, carbohidratos, pentosas y azúcares reductores.

Y en los callos de esta especie se encontraron: alcaloides, 2-desoxiazúcares y/o glicósidos unidos a 2-desoxiazúcares, carbohidratos y pentosas.

3. En los brotes de Leuchtenbergia principis se encontraron presentes:

alcaloides, 2-desoxiazúcares y/o glicósidos unidos a 2-desoxiazúcares, taninos y compuestos fenólicos tipo catecol, carbohidratos, pentosas y azúcares reductores.

Y en los callos de esta especie se encontraron: carbohidratos y azúcares reductores.

4. En los brotes de Stenocereus queretaroensis se encontraron presentes: alcaloides, 2-desoxiazúcares y/o glicósidos unidos a 2-desoxiazúcares, taninos y compuestos fenólicos tipo catecol, carbohidratos, pentosas y azúcares reductores.

Y en los callos de esta especie se encontraron: alcaloides, 2-desoxiazúcares y/o glicósidos unidos a los desoxiazúcares, taninos y compuestos fenólicos tipo catecol, carbohidratos y pentosas.

Estos resultados están reportados en las tablas 4.2.1 y 4.2.2.



Tabla 4.2.1 Pruebas preliminares químicas primarias en brotes

COMPUESTOS	ESPECIES			
	<i>Coryphantha sp.</i>	<i>L. arizonicus</i>	<i>E. missouriensis</i>	<i>S. guerezae</i>
1.- ALCALOIDES	+	+	-	+
2.- GLICOSIDOS				
a) cianogénicos	-	-	-	-
b) cardíacos - Lactonas insaturadas				
i) P. de Yoda	-	-	-	-
ii) P. de Bush & Taylor	-	-	-	-
3.- 2- DESOXIACUCARES	+	+	+	+
4.- TERNINOS Y COMPUESTOS FENOLICOS	+	+	+	+
5.- ACEITES VOLATILES	-	-	-	-
6.- AZUFRE	-	-	-	-
7.- ACUCARES				
a) carbohidratos	+	+	+	+
b) pentosas	+	+	+	+
c) azúcar reductor	+	+	+	+
8.- FLAVONAS				
a) leucoantocianinas	-	-	-	-
b) flavonoles	-	-	-	-
9.- ANTRACINGNAS	-	-	-	-

+ = presencia

- = ausencia

\* tipo catecol

Tabla 4.2.2 Pruebas preliminares químicas primarias en callos.

COMPUESTOS	ESPECIES			
	<i>Coriaria sp</i>	<i>L. arizonic</i>	<i>S. missouriensis</i>	<i>S. queretarensis</i>
1.- ALCALOIDES	+	-	+	+
2.- GLUCOSIDOS				
a) cianoglucosidos	-	-	-	-
b) cardiacos + Lactonas isoprenadas				
1) P. de Kiedde	-	-	-	-
2) P. de Sushu Taylor	-	-	-	-
3.- 2- ODESOMAZUCAROS	+	-	+	+
4.- TANINOS* + COMPUESTOS FENOLICOS	-	-	-	+
5.- AGENTES VOLATILES	-	-	-	-
6.- AZUFRE	-	-	-	-
7.- AZUCAROS				
a) carbohidratos	+	+	+	+
b) pentosa	+	-	+	+
c) azúcar reductor	-	+	-	-
8.- FLAVONAS				
a) leucoantocianinas	-	-	-	-
b) flavonoles	-	-	-	-
9.- ANTRACENONAS	-	-	-	-

+ = presencia

- = ausencia

\* tipo catecol

#### 4.3 ESTANDARIZACION DEL INOCULO.

El crecimiento de la población bacteriana para cada una de las cepas utilizadas fue esquematizado en sus respectivas curvas de crecimiento, encontrándose que cada uno de los cultivos atravesaron las fases lag y logarítmica llegando a su fase estacionaria. Allí se indican los tiempos y las concentraciones bacterianas existentes en cada fase.

Ver figuras 4.3.1, 4.3.2 y 4.3.3.

Ver tabla 4.3.1.

Se hicieron diluciones a absorbancias mayores de 0.800 y se graficó la Densidad Óptica.

Figura 4.3.1- Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus*

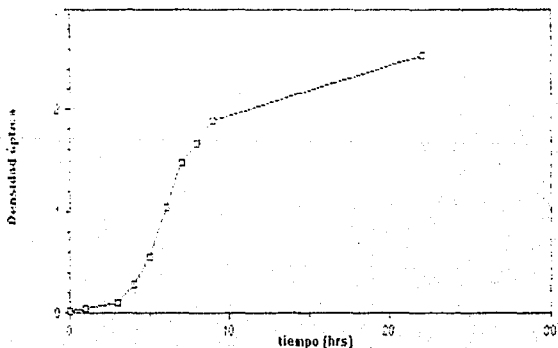


Figura 4.3.2- Curva de crecimiento de *Agrobacterium rhizogenes*

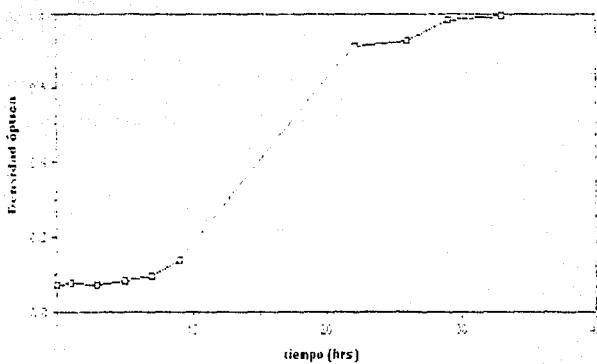


Figura 4.3.3 - Curva de crescimento de *Escherichia coli*

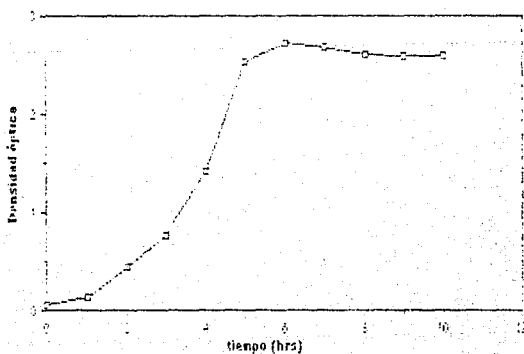


Tabla 4.3.1 Velocidad de crecimiento,  
 Tiempo de duplicación de E. coli  
S. aureus y A. rhizogenes.

Cálculo de la velocidad de crecimiento de cada uno de los microorganismos: ( $\mu$ ); y del tiempo de duplicación ( $t_d$ ). De acuerdo a los valores de las figuras 4.3.4, 4.3.5 y 4.3.6 respectivamente.

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$$\mu_{\text{S. aureus}} = 0.686 \text{ h}^{-1}$$

$$t_{d \text{ S. aureus}} = 1.01 \text{ horas}$$

$$\mu_{\text{A. rhizogenes}} = 0.125 \text{ h}^{-1}$$

$$t_{d \text{ A. rhizogenes}} = 5.53 \text{ horas}$$

$$\mu_{\text{E. coli}} = 0.574 \text{ h}^{-1}$$

$$t_{d \text{ E. coli}} = 1.2 \text{ horas}$$

Figura 4.3.4- Determinación gráfica de la velocidad de crecimiento específico de *Staphylococcus aureus*

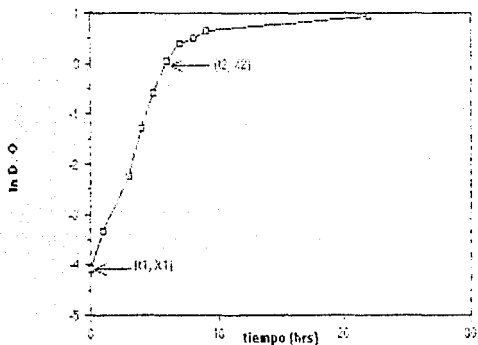


Figura 4.3.5 - Determinación gráfica de la velocidad de crecimiento específico de *Agrobacterium rhizogenes*

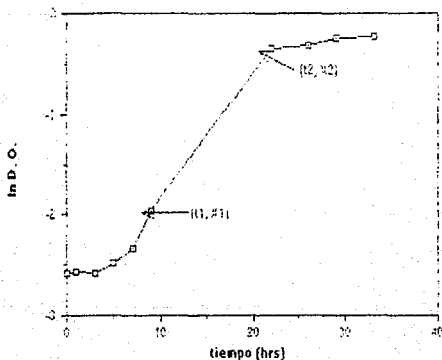
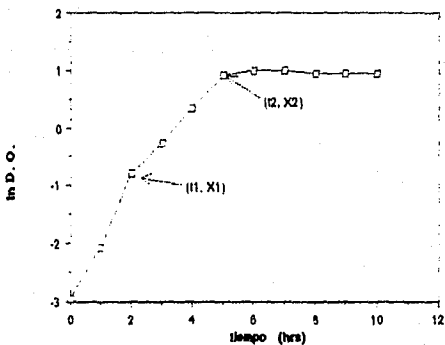


Figura 4.3.5 - Determinación gráfica de la velocidad de crecimiento específico de *Escherichia coli*



#### 4.4 MEDICION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE BROTES Y CALLOS DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE CACTACEAS CULTIVADAS in vitro.

A partir de los brotes de Coryphanta sp. se obtuvieron los siguientes resultados:

1. El extracto obtenido con la solución reguladora pH=4 formó un halo de inhibición de 10 mm. de diámetro con la bacteria A. rhizogenes.

2. El extracto obtenido con la solución reguladora pH=9 formó un halo de 10 mm. de diámetro con la bacteria A. rhizogenes creciendo sobre este halo una capa fina de bacterias.

3. Los extractos obtenidos con la solución salina, el ácido sulfúrico al 1.5%, éter etílico antes y después del tratamiento con carbón activado, agua y alcohol etílico no inhibieron el crecimiento bacteriano de las cepas en estudio.

A partir de los callos de Coryphanta sp. se obtuvieron los siguientes resultados:

1. El extracto obtenido con ácido sulfúrico al 1.5% formó un halo de inhibición de 14 mm. de diámetro con la bacteria S. aureus.

Figura 4.4.2

2. Con el extracto obtenido con la solución reguladora pH=4 se observó una inhibición en el crecimiento bacteriano de E. coli y S. aureus dentro de los penicilindros. Figura 4.4.2

3. El extracto obtenido con la solución reguladora pH=4 formó un halo de inhibición de 14 mm. de diámetro con la bacteria A. rhizogenes.

4. Los extractos obtenidos con la solución salina, éter etílico antes y después del tratamiento con carbón activado, agua y alcohol etílico no inhibieron el crecimiento bacteriano.

A partir de los brotes de Leuchtenbergia principis se obtuvieron los siguientes resultados:



1. El extracto obtenido con de la solución reguladora pH= 9 formó un halo de inhibición de 12 mm. de diámetro con la bacteria A. rhizogenes y sobre este halo se observa una capa fina de bacterias.

2. Los extractos obtenidos con la solución salina, el ácido sulfúrico al 1.5% , la solución reguladora pH= 4, el éter etílico antes y después del tratamiento con carbón activado y de alcohol etílico no inhibieron el crecimiento bacteriano.

A partir de los callos de Leuchtenbergia principis se obtuvieron los siguientes resultados:

1. El extracto obtenido con ácido sulfúrico al 1.5% formó un halo de inhibición de 6.70 mm. de diámetro con la bacteria S. aureus.

2. Al utilizar el extracto obtenido con la solución reguladora pH= 4 se observó una inhibición del crecimiento bacteriano de S. aureus dentro del penicilindro.

3. El extracto obtenido con la solución reguladora pH= 4 formó un halo de inhibición de 12 mm. de diámetro con la bacteria A. rhizogenes.

4. Los extractos obtenidos con la solución salina, la solución reguladora pH= 9, éter etílico antes y después del tratamiento con carbón activado, agua y alcohol etílico no inhibieron el crecimiento bacteriano.

A partir de los brotes de Escobaria missouriensis se obtuvieron los siguientes resultados:

1. Ninguno de los extractos obtenidos con la solución salina, el ácido sulfúrico al 1.5%, las soluciones reguladoras pH=4 y pH=9, éter etílico antes y después del tratamiento con carbón, agua y alcohol etílico tuvo acción bactericida. o inhibió el crecimiento de las bacterias probadas.

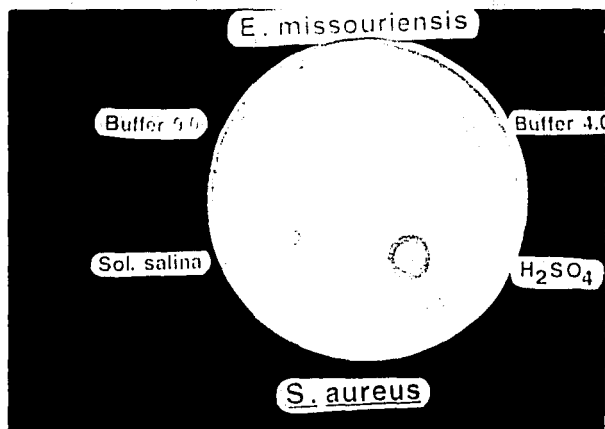


Figura 4.4.1

Inhibición del crecimiento de Staphylococcus aureus a partir de los extractos obtenidos de callos de Escobaria missouriensis con solución salina y ácido sulfúrico.

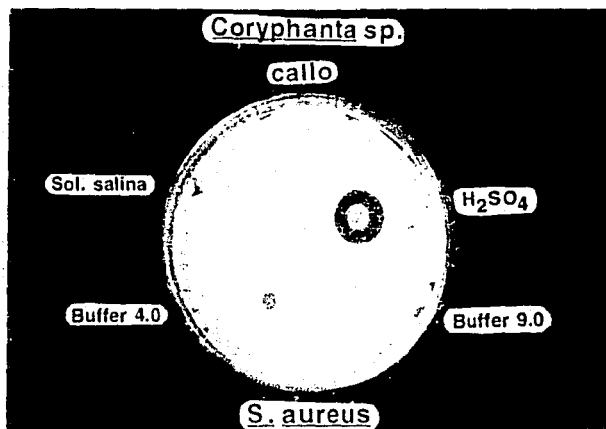


Figura 4.4.2

Inhibición del crecimiento de Staphylococcus aureus a partir de los extractos obtenidos de callos de Coryphanta sp. con ácido sulfúrico y solución reguladora con pH = 4.0.

A partir de los callos de Escobaria missouriensis se obtuvieron los siguientes resultados:

1. El extracto obtenido con ácido sulfúrico al 1.5% formó un halo de inhibición de 12 mm de diámetro con la bacteria S. aureus.

Figura 4.4.1

2. Al utilizar el extracto obtenido con la solución salina se observó una inhibición del crecimiento bacteriano de S. aureus dentro del penicilindro. Figura 4.4.1

3. Los extractos obtenidos con las soluciones reguladoras pH= 4 y pH= 9, éter etílico antes y después del tratamiento con carbón, agua y alcohol etílico no inhibieron el crecimiento bacteriano.

A partir de los brotes de Stenocereus queretaroensis se obtuvieron los siguientes resultados:

1. Los extractos obtenidos con ácido sulfúrico al 1.5% ; solución reguladora pH= 4 forman un halo de inhibición de 12 mm. de diámetro con la bacteria S. aureus.

2. Los extractos preparados obtenidos a partir de solución salina, solución reguladora pH = 9, éter etílico antes y después del tratamiento con carbón activado, agua y alcohol etílico no presentaron inhibición del crecimiento bacteriano.

A partir de los callos de Stenocereus queretaroensis se obtuvieron los siguientes resultados:

1. El extracto obtenido con la solución salina formó un halo de inhibición de 6.70 mm. de diámetro con la bacteria S. aureus.

2. Los extractos obtenidos con el ácido sulfúrico al 1.5% y la solución reguladora pH = 4 inhibieron el crecimiento de S. aureus formando con ambos un halo de inhibición de 5.35 mm. de diámetro.

3. El extracto obtenido con la solución reguladora pH = 9 formó un halo de inhibición de 4.70 mm. de diámetro con la bacteria S. aureus.

4. Los extractos obtenidos con solución salina, ácido sulfúrico al 1.5%, éter etílico antes y después del tratamiento con carbón activado, agua y alcohol etílico no presentaron inhibición del crecimiento bacteriano.

Todos los experimentos fueron realizados por duplicado y los resultados siempre fueron los mismos.

Ver tablas 4.4.1, 4.4.2 y 4.4.3.

**Tabla 4.4.1 Acción bactericida de los extractos vegetales sobre *S. aureus***

Extractos Especies	Diámetro de inhibición (mm.)			
	solución salina	Ac. sulfúrico al 1.5%	Soluciones reguladoras	
			pH=4	pH=9
<i>Coryphanta</i> sp brote callo	- -	- 14	- *	- -
<i>L. principis</i> brote callo	- -	- 6.7	- *	- -
<i>E. missouriensis</i> brote callo	- *	- 12	- -	- -
<i>S. queretaroensis</i> brote callo	- 6.7	12 5.35	12 5.35	- 4.7

\* inhibición dentro del penicilindro

Tabla No.4.4.2 Acción bactericida de los extractos vegetales sobre *A. rhizogenes*.

Extractos Especies	Diámetro de inhibición (mm.)			
	Solución salina	Ac. sulfúrico al 1.5%	Soluciones reguladoras	
			pH=4	pH=9
<i>Coryphantha</i> sp. brote callo	- -	- -	10 14	10* -
<i>L. principis</i> brote callo	- -	- -	- 12	12* -
<i>E. missouriensis</i> brote callo	- -	- -	- -	- -
<i>Squeretsroensis</i> brote callo	- -	- -	- -	- -

\* Hay una capa de bacterias fina sobre el halo.

**Tabla No.4.4.3 Acción bactericida de los extractos vegetales sobre *E. coli***

Extractos Especies	Diámetro de inhibición (mm.)			
	solución salina	Ac. sulfúrico al 1.5%	Soluciones reguladoras	
			pH=4	pH=9
<i>Coryphanta sp</i> brote callo	- -	- -	- *	- -
<i>L. principis</i> brote callo	- -	- -	- -	- -
<i>E. missouriensis</i> brote callo	- -	- -	- -	- -
<i>S. queretaroensis</i> brote callo	- -	- -	- -	- -

\* Inhibición dentro del penicilindro.



#### 4.5 MEDICION DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS ANTIBIOTICOS COMERCIALES Y LAS SOLUCIONES PARA HACER LOS EXTRACTOS.

Las soluciones salina, de ácido sulfúrico al 1.5% e hidróxido de sodio, reguladoras pH=4 y pH=9, y carbón activado sin extracto de plantas (testigos) no inhibieron el crecimiento de las bacterias empleadas en este estudio, excepto la solución reguladora pH=4 con la cual se observa una capa fina de bacterias de A. rhizogenes alrededor del penicilindro formandose un halo de 12 mm de diámetro.

Los discos de papel filtro impregnados con éter y alcohol etílico una vez secos, no inhibieron el crecimiento de las bacterias utilizadas.

El crecimiento de S. aureus fué inhibido con el antibiótico Gentamicina a una concentración de 40 mg/ml formando un halo de 15 mm. de diámetro.

El crecimiento de E. coli fué inhibido con el antibiótico Amoxicilina a una concentración de 166 mg/ml formando un halo de 16 mm. de diámetro.

El crecimiento de A. rhizogenes fué inhibido con el antibiótico Cefotaxima (Claforán) a una concentración de 25 mg/ml formando un halo de 23 mm. de diámetro.

Ver tablas 4.5.1 y 4.5.2.

**Tabla 4.5.1 Acción bactericida de los reactivos utilizados en la preparación de los extractos vegetales.**

Reactivos Bacterias	Diámetro de inhibición (mm.)					
	Soluciones Reguladoras		Carbón Activado	Solución NaOH + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Eter etílico	Alcohol etílico
	pH=9	pH=4		pH=7.0		
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. rhizogenes</i>	-	12 *	-	-	-	-

\* Existe una capa fina de bacterias sobre el halo.

**Tabla 4.5.2 Acción bactericida de los antibióticos sobre *E. coli*, *S. aureus* y *A. rhizogenes*.**

Antibióticos Bacterias	Diámetro de inhibición (mm.)		
	Gentamicina (40 mg/ml)	Cefotaxima (25 mg/ml)	Amoxicilina (166 mg/ml)
<i>E. coli</i>	-	-	16
<i>S. aureus</i>	15	-	-
<i>A. rhizogenes</i>	-	23	-

## CAPITULO V

### DISCUSION

En este trabajo de investigación se obtuvieron drogas no refinadas de origen vegetal mediante las extracciones de diferentes soluciones con los brotes y callos de las cactáceas cultivadas in vitro que inhibieron el crecimiento de los microorganismos E. coli, S. aureus y A. rhizogenes.

Los extractos obtenidos a partir de los brotes y callos de S. queretaroensis, brotes de Leuchtenbergia principis y Coryphanta sp., callos de Coryphanta sp. y Escobaria missouriensis presentaron una inhibición del crecimiento bacteriano frente a las cepas E. coli, A. rhizogenes y S. aureus.

Por otro lado en dos investigaciones realizadas por Carlson y cols. (1947), en las especies de Meibomia rigida, Verbascum blattaria, Ceanothus velutinus y Chrysopsis mariana al igual que en este trabajo, donde se utilizaron las mismas técnicas de estudio se encontró una actividad inhibitoria de crecimiento para bacterias gramnegativas y grampositivas.

En las pruebas químicas preliminares de las cactáceas cultivadas in vitro se encontró la presencia de carbohidratos, alcaloides, glicósidos, taninos y compuestos fenólicos, reportados en las tablas 4.2.1 y 4.2.2. Staba (1980) menciona que la obtención de este tipo de metabolitos es muy común a partir de diferentes plantas bajo la técnica de cultivo de tejidos. Figuran alcaloides del grupo de la isoquinolina (Catarantus roseus), taninos (callos de Juniperus communis), compuestos fenólicos (Acer pseudoplatanus) glicósidos (Digitalis metronensis) y carbohidratos (Helianthus annus).

Se hace referencia a los alcaloides tipo isoquinolina debido a que existen evidencias de las propiedades bactericidas de ellos y además son los que generalmente producen las cactáceas (Sodi, 1953).

El alcaloide peyocactina fué obtenido y probado su actividad bactericida por Walkington y cols (1960) observando halos de inhibición mayores que los producidos por los extractos de los cactos reportados en este trabajo. En cuanto a la investigación realizada por Viramontes (1991) sobre la misma temática sus resultados muestran una acción bactericida por parte de este alcaloide, así como lo reportado por las cactáceas que contenían alcaloides y que presentaron acción inhibitoria del crecimiento bacteriano. Otra evidencia de esto es la existencia de la berberina perteneciente a este mencionado grupo obtenida a través de la técnica de cultivo de tejidos (Staba, 1980) y que tiene propiedades bactericidas (Tabata, 1991).

En lo que respecta al grupo de taninos y compuestos fenólicos no es rara su presencia en las cactáceas cultivadas in vitro. Ya que se les considera como los metabolitos secundarios más comunes (Sharp et al., 1977).

Por otra parte, la acción antiséptica de estos compuestos esta presente en determinados estados o etapas de crecimiento de las plantas a veces como mecanismo preventivo de defensa contra el medio ambiente es decir por un efecto alelopático de las plantas (Harborne, 1985).

Esto coincide con la inhibición del crecimiento bacteriano por parte de los extractos de las cactáceas reportadas que contenían taninos y compuestos fenólicos, además de que los callos fueron tomados en la fase de proliferación celular.

La presencia de carbohidratos en las cactáceas es importante. Ya que estos metabolitos primarios dan origen a la presencia de los secundarios. Algunos azúcares como la glucosa, fructuosa ocurren muy frecuentemente en las drogas vegetales, tales como las que estan en combinación con los glicósidos. Dentro de las estructuras glicosídicas estan involucrados muchos antibióticos que derivan del metabolismo de los carbohidratos, los aminoglicósidos: gentamicina, kanamicina, neomicina, estreptomycin (Tyler et al., 1976). Por lo cual quizá también a estructuras similares se les pudieran atribuir estas propiedades

inhibitorias del crecimiento bacteriano por parte de las cactáceas reportadas que contienen estos compuestos y que sus extractos presentaron esta inhibición.

Los extractos vegetales preparados a partir de callos de Stenocereus queretaroensis, tuvieron una actividad constante bactericida. En el análisis cualitativo realizado de estos se encontró la presencia de taninos y compuestos fenólicos los cuales aparecen en determinados estados o etapas de crecimiento de los cultivos como lo menciona Harborne (1985).

La bacteria más susceptible a los diferentes tipos de extractos reportados en la sección de resultados fue S. aureus.

De acuerdo a los resultados de los experimentos, las posibilidades del uso industrial en el área farmacéutica de los metabolitos secundarios encontrados en las diferentes cactáceas estudiadas, son enormes ya que la biosíntesis de estos metabolitos apoyada con la técnica de cultivo de tejidos vegetales, se pudiera obtener una serie de beneficios económicos a partir de una comercialización adecuada de estos productos naturales de interés médico.

Se sugiere que los resultados obtenidos sean comprobados ya que los problemas a los que se enfrenta este tipo de investigación, son de orden genético, morfológico y bioquímico.

Se debe estar alerta ante la posibilidad de que los metabolitos puedan estar solamente en el primer explante y no persistir en los subcultivos (Staba, 1980).

## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES

1. Los inóculos utilizados fueron los adecuados para observar la inhibición del crecimiento bacteriano de E. coli, S. aureus y A. rhizogenes.

2. Diferentes tipos de extractos preparados a partir de los callos y brotes de las cactáceas cultivadas in vitro presentaron acción bactericida con las cepas S. aureus, E. coli y A. rhizogenes.

a. El crecimiento de S. aureus fué inhibido por diferentes extractos preparados a partir de callos de Coryphanta sp. Leuchtenbergia principis, Escobaria missouriensis y brotes de Stenocereus queretaroensis.

b. El crecimiento de E. coli fué inhibido por el extracto obtenido a partir de los callos de Coryphanta sp.

c. El crecimiento de A. rhizogenes fué inhibido por el extracto obtenido a partir de los brotes de Coryphanta sp. y Leuchtenbergia principis.

3. El cultivo de tejidos vegetales a través de las diferentes técnicas de micropropagación puede ser usado como alternativa para la obtención de plantas como una fuente biológica de potenciales compuestos.

Las ventajas que ofrece el uso de esta técnica sobre el convencional tipo cultivo de plantas completas son:

- a. Evita la destrucción del ecosistema.
- b. Producir compuestos bajo controladas condiciones ambientales.
- c. Regula el crecimiento celular y sus procesos metabólicos.
- d. Quizás se pudiera obtener suficiente materia prima para las necesidades industriales.

e. La biotransformación de compuestos a compuestos de uso medicinal.

f. Biosíntesis de metabolitos secundarios

La técnica de cultivo de tejidos vegetales es de potencial valor para ser usada como una eficiente fuente industrial de metabolitos secundarios y ser producidos comercialmente a más bajo costo que a partir de las usuales fuentes comerciales.

Una tecnología tan bondadosa y potencialmente importante debe estar ligada a la realidad social y económica del país.

México posee una gran riqueza vegetal, con recursos humanos calificados y estudios tecnológicos haciendo que sea necesaria la participación del sector público, privado y productivo para que exista una comercialización adecuada de esta tecnología y así el país pueda alcanzar una posición más ventajosa en los mercados mundiales.

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fué determinar la acción bactericida in vitro de las siguientes especies de cactáceas:

Leuchtenbergia principis

Escobaria missouriensis

Coryphanta sp.

Stenocereus queretaroensis

En este trabajo de investigación se hizo la micropropagación de las especies utilizando técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Se determinó cualitativamente la composición química de cada una de ellas.

Se probaron las propiedades bactericidas de cada extracto obtenido a partir de los callos y brotes de cada una de las especies con las cepas: E. coli, A. rhizogenes y S. aureus.

El crecimiento de E. coli fué inhibido por el extracto obtenido a partir de los callos de Coryphanta sp.

El crecimiento de A. rhizogenes fué inhibido por el extracto obtenido a partir de los brotes de Coryphanta sp. y Leuchtenbergia principis.

El crecimiento de S. aureus fué inhibido por diferentes extractos preparados a partir de callos de Coryphanta sp., Leuchtenbergia principis, Escobaria missouriensis y brotes de Stenocereus queretaroensis.



## CAPITULO VII

### APENDICE

- 7.1 Medio Murashige y Skoog (1962) adicionado con las vitaminas -L<sub>2</sub> (Phillips and Collins, 1979), para la producción de brotes múltiples. (\*)

MS- Mayores	10 ml/l
MS- Menores	5 ml/l
CaCl <sub>2</sub>	22 ml/l
Fe.EDTA	10 ml/l
Vitaminas -L <sub>2</sub>	10 ml/l
Sacarosa	30 gr/l
Acido naftalenacético (ANA)	0.02 mg/l
6-furfuril aminopurina (KIN)	5.00 mg/l
Agar	8.00 gr/l
pH = 5.8 ± 0.05	

Esterilizar en autoclave.

(\*) Solución Stock de elementos mayores MS:

<u>COMPUESTO</u>	<u>gr/l</u>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165.0
KNO <sub>3</sub>	190.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.0

Esterilizar (autoclave).

(\*) Solución Stock de elementos menores MS:

$H_3BO_3$	1240 mg/l
$MnSO_4 \cdot H_2O$	2.38 gr/l
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.12 gr/l
KI	176 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	50 mg/l
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	5 mg/l
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	5 mg/l

Esterilizar (autoclave).

(\*) Solución stock de Vitaminas -L<sub>2</sub>.

Thiamina	200 mg/l
Pyridoxina	50 mg/l
Inositol	25 gr/l

No se esteriliza . Solo guardar en refrigeración para uso inmediato, o congelar para conservar por más tiempo.

(\*) Solución stock de cloruro de calcio.

$CaCl_2$	20 gr/l
----------	---------

Esterilizar en autoclave.

(\*) Solución stock de Fe.EDTA.

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2.784 gr/l
$Na_2EDTA$	2.724 gr/l

Esterilizar en autoclave.

- 7.2 Medio Murashige y Skoog (1962) adicionado con las vitaminas -L<sub>2</sub> (Phillips and Collins, 1979), modificado por Clayton., y cols. 1990) para la producción de callo. (\*)

MS-Mayores	10 ml/l
MS-Menores	5 ml/l
CaCl <sub>2</sub>	22 ml/l
Fe,EDTA	10 ml/l
Vitaminas -L <sub>2</sub>	10 ml/l
Sacarosa	30 gr/l
Acido 2,4-Dicloro- fenoxiacético (2,4-D)	3 mg/l
Acido naftalenacético (ANA)	2 mg/l
6-furfuril aminopurina (KIN)	2 mg/l
Agar	8 gr/l

pH = 5.8 ± 0.05

- 7.3 Medio de cultivo para Agrobacterium rhizogenes YMB. (\*)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.0 g/l
NaCl	0.1 g/l
Manitol	10.0 g/l
Extracto de levadura	0.4 g/l
pH	7.0
agar	15.0 g/l
Rifampicina	50.0 mg/l

(\*) Se utiliza como solvente agua destilada.

## CAPITULO VIII

### BIBLIOGRAFIA

1. Agurell, S., Bruhn J.G. Lundstrom P. and Stevenson U. CACTACEAE ALCALOIDES OF Trichocereus SPECIES AND SOME OTHER CACTI. Lloydia. 34 (2): 183-187. Junio. 1971
2. Arias-Montes, S. COLECTA DE CACTACEAS. Resúmenes de la Reunión "Programa nacional para el rescate de cactáceas". Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. (Documento inédito). México. 1990.
3. Ault, J.R. and Backmon W.J. In vitro PROPAGATION OF Ferocactus acanthodes (cactaceae). Hortscience 22 (1): 126-127. 1987.
4. Bravo-Hollis, H. LAS CACTACEAS DE MEXICO. Universidad Nacional Autónoma de México. Vol 1. México. 1978.
5. Bravo-Hollis, H. y Sánchez-Mejorada, H. LAS CACTACEAS DE MEXICO. Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. 2. México. 1991.
6. Buchanan, R.E. and Gibbson N.E. 1984. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 8ª edición. U.S.A. Ed. The Williams & Wilkins Co. 1984.
7. Campbell, G.E., Chan S. and Baker W.G. GROWTH OF LETTUCE AND CAULIFLOWER TISSUES in vitro AND THEIR PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL METABOLITES. Can. J. of Microbiol. 11: 785-789. 1965.
8. Carlson, H.J., Douglas H.G. and Robertson J. ANTIBACTERIAL SUBSTANCES SEPARATED FROM PLANTS. J. Bact. 55: 241-248. 1947.

9. Carlson, H.J. and Douglas H.G. SCREENING METHODS FOR DETERMINING ANTIBIOTIC ACTIVITY OF HIGHER PLANTS. *J.Bact.* 55: 235-240. 1947.
10. Clayton, W.P. MICROPROPAGATION AS A MEANS OF CONSERVATION AND COMMERCIALIZATION OF MEMBERS OF THE SUBTRIBE CACTINAE (cactaceae). Tesis de Maestria. New Mexico State University. U.S.A. 1987.
11. Clayton, W.P., Hubstenberger F.J. and Philips G.C. MICROPROPAGATION OF MEMBERS OF THE CACTACEAE SUBTRIBE CACTINAE. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 337-343. 1990.
12. Davis, B., Dulbecco R., Ellen H., Ginsberg K., Wood B. y McCarty M. TRATADO DE MICROBIOLOGIA. 2ª Ed. España. Ed. Salvat. 1979.
13. Domínguez, A. METODOS DE INVESTIGACION FITOQUIMICA. 4ª Ed. México. Ed. Limusa. 1988.
14. Gautheret, R.J. SUR LA POSSIBILITE DE REALISER LA CULTURE INDEFINIE DES TISSUS DE TUBERCULES DE CAROTTE. *Hebd. C.R. Séanc. Acad. Sci. Paris.* 208: 119-121. 1939.
15. González, S. y Peñaloza I. METODOS DE BIOMOLECULAS. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 1981.
16. Harborne, J.B. INTRODUCCION A LA BIQUIMICA ECOLOGICA. España. Ed. Alhambra. 1985.
17. Helrich K. OFFICIALS METHOD OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OFFICIAL ANALITICAL CHEMIST. 15ª edición. Vol. 1. Tomo I. U.S.A. Editorial Association of Official Analytical Chemists, Inc. 1990.
18. Hurtado, D. y Merino M.E. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES. México. Ed. Trillas. 1988.

19. Jawetz, E., Melnick J.L. y Adelberg E. MICROBIOLOGIA MEDICA. 7ª Ed. México. Ed. El Manual Moderno, S.A. 1977.
20. Khanna, P.E. and Staba J. ANTIMICROBIAL FROM PLANT TISSUE CULTURES. Lloydia 31 (2): 180-189. Junio. 1968.
21. Khanna, P.E., Mohan S. and Nag T.N. ANTIMICROBIAL FROM PLANT TISSUE CULTURES. Lloydia 34: 168-169. Marzo. 1971.
22. López, G. y Lozoya E. LAS CACTACEAS. ¿Fuente potencial de metabolitos secundarios en desaparición?. (En prensa). 1991.
23. Mathes, M.C. THE SECRETION OF ANTIMICROBIAL MATERIALS BY VARIOUS ISOLATED PLANT TISSUES. Lloydia 30: 177-181. Marzo. 1963.
24. McCleary, P., Sypherd S. and Walkington D.L. ANTIBIOTICS ACTIVITY OF AN EXTRACT OF PEYOTE [Lophophora williamsii (Lemaire coulter)]. Econ. Bot. 14: 247-249. 1960.
25. Michel, R., Calcagno M., Zabiky J., Arriola L., Muñoz J., Moreno J. y García F. DESARROLLO BIOTECNOLÓGICO: UNA ESTRATEGIA PARA JALISCO. México. Ed. Unidad Editorial, 1986.
26. Muir, W.H., Hidelandt A.C. and Riker A.J. THE PREPARATION ISOLATION AND GROWTH IN CULTURE OF SINGLE CELLS FROM HIGER PLANTS. Am. J. Bot. 45: 589-597. 1954.
27. Murashige, T. and Skoog F. A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH IN CULTURE OF SINGLE CELLS. Physiol. Pl. 15: 473-497. 1962.
28. Nobecourt, P., SUR LES RADICELLES NAISSANT DES CULTURES DE TISSUS VEGETAUX. C.R. Séanc. Soc. Biol. 130: 1271. 1939.

29. Quintero, R. PROSPECTIVAS DE LA BIOTECNOLOGIA EN MEXICO. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México. 1985.
30. Robbins, W.L. CULTIVATION OF EXCISED ROOT TIPS AND STEAM UNDER ESTERILE CONDITION. Bot. Gaz. 73: 376-390. 1922.
31. Robert M. y Loyola V. EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES EN MEXICO. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México. 1985.
32. Rodríguez-Garay, B. APLICACIONES BIOTECNOLOGICAS DE LA PRODUCCION DE CACTACEAS DE INTERES COMERCIAL. Resúmenes de la reunión " Programa para el Rescate de Cactáceas 1990". Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. México. 1990.
33. Rodríguez-Garay, B., López-Gómez R., Bayardo Prieto C., and Vivas de la Torre E.N. Agrobacterium rhizogenes INDUCED ROOTING IN in vitro PRODUCED SHOOTS OF THE CACTUS Leuchtenbergia principis Memorias del " Second Internat. Symp. In vitro Culture and Hort. Breeding." International society for Horticultural science. U.S.A. 1992.
34. Rodríguez-Garay, B. and Rubluo A. In vitro MORPHOGENETIC RESPONSES OF THE ENDANGERED CACTUS Aztekium ritteri (Boedeker). Cact. Succ. Jl. (U.S.). 64 (3): 116-119. Mayo-Junio. 1992.
35. Sharp, W.R. Larsen P.O., Paddock E.F., Raghavan V. PLANT CELL AND TISSUE CULTURE . U.S.A. Press Ohio State University Columbus. 1977.
36. Skoog, F. and Miller, C.G. CHEMICAL REGULATION OF GROWTH AND ORGAN FORMATION IN PLANT TISSUE CULTURED. in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-130. 1957.

37. Sodi Pallares, E. ALCALOIDES EN LAS CACTACEAS. Cact. Suc. Mex. 5: 35-43. 1953.
38. Soltero, R. IMPORTANCIA ORNAMENTAL DE LAS CACTACEAS. Resúmenes de la reunión "Programa para el Rescate de Cactáceas 1990". CIATEJ A.C. México 1990.
39. Staba, John E. PLANT TISSUE CULTURE AS A SOURCE OF BIOCHEMICALS. U.S.A. CRC Press, Inc. 1980.
40. Starling R. In vitro PROPAGATION OF Leuchtenbergia principis. Cact. Succ. J1. (U.S.). 57: 114-115. 1985.
41. Street, H.E. PLANT CELL CULTURES. U.S.A. Academic Press. 1977.
42. Tabata, M. TRANSPORT AND SECRETION OF NATURAL PRODUCTS IN PLANT CELL CULTURES. Planta Med. 57: 21-26. 1991.
43. Tayler V.E., Brandy L.R. y Robbers J.E. PHARMACOGNOSY. 7ª Ed. U.S.A. LEA & Febiger. 1976.
44. Trease, G. y Charlef E. FARMACOGNOSIA. 2ª Ed. México. Ed. Continental. 1982.
45. Veliky, I. A. and Genest K. GROWTH AND METABOLITES OF Cannabis sativa CELL SUSPENSION CULTURES. Lloydia 35: 450-456. 1972.
46. Veliky, I. A. and Lata I. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CULTURED PLANT CELLS AND TISSUES. Lloydia 37.(4): 611-620. Dic. 1974.
47. Viramontes, M. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PEYOTE (Lophopora williamsii). Tesis profesional de la carrera de medicina. Universidad de Guadalajara. México. 1991.



48. Wallace, R.S. BIOCHEMICAL TAXONOMY AND THE CACTACEAE: AN INTRODUCTION AND REVIEW. *Cact. Succ. Jl. (U.S.)*. 58: 35-39. 1968.
49. Welcher, F. CHEMICAL SOLUTIONS. 2<sup>nd</sup> Ed. Canada. Ed. Van Nostrand Applied Science Library. 1966.
50. Went, F.W. and Thiman K.S. PHYTOHORMONES. U.S.A. Ed. Mc Millan Co. 1937.
51. White, P.R. POTENCIALY UNLIMITED GROWTH OF EXCISED TOMATO ROOT TIPS IN A LIQUID MEDIUM. *Pl. Physiol. Lancaster*. 9: 585-600. 1934.