UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS

TESIS DOCTORAL

ESTUDIOS FARMACOLÓGICOS Y TOXICOLÓGICOS DE UN EXTRACTO ACUOSO DE FRUTOS DE OPUNTIA DILLENII HAW

JUAN FRANCISCO LORO FERRER

Las Palmas de Gran Canaria, Febrero de 1994

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

32-1993/94

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el Doctorando las objeciones formuladas por los señores jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de APTO CUM LAUDE

Las Palmas de G. C., á 26 de Marzo de 1.994.

El Presidente: Dr. D. Pedro Sánchez García,

La Secretaria: Drª Dª Mª del Pilar Fresén Cansino,

El Vocal: Dr. D. Pedro González Santos,

El Vocal: Dr. D. Antonio Fernández Rodríguez,

El Vocal: Dr. D. Félix López Blanco,

El Doctorando: D. Juan-Fco. Loro Ferrer,

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA · NEGOCIADO UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

BIBLIOTECA GENERAL

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DOCTORADO EN MEDICINA Y CIRUGIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLINICAS

PROGRAMA DE: FARMACOLOGIA EXPERIMENTAL Y CLINICA

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

TITULO DE LA TESIS:

ESTUDIOS FARMACOLOGICOS Y TOXICOLOGICOS DE UN EXTRACTO ACUOSO DE FRUTOS DE *OPUNTIA DILLENII HAW.*

Tesis Doctoral presentada por D. **Juan Francisco Loro Ferrer**
Dirigida por el Dr. D. Isidoro del Rio Lozano

El Director,
(firma)

El Doctorando,
(firma)

Las Palmas de Gran Canaria, a 7 de Febrero de 1994.

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
LAS PALMAS DE G. CANARIA
Nº Documento 340.408
Nº Copia 340.416

D. ISIDORO DEL RIO LOZANO, CATEDRATICO DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD, DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLINICAS, UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado "**Estudios farmacológicos y toxicológicos de un extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw.**", ha sido realizado por D. **Juan Francisco Loro Ferrer**, en la Unidad docente de Farmacología, Departamento de Ciencias Clínicas de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, bajo su dirección y asesoramiento técnico, y que una vez revisada la presente Memoria la encuentra apta para su defensa ante tribunal.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, extiende el presente certificado en Las Palmas de Gran Canaria a siete de Febrero de 1994.

Fdo.: D.Isidoro del Rio Lozano

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003.

A Lilián
A Jorge
A mis padres y hermano

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

ESTE TRABAJO HA SIDO FINANCIADO POR LA CONSEJERIA DE EDUCACION DEL GOBIERNO AUTONOMO DE CANARIAS (PROYECTO 91/21, CONVOCATORIA 1981).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

AGRADECIMIENTOS

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han brindado su apoyo y ayuda, para que esta tesis llegase a buen fin, y con especial mención

Al Prof. Dr. Dn. Isidoro del Rio Lozano, director de esta tesis y que además de asesorarme adecuadamente, me ha aportado innumerables consejos que me ayudan a mi formación como investigador y como persona.

A Lilian Rosa Pérez Santana, Profesora del Departamento de Morfología, mi esposa y amiga, que con su cariño diario y con su apoyo incondicional, ha sido un pilar imprescindible en la realización de este trabajo de investigación.

A Leandro Pérez Fernández, profesor de la Unidad Docente de Farmacología y que gracias a su visión crítica y precisa de la investigación me enseñó a desenvolverme en los caminos del método experimental.

A Pilar Fresen Cansino, profesora de la Unidad Docente de Farmacología, que me ayudó día a día y con la que siempre pude contar en los momentos de desánimo.

A los profesores de la Unidad Docente de Farmacología Don Luis Domínguez Boada y Don Javier Cabrera Oliva que me brindaron su apoyo incondicional.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Al profesor del Dpto. de Farmacología de la Universidad de La Laguna Don Eduardo Navarro, por su orientación científica y cooperación en la realización del presente trabajo.

A los laboratorios de Urgencias del Hospital Insular y del Centro de Salud de Vecindario y en especial a Don Rafael Pérez Rodríguez y Dña Elena Cebrero, que me brindaron su ayuda en gran parte de las determinaciones analíticas de este trabajo de investigación.

A los profesores de Estadística Don José María Limiñana y Don Pedro Saavedra por su inestimable ayuda y por las enseñanzas estadísticas que de ellos recibí.

A mis padres y hermano y a todas aquellas personas que de una u otra forma me ayudaron y confiaron en la finalización de este trabajo.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

INDICE

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

1.- INTRODUCCION 1

1.1.-Introducción 2

1.2.-Aspectos etnofarmacológicos 7

1.3.-Química de las betalaínas 9

1.4.-Biosíntesis de las betalaínas 16

1.5.-Quimiotaxonomía de las betalaínas 20

1.6.-Función de las betalaínas en la naturaleza 25

1.7.-Métodos de extracción, separación y cuantificación de las betalaínas 27

1.8.-Análisis y cuantificación de las betalaínas 32

1.9.-Justificación al estudio de los efectos farmacológicos 37

2.- OBJETIVOS 41

3.- PARTE EXPERIMENTAL 44

3.1.-Preparación y purificación parcial del extracto acuoso obtenido de Opuntia dillenii Haw. 45

3.1.1.-Introducción 45

3.1.2.-Material y método 45

3.1.3.-Resultados 53

3.2.-Análisis estadístico 54

3.3.-Test de Irwin 55

3.3.1.-Introducción 55

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.3.2.-Material y método 56

3.3.3.-Resultados 65

3.4.-Toxicidad aguda 72

3.4.1.-Introducción 72

3.4.2.-Material y método 72

3.4.3.-Resultados 74

3.5.-Estudio de analgesia 75

3.5.1.-Introducción 75

3.5.2.-Material y método 75

3.5.3.-Resultados 78

3.6.-Estudio de la actividad antiinflamatoria 83

3.6.1.-Introducción 83

3.6.2.-Material y método 84

3.6.3.-Resultados 86

3.7.-Estudio de la coordinación motora 88

3.7.1.-Introducción 88

3.7.2.-Material y método 88

3.7.3.-Resultados 90

3.8.-Estudio del tránsito intestinal 93

3.8.1.-Introducción 93

3.8.2.-Material y método 93

3.8.3.-Resultados 95

3.9.-Estudio bioquímico 99

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.9.1.-Introducción 99

3.9.2.-Material y método 99

3.9.3.-Resultados 101

3.10.-Estudio hipoglucémico 111

3.10.1.-Introducción 111

3.10.2.-Material y método 111

3.10.3.-Resultados 113

3.11.-Estudio gasométrico 116

3.11.1.-Introducción 116

3.11.2.-Material y método 116

3.11.3.-Resultados 117

3.12.-Influencia sobre la coagulación sanguínea 123

3.12.1.-Introducción 123

3.12.2.-Material y método 123

3.12.3.-Resultados 125

3.13.-Propiedades hepatoprotectoras 128

3.13.1.-Introducción 128

3.13.2.-Material y método 129

3.13.3.-Resultados 131

3.14.-Estudios *in vitro* de la musculatura lisa traqueal 135

3.14.1.-Introducción 135

3.14.2.-Material y método 138

3.14.3.-Resultados 143

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

4.-DISCUSION GENERAL 151

5.-CONCLUSIONES 168

6.-BIBLIOGRAFIA 170

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

INTRODUCCION

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

1.1.-*INTRODUCCION*

Aunque hoy en día la investigación farmacológica de productos sintéticos ha desplazado casi por completo la relativa a productos naturales, no puede dudarse de la importancia que éstos siguen teniendo en la Terapéutica actual.

Actualmente, las opiniones sobre el uso de las plantas medicinales están encontradas. Existen partidarios acérrimos de la utilidad de las plantas medicinales, y ponen en ellas una confianza ciega, mientras que otros consideran que el tratamiento por medio de plantas medicinales es inútil o perjudicial, debido a la difícil cuantificación de las dosis de principios activos administradas y a las impurezas que podrían tener un efecto adverso.

Las plantas nos ofrecen, efectivamente, sustancias medicamentosas de notable eficacia. Constituyen la base de muchos productos farmacéuticos. La industria farmacéutica, aislando los principios activos de las plantas hasta un elevado grado de pureza, ha obtenido fármacos de vital importancia. No hay duda de que las plantas pueden ser fármacos óptimos; sin embargo, si se usan de un modo erróneo, o bien en dosis exageradas, pueden resultar perjudiciales y, a veces, mortales.

Precisamente por el peligro de una dosificación incontrolada, la

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

medicina actual rechaza la curación por las hierbas; además los medicamentos fabricados en los laboratorios farmacéuticos tienen la ventaja del control sanitario. Sin embargo, el conocimiento y uso de las propiedades curativas de las plantas ayudan en la prevención y tratamiento de molestias menores: diarreas, estreñimiento, falta de apetito, tos, afonía, etc. El empleo de los vegetales adecuados en tales casos, puede usarse como un complemento de la dieta.

Según Reuben y Wittcoff (1989), en la actualidad, la búsqueda de nuevos fármacos está basada en la investigación de efectos agonistas o antagonistas sobre receptores tisulares. El desarrollo de la tecnología para el estudio de receptores y los gráficos computerizados para buscar nuevas estructuras químicas, facilitan sin duda la selección y cribado de posibles fármacos útiles para el control de ciertas enfermedades.

A pesar de que se ha avanzado mucho en el diseño de nuevos fármacos que actúan en el espacio o "locus" casi exacto de manera selectiva (Ej. broncodilatadores administrados en aerosol que no son absorbidos a la circulación sanguínea) y en el tiempo previsto (liberación lenta, depots etc.), la industria farmacéutica no puede prescindir todavía de los productos naturales como agentes terapéuticos, la morfina es solo un ejemplo.

Según Sánchez Albornoz (1980), reconociendo que la búsqueda de

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

nuevos fármacos de origen vegetal ha disminuido considerablemente durante las últimas décadas, aún continua vigente la frase de Alfredo Taylor de la Universidad de Texas: "En veinte años de investigación sobre el cáncer, no se ha logrado tanto éxito con productos químicos sintéticos como con extractos vegetales. No hay un solo agente químico que haya inhibido completamente el crecimiento del tumor, sin causar lesiones en tejidos sanos. Por norma, los productos naturales son menos tóxicos que los sintéticos, ya que han sido elaborados en asociación con la vida".

Existen otros factores importantes que dan la pauta en la búsqueda de fármacos útiles, así la conveniencia económica es la que rige en la actualidad la investigación de nuevos fármacos. La síntesis química ofrece estas ventajas, obviando el coste de la materia prima y las dificultades que pueden presentarse para adquirirla (Reuben y Wittcoff, 1989).

Así en la actualidad, sólo si la síntesis es muy difícil, compleja o imposible de conseguir, se acude a las fuentes naturales para aprovechar estas moléculas o parte de ellas (semisíntesis).

Según Reuben y Wittcoff (1989), también existen enfermedades raras o de escasa incidencia en la población que no responden a los tratamientos quimioterápicos actualmente en uso. Por tanto, no se tratan, o se tratan mal, por hacerlo exclusivamente de forma paliativa con fármacos que controlan

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

parcialmente los síntomas de la enfermedad. Ejemplos de todos conocidos serían: El corea de Huntingdon, la enfermedad de Paget, el síndrome de Tourette entre otros.

El conocimiento de la biosíntesis de los productos naturales por las plantas nos conduce a distinguir un gran número de productos de utilidad terapéutica por el desarrollo y similitud de su estructura química (tetraciclinas, alcaloides de todo tipo, esteroides, etc.).

La biosíntesis de aminoácidos esenciales por las plantas se realiza de forma similar a la de los animales. Dentro de este grupo, podemos incluir a la betacianina. Así a partir del alfa-cetoácido Shikímico producido por la degradación de los carbohidratos, se derivan la fenilalanina, la tirosina y el triptófano; y del ácido aspártico, la lisina y la metionina entre otros.

Es más probable, que productos con ciertas similitudes en su estructura química, ejerzan efectos biológicos semejantes y que interactúen con estructuras celulares idénticas, que todo lo contrario. El hecho de que ello no ocurra, aunque no infrecuente en Farmacología, no invalida la afirmación anterior. Es más, un fármaco puede ejercer sus efectos sobre muy distintos componentes biológicos poco o nada relacionados entre si, de lo que es un ejemplo la aspirina.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Teniendo en cuenta que las Betalaínas se sintetizan a partir de aminas primarias, no es de extrañar que nos encontremos con un gran número de fármacos con muy diferentes efectos farmacológicos que también tienen su origen natural, semisintético o sintético en estas aminas biógenas simples.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

1.2.-*ASPECTOS ETNOFARMACOLOGICOS*

En nuestro entorno geográfico han sido introducidas una serie de especies de la familia Cactaceae, indígena de América. Esta familia Cactaceae ha ocupado y aún ocupa, un lugar relevante en la investigación química y farmacológica de sustancias de origen natural. Estas especies han sido utilizadas desde muy antiguo por sus propiedades curativas en la medicina popular de las Islas Canarias, en patologías muy diversas. Así, Pérez de Paz y Medina (1988), citan como cactáceas más destacadas por sus propiedades curativas a las siguientes pertenecientes al género Opuntia: *Opuntia dillenii (Ker-Grawl) Haw., Opuntia ficus barbárica (A. Berger.) y la Opuntia tomentosa.* Así, hace referencia a la propiedad hipoglucemiante que se le asigna a la *O. dillenii Haw.* o antitusiva adjudicada a la *O. tomentosa Salm-Dyck*, mientras que la *O. ficus-barbárica (A. Berguer)*, goza de otras virtudes populares como son su poder astringente, emoliente, "pectoral", "febrífuga" o su utilidad en el "tratamiento de la erisipela".

En la obra de Viera y Clavijo (1982) se hace referencia a la capacidad para teñir la orina que poseen los frutos de la *Cactus cochenillifer (Linneo)* al ser ingeridos, lo que da a la orina un "color perfecto de sangre, lo que asustaba a los que no tienen experiencia".

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Ya desde el siglo XVII se intentó el tratamiento de la ictericia por los habitantes de la isla y para ello era aconsejable, según citaba Bosh Millares (1967) "...tomar tunos colorados por las mañanas para que la orina se tiñera de rojo". Durante el siglo XVIII, se usaron como remedios caseros de otras afecciones, lo cual queda descrito con claridad por este mismo autor: "para madurar los tumores flemonosos empleaban la cataplasma hecha con las hojas de la higuera tuna (Cactus Opuntia) en estado de putrefacción. Y para resolutivo de ciertas ingurgitaciones articulares que conocen causa traumática, recomendaban las referidas hojas o pencas abiertas por el medio y cocidas al horno".

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

1.3.-*QUIMICA DE LAS BETALAINAS*

La gran variedad de colores que aparecen en las flores y frutos de numerosas plantas se deben, principalmente, a la presencia de dos tipos de pigmentos naturales denominados carotenoides y antocianinas. Mientras que los primeros son liposolubles y aportan la mayoría de las tonalidades amarillas, los segundos son hidrosolubles y son responsables de la mayor parte de los colores azul, violeta, púrpura, escarlata, naranja y carmesí. Además, existe en un número escaso de plantas un tipo muy peculiar de pigmentos nitrogenados e hidrosolubles, denominados betalaínas.

Mabry y Dreiding (1968) introdujeron el término betalaínas (figura 1), para describir a aquella clase de sustancias a la que pertenecían los pigmentos rojo-violetas (betacianinas) y amarillos (betaxantinas) que existían en plantas floreadas pertenecientes al orden Centrospermae.

Inicialmente el término betacianina hacía alusión a los pigmentos rojo-violetas que existían en la *Beta vulgaris var. rubra*, en especies de Chenopodium y en la *Celosia cristata*, siendo la betanina el pigmento rojo que en mayor porcentaje se encontraba en la remolacha roja (Schudel, 1918). Sin embargo, actualmente, el término betacianina se usa para identificar a todos los pigmentos rojo violetas de las plantas incluidas en el orden Centrospermae.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Wyler *et al.* (1965) definieron a las betalaínas desde un punto de vista químico, como aquellos productos que se formaban por la condensación de una amina primaria o secundaria con el ácido betalámico.

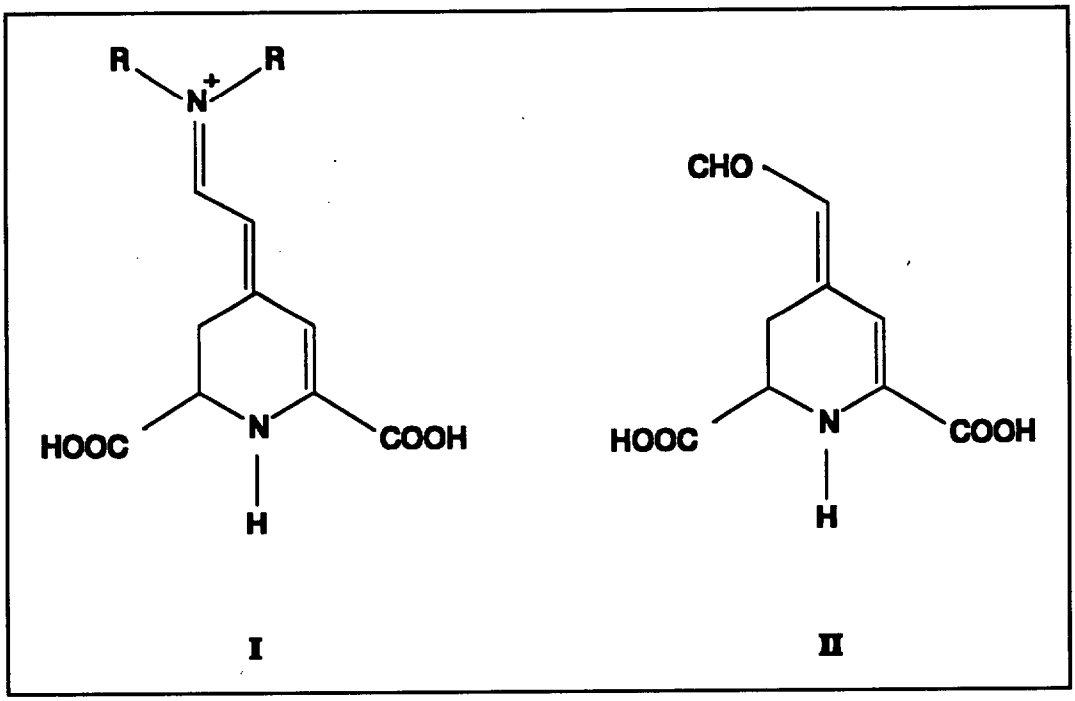

Figura 1: Estructura química general para las betalaínas, donde se representan a una amina primaria o secundaria (I) y el ácido betalámico (II). Los radicales sustituyentes R y R' son grupos amino, imino o indólico. Tomado de Mabry y Dreiding (1968).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Pucher *et al.* (1938) comprobaron que la betanina (figura 2), era un monoglucósido que, por hidrólisis ácida, daba lugar a una aglicona denominada betanidina. Wyler *et al.* (1959), mediante espectrofotometría, observaron que la betanina disuelta en agua mostraba una densidad óptica máxima a 536-538 nm ($E_{1\%}^{1cm}$=1120), a 273 nm, y un hombro a 295 nm. La betanidina, aglicona de la betanina, tenía una fórmula molecular y un espectro de absorción en agua similares al glucósido, con máximos de absorbancia a 542-546 nm, 271-272 nm y un hombro a 295 nm (Wiler y Dreiding, 1959). Los pesos moleculares eran de 550.22 para la betanina y de 388.14 para la betanidina.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

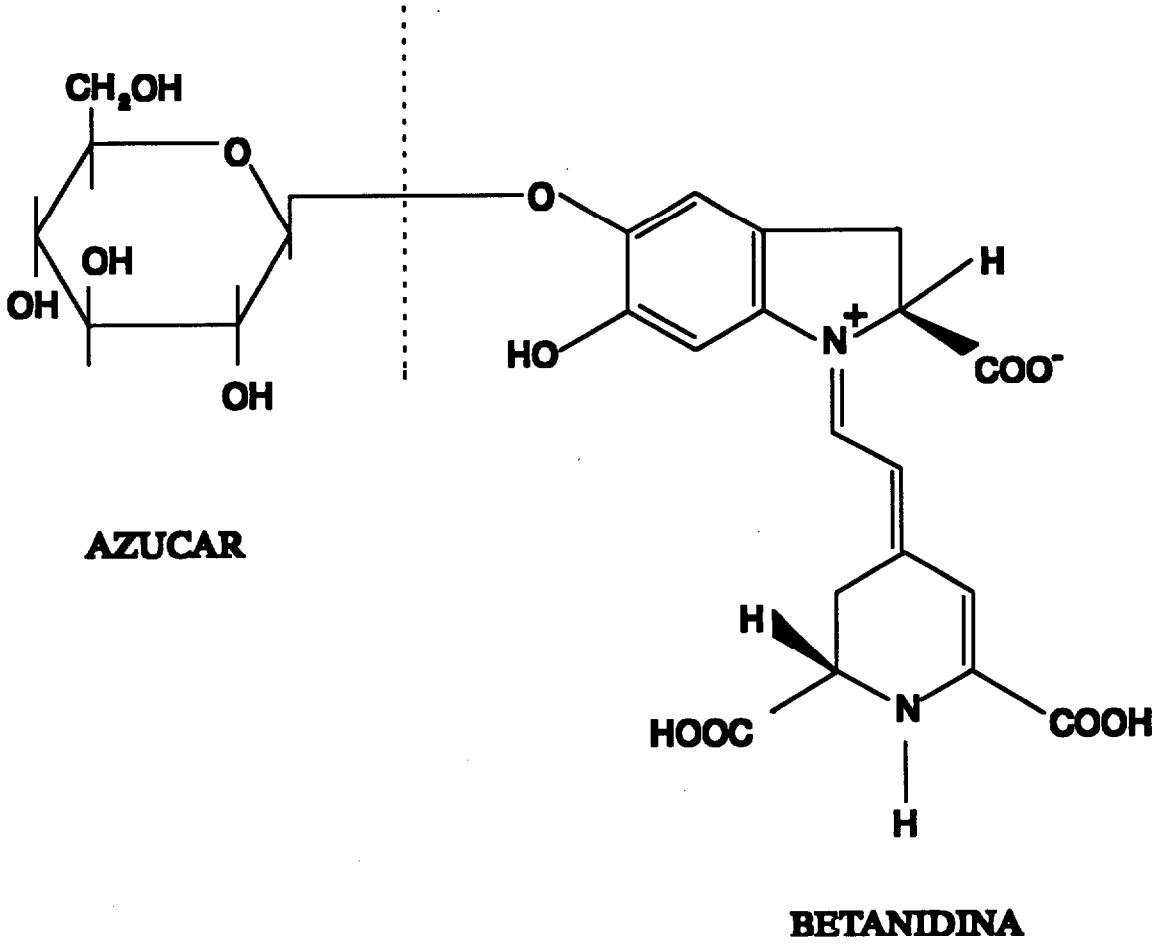

Figura 2: Estructura química de la betanina. Tomado de Nilsson (1970).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Wyler y Dreiding (1959,1965) identificaron tres productos de suma importancia a partir de la degradación alcalina de la betanidina (figura 3): el ácido 5,6-dihidroxi-2,3-dihidroindol-2-carboxílico, el ácido fórmico y el ácido 4-metilpiridina-2,6-dicarboxílico.

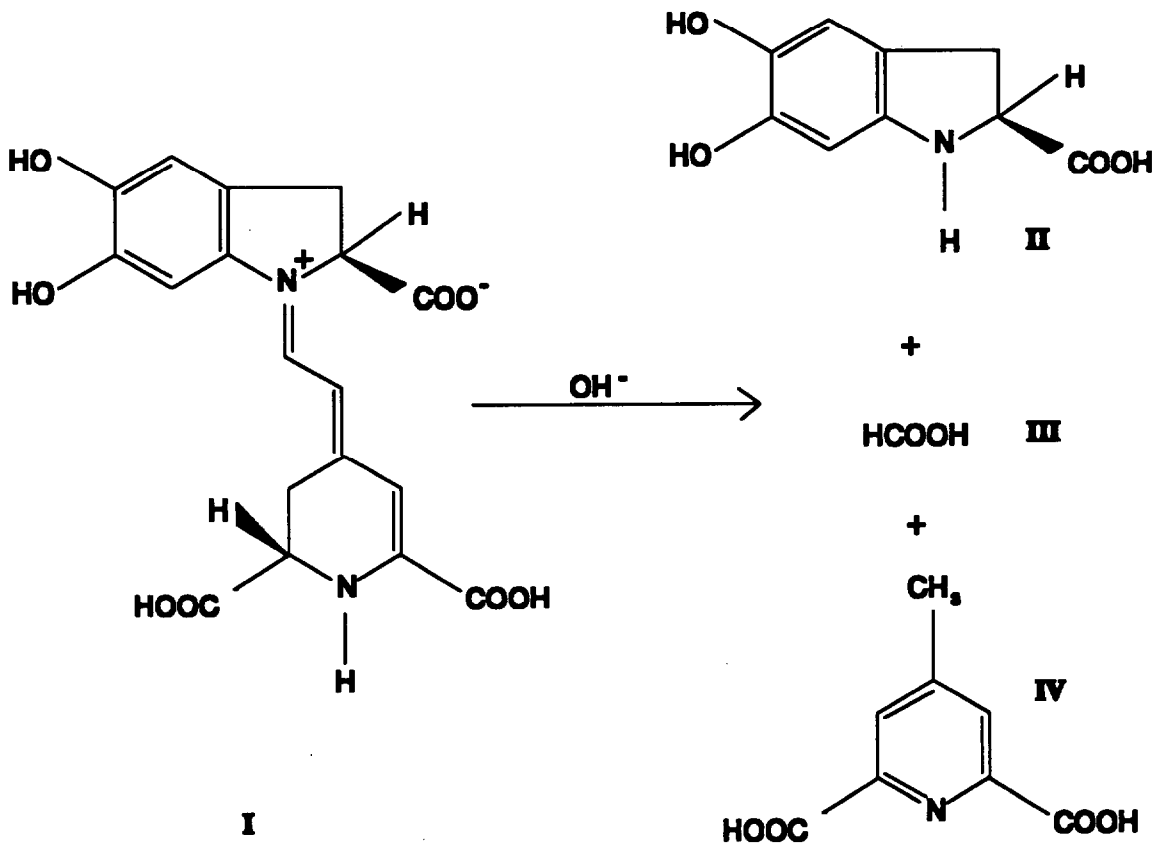

Figura 3: Degradación alcalina de la betanidina. I: Betanidina, Isobetanidina. II: Acido 5,6-dihidroxi-2,3-dihidroindol-2-carboxílico. III: Acido fórmico. IV: Acido 4-metilpiridina-2,6-dicarboxílico. Tomado de Mabry (1966).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Mabry *et al.* (1972) demostraron que la estructura química de estos pigmentos era diferente de las antocianinas y por tanto, pertenecía a una nueva clase de pigmentos. Su estructura no tenía relación con el esqueleto C6-C3-C6 de los antocianos (estructura flavonoide), pero en cambio, contaba con un núcleo indol y otro piridínico parcialmente hidrogenados. Químicamente, la betanidina estaba relacionada con los alcaloides, por lo que Mabry propuso para las betalaínas la expresión de cromoalcaloides.

Piatelli *et al.* (1964) y Wilcox *et al.* (1965) reconocieron la posición exacta del enlace de la glucosa en la betanina. Para ello, usando diferentes procedimientos, rompieron por su mitad el derivado neobetanidínico para formar el ácido 5-hidroxi-6-metoxi-indol-2-carboxílico o su éster metílico, lo que les permitió llegar a la conclusión de que la betanina era el 5-O-glucósido de la betanidina. Así tanto el glucósido como su isómero, la isobetanina, se podían formular como 5-O-beta-glucopiranosil de betanidina e isobetanidina, respectivamente.

Por los datos que se poseen hasta ahora, se ha sugerido que las betacianinas se diferencian, solamente, en las modificaciones de sus patrones glicosídicos, en la configuración en el C15 y en la esterificación de los grupos carboxílicos.

Harborne (1973) detalló una serie de propiedades y pruebas que

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

diferencian las betacianinas presentes en el orden Centrospermae de las antocianinas. Estas resultan fácilmente distinguibles con simples ensayos de colores que pueden realizarse con los extractos crudos de las plantas: son mucho más inestables a la hidrólisis ácida, los colores que adquieren ante diferentes pH son distintos, siendo diferentes también tanto en sus propiedades cromatográficas como electroforéticas.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

1.4.-*BIOSINTESIS DE LAS BETALAINAS*

Como ha sido descrito en el apartado anterior, la estructura química general de las betalaínas deriva de una amina o aminoácido y un aldehido llamado ácido betalámico (Mabry, 1970).

La molécula de betanidina podía dividirse en dos subunidades C_9N, ambas derivadas de la molécula 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) (figura 4). La molécula de DOPA sufriría una rotura de su anillo con posterior cierre del mismo para dar lugar al ácido betalámico. Una segunda molécula sufriría la ciclación oxidativa para dar lugar a la formación de ciclo-DOPA. La condensación del ácido betalámico con una molécula de ciclo-DOPA daría lugar a la formación de betanidina (Wyler *et al.*, 1963). La condensación del ácido betalámico con otro compuesto amino (tiramina, glutamina, etc.) o imino (prolina, ácido glutámico, etc.) daría lugar a las betaxantinas.

Miller *et al.* (1968), demostraron que la DOPA se incorporaba a la betanina en un gran porcentaje, y a partir de ese momento el interés se centraría en realizar un detallado estudio de aquellas vías que iban desde la molécula de DOPA hasta el sistema dihidropiridínico de las betalaínas. A priori, se especulaba sobre la apertura del anillo aromático de la molécula de DOPA entre los dos grupos hidroxílicos (rotura intradiol), seguida de la unión

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

del nitrógeno al carbono C'_5; o entre los carbonos C'_4 y C'_5 (rotura extradiol) y posterior cierre, vinculándose el nitrógeno al carbono C'_3.

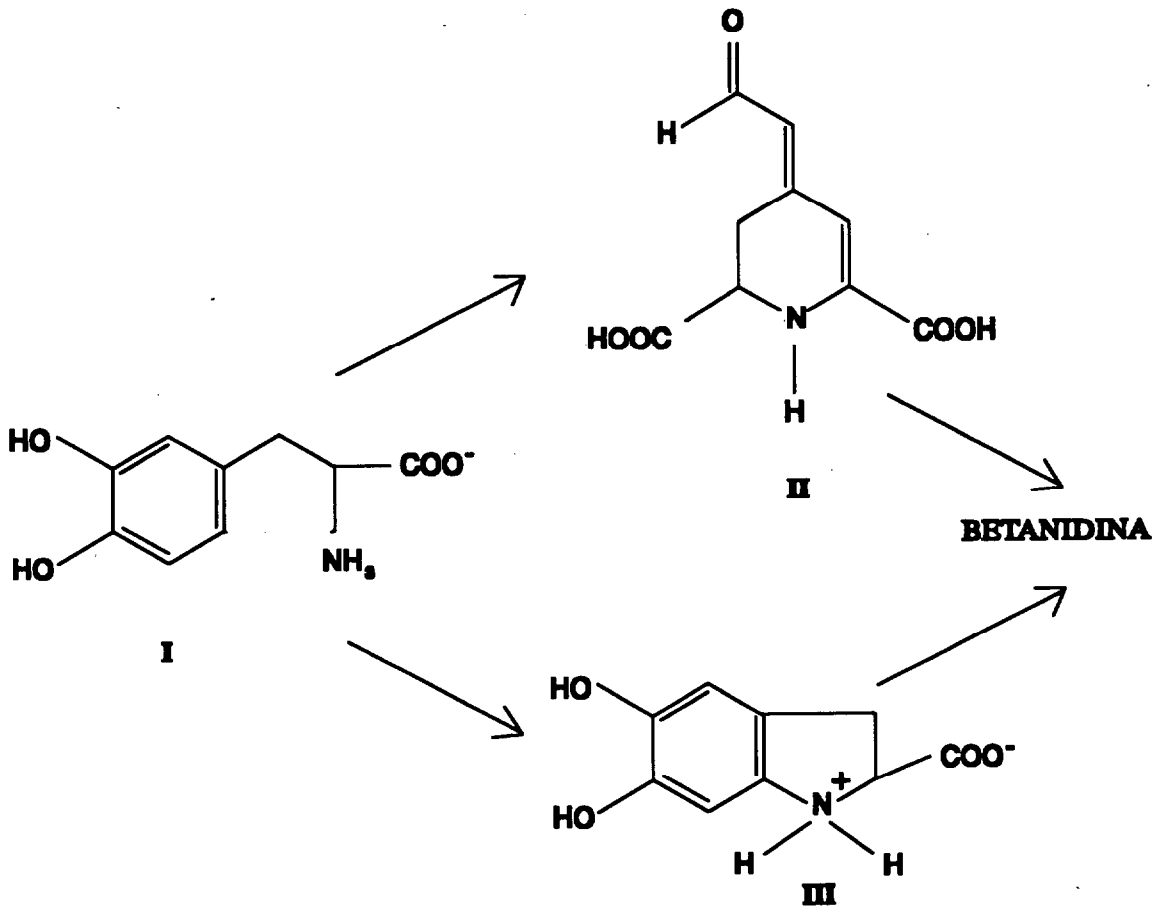

Figura 4: Esquema especulativo para la biosíntesis de la betanidina. I: Dopa. II: Acido betalámico (C_9N). III: Ciclo-dopa (C_9N). Tomado de Piattelli (1981).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Impellizzeri *et al* (1973), y Fischer y Dreiding (1972) defendían, a la vista de sus resultados experimentales, la hipótesis de la apertura extradiol. Finalmente, alimentaron con DOPA marcada las yemas de flores amarillas de *Portulacca grandiflora* y detectaron la marca en la molécula de ácido betalámico con la misma configuración S que la de la L-DOPA. A partir de ese momento, se propuso tanto para la biosíntesis de la betanidina como de las betaxantinas el esquema que se muestra en la figura 5.

Sciuto *et al.* (1972), demostraron que la betanidina, marcada radiactivamente, se incorporaba a la betanina en frutos de *Opuntia dillenii*. Estos resultados demostraban la glicosilación de la betanidina. Según Piatelli (1981), se desconoce la forma exacta de cómo las betacianinas se forman a partir de la betanidina e isobetanidina.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

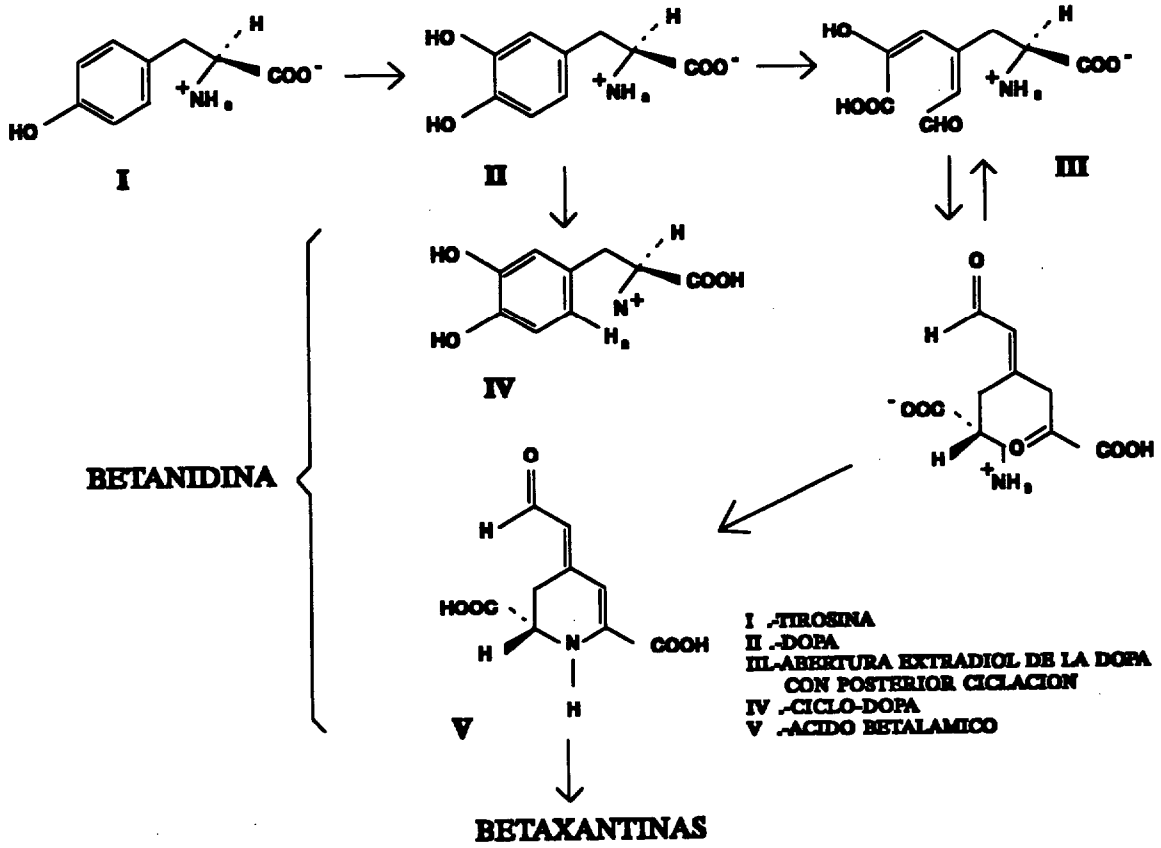

Figura 5: Mecanismo probable para la biosíntesis de la betalaínas. Tomado de Piattelli (1981).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

1.5.-*QUIMIOTAXONOMIA DE LAS BETALAINAS*

Las Betacianinas están restringidas a diez familias pertenecientes al orden Centrospermae (tabla 1). Excepto las familias Basellaceae, Didiraceae y Stegnospermaceae, las demás contienen especies productoras de Betaxantinas. La mayoría de los géneros y especies de estas familias aun no han sido investigadas, como ocurre, por ejemplo, con la familia Cactaceae (Tabla 2). Además, la mayoría de los investigadores no publican sus resultados negativos, es decir, cuando los pigmentos no estaban presentes, o cuando solo existían en cantidades tan bajas que su detección analítica no podía realizarse. Debido a ello, no ha sido posible dar una estimación exacta del número de especies investigadas. El estudio de la distribución de las Betaxantinas es aun más limitado según Piattelli (1981).

Para Mabry *et al.* (1972), el orden Centrospermae debe reconocerse como aquel que contiene a las diez familias de plantas productoras de Betalaínas que se citan en la tabla 1. La importancia taxonómica estriba en las diferentes características químicas existentes entre las Betacianinas y las Antocianinas. Estas diferencias incluyen: vías diferentes en sus correspondientes biosíntesis, su mutua exclusión y la limitada distribución de las Betacianinas dentro del reino vegetal. Todo esto, las convertía en un punto de mira de particular interés taxonómico (Mabry *et al.*, 1962; Piattelli *et al.*, 1981).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 1

ORDEN CENTROSPERMAE

1. CHENOPODIACEAE
2. AMARANTHACEAE
3. NYCTAGINACEAE
4. PORTULACACEAE
5. PHYTOLACACEAE
6. STEGNOSPERMACEAE
7. AIZOACEAE
8. BASELLACEAE
9. CACTACEAE
10. DIDIERACEAE

Familias incluidas en el orden Centrospermae. Tomado de Piattelli (1981).

Antes de que la estructura química de las Betalaínas fuera clarificada, la importancia potencial de su presencia en la taxonomía de estas plantas fue evaluada por varios autores. Bischoff (1876), conocía la presencia de un pigmento violeta poco común que existía en un grupo muy restringido de plantas relacionadas desde un punto de vista taxonómico. Su lista por aquel entonces incluía, representantes de las familias Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Phytolaccaceae y Portulaccaceae. Gertz (1906) aumentó a

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

siete el número de familias que poseían Betacianinas añadiendo a la lista la Nyctaginaceae, la Aizoaceae y Basellaceae. Kryz (1920), observó que el pigmento rojo de las flores y frutos de *Nopalxochia phyllanthoides* daba las reacciones típicas de las Betacianinas, por lo que, posteriormente, amplió la lista de las familias que poseían Betacianinas con la adición de las Cactaceae, una familia algunas veces tratada como un orden separado (Cactales syn. Opuntiales), pero que en la clasificación moderna está considerada como perteneciente al orden Centrospermae. Estas observaciones previas basadas en reacciones colorimétricas, fueron confirmadas por Reznik (1957), con la aplicación de técnicas refinadas de cromatografía y electroforesis. Rauh y Reznik (1961), añadieron a la lista de familias con Betacianinas la Didieraceae; y Mabry *et al.* (1963), incluyeron la Stegnospermaceae.

Mabry (1964), basándose en la marcada correlación entre las características químicas y morfológicas, propuso que el orden Centrospermae, incluyendo la Cactaceae, fuera reservado para las familias poseedoras de Betalaínas, y que las que tuvieran Antocianinas se separaran del mismo. La estructura química diferente que existía entre ambos grupos de pigmentos naturales, el hecho de que estuvieran excluidos mutuamente (aunque existe otra clase de flavonoides comunes dentro de las familias Betacianínicas) y la restringida distribución de las Betalaínas, fueron argumentos más que suficientes a favor de la gran importancia taxonómica que tienen estos cromoalcaloides. Dopp y Musso (1973), descubrieron la presencia de

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Betalaínas en la *Amanita muscaria*, la cual carece de cualquier relación filogenética con las plantas del orden Centrospermae. A pesar de este descubrimiento los argumentos citados no se han visto lesionados. Este hallazgo ha sido considerado, simplemente, como un caso de convergencia química bajo la presión de la evolución o como una rareza bioquímica aislada (Piattelli *et al.* 1981).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 2

Géneros de la Familia Cactaceae (Cerca de 200 géneros, 2000 especies) que contienen betacianinas y/o betaxantinas.

ARIOCARPUS	(8:5)
AYLOSTERA	(10:1)
CEREUS*	(40:3)
CHAMAECERCEUS*	(11:1)
CLEISTOCACTUS*	(35:1)
GYMMOCALYCIUM	(70:3)
HARIOTA*	(2:1)
HYLOCEREUS	(20:1)
LOBIVIA*	(75:2)
MAMMILLARIA*	(300:7)
MELOCACTUS	(35:1)
MONVILLEA	(5:1)
NEOPORTERIA*	(40:1)
NOPALXOCHIA	(2:1)
NOTOCACTUS	(20:1)
OPUNTIA*	(200:6)
PARODIA*	(35:3)
PERESKIA*	(20:1)
PHYLLOCACTUS	(20:1)
REBUTIA*	(40:3)
SELINOCEREUS	(23:1)
THELOCACTUS	(20:1)

Tomado de Mabry *et al.* (1968). *=Contienen betaxantinas
(N° especies del género: N° que tienen betacianinas)

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

1.6.-*FUNCION DE LAS BETALAINAS EN LA NATURALEZA*

En otras familias no incluidas en el orden Centrospermae, a las antocianinas, aparte de su papel en la coloración de las flores para atraer a los animales vectores colaboradores de la reproducción, se les ha atribuido varias funciones. Estas incluyen el participar en oxidaciones biológicas y la de proporcionar resistencia a la infección microbiana.

Las Betalaínas parecen haber sustituido a las Antocianinas como factores de polinización cuando se localizan en flores y frutos de las familias que las producen. Sin embargo, su presencia en otras partes de las plantas, tales como tallos, raíces y hojas no parece tener ninguna función inmediata. Según Piattelli (1981) como ocurre con la mayoría de los llamados "metabolitos secundarios", es muy difícil asignar una razón definida a las Betalaínas en la economía de los organismos que las producen.

Al igual que las Antocianinas, las Betalaínas son hidrosolubles, y existen en la naturaleza como sales en vacuolas de flores, frutos y hojas. Tronchet (1968) afirmaba que, tanto las Betalaínas como las Antocianinas, estaban frecuentemente presentes en las capas epidérmicas del tejido de las plantas. Se ha observado que las Betalaínas, frecuentemente, se acumulan en los sitios lesionados o que sufren algún daño, por lo que se pensó que quizás fuera un mecanismo de defensa contra la infección vírica. En apoyo de esta

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

hipótesis, Sosnova (1970) comprobó que las Betalaínas tenían un efecto inhibitorio sobre la reproducción viral. Fresen (1992) demostró que un extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw., rico en betacianinas presentaba un efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano.

Stenlid (1976), demostró que tanto la Betanina como la Vulgaxantina eran inhibidores efectivos de la oxidasa del ácido indol-3-acético, y que la Betanina contrarrestaba el efecto inhibitorio del citado ácido sobre la elongación de la raíz del trigo. Sin embargo, no se ha encontrado que las Betalaínas puedan jugar algún papel *in vivo* como reguladores de la actividad del ácido indolacético, aunque han sido consideradas como modificadores potenciales del metabolismo auxínico.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

1.7.-*METODOS DE EXTRACCION, SEPARACION Y CUANTIFICACION DE LAS BETALAINAS*

Durante mucho tiempo los métodos para la separación y cuantificación de los pigmentos betalaínicos desde extractos de plantas, se han basado principalmente en técnicas electroforéticas (Powrie y Fennema, 1962; Piattelli y Minale, 1964; Nilsson, 1970; von Elbe *et al.*, 1972) o espectrofotométricas. Estas técnicas tenían el inconveniente de que consumían mucho tiempo o carecían de exactitud cuando existían sustancias que interferían en las lecturas. Por estos motivos, surgía la necesidad de encontrar un método más rápido y exacto que permitiera la separación y cuantificación de las betalaínas.

Aronoff y Aronoff (1948) encontraron que los pigmentos de la remolacha roja eran bastante más complejos de lo que se había descrito previamente. Estos autores, observaron que el extracto acuoso podía ser fraccionado en, al menos, once bandas pigmentadas mediante cromatografía líquida en columna.

Sin duda, el método más eficaz para aislar los diferentes pigmentos betalaínicos era la cromatografía líquida en columna. Sin embargo, ésta iba precedida de la purificación del extracto crudo, empleándose para ello la

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

resina de intercambio iónico o la filtración en gel, con lo que se evitaba la excesiva difusión de la banda en el soporte de cromatografía adsortiva (Nilsson, 1970; Kimler *et al*, 1970; Lempka y Krauze, 1970; von Elbe *et al.*, 1972). Además para realizar investigaciones más profundas de los pigmentos betalaínicos, las cantidades que se separaban con la electroforesis en papel eran, frecuentemente, insuficientes. La cromatografía en columna, sin embargo, hacía posible la separación de cantidades considerablemente más grandes.

Lempka y Krauze (1970), consiguieron con éxito emplear la cromatografía líquida en Sephadex G 25 como técnica preliminar de purificación para separar los pigmentos de las proteínas y azúcares. Comprobaron que esta prepurificación era tan efectiva como la que hasta ese momento se venía realizando con columnas de intercambio iónico. Posteriormente, los extractos purificados eran perfectamente fraccionados en betaxantinas y betacianinas con columnas de poliamida.

Con el propósito de simplificar los estudios de las betalaínas, Colomas *et al.* (1977), basándose en las diferencias de peso molecular existentes entre las betacianinas y las betaxantinas, aplicaron la cromatografía líquida sobre gel de Sephadex. Para ello, efectuaron la separación del extracto bruto sobre semillas de *Amaranthus caudatus L. var pendula* sobre columnas de Sephadex G 15 equilibradas con una solución tampón acetato a pH=4.5. Además,

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

realizaron estudios paralelos con columnas de intercambio iónico Dowex y del citado gel, con lo que demostraron una superioridad de este último, que permitía, no sólo la separación entre los diferentes cromoalcaloides violetas y amarillos, sino también de los distintos tipos de betaxantinas y de betacianinas. Comprobaron que era un método suficientemente preciso para ser aplicado como técnica de identificación, y que además permitía el uso de cantidades de material vegetal relativamente pequeñas.

Adams *et al.* (1977) demostraron que la cromatografía de filtración en gel (Sephadex G 25 o Bio Gel poliacrilamida) constituía un método rápido y eficaz para separar las betalaínas del jugo crudo de la remolacha roja. Para ello, emplearon tanto este último, como un concentrado obtenido por fermentación (Adams *et al.*, 1976) que aplicaban directamente sobre ambos geles. Estos autores, efectuaron un estudio comparativo entre ambos tipos de lechos cromatográficos y estudiaron tanto el modo de operar con ellos como de cuantificar la betanina. La resolución entre la betanina y la betanidina era mayor con el gel de Sephadex G 25 que con el de poliacrilamida, aunque la capacidad de carga era mayor con este último.

Porath *et al.* (1959) ya habían comprobado que, aunque el principal efecto cromatográfico del Sephadex era separar los solutos por un fenómeno de tamizado molecular, posiblemente también existiría un mecanismo de adsorción de compuestos orgánicos aromáticos y heterocíclicos con las

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

moléculas del gel. Años después, propondrían un mecanismo de interacción de fenoles, anilinas y ácidos benzoicos con el Sephadex. Este fenómeno era muy ventajoso cuando existían dos moléculas con un tamaño aproximadamente igual. En este último caso, la separación se produciría si uno de los compuestos mostraba mayor afinidad por el gel que el otro. Para Adams *et al.* (1977) existía una adsorción sustancial de los pigmentos betalaínicos cuando se cromatografiaban en una columna de Sephadex G 25. El mecanismo de adsorción tanto sobre el Sephadex como con el Bio Gel P6 se podía explicar, al menos en parte, por la protonización de los grupos carboxílicos en las posiciones C_{15} y C_{17} y el establecimiento de puentes de hidrógeno con las moléculas del gel. Las betacianinas contenían un grupo indol aromático, mientras que los azúcares y las betaxantinas de la remolacha roja carecían de él. Por lo tanto, los derivados indólicos eran fuertemente retenidos por el Sephadex y podían desalinizarse. Demostraron que tanto el coeficiente de distribución (Kav) como la resolución de los pigmentos dependían del pH. Cuando éste era de 2.25 se obtenía la mejor resolución en el Sephadex G 25 si se empleaba como fase móvil agua destilada. La betanidina permanecía retenida en la columna en mayor grado que la betanina debido a su menor tamaño molecular y por tener un sitio más de adsorción en el grupo -OH del C_6.

Tal como comprobaron Vergeront *et al.* (1980), la filtración sobre Sephadex G 25 medium era un método muy eficaz con el que se podía

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

realizar la purificación de las betalaínas a partir de un extracto crudo (jugo) de remolacha roja. Estos autores demostraron que este tipo de cromatografía preparativa era un medio efectivo para reducir los azúcares solubles y/o las sales presentes en un jugo crudo o fermentado de remolacha roja, incrementando considerablemente el contenido de betacianinas del mismo. Demostraron experimentalmente que para que la filtración en Sephadex G 25 fuera un medio eficaz para conseguir los fines descritos anteriormente, se tenían que cumplir las condiciones siguientes: 1) que el tamaño de muestra fuera inferior al 25% del volumen total del lecho cromatográfico, 2) que la viscosidad de la muestra fuera inferior a dos en relación con la del eluyente, y 3) que el flujo de salida de la columna se modificara con el propósito de conseguir una separación más eficaz. En opinión de estos autores, se confirmaba la eficacia y la capacidad de la cromatografía líquida en Sephadex G 25 como un método útil para la purificación de las betacianinas a gran escala, y como herramienta analítica en los estudios de estabilidad o de degradación de estos alcaloides.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

1.8.-*ANALISIS Y CUANTIFICACION DE LAS BETALAINAS*

Los pigmentos naturales extraídos de la raíz de la *Beta vulgaris var. rubra* tienen, en la actualidad, su principal actividad como colorante rojo para múltiples alimentos. Por este motivo, desde hace varios años se viene desarrollando una exhaustiva investigación con el propósito de identificar aquellos factores que afectan la estabilidad de estos productos una vez añadidos a los alimentos así como en determinadas condiciones de laboratorio. No obstante, los datos cuantitativos siempre mostraban resultados que variaban entre los diferentes estudios y, en opinión de Scwartz *et al.* (1981), los responsables de esas diferencias eran los distintos métodos usados para cuantificar las betalaínas.

Nilsson (1970), desarrolló un método espectrofotométrico que permitía medir tanto los pigmentos rojos como los amarillos presentes en el jugo fresco de la remolacha roja sin necesidad de separarlos previamente. Después de estudiar diferentes variedades de remolachas ricas en betalaínas, comprobaron que la betanina-isobetanina constituía el 95% de las betacianinas, y la vulgaxantina I el 95% de las betaxantinas. La betanina tenía una longitud de onda máxima en 535-540 nm. con una $E_{1\%}^{1cm}$= 1120 (Piattelli y Minale, 1964), y la vulgaxantina en 476-478 nm. con una $E_{1\%}^{1cm}$= 750 (Piattelli *et al.*, 1965a) dentro del rango del pH presente en el jugo de la

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

remolacha fresco, siguiendo la ley de Beer. Todo ésto permitía una medida espectrofotométrica simultánea del contenido de los pigmentos sin necesidad de separarlos por técnicas cromatográficas o electroforética. Estos autores, observaron que el espectro de absorción de una mezcla de betanina y vulgaxantina I puras, era una adición del correspondiente a cada uno de los pigmentos. Como además se conocía la absorción de uno de los pigmentos en el máximo del otro y viceversa, era posible calcular, desde la mezcla de ambos, la contribución de cada uno en los correspondientes máximos de absorbancia. La betanina absorbía a 476-478 nm (longitud de onda máxima de la vulgaxantina), pero este valor no era constante y variaba con la concentración. El cociente A_{538}/A_{476} se podía calcular para todas las concentraciones de betanina medibles. La vulgaxantina I, sin embargo, no absorbía a 538 nm (longitud de onda máxima de la betanina), lo que significaba que la absorción de la mezcla en esta longitud de onda solamente dependía de la cantidad de betanina. Todas las determinaciones se hacían con un tampón de fosfato 0.05 M a pH=6.5.

Cuando se extraían los pigmentos de la raíz de la remolacha roja empleando como solvente el agua, existían sustancias que pasaban al extracto que, aunque no tenían color en el pH natural del jugo fresco, sí contribuían a aumentar la absorbancia en el rango visual del espectro. Gracias a estas observaciones, Nilsson (1970) propuso una ecuación para calcular la absorción de los diferentes pigmentos del jugo en la que se incluía una corrección

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

correspondiente a las impurezas. Este autor reconocía la existencia de otros pigmentos existentes en la remolacha roja (pre e isobetanina, vulgaxantina II), aunque en baja concentración, y que, por lo tanto, no era totalmente correcto especificar las cantidades encontradas en términos absolutos de betanina y vulgaxantina I. Las absorbancias de los otros pigmentos minoritarios también quedaban incluidas en 538 y 476 nm. pero, lógicamente, tendrían otros valores de absortividad diferentes a los dados para la betanina y la vulgaxantina I. No obstante, el error que se introducía al calcular todas las betacianinas como betanina y todas las betaxantinas como vulgaxantina I, se podía admitir ya que estos dos pigmentos constituían el 95% del color. A pesar de ésto, opinaban que era más correcto expresar la cantidad de pigmento con los términos de betacianina y betaxantina.

Schwartz *et al.* (1980), describieron un método de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) aplicable tanto como técnica preparatoria como analítica para obtener betacianinas altamente purificadas. Para ello siguieron inicialmente el método aportado por Adams *et al.* (1977) algo modificado. Aplicaron la cromatografía líquida en Sephadex G 25 con una fase móvil de ácido acético al 1% en agua destilada con la que obtenían una fracción rica en betacianinas. Estas, después de que se liofilizaban y se reconstituían con agua bidestilada, eran fraccionadas con HPLC preparatoria, lo que les permitía obtener tanto betanina como betanidina puras que utilizaban como productos de referencia en los correspondientes

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

análisis. Estos los desarrollaban sobre columna de RP C18 y con una fase móvil de CH_3OH-KH_2PO_4 0.05 M (18:20, v/v) ajustadas a un pH=2.75 con H_3PO_4.

Hasta este momento, los distintos autores habían asumido que la absortividad de la betanidina era igual a la de la betanina, mientras que para Schwartz *et al.* (1980) ambas eran diferentes. De este modo comprobaron que los valores de absortividad molar para el hidroclorhidrato de betanidina e hidroclorhidrato de betanina eran de 54.000 y 65.000 respectivamente. También para la vulgaxantina, su absortividad molar correspondía con un valor de 25.300. Si estos datos se convertían en absortividad ($E_{1\%}^{1cm}$), obtenían los valores de 1.275 para la betaina y de 1.120 para la betanidina, datos que estaban en estrecha relación con los aportados por otros autores (Wyler y Dreiding, 1959; Wilcox *et al.*, 1965). Esta metodología se podía extender, perfectamente, al estudio de las betaxantinas.

Schwartz *et al.* (1981), realizaron un interesante estudio comparativo entre el método espectrofotométrico y la cromatografía líquida de alta presión como técnicas válidas para cuantificar las betacianinas. Para ello, compararon los resultados obtenidos tras la lectura por ambos métodos de las cantidades de betanina-isobetanina que estaban presentes en diversas soluciones expuestas a distintas condiciones de temperatura y pH. En todas ellas, existía una excelente correlación inicial (tiempo 0) entre los resultados

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

obtenidos por métodos cuantitativos. Esto era lógico puesto que ambas técnicas estaban midiendo un pigmento puro sin degradar, pero, a medida que el tiempo de exposición aumentaba, los datos discrepaban. Para estos autores, la razón de esas diferencias se encontraba en la formación de productos de degradación que absorbían luz en las longitudes de onda seleccionadas para el análisis. Por tanto, si la separación de los productos de degradación y los pigmentos no se realizaba antes del análisis espectrofotométrico, se obtenían valores mayores a los aportados por HPLC. Esto significaba que los datos que habían encontrado investigadores precedentes usando el método espectrofotométrico para cuantificar a las betacianinas eran más altos que los reales. No obstante, este método podía aplicarse perfectamente si, únicamente, se pretendía comparar diversas muestras entre sí, ya que entonces se cometerían errores similares con todas ellas.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

1.9.-JUSTIFICACION AL ESTUDIO DE LOS EFECTOS FARMACOLOGICOS DEL EXTRACTO DE OPUNTIA DILLENII Haw.

La puesta en marcha de los presentes estudios tienen su origen en cuatro hechos fundamentales a partir de los cuales se desarrolló nuestro interés por llevar a cabo las actuales investigaciones:

a) De un lado el conocimiento adquirido a partir de fuentes orales y escritas de que, tanto en nuestro entorno geográfico como en otras latitudes (zona Mediterránea, Andalucía), existía un uso tradicional y empírico de los frutos de diversas especies de plantas del género Opuntia (*Opuntia dillenii Haw.*, *Opuntia ficus indica Mill.*) en relación con determinados trastornos orgánicos ("tratamiento de la tosferina", "regulación de la presión arterial", diuréticos, hipoglucemiantes, constipación intestinal, "reductor de la ictericia", etc.).

b) De otra parte, los frutos de estas plantas eran ampliamente consumidos y formaban parte de la dieta habitual de muchas personas sobre todo en ambientes rurales.

c) Indudablemente, nuestro interés se incrementó aún más tras

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

constatar en la información bibliográfica recopilada que dos de las especies de plantas del género Opuntia más abundantes en nuestras islas presentaban en las partes consumidas por la población (frutos y flores) un tipo de pigmentos nitrogenados (cromoalcaloides) poco abundantes en la Naturaleza, pero con una biogénesis y una similitud químicas relacionadas con las catecolaminas, bencilisoquinolinas o tetrahidroisoquinolinas compuestos que, como sabemos, tienen un importante interés farmacológico. Además, la revisión bibliográfica no aportaba ningún tipo de estudio farmacológico relacionado con estas especies, con excepción de los trabajos realizados por Fernández Pérez y Fresen Cansino en el mismo equipo de investigación, por lo que nuestro interés en este aspecto pensamos que estaba perfectamente justificado, ampliando los estudios realizados por ellos.

d) El estudio de la bibliografía relacionada con estos cromoalcaloides, conocidos como betalaínas, nos permitió constatar que prácticamente todas las investigaciones estaban encaminadas a estudiar: 1) su papel como marcador quimiotaxonómico y 2) su función como colorante natural en las Industrias de la Alimentación y Farmacéutica. En relación con este último aspecto existía una amplia literatura limitada al estudio de las betacianinas (cromoalcaloides rojos) presentes en una de las fuentes naturales más ricas en estos productos como es la *Beta vulgaris var. rubra* y su aplicación a la Industria de la alimentación o farmacéutica como colorante. En este sentido, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (1984),

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

aconsejaba la búsqueda de nuevas fuentes naturales de colorantes atóxicos utilizables en productos de consumo humano.

Observamos también, que los estudios farmacológicos o toxicológicos relacionados con los extractos acuosos ricos en estos cromoalcaloides rojos obtenidos de la remolacha roja (actual fuente comercial de estos productos) no eran muy abundantes, aunque todos apuntaban hacia una toxicidad nula.

Ante estas condiciones, se decidió abordar algunos aspectos farmacológicos y físico-químicos del jugo obtenido de los frutos de la planta *Opuntia dillenii Haw*. Las razones por las cuales se seleccionó esta especie de Opuntia y no otra, estaba apoyada en que ésta era una fuente natural rica en cromoalcaloides betalaínicos rojos (betacianinas) sobre los cuales existía una exhaustiva información química y en torno a los cuales se han desarrollado, a lo largo de estos últimos años, amplias investigaciones sobre sus aspectos biogenéticos y quimiotaxonómicos.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

OBJETIVOS

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

2.-*OBJETIVOS*

A la vista de los datos anteriormente expuestos, se planificó la presente Tesis Doctoral con el propósito de abordar los siguientes objetivos:

1) Obtener un extracto acuoso rico en cromoalcaloides betalaínicos a partir de frutos de la especie Opuntia dillenii Haw. purificado parcialmente en Sephadex G25M.

2) Realizar un estudio físico-químico del extracto acuoso rico en betalaínas, con el cual se iban a realizar posteriores estudios farmacológicos, que nos permitiera conocer la estabilidad de estos productos bajo determinadas condiciones de pH, luz y temperatura, y así dilucidar las condiciones más adecuadas para la manipulación de estos extractos ya que estos cromoalcaloides naturales eran sumamente lábiles y difíciles de manejar.

3) Comprobar la inocuidad del extracto de frutos de *Opuntia dillenii Haw.* cuando éste era administrado a altas dosis. Con esté fin se realizó un estudio de toxicidad aguda, así como el test de Irwin.

4) Comprobar la existencia de principios con actividad biológica en el jugo obtenido de los frutos de la planta *Opuntia dillenii Haw.* Con este fin

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

se realizaron diferentes pruebas farmacológicas, como son:

4.1) Estudio de analgesia.

4.2) Estudio de la actividad antiinflamatoria.

4.3) Estudio de la coordinación motora.

4.4) Estudio del tránsito intestinal con carbón vegetal.

4.5) Utilización de un preparado de músculo liso aislado, que en nuestro caso ha sido músculo liso traqueal, para detectar los posibles efectos del extracto de *Opuntia dillenii Haw.* a nivel del árbol traqueobronquial.

5) Estudiar las posibles variaciones sanguíneas que la administración del extracto de *Opuntia dillenii Haw.* produce a nivel sanguíneo y a nivel del pH y la gasometría. Esto ha sido realizado mediante las siguientes pruebas:

5.1) Estudio bioquímico.

5.2) Estudio gasométrico.

6) Estudiar las posibles propiedades hepatoprotectoras que se atribuyen al extracto de frutos de *Opuntia dillenii Haw.* mediante los siguientes experimentos:

6.1) Hepatotoxicidad inducida por etanol en ratones.

6.2) Hepatotoxicidad inducida con tetracloruro de carbono en ratas.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

7) Influencia sobre la coagulación sanguínea siguiendo una aplicación del método de Lee-White.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

PARTE EXPERIMENTAL

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.1.-*PREPARACION Y PURIFICACION PARCIAL DEL EXTRACTO ACUOSO OBTENIDO DE OPUNTIA DILLENII HAW.*

3.1.1.-INTRODUCCION

Para poder realizar los estudios farmacológicos incluidos en este trabajo obtuvimos cantidades suficientes de un extracto acuoso de los frutos de *Opuntia dillenii* (Extracto acuoso I) que fue parcialmente purificado mediante columna gravitatoria con gel Sephadex constituyendo el extracto acuoso II de frutos de *Opuntia dillenii Haw.* parcialmente purificado (EAOD), para la realización de los experimentos.

3.1.2.-MATERIAL Y METODOS

I.-Preparación del extracto acuoso I de frutos de Opuntia dillenii Haw.

Fuente de materia prima

Se seleccionaron los frutos maduros de una especie de cactácea silvestre muy abundante en nuestro entorno. Esta fue identificada por D. Branwell (Jardín Botánico "Viera y Clavijo") con el nombre genérico de

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Opuntia dillenii Haw. Estos frutos se recolectaban durante los meses de Octubre a Febrero en la isla de Gran Canaria en una zona conocida con el nombre de Montequemado (Marzagán, Las Palmas de G.C).

Conservación de la materia prima

Los frutos de *Opuntia dillenii Haw.* fueron seleccionados, limpiados, pesados y, finalmente, almacenados a una temperatura de -20°C hasta el momento de su procesamiento.

Extracción del jugo

Para cada extracción se utilizaban 400-420 g de frutos maduros de *Opuntia dillenii Haw.* Las muestras congeladas se troceaban y trituraban, en presencia de agua desionizada, con un triturador eléctrico de uso doméstico. Durante el proceso de extracción se añadían sucesivas alícuotas de agua desionizada hasta que se blanqueaban totalmente los residuos. Para arrastrar todos los pigmentos de las muestras vegetales se necesitaba una cantidad de 1.000-1.100 cc de agua. El proceso de extracción se realizaba a temperatura ambiente.

De la forma descrita anteriormente, se conseguía un extracto acuoso intensamente coloreado de rojo y muy viscoso. Este se centrifugaba a 10.000

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

rpm durante 30 minutos y a una temperatura de 0-5° C en una Ultracentrífuga Sorvall modelo RC 5, obteniéndose un sobrenadante transparente de color rojo brillante (extracto acuoso I de frutos de *Opuntia dillenii Haw.*). Finalmente, el sobrenadante se filtraba en papel Whatman nº 4 a temperatura ambiente con la ayuda de una bomba de vacío (Millipore). El residuo obtenido mediante la centrifugación era desecado mediante una estufa a 100 °C, siendo posteriormente pesado. El peso del residuo obtenido se utilizaba para el cálculo del rendimiento obtenido.

Concentración del extracto acuoso I de frutos de Opuntia dillenii Haw.

El extracto acuoso filtrado se repartía en tubos de ensayo y se llevaba a sequedad en un liofilizador modelo Flexi-Dry-3-85D-MP. La liofilización del extracto se desarrollaba en condiciones de oscuridad durante un tiempo de 36-40 horas hasta que se alcanzaba una presión de vapor de agua de 10^{-1} Torr y una temperatura de condensador que se estabilizaba a -80°C.

Cuantificación

La cantidad de producto seco se determinaba calculando la diferencia de peso existente entre el que correspondía al tubo de ensayo con la muestra liofilizada y el obtenido al pesar el tubo vacío antes de añadir el extracto. Una vez se pesaba el tubo con el extracto liofilizado en su interior, se tapaba

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

y se almacenaba a una temperatura de -20°C.

II.-Purificación parcial del extracto acuoso I de frutos de Opuntia dillenii Haw. en columna de filtración en gel Sephadex

Se utilizó la cromatografía preparativa en Sephadex G25M por ser un método muy eficaz para realizar la prepurificación de los extractos acuosos brutos ricos en betalaínas tal como ya habían demostrado Vergeront *et al.* (1980) y Schwartz *et al.* (1980).

Preparación de la columna

Se empleó una columna de vidrio (Anorsa), con dimensiones de 3x50 cm que se rellenó con una fase estacionaria de gel tipo Sephadex G 25 *medium* (Sigma) con una tamaño de partícula de 50-150 μm. Siguiendo las recomendaciones de Pharmacia Fine Chemicals (1979), el gel se hidrataba con agua desionizada y a una temperatura de 90°C durante una hora, empleándose una relación de, como mínimo, 4 cc por cada gramo de gel seco. Una vez fabricada la papilla de gel, se desgasificaba y se llevaba a una temperatura de 4-5°C en la que se trabajó siempre. La papilla de gel se vertía, con extremo cuidado y de una sola vez, en el interior de la columna de vidrio hasta que se alcanzaba la altura, previamente establecida, de 43 cm. Una vez sedimentado, el lecho cromatográfico se equilibraba con ácido acético

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

(Scharlau) al 1% en agua desionizada que sería la fase móvil empleada para eluir la muestra. Para conseguir un correcto equilibrio del lecho cromatográfico éste se lavaba con un volumen de, al menos, 2-3 veces el volumen total que ocupaba aquél. El volumen total que ocupaba el lecho de gel en la columna (Vt) era de 304 cc. Para calcular el volumen total, se llenaba la columna con agua hasta la altura que iba a ocupar el gel (43 cm) y a continuación se vaciaba y se medía con una probeta.

Chequeo del lecho cromatográfico

La integridad y correcta manipulación del lecho cromatográfico se chequeaban inmediatamente después de que era equilibrado con la fase móvil utilizada como eluyente (1% ácido acético en agua desionizada), y, también, periódicamente cada 5 o 6 muestras cromatografiadas. Para ello y siguiendo las recomendaciones de Pharmacia Fine Chemicals, se utilizaba una solución de azul dextrano 2000 (Sigma) a una concentración de 2 mg/cc en agua desionizada.

Preparación de la muestra para cromatografiar

Una cantidad de 1200 mg de extracto acuoso I de frutos de *Opuntia dillenii Haw.*, obtenido y liofilizado según se ha expuesto anteriormente, se reconstituía con ácido acético al 1% en agua desionizada para dar una

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

concentración de 15-16 mg/cc. Siguiendo las indicaciones de Vergeront *et al.* (1980), estas soluciones se mantenían con una viscosidad siempre inferior a dos en relación con la de la fase móvil. La muestra se acidificaba hasta un pH=2.80 con HCl 0.1 N y se centrifugaba a 2000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 0-5° C. Finalmente se aplicaba sobre el lecho de gel un volumen de muestra del 5% del volumen total de la columna (Pharmacia Fine Chemicals, 1979; Vergeront *et al.*, 1980) que en nuestro caso era siempre de 30 cc.

Condiciones cromatográficas

La purificación del extracto acuoso I de frutos de Opuntia dillenii Haw., se desarrollaba en oscuridad y a una temperatura de 4-5°C. Se empleaba una fase móvil formada por ácido acético (Scharlau) al 1% en agua desionizada (v:v) con una fuerza iónica superior a 0.08 (Schwartz *et al.*, 1980). El flujo de salida de la columna se mantenía en un rango de 1.3 a 1.8 cc/min y la presión de caída del solvente sobre la superficie del gel no sobrepasaba los 76 cm de H_2O. Las fracciones se recogían con un colector automático (LKB, Ultrarac 7000 A), programado para tomar un volumen constante de 6.5 cc por fracción. Después de que se eluían todas las bandas coloreadas, la superficie del lecho se limpiaba y se reemplazaba por gel nuevo. Antes de aplicar una nueva muestra, la columna se lavaba durante un tiempo de, al menos, 24 horas con el propósito de eliminar cualquier

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

sustancia incolora.

Cuantificación y conservación del extracto acuoso I de frutos de Opuntia dillenii Haw. parcialmente purificado

Como nuestros objetivos estaban dirigidos al estudio de un extracto acuoso rico en cromoalcaloides betalaínicos, se seleccionaron las bandas coloreadas que se eluían del Sephadex G25M y que aportaban un mayor rendimiento de cromoalcaloides betalaínicos, determinadas previamente mediante estudio espectrofotométrico. Es por este motivo que no podemos, en absoluto, descartar la existencia de algún principio activo en las fracciones no estudiadas.

Después de realizar la purificación parcial del extracto acuoso I en las condiciones citadas anteriormente de oscuridad y temperatura de 4 °C, las fracciones ricas en betalaínas (n° 52 a n° 80), se mezclaban y, de la misma forma que para el extracto acuoso I, se liofilizaban y cuantificaban. Esta muestra formada por las fracciones citadas anteriormente constituían el "extracto acuoso II de frutos de Opuntia dillenii Haw. parcialmente purificado" (EAOD) que se conservaba a una temperatura de -20°C.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Preparación del extracto acuoso II de frutos de Opuntia dillenii Haw. parcialmente purificado (EAOD) para la realización de los experimentos farmacológicos

Dada la acidez del extracto, y para poder realizar los diferentes estudios farmacológicos, fue reconstituido con tampón fosfato a pH 7 y 0.001 M, evitando la aparición de modificaciones en la conducta y alteraciones en las respuestas del animal que produjeran errores en la interpretación de los datos obtenidos.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.1.3.-RESULTADOS

Una vez realizado el procesamiento necesario para la obtención del extracto acuoso II de frutos de Opuntia dillenii Haw. (EAOD), se calculó el rendimiento alcanzado tanto para el extracto acuoso I como para el EAOD. Así, para el extracto acuoso I se obtuvo un rendimiento del 8.92±0.38% (porcentaje obtenido a partir del peso total de materia prima utilizada), similar a los obtenidos por Fernández (1989) y Fresen (1992). Para el extracto acuoso II de frutos de Opuntia dillenii Haw. se obtuvo un rendimiento del 1.47±0.30% (porcentaje obtenido a partir del peso del extracto acuoso I, aplicado sobre el lecho de Sephadex G25M), similar al obtenido por Fresen (1992).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.2.-*ANALISIS ESTADISTICO*

Para objetivar la existencia de diferencia estadísticamente significativa se realizó un análisis de la varianza, mediante el procedimiento ONE WAY del paquete de programas estadísticos SPSS (Statistical Package for the Social Sciencies). Se consideró la existencia de diferencia significativa para $p \leq 0.05$.

Previamente se había realizado un estudio de la normalidad de los diferentes grupos experimentales mediante el procedimiento NPAR-test. En cada experimento se estudió la homogeneidad de las varianzas mediante diferentes test (Cochrans y Bartlett-box).

En el caso de que existiese diferencia significativa en el análisis de la varianza se realizaron comparaciones múltiples mediante el test de Scheffe (un subprocedimiento del procedimiento ONE WAY del SPSS) para determinar en que grupo aparecía la diferencia significativa.

En las gráficas de los diferentes experimentos queda reflejada mediante la presencia de un asterisco la existencia de diferencia significativa.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.3.-*TEST DE IRWIN*

3.3.1.-INTRODUCCION

El test de Irwin (1968) ha sido ampliamente utilizado como método de observación exhaustivo a nivel de conducta, estado neurológico y autonómico. Se utiliza una escala de valoración y aproximadamente se requieren 3 minutos para procesar cada animal.

Este test ocupa un lugar importante dentro de las pruebas farmacológicas que deben realizarse en el estudio de un nuevo producto farmacológico, debido a la gran diversidad y calidad de la información obtenida. Es una prueba preliminar junto con la DL_{50} en el screening de nuevos fármacos, siendo su realización necesarias para proseguir la investigación. La valoración se hace de forma subjetiva, por lo que es necesario un período prolongado de adiestramiento del investigador, para poder conocer las reacciones normales del animal.

Mediante este test podemos obtener información sobre: comportamiento (percepción, esterotipia, pasividad), disposición de ánimo, actividad motora, excitación del S.N.C., tono muscular, reflejos y sistema nervioso autónomo. La secuencia del procesamiento de los animales para la realización del test de Irwin viene reflejada en las figuras 6 y 7. Para la

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

valoración nos basaremos en los estudios realizados por Irwin (1968).

3.3.2.-MATERIAL Y METODO

Para la realización del test se utilizaron 50 ratones machos (Albino-Swiss OF 1), suministrados por Iffa Credo y posteriormente adaptados y criados en el bioterio de la Facultad de Medicina, con un peso comprendido entre 35 y 40 g, valorándose comparativamente con animales control los 49 parámetros del test a los 15, 30, 60 y 120 minutos tras la administración del extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw.*

El test fue realizado con el extracto tipo I reconstituido con tampón fosfato, administrándose un volumen de 0.5 ml i.p. según los siguientes grupos experimentales:

-grupo control: 0.5 ml i.p. de tampón fosfato (n=10)

-grupo I: 25 mg/kg de extracto (n=10)

-grupo II: 100 mg/kg de extracto (n=10)

-grupo III: 400 mg/kg de extracto (n=10)

-grupo IV: 1600 mg/kg de extracto (n=10)

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

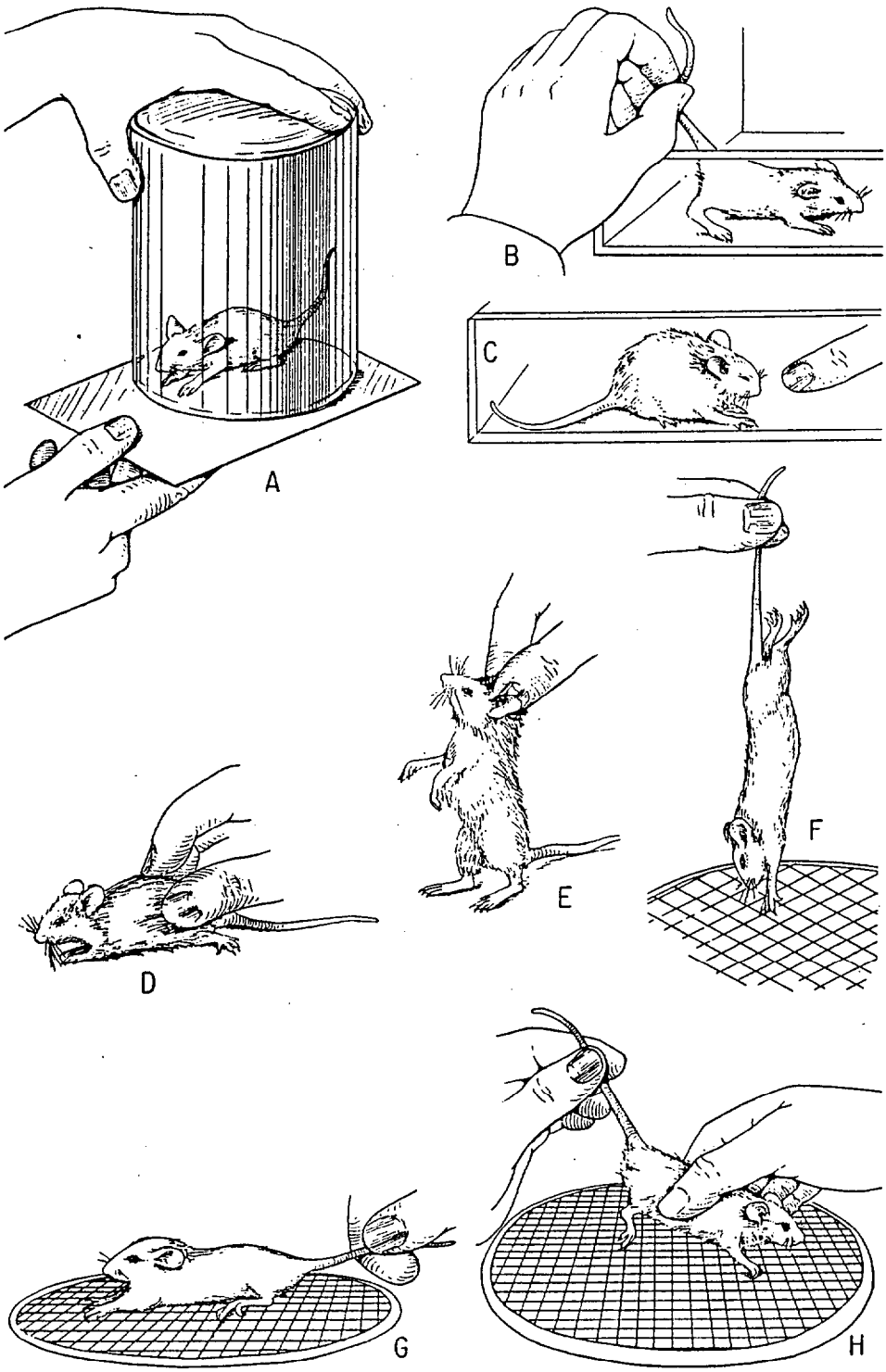

Figura 6: Secuencia del manejo de animales para la realización del test de Irwin. Tomado de Irwin (1968).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

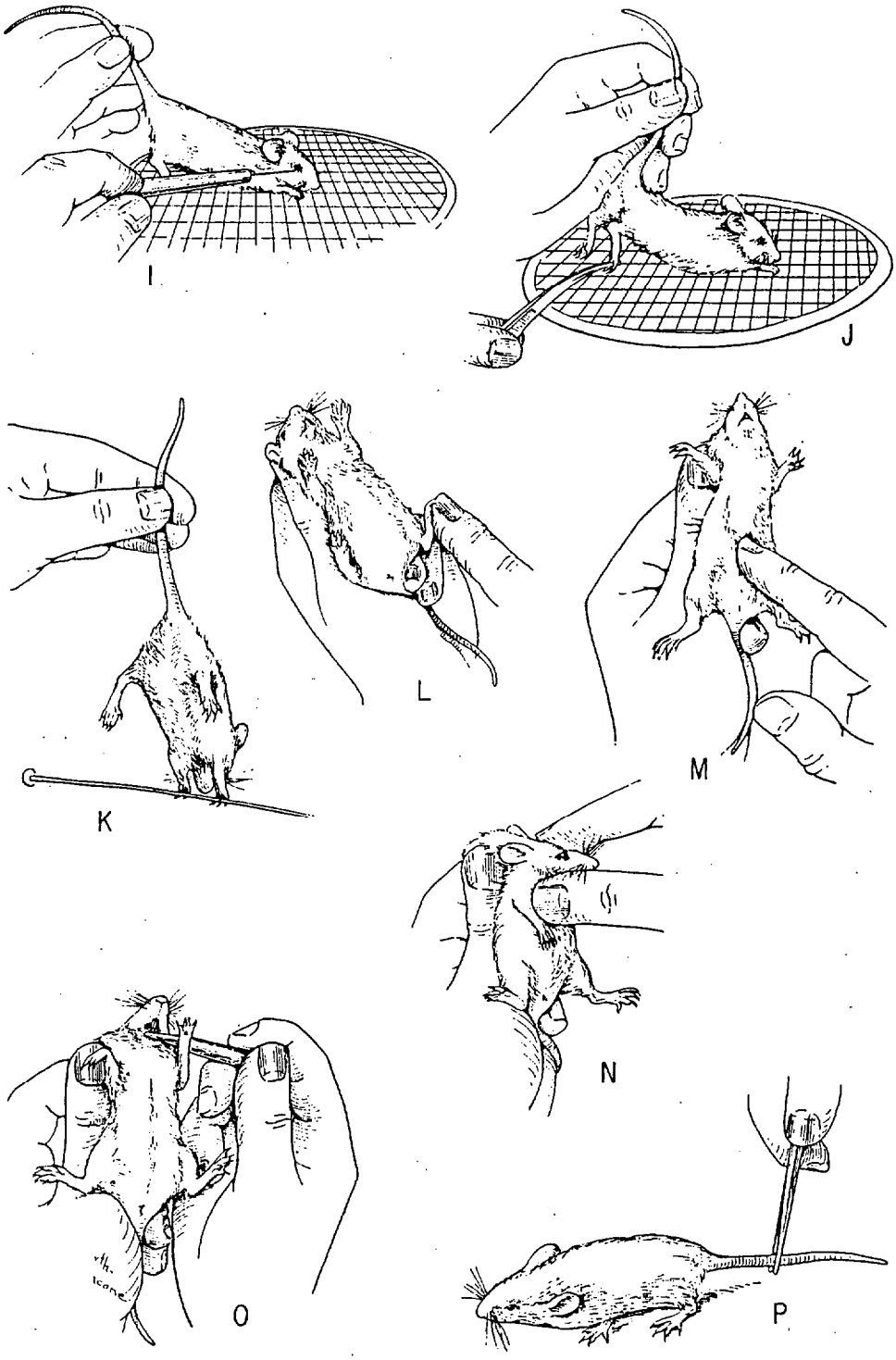

Figura 7: Secuencia del manejo de animales para la realización del test de Irwin. Tomado de Irwin (1968).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

RESUMEN DE LOS PARAMETROS DE CONDUCTA EXAMINADOS Y LOS CRITERIOS DE VALORACION

I.-En recipiente transparente

I.a.-Posición corporal

0 Completamente acostado
1 Tendido sobre un costado
2 Tendido derecho
4 Sentado
6 De pie sobre las patas traseras
8 Saltos verticales repetidos
P = Cierre palpebral (0-8)

I.b.-Actividad locomotora

0 Ninguna; Descansando
2 Rascado casual, acicalado/despacio apatía
4 Rascado vigoroso
6 Movimientos vigorosos
8 Movimientos vigorosos extremos

I.c.-Conducta extraña (0-8)

HF Golpes de cabeza
HS Búsqueda con la cabeza
H Alucinaciones
B Mordida compulsiva
SB Mordidas autolesivas
L Lamer compulsivamente
D Desorientación espacial
P Encabritarse
UW Caminar sobre patas traseras
AW Vagar sin propósito
C Hacer círculos
W Hacer círculos rápidos
R Retroceso

I.d.-Exoftalmos

\+ Presente

I.e.-Frecuencia y ritmo respiratorio

0 Apnea
2 60/min
4 120/min
6 180/min
8 240^{+}/min
R Laboriosa
R Esforzada
D Disneica
G Gasping

I.f.-Temblor

I.g.-Sacudidas

I.h.-Convulsiones

II.-En anfiteatro

II.a.-Excitación al ser transferida

0 Coma
1 Marcado estupor
2 Moderado estupor

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3 Ligero estupor
4 Alerta
5 Hiperalerta
6 Excitación ligera
7 Excitación moderada
8 Escudasen extrema
C Catalepsia

II.b.-Locomoción espacial
(0-4) multiplicado por factor:
Despacio = 1
Activo = 1.5
Rápido = 2

II.c.-Cierre palpebral
0 Ojos completamente abiertos
2 ¼ cerrado
4 ½ cerrados
6 3/4 cerrados
8 Totalmente cerrado

II.d.-Piloerección
(0-8) Ligera, Moderada, Marcada, Extrema

II.e.-Asustar
0 Ninguno
2 ¼ cm
4 ½ cm
6 3/4 cm
8 1 cm o más

II.f.-Progresión en el callejón
D retraso de 4^{+} segundos; E Salida rápida
-> No exploración

II.g.-Elevación pélvica
0 Marcadamente tendido
2 Apenas acostado
4 3 mm de elevación
6 6 mm de elevación
8 12 mm de elevación
C Postura agachada H Posición de cabeza anormal

II.h.-Elevación de la cola
0 Relajada
2 Extendida horizontalmente
4 Elevada diagonalmente (45°)
6 Levantada verticalmente (90°)
8 Elevada diagonalmente retrógradamente (135°)

II.i.-Aproximación del dedo (3 mm cerca del ratón durante 4 ")
0 Ninguna respuesta
2 Solo movimientos de cabeza

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

4 Movimientos hacia el dedo
6 Contacto parcial con el dedo
8 Contacto completo y exploración

II.j.-Retirada ante el dedo
0 Ninguna respuesta
2 Marcada mirada furtiva
4 Mirada furtiva con ligero retroceso de cabeza y cuerpo
6 Mirada furtiva con moderado retroceso de cabeza y cuerpo
8 Retirada continua
B Morder F Inmovilidad

II.k.-Escape al contacto (Tocar 3 veces al animal desde la base del tórax hacia la cola)
0 Ninguna respuesta
2 Escape lento, ligeramente inmóvil (presión firme)
4 Escape moderadamente rápido (presión ligera)
6 Escape vigoroso y rápido
8 Escape extremadamente vigoroso (presión ligerísima)

II.l.-Caminar atáxico (tumbos)
0 Ninguno
2 Ligero
4 Considerable
6 Marcado (caída cada 4-6 pasos
8 Se cae apenas se mueve

II.m.-Caminar hipotónico
0 Ninguno
2 Ligero con pelvis subnormal
4 Moderada con pelvis baja
6 Moderada con pelvis tendida
8 Extrema con abdomen tendido

II.n.-Caminar alterado
St Estepaje
Sp Espasticidad
W Caminar anadeante
Ds Dismetría
Dk Caminar de pato
Sc Caminar en tijera

II.o.-Rotación de los miembros
0-8 Ligero, moderado, marcado, extremo
A Anterior
P Posterior
L Lateral
M Medial
F Solo los miembros anteriores

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

II.p.-Total incapacidad para caminar
0-8 Ligero, moderado, marcado, extremo
II.q.-Pasividad posicional (no lucha)
2 Sostenido por el cuello
4 Sostenido en posición supina
6 Sostenido por un miembro delantero
8 Sostenido por un miembro trasero

III.-Suspensión por la cola

III.a.-Situación visual (distancia de la nariz)
0 Ninguno, incluso después del contacto con la nariz
1 Después del contacto con la nariz
2 Después de un marcado contacto con los pelos del morro (6 mm)
4 Después de ligero contacto con los pelos del morro. Activo (12 mm)
6 Antes del contacto con los pelos del morro. Activo (18 mm)
8 Extensión vigorosa temprana, incluso miembros posteriores (25 mm)
III.b.-Fuerza de agarre (Agarrado a la rejilla se tira de la cola horizontalmente)
0 Ninguno
2 Agarre ligero. Semiefectivo.
4 Agarre moderado. Efectivo.
6 Agarre activo. Efectivo
8 Inusualmente efectivo.
III.c.-Tono corporal (comprimir ligeramente los lados del abdomen)
0 Completamente flácido (no vuelve a la posición normal)
2 Ligeramente flácido (vuelve ligeramente a la posición normal)
4 Ligera resistencia
6 Moderada resistencia
8 Extrema resistencia. Como una tabla
III.d.-Hipotermia
+ Presente
III.e.-Reflejo pineal
0 Ninguno
2 Retracción moderada. Golpecito ligeramente enérgico
4 Retracción moderada. Golpecito moderadamente enérgico
6 Golpecito muy enérgico
8 Golpecitos repetidos hiperactivos apenas se toca
III.f.-Reflejo corneal
0 Ninguno
2 Cierre perezoso
4 Singular cierre palpebral activo
6 Doble cierre de ojos
8 Triple cierre de ojos
III.g.-Compresión digital (Compresión de la cara lateral del dedo medio de

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

ambos miembros traseros)

0 Ninguno
2 Ligera retirada
4 Retirada moderadamente rápida
6 Retirada enérgica y rápida
8 Retirada muy enérgica con extensiones y flexiones repetidas

III.h.-Lucha posicional (al ser suspendido por la cola)

0-8 Ligera, moderada, marcada, extrema
(media entre reflejo pineal, corneal y situación visual)

III.i.-Manejo en el alambre (se deja que se agarre en el alambre y después se suelta para ver el tiempo que tarda en caer)

0 Agarre activo con los miembros traseros
2 Moderada dificultad de agarre con los miembros traseros
4 Incapacidad de agarrarse con los miembros traseros. Subida ligera
6 Incapaz de levantar los miembros traseros. Cae en 6-10 "
8 Cae inmediatamente
B Cae por alteración de la conducta

IV.-Posición supina

IV.a.-Color de la piel

0 Extremadamente pálida
2 Moderadamente pálida
4 No pálida. Escaso-moderadamente rosa oscuro
6 Profundamente rosa oscuro
8 Profundamente rojo oscuro
C Cianosis (0-8)

IV.b.-Diarrea

+ Presente

IV.c.-Tono de los miembros

0-8 Ligero, moderado, marcado, extremo, resistente.

IV.d.-Tono abdominal

0 Completamente flácido. No retorna la cavidad
2 Ligeramente flácido. Retorna lenta o rápidamente
4 Ligera resistencia
6 Moderada resistencia
8 Extrema resistencia. Como una tabla

IV.e.-Lagrimeo

+ Presente
C Cromodacriorrea

IV.f.-Salivación

0 Ninguno
2 Muy ligeramente húmedo la zona submaxilar
4 Húmedo 1/4 de la zona submaxilar
6 Húmedo 1/2 de la zona submaxilar

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

8 Zona húmeda en toda el area submaxilar

IV.g.-Mordida provocada (Se fuerza la apertura bucal con una clavija de madera mientras que se le aplica una presión moderada con un fórceps en la base de la cola (a 2.5 cm) durante 4"

0 Ninguno
2 Ligero, débil
4 Moderadamente activo; no vigoroso
6 Vigoroso; no inmediatamente o continuo
8 Extremadamente vigoroso, intenso y continuo

IV.h.-Estimulación en la cola

0 Sin respuesta
1 Movimientos muy lentos, ligeramente paralizado/vocalización
2 Mordedura/escape ligera, vocalización moderada
4 Mordedura/escape moderada
6 Mordedura/escape vigorosa
8 Mordedura/escape extremadamente vigorosa

IV.i.-Reflejo de enderezamiento (Se deja caer el animal desde 30 cm en un salto mortal y se ve como cae. Si hay alteración se repite 3 veces)

0 Ninguna alteración
1 Sobre un lado 1-2 veces
2 Sobre un lado 3-4 veces
3 Sobre un lado 5 veces
4 Sobre el lomo 1-2 veces
5 Sobre el lomo 3-4 veces
6 Sobre el lomo 5 veces
7 Perezoso cuando es colocado sobre el lomo
8 Ausente cuando es colocado sobre el lomo y se le aprieta la cola

V.-Durante todo el manejo

V.a.-Irritabilidad al agarre (Tendencia a morder)

0 Ninguna
1 Ligera
2 Moderada
3 Marcada

V.b.-Vocalización

f Numero durante el manejo

V.c.-Urinación-defecación

f Numero durante el manejo

V.d.-Muerte aguda

+ Presente
C Convulsiones R Depresión respiratoria

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.3.3.-RESULTADOS

Uno de los estudios preliminares a realizar con el extracto de Opuntia dillenii Haw. es la realización del test de Irwin, el cual nos da una amplia información sobre el mecanismo y lugar de acción de dicho extracto. En función de la DL_{50} se establecen las dosis utilizadas en el presente estudio, acorde con el método de Miller y Tainter (1944).

En las siguientes tablas (tabla 3, 4, 5, 6 y 7) se muestran los resultados obtenidos tras la realización del test de Irwin, para los diferentes grupos experimentales estudiados.

Se apreció una reducción de la actividad motora general, objetivada por el descenso de la actividad locomotora en el recipiente transparente, un descenso de la locomoción espacial y una disminución de la progresión en el callejón, que al igual que en el caso anterior se incrementa con la dosis del extracto pero que desciende cuando el tiempo tras la administración es superior a los 60-120 min.

Con las dosis más altas se objetivó a nivel del Sistema Nervioso Autónomo una disminución en la abertura palpebral, así como una ligera piloerección, asociándose a un ligero descenso de la frecuencia respiratoria.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

En cuanto a los posibles efectos del extracto a nivel del Sistema Nervioso Central, se observó una ligera sedación, una reducción del estado de alerta y un aumento de la pasividad que aparece fundamentalmente en las primeras determinaciones (15 y 30 min), mejorando a medida que pasaba el tiempo, manifestándose fundamentalmente en las pruebas en las que el animal debía reaccionar frente al investigador o ante el emplazamiento en un espacio nuevo para el animal, como era el caso de la excitación al ser transferido, aproximación del dedo, retirada ante el dedo y escape al contacto, en las cuales la respuesta del animal al ir aumentando la dosis descendía al compararla con la respuesta de los animales controles.

También se objetivó un descenso de la coordinación motora, principalmente cuando el animal era sometido a la prueba del manejo sobre el alambre, en la cual para las dosis mayores el animal era incapaz de sujetarse con las patas traseras en el mismo.

Se objetiva asimismo un cierto efecto analgésico del extracto, puesto de manifiesto por la escasa respuesta ante la compresión digital, la mordida provocada y la presión en la cola, que se producía al ir aumentando las dosis.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 3

	VALORACION	Control			
		t_{15}	t_{30}	t_{60}	t_{120}
Recipiente transparente	Dormido	2	2	2	2
	Cierre palpebral	0	0	0	0
	Actividad locomotora	3	3	3	3
	Conducta extraña	0	0	0	0
	Exoftalmos				
	Frecuencia y ritmo respiratorio	4	4	4	4
	Temblor				
	Sacudidas				
	Convulsiones				
Arena	Excitación al ser transferida	4	4	4	4
	Locomoción espacial	3	3	3	3
	Cierre palpebral	0	0	0	0
	Piloerección	2	2	2	2
	Asustar	1,5	1,5	1,5	1,5
	Progresión en el callejón	54	53	55	54
	Elevación pélvica	4	4	4	4
	Elevación de la cola	2,5	2,5	2,5	2,5
	Aproximación del dedo	1,3	1,2	1,3	1,3
	Retirada ante el dedo	5	5	5	5
	Escape al contacto	4	4	4	4
	Caminar atáxico	0	0	0	0
	Caminar hipotónico	0	0	0	0
	Caminar alterado	0	0	0	0
	Rotación de los miembros	0	0	0	0
	Total incapacidad para caminar	0	0	0	0
	Pasividad posicional	0	0	0	0
Suspensión por la cola	Situación visual	6	6	6	6
	Fuerza de agarre	6	6	6	6
	Tono corporal	4	4	4	4
	Hipotermia				
	Reflejo pineal	6	5,8	6	6
	Reflejo corneal	6	6	6	6
	Compresión digital	6	6	6	6
	Lucha posicional	2	2	2	2
	Manejo en el alambre	0	0	0	0
Posición supina	Color de la piel	4	4	4	4
	Diarrea				
	Tono de los miembros	4	4	4	4
	Tono abdominal	4	4	4	4
	Lacrimeo				
	Salivación	0	0	0	0
	Mordida provocada	4	4	4	4
Arena	Presión en la cola	6	6	6	6
	Reflejo de enderezamiento	0	0	0	0
	Irritabilidad al agarre	0	0	0	0
	Vocalización	0	0	0	0
	Urinación-defecación	2	3	2	3
Coment. Miscel.	Muerte aguda				

+ =Presente; -=Incapacidad para medir; Espacio en blanco= Valor normal

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 4

VALORACION — **Dosis: 25mg/kg**

		t_{15}	t_{30}	t_{60}	t_{120}
Recipiente transparente	Dormido	2	2	2	2
	Cierre palpebral	0	0	0	0
	Actividad locomotora	3	3	3	3
	Conducta extraña	0	0	0	0
	Exoftalmos				
	Frecuencia y ritmo respiratorio	4	4,2	4	4
	Temblor				
	Sacudidas				
	Convulsiones				
Arena	Excitación al ser transferida	4	4	4	4
	Locomoción espacial	3	2,6	3	3
	Cierre palpebral	0	0	0	0
	Piloerección	2	2	2	2
	Asustar	1,5	1,5	1,5	1,5
	Progresión en el callejón	48	50	54	54
	Elevación pélvica	4	4	4	4
	Elevación de la cola	2,8	2,6	2,8	2,8
	Aproximación del dedo	1,3	1,3	1,3	1,3
	Retirada ante el dedo	5	5	5	5
	Escape al contacto	4	4	4	4
	Caminar atáxico	0	0	0	0
	Caminar hipotónico	0	0	0	0
	Caminar alterado	0	0	0	0
	Rotación de los miembros	0	0	0	0
	Total incapacidad para caminar	0	0	0	0
	Pasividad posicional	0	0	0	0
Suspensión por la cola	Situación visual	5,8	6	6	6
	Fuerza de agarre	5,8	6	6	6
	Tono corporal	3,8	4	4	4
	Hipotermia				
	Reflejo pineal	6,2	6	6	6
	Reflejo corneal	6,2	6	6	6
	Compresión digital	5,6	5,8	6	6
	Lucha posicional	2,2	2	2	2
	Manejo en el alambre	0	0	0	0
Posición supina	Color de la piel	4	4	4	4
	Diarrea				
	Tono de los miembros	4	4	4	4
	Tono abdominal	4	4	4	4
	Lacrimeo				
	Salivación	0	0	0	0
	Mordida provocada	4	4	4	4
Arena	Presión en la cola	6	6	6	6
	Reflejo de enderezamiento	0	0	0	0
	Irritabilidad al agarre	0	0	0	0
	Vocalización	0	0	0	0
	Urinación-defecación	2,8	2,4	2,6	2
Coment. Miscel.	Muerte aguda				

+ =Presente; -=Incapacidad para medir; Espacio en blanco= Valor normal

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 5

VALORACION — **Dosis: 100 mg/kg**

		t_{15}	t_{30}	t_{60}	t_{120}
Recipiente transparente	Dormido	2	2	2	2
	Cierre palpebral	0	0	0	0
	Actividad locomotora	3	3	3	3
	Conducta extraña	0	0	0	0
	Exoftalmos				
	Frecuencia y ritmo respiratorio	3,8	4	4	4
	Temblor				
	Sacudidas				
	Convulsiones				
Arena	Excitación al ser transferida	3,6	3,8	4	4
	Locomoción espacial	2,4	2,4	3	3
	Cierre palpebral	0	0	0	0
	Piloerección	2,5	2,4	2	2
	Asustar	1,9	1,8	1,5	1,5
	Progresión en el callejón	45	47	50	52
	Elevación pélvica	3,5	3,8	4	4
	Elevación de la cola	2	2,3	2,5	2,5
	Aproximación del dedo	1	1,3	1,3	1,3
	Retirada ante el dedo	6	5	5	5
	Escape al contacto	3	4	4	4
	Caminar atáxico	0	0	0	0
	Caminar hipotónico	0	0	0	0
	Caminar alterado	0	0	0	0
	Rotación de los miembros	0	0	0	0
	Total incapacidad para caminar	0	0	0	0
	Pasividad posicional	0	0	0	0
Suspensión por la cola	Situación visual	5,6	5,8	6	6
	Fuerza de agarre	5,5	5,6	6	6
	Tono corporal	3,5	3,6	4	4
	Hipotermia				
	Reflejo pineal	5,4	5,7	6	6
	Reflejo corneal	5,5	5,8	6	6
	Compresión digital	5,5	5,5	6,2	6
	Lucha posicional	1,8	2	2	2
	Manejo en el alambre	2	1,5	0	0
Posición supina	Color de la piel	5	4,8	4	4
	Diarrea				
	Tono de los miembros	3,5	3,8	4	4
	Tono abdominal	4	4	4	4
	Lacrimeo				
	Salivación	0	0	0	0
	Mordida provocada	3	3,5	4	4
Arena	Presión en la cola	6	6	6	6
	Reflejo de enderezamiento	0	0	0	0
	Irritabilidad al agarre	0	0	0	0
	Vocalización	0	0	0	0
	Urinación-defecación	1,8	1	1	1
Coment. Miscel.	Muerte aguda				

+ =Presente; -=Incapacidad para medir; Espacio en blanco= Valor normal

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 6

VALORACION — **Dosis: 400 mg/kg**

		t_{15}	t_{30}	t_{60}	t_{120}
Recipiente transparente	Dormido	2	2	2	2
	Cierre palpebral	1	2	0	0
	Actividad locomotora	1,5	1,8	2,2	3
	Conducta extraña	0	0	0	0
	Exoftalmos				
	Frecuencia y ritmo respiratorio	3,5	3,6	4	4
	Temblor				
	Sacudidas				
	Convulsiones				
Arena	Excitación al ser transferida	2,5	2,8	3	4
	Locomoción espacial	1,5	1,8	2	3
	Cierre palpebral	1,4	0,9	0	0
	Piloerección	3	2,8	2,5	2
	Asustar	2,8	1,8	1,6	1,5
	Progresión en el callejón	25	22	38	45
	Elevación pélvica	3	3,5	4	4
	Elevación de la cola	2,1	2	2,5	2,5
	Aproximación del dedo	0,8	1	1,3	1,3
	Retirada ante el dedo	4	4,2	4,8	5
	Escape al contacto	2,8	3,3	3,7	4
	Caminar atáxico	0	0	0	0
	Caminar hipotónico	0	0	0	0
	Caminar alterado	0	0	0	0
	Rotación de los miembros	0	0	0	0
	Total incapacidad para caminar	0	0	0	0
	Pasividad posicional	0	0	0	0
Suspensión por la cola	Situación visual	5,6	5,6	6	6
	Fuerza de agarre	5	5,2	5,2	6
	Tono corporal	3	3,2	4	4
	Hipotermia				
	Reflejo pineal	5	5,3	6	6
	Reflejo corneal	5,2	5,6	6	6
	Compresión digital	4	4,2	4,8	6
	Lucha posicional	1,6	1,8	2	2
	Manejo en el alambre	2,8	3	1,5	0
Posición supina	Color de la piel	6	6	4,8	4
	Diarrea				
	Tono de los miembros	3,3	3,8	4	4
	Tono abdominal	3,5	4	4	4
	Lacrimeo				
	Salivación	0	0	0	0
	Mordida provocada	2,5	2,9	4	4
Arena	Presión en la cola	3,8	4,6	5	6
	Reflejo de enderezamiento	0	0	0	0
	Irritabilidad al agarre	0	0	0	0
	Vocalización	0	0	0	0
	Urinación-defecación	1	0,5	0	0
Coment. Miscel.	Muerte aguda				

+ =Presente; -=Incapacidad para medir; Espacio en blanco= Valor normal

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 7

VALORACION — **Dosis: 1600 mg/kg**

		t_{15}	t_{30}	t_{60}	t_{120}
Recipiente transparente	Dormido	2	2	2	2
	Cierre palpebral	1,7	2	0	0
	Actividad locomotora	1,4	1,7	2,3	3
	Conducta extraña	0	0	0	0
	Exoftalmos				
	Frecuencia y ritmo respiratorio	3,4	3,6	4	4
	Temblor				
	Sacudidas				
	Convulsiones				
Arena	Excitación al ser transferida	2,4	2,6	2,9	3,8
	Locomoción espacial	1,5	1,8	2	3
	Cierre palpebral	1,6	1,3	0,5	0
	Piloerección	3	2,8	2,5	2
	Asustar	2,8	1,8	1,6	1,5
	Progresión en el callejón	24	23	30	41
	Elevación pélvica	3	3,4	4	4
	Elevación de la cola	2,1	2	2,5	2,5
	Aproximación del dedo	0,8	0,9	1,3	1,3
	Retirada ante el dedo	3,9	4,2	4,8	5
	Escape al contacto	2,8	3,2	3,7	4
	Caminar atáxico	0	0	0	0
	Caminar hipotónico	0	0	0	0
	Caminar alterado	0	0	0	0
	Rotación de los miembros	0	0	0	0
	Total incapacidad para caminar	0	0	0	0
	Pasividad posicional	0	0	0	0
Suspensión por la cola	Situación visual	5,4	5,6	6	6
	Fuerza de agarre	5	5,2	5,1	6
	Tono corporal	3	3,2	4	4
	Hipotermia				
	Reflejo pineal	5	5,3	6	6
	Reflejo corneal	5,3	5,7	6	6
	Compresión digital	4	4,1	4,8	6
	Lucha posicional	1,5	1,8	2	2
	Manejo en el alambre	4	3,5	2	0
Posición supina	Color de la piel	6	6	6	5
	Diarrea				
	Tono de los miembros	3,2	3,8	4	4
	Tono abdominal	3,5	4	4	4
	Lacrimeo				
	Salivación	0	0	0	0
	Mordida provocada	2,4	2,9	4	4
Arena	Presión en la cola	3,8	4,5	5	6
	Reflejo de enderezamiento	0	0	0	0
	Irritabilidad al agarre	0	0	0	0
	Vocalización	0	0	0	0
	Urinación-defecación	0,5	0	0	0
Coment. Miscel.	Muerte aguda				

+ =Presente; -=Incapacidad para medir; Espacio en blanco= Valor normal

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.4.-*TOXICIDAD AGUDA*

3.4.1.-INTRODUCCION

La toxicidad aguda es un término que se refiere a los efectos tóxicos producidos por una dosis única de un compuesto. Esta es investigada en animales de experimentación durante la evaluación de la seguridad de un producto químico que vaya a ser utilizado como aditivo alimentario, drogas farmacológicas, cosmético o productos del hogar.

El conocimiento de la toxicidad aguda de un compuesto es de gran importancia, ya sea en el caso de un envenenamiento accidental con un producto químico o en el caso de que se considere el ensayo terapéutico de un determinado fármaco (Balazs, 1970).

3.4.2.-MATERIAL Y METODO

Para la determinación de la DL_{50} se utilizaron 46 ratones machos (Albino-Swiss OF 1) suministrados por Iffa Credo y posteriormente adaptados y criados en el bioterio de la Facultad de Medicina, con un peso comprendido entre 35 y 40 g.

Cada día se les administraba a 10 animales por via IP 0.5 ml del

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

extracto I de Opuntia dillenii Haw., reconstituido con tampón fosfato a las dosis más abajo indicadas, y eran devueltos a sus jaulas sin restricción de comida y agua. A las 24 horas de la administración fue valorado el número de muertes inducido por cada dosis.

Como primera aproximación, se realizaron una serie de experimentos dirigidos a buscar una dosis máxima que no produjera letalidad alguna y una dosis mínima que representara el 100% de letalidad.

Los grupos experimentales realizados fueron los siguientes:

-grupo control:	tampón fosfato (0,5 ml) (n=10)
-grupo I:	800 mg/kg (n=10)
-grupo II:	1600 mg/kg (n=10)
-grupo III:	3000 mg/kg (n=10)
-grupo IV:	5560 mg/kg (n=10)

Con los datos resultantes se calculó la DL_{50} siguiendo el método de Miller y Tainter (según lo describe Paget, 1970). Con este método se determinó de forma práctica la DL_{50} así como una estimación del error estándar. Los datos se dibujaron sobre un papel logarítmico. La DL_{50} se obtuvo directamente de la gráfica y representaba la mortalidad inducida por el 50% de la dosis máxima administrada. El error estándar fue estimado a partir de la siguiente fórmula:

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

$$\frac{Dosis\ 84\% - 16\%}{\sqrt{2N}}$$

Las dosis 84% y 16% fueron leídas directamente del gráfico. N representa el número de animales que contribuyen a cada valor dibujado.

Para el cálculo de la toxicidad aguda "per os" se siguió un método similar al descrito, con los mismos grupos experimentales.

3.4.3.-RESULTADOS

Con las dosis administradas del extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. (800, 1600, 3000 y 5560 mg/kg), tanto cuando se administró "per os" como cuando se administró por via i.p., no se observó la muerte de ningún animal.

Con las dosis máximas se observó un cierto aturdimiento del animal, el cual respondía mediante estímulo sonoro.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.5.-*ESTUDIO DE ANALGESIA*

3.5.1.-INTRODUCCION

Autores como Murayama *et al.* (1991) y Cao *et al.* (1992) han estudiado el efecto analgésico de diversos extractos de plantas (*Aconitum, Ranunculus japonicus*) mediante diferentes métodos entre los que destacan el estudio de la analgesia mediante el plato caliente (hot-plate), inhibición del retorcimiento del animal al administrarle ácido acético, estudios de la analgesia mediante ensayos de presión y mediante la utilización de focos caloríficos.

Atendiendo a la similitud de la estructura química de la betanina con la de ciertas drogas utilizadas por sus efectos analgésicos, se idearon una serie de estudios para dilucidar los posibles efectos analgésicos y antiinflamatorios del extracto de los frutos de *Opuntia dillenii Haw*. Nos pareció que un método fiable y reproducible, para el estudio de la analgesia, era la utilización del analgesímetro de foco calorífico en la cola de la rata.

3.5.2.-MATERIAL Y METODO

Los estudios de analgesia se realizaron mediante un analgesímetro de

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

foco calorífico (Letica, LI-7106), instrumento que permite la medición del tiempo de respuesta de ratas a la estimulación dolorosa mediante calor radiante en la cola. El analgesímetro está dotado de una fuente de calor de intensidad regulable y de un adecuado sistema de detección de la respuesta del animal asociado a un cronómetro que mide la latencia de respuesta con una precisión de décimas de segundo.

Para la realización del estudio de analgesia se utilizaron 48 ratas hembras Sprague-Dawley suministrados por Iffa Credo y posteriormente adaptados y criados en el bioterio de la Facultad de Medicina, con un peso comprendido entre 220 y 250 g, a las que se permitió habituar a las condiciones del laboratorio durante un período de 4 días, disponiendo de comida y agua "ad libitum".

El día del estudio las ratas se introdujeron en un contenedor, que servía para inmovilizar el animal, previamente a la realización del experimento con el fin de que durante la realización del mismo el animal estuviese tranquilo.

A cuatro grupos de ratas se les administró por via i.p. 1 ml de Extracto I, reconstituido con agua desionizada, mientras que a un quinto grupo se le administró metamizol magnésico, fármaco de efecto analgésico conocido, según los siguientes grupos experimentales:

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Grupo control:	**tampón fosfato (n=6)**
Grupo I:	**25 mg/kg de extracto (n=6)**
Grupo II:	**100 mg/kg de extracto (n=6)**
Grupo III:	**400 mg/kg de extracto (n=6)**
Grupo IV:	**1600 mg/kg de extracto (n=6)**
Grupo V:	**30 mg/kg de Metamizol Magnésico (n=6)**
Grupo VI:	**60 mg/kg de Metamizol Magnésico (n=6)**

Se valoraron comparativamente con animales control a los 15, 30, 60 y 120 minutos tras la administración intraperitoneal.

La intensidad de la fuente de calor se colocó en el nivel 3.

El efecto analgésico del extracto se comparó con un fármaco de importante efecto analgésico, como es el metamizol magnésico. El metamizol magnésico es un derivado pirazolónico que posee una acción analgésica a tres niveles: periférico, medular y talámico, sin efectos opiáceos, ni inhibidores de las prostaglandinas. Asimismo desarrolla una acción antitérmica y antiinflamatoria. Por ser una sal magnésica posee un efecto positivo sobre el dolor provocado por espasmos de órganos huecos.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.5.3.-RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el estudio de la analgesia en la cola de la rata mediante analgesímetro de foco de calor quedan reflejados en las tablas 8 y 9 y en las figuras 8 y 9, donde se muestra el tiempo de latencia a los 15, 30, 60 y 120 min tras la administración de diferentes dosis de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. y de metamizol magnésico.

Tabla 8

Influencia sobre la sensación dolorosa inducida mediante estímulo calorífico en la cola de rata, de diferentes dosis de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw., medido con un analgesímetro (tail-flick).

Dosis (mg/kg)	n[a]	T_{15}[b]	T_{30}[c]	T_{60}[d]	T_{120}[e]
Control	6	5,42±0,34[f]	4,90±1,67	4,73±0,53	4,68±0,65
1600	6	8,47±2,05	6,83±2,09	5,97±2,34	4,93±0,70
400	6	7,57±2,44	6,75±2,30	5,52±1,37	5,30±1,05
100	6	7,38±1,05	5,98±1,27	5,67±3,16	4,87±0,62
25	6	5,78±2,13	5,30±1,42	4,82±1,22	4,83±1,60

[a] número de experimentos realizados

[b, c, d, e] tiempo de latencia en segundos, a los 15, 30, 60 y 120 min tras la administración IP del extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw.*

[f] media ± desviación estándar

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 9

Influencia sobre la sensación dolorosa inducida mediante estímulo calorífico en la cola de rata de diferentes dosis de metamizol magnésico, medido con un analgesímetro (tail-flick).

Dosis (mg/kg)	n[a]	T_{15}[b]	T_{30}[c]	T_{60}[d]	T_{120}[e]
Control	6	5,42±0,34[f]	4,90±1,67	4,73±0,53	4,68±0,65
30	6	8,48±1,15	6,85±1,27	5,12±1,23	4,62±0,92
60	6	7,62±2,13	8,43±1,60	8,70±1,08	11,65±0,75

[a] número de experimentos realizados
[b, c, d, e] tiempo de latencia en segundos, a los 15, 30, 60 y 120 min de la administración IP del metamizol magnésico.
[f] media ± desviación estándar

En la tabla 8 puede observarse como para las dosis de 100, 400 y 1600 mg/kg a los 15 y 30 minutos de haber administrado el extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw. por via intraperitoneal, se produce un efecto analgésico, reflejado en un incremento sobre los valores control de la permanencia de la cola del animal bajo el foco calorífico del analgesímetro.

En la tabla 9 se observa con la dosis de 30 mg/kg de metamizol magnésico un efecto analgésico de corta duración, similar al efecto analgésico provocado tras la administración de 400 mg/kg del EAOD, perdiéndose este efecto analgésico al cabo de 2 horas. Con la dosis superior del metamizol magnésico (60 mg/kg) el efecto analgésico a las dos horas de la administración es superior en intensidad al provocado tras la administración de la dosis mas

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

alta del EAOD, así como también en duración.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

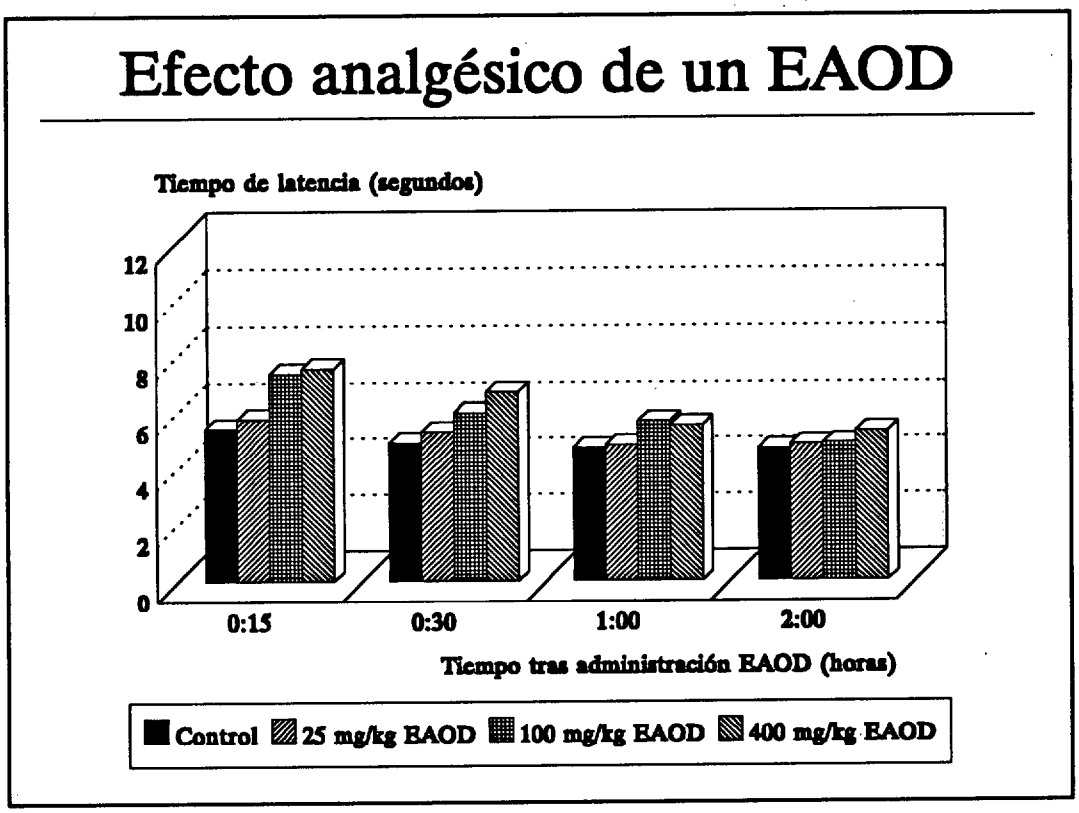

Figura 8: Influencia de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre la sensación dolorosa inducida mediante foco calorífico (tail-flick) en ratas. Cada barra representa la $\bar{x}$ para $n \geq 6$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

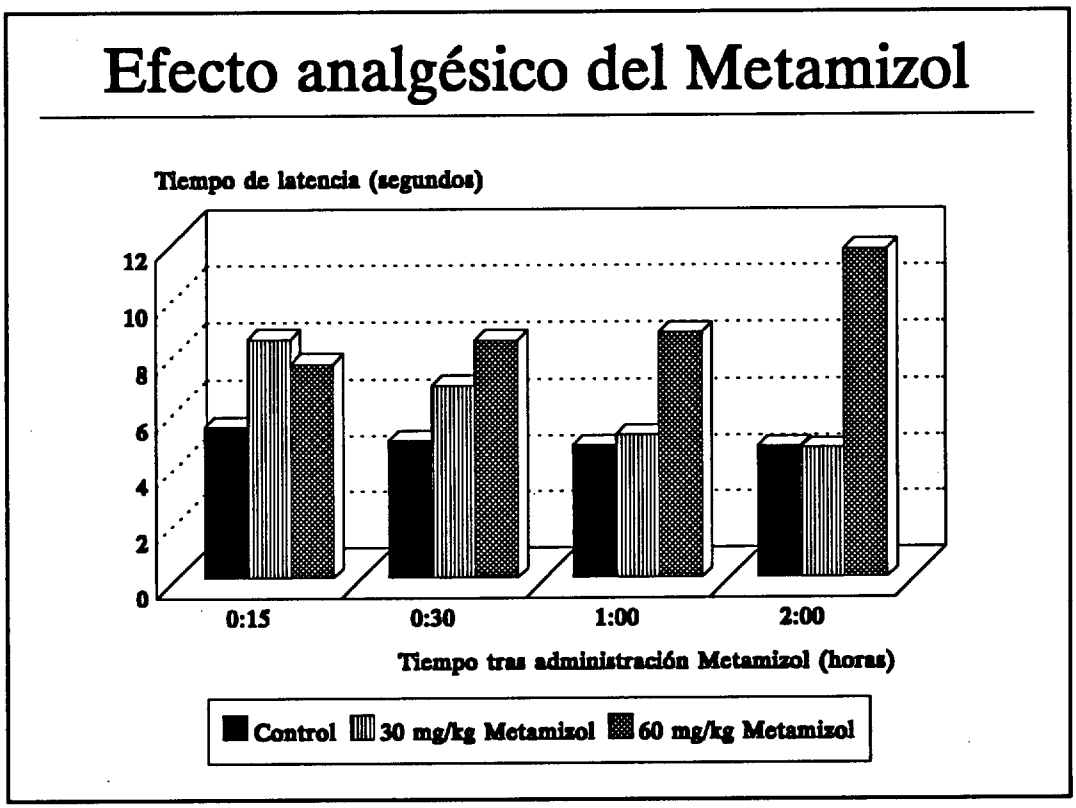

Figura 9: Influencia de diferentes dosis de metamizol magnésico sobre la sensación dolorosa inducida mediante foco calorífico (tail-flick) en ratas. Cada barra representa la $\bar{x}$ para $n \geq 6$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.6.-*ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA*

3.6.1.-INTRODUCCION

Han sido muchos los autores (Cao *et al.*, 1992; Murayama *et al.*, 1991; Lanhers *et al.*, 1991) que han estudiado el efecto antiinflamatorio de diferentes extractos de plantas, intentando comprobar lo que en este sentido refiere la cultura popular. En muchos de los casos las características estructurales de los componentes activos de estos extractos, suelen tener similitud con muchos fármacos de efecto analgésico reconocido. Algunos de los estudios más frecuentes que se suelen realizar para determinar la actividad antiinflamatoria de un producto farmacológico son el test del edema inducido por carragenina, estudio de la permeabilidad vascular inducido por ácido acético y estudio del granuloma inducido por algodón.

Para el estudio del efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw., el agente flogístico elegido fue la carragenina, un mucopolisacárido derivado de un musgo del Mar de Irlanda (*Chondrus*). La respuesta inflamatoria a esta sustancia depende enteramente de estímulos locales (Gardner, 1960), se desconoce que tenga efectos antigénicos, no existen efectos sistémicos y tiene un alto grado de reproducibilidad.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

El edema inducido por la inyección subplantar de carragenina es bifásico. En la primera fase el edema está inducido por la liberación de serotonina e histamina, mientras que el edema de la fase tardía está mediado por las prostaglandinas; la continuidad entre las dos fases está mediada por las cininas. Este proceder ha sido ampliamente aceptado como un método para la investigación prospectiva de agentes antiinflamatorios.

3.6.2.-MATERIAL Y METODO

30 ratas macho de raza Sprague-Dawley variedad albina norvegicus suministrados por Iffa Credo y posteriormente adaptados y criados en el bioterio de la facultad de Medicina, con un peso comprendido entre 160-200 g, fueron mantenidas con agua y alimento "ad libitum". El efecto del extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre la inflamación provocada por la carragenina fue comparado con el efecto antiinflamatorio producido tras la administración de 100 mg/kg de fenilbutazona (Sen *et al.*, 1991).

Las drogas fueron administradas mediante inyección intraperitoneal. Quince minutos antes de la administración intraperitoneal de las diferentes dosis del extracto y de la fenilbutazona, 0.1 ml de una solución de carragenina (Sigma) en solución fisiológica fue inyectada en el tejido subplantar de la pata trasera derecha, mientras que 0.1 ml de solución salina fue inyectada en la pata trasera izquierda. Debido a la hidratación uniforme

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

de las ratas, la variabilidad de la respuesta edematosa en la pata fue minimizada.

La fenilbutazona y las diferentes dosis del extracto fueron administradas por vía IP en un volumen de 0.5 ml, según los siguientes grupos experimentales:

Grupo control:	0,5 ml de tampón fosfato IP (n=6)
Grupo I:	25 mg/kg de extracto IP (n=6)
Grupo II:	100 mg/kg de extracto IP (n=6)
Grupo III:	400 mg/kg de extracto IP (n=6)

La carragenina fue preparada como suspensión al 1% en NaCl al 0.9% (1000 μg/100 μl). Un volumen de 0.1 ml fue inyectado a través de una aguja dentro del tejido plantar de la pata trasera derecha. El incremento de diámetro en porcentaje fue medido a las 1/2, 1, 2 y 3 horas tras la administración del agente flogístico.

Se realizaron mediciones dorso-ventrales de la pata trasera del animal en la que se iba a inyectar la carragenina, antes y después de la inyección, mediante un calibrador micrométrico, considerándose como control al diámetro de la pata contralateral (Murayama *et al.*, 1991).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.6.3.-RESULTADOS

Los resultados del estudio del efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. se muestran en la tabla 10 y en la figura 10, donde se observa cómo la fenilbutazona presenta un efecto antiinflamatorio similar al relatado por otros autores (Sent *et al.*, 1991), mientras que el extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sólo presenta un efecto antiinflamatorio significativo para la dosis más alta y únicamente para los primeros períodos de tiempo estudiados.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 10

Efecto de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre el edema en la pata de rata inducido por carragenina al 1%

		% de incremento del diámetro de la pata			
Substancia	Dosis (mg/kg)	0.5 h[a]	1 h[b]	2 h[c]	3 h[d]
Control		35,4±2,4[e]	37,3±2,6	42,5±2,0	48,0±4,1
Fenilbutazona	100	35,1±1,8	30,1±3,6	28,2±1,8	25,2±3,0
E.A.O.D.	25	35,7±2,5	37,4±2,8	42,3±3,5	48,3±3,1
E.A.O.D.	100	35,7±3,8	36,1±2,1	42,3±2,9	48,8±3,5
E.A.O.D.	400	36,8±2,8	32,0±2,2	38,4±1,8	47,3±2,7

[a,b,c,d] tiempo transcurrido (en horas) desde la administración del agente flogístico hasta la medición.
[e] media ± desviación

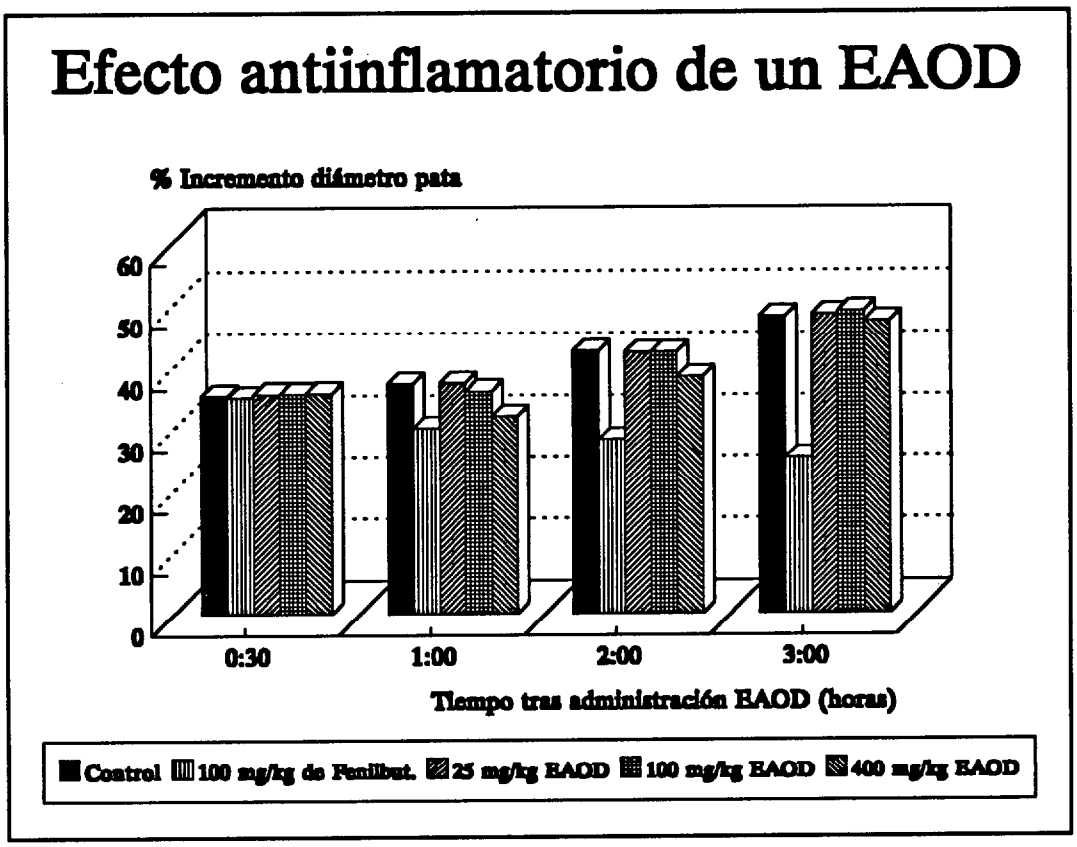

Figura 10: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre la inflamación provocada por la carragenina inyectada en la pata de la rata, comparándolo con la fenilbutazona. Cada barra representa la $\bar{x}$ para $n \geq 6$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.7.-*ESTUDIO DE LA COORDINACION MOTORA*

3.7.1.-INTRODUCCION

Las influencias del extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre la coordinación motora, el tono muscular y la función de prensa de los animales fue realizado mediante un Rota-Rod LI 8500. El Rota-Rod está basado en un tambor rotatorio controlado mediante un potente motor. La velocidad de giro es controlable linealmente. Bajo cada uno de los discos separadores existe una plataforma basculante que se desplaza al caer el animal desde el tambor, desactiva el temporizador, y permite establecer el tiempo de permanencia (latencia) de cada animal sobre el cilindro.

Hay diversas modalidades de trabajo en lo que se refiere al momento en que los animales deben ser colocados sobre el tambor. Es posible ponerlos con el aparato detenido, con el aparato en marcha a su velocidad mínima o bien con el aparato en marcha a la velocidad de test seleccionada. Para realizar este experimento se ha elegido la primera modalidad, es decir, poner los animales con el aparato detenido a la velocidad de test seleccionada.

3.7.2.-MATERIAL Y METODO

Para la realización del estudio los animales fueron adiestrados durante

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

dos días consecutivos manteniéndose sobre el tambor un tiempo determinado en cuatro sesiones diarias, seleccionando los animales según su tiempo de latencia. El tiempo de latencia establecido fue de 5 minutos, desechando aquellos animales que no conseguían superarlo, realizando el aprendizaje a 12 rpm.

El día del experimento los animales realizaron la última sesión de adiestramiento 3 horas antes de la administración del extracto.

El estudio se realizó a una velocidad superior a la que estaban habituados los animales, a una velocidad de giro de 20 rpm para aumentar la sensibilidad del test, y se contabilizó el tiempo de latencia. Para observar el efecto del extracto en relación con el tiempo, el estudio se hizo a los 15, 30 y 60 minutos tras la administración de 1 ml del extracto por via intraperitoneal.

Se utilizaron 40 ratones machos (Albino-Swiss OF 1) suministrados por Iffa Credo y posteriormente adaptados y criados en el bioterio de la facultad de Medicina, con un peso comprendido entre 35 y 40 g, de los que se seleccionaron 24 según el tiempo de latencia en el Rota-Rod.

Se utilizaron 3 dosis del Extracto Acuoso Bruto de Opuntia dillenii Haw. según los siguientes grupos experimentales:

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

* grupo control: 0.5 ml de tampón fosfato a pH 7 (n=6)

* grupo I: 1600 mg/kg de extracto (n=6)

* grupo II: 400 mg/kg de extracto (n=6)

* grupo III: 100 mg/kg de extracto (n=6)

El extracto fue reconstituido con tampón fosfato a pH 7, administrándose un volumen de 0.5 ml por via i.p.

3.7.3.-RESULTADOS

Los resultados obtenidos al estudiar la coordinación de ratones sobre un Rota-Rod tras la administración IP de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. a las dosis de 1600, 400 y 100 mg/kg se refleja en la tabla 11 y figura 11, donde se anota el tiempo que el ratón tarda en caer de un rotor que gira con aceleración constante, partiendo de una velocidad de 20 rpm, y que cada minuto la velocidad aumenta en 7,2 rpm. El experimento se realizó a los 15, 30, 60 y 120 tras la administración IP del extracto.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 11

Efecto de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre la coordinación motora del ratón estudiado mediante un Rota-Rod

Dosis (mg/kg)	n[a]	15 min[b]	30 min[c]	60 min[d]	120 min[e]
Control	6	56,0±23,9[f]	65,7±27,3	69,5±23,0	68,0±27,8
1600	6	20,5±11,0	40,2±9,4	59,7±26,1	67,5±74,2
400	6	66,2±12,7	67,5±27,4	56,7±27,8	53,5±20,4
100	6	132,8±49,7	155,4±41,4	150,2±54,6	138,8±42,7

[a] número de experimentos realizados

[b, c, d, e] tiempo de permanencia sobre el rotor a los 15, 30, 60 y 120 min tras la administración del extracto acuosos de Opuntia dillenii Haw.

[f] media ± desviación estándar

En la tabla 11 se observa que con la dosis de 1600 mg/kg aparece una disminución importante del tiempo de permanencia del ratón sobre el rotor, mientras que con la dosis de 100 mg/kg se observa un importante incremento del tiempo de permanencia sobre el rotor.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

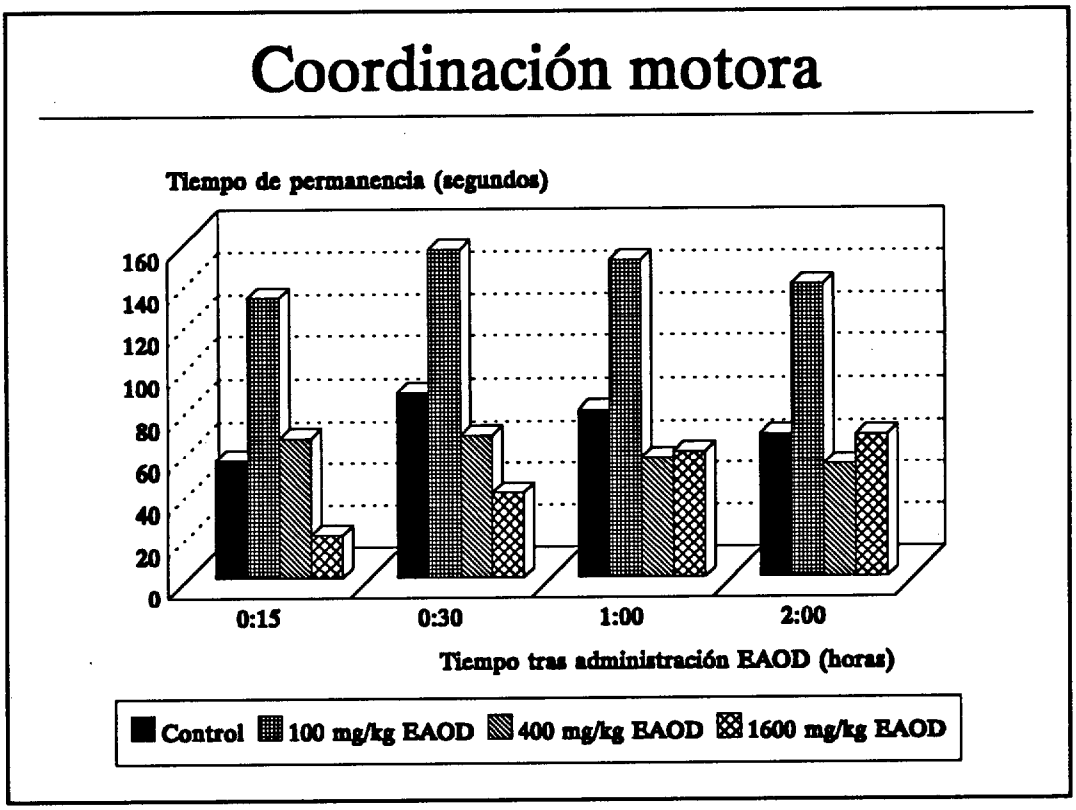

Figura 11: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre la coordinación motora del ratón sobre un Rota-rod. Cada barra representa la $\bar{x}$ para $n \geq 6$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.8.-*ESTUDIO DEL TRANSITO INTESTINAL*

3.8.1.-INTRODUCCION

Cuando se realiza el estudio farmacológico de un extracto vegetal, suele ser frecuente la aparición de efectos a nivel de la motilidad gastrointestinal, ya sea aumentándola o disminuyéndola (Lutterodt, 1992; Poli *et al.*, 1992; Aguwa, 1986).

Nosotros ya conocíamos a través de la tradición popular la existencia de casos de obstrucciones intestinales desencadenadas por la ingesta de frutos de Opuntia dillenii Haw., por lo que realizamos el estudio *in vivo* del tránsito intestinal en ratones .

3.8.2.-MATERIAL Y METODO

El estudio consiste en objetivar la variación del tránsito intestinal de una suspensión de carbón vegetal cuando se administran diversas dosis del extracto acuoso I de Opuntia dillenii Haw., así como de sulfato de atropina, ambas sustancias administradas por via IP, según el método descrito por Aguwa (1986).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Para la realización del presente estudio se utilizaron 36 ratones albinos de ambos sexos (Albino-Swiss OF1), suministrados por Iffa Credo y posteriormente adaptados y criados en el bioterio de la facultad de Medicina, con un peso comprendido entre 30-35 g, que fueron aleatoriamente divididos en 6 grupos iguales. Todos los animales fueron enjaulados durante 24 horas permitiéndoseles el libre acceso al agua. A los animales se les administraron diferentes dosis del extracto y de un anticolinérgico conocido (sulfato de atropina), según los grupos experimentales siguientes:

Grupo control:	0,5 ml de tampón fosfato IP (n=6)
Grupo I:	25 mg/kg de extracto IP (n=6)
Grupo II:	100 mg/kg de extracto IP (n=6)
Grupo III:	400 mg/kg de extracto IP (n=6)
Grupo IV:	1600 mg/kg de extracto IP (n=6)
Grupo V:	10 mg/kg de sulfato de atropina SC (n=6)

A los 15 min se les administró a todos los grupos de ratones 0.5 ml de una suspensión de carbón vegetal al 5% V/V en una suspensión de goma tragacanto por via oral. Dicha suspensión fue preparada de acuerdo con la siguiente fórmula:

-Carbón vegetal: 5 mg

-Goma tragacanto: 5 gr

-Agua destilada: 100 ml

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Una vez transcurridos 20 min tras la administración de la suspensión de carbón vegetal, los animales fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital (130 mg/kg IP).

Posteriormente el abdomen fue abierto en la línea media, se localizó y ligó el píloro y se fue extrayendo el intestino sin producir tracciones, al tiempo que era separado de los mesos lo mas cerca del intestino posible, sin poner el intestino en posición vertical. Se localizó, ligó y cortó en la unión ileocecal y se extendió sobre una superficie blanca para su posterior medición. Se midió la longitud del recorrido de la suspensión de carbón vegetal desde el píloro hacia la unión ileocecal, expresando esta medida como porcentaje de la longitud total del intestino delgado, según la siguiente fórmula:

$$\%recorrido = \frac{l \times 100}{L}$$

l= Longitud recorrida por la suspensión de carbón vegetal

L= Longitud total del intestino

3.8.3.-RESULTADOS

Los resultados del estudio de la motilidad intestinal se pueden observar en la tabla 12, donde se refleja la longitud total del intestino, la longitud de intestino recorrida por la suspensión de carbón vegetal y el porcentaje recorrido en relación a la distancia total del intestino delgado. En la figura

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

12 se refleja el porcentaje de intestino recorrido en función de la dosis administrada del extracto acuoso I de Opuntia dillenii Haw. comparándola con el efecto que provoca una dosis de atropina de 10 mg/kg de peso en el tránsito intestinal. El experimento se realizó con una suspensión de carbón vegetal administrado por via oral, administrándose previamente 1 ml IP de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. a las dosis de 1600, 400, 100 y 25 mg/kg.

En la tabla 12 se observa un importante descenso del porcentaje de recorrido para la suspensión de carbón vegetal, incluso para la dosis más pequeña utilizada de 25 mg/kg, siendo máxima esta disminución del recorrido para la mayor dosis utilizada (1600 mg/kg) Para la dosis administrada de atropina, la reducción del tránsito intestinal es similar a la objetivada tras la administración de una dosis que oscila entre 400 y 100 mg/kg, del extracto acuoso de frutos de *Opuntia dillenii Haw.*

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 12

Efecto de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre el tránsito intestinal con carbón activo en la rata.

Droga	Dosis (mg/kg)	n[a]	$Long_{total}$[b]	$long_{trans}$[c]	Porcentaje[d]
Tampón fosfato	40 ml/kg	6	70,7±2,5[e]	46,2±2,5	65,3±1,2
Sulfato de Atropina	10	6	72,3±3,2	13,9±1,9	19,3±2,1
EAOD I	1600	6	62,8±1,9	6,5±4,5	10,5±7,3
EAOD I	400	6	69,5±4,2	9,1±2,8	13,0±3,3
EAOD I	100	6	68,7±2,6	17,6±9,4	26,1±9,7
EAOD I	25	6	76,7±4,7	38,2±6,4	49,7±6,0

[a] número de experimentos realizados
[b] longitud total del intestino delgado de la rata (desde el píloro hasta la válvula ileocecal)
[c] longitud recorrida por el carbón activo 20 min tras su administración mediante cánula intragástrica
[d] porcentaje de intestino delgado recorrido por el carbón activo
[e] media ± desviación estándar

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

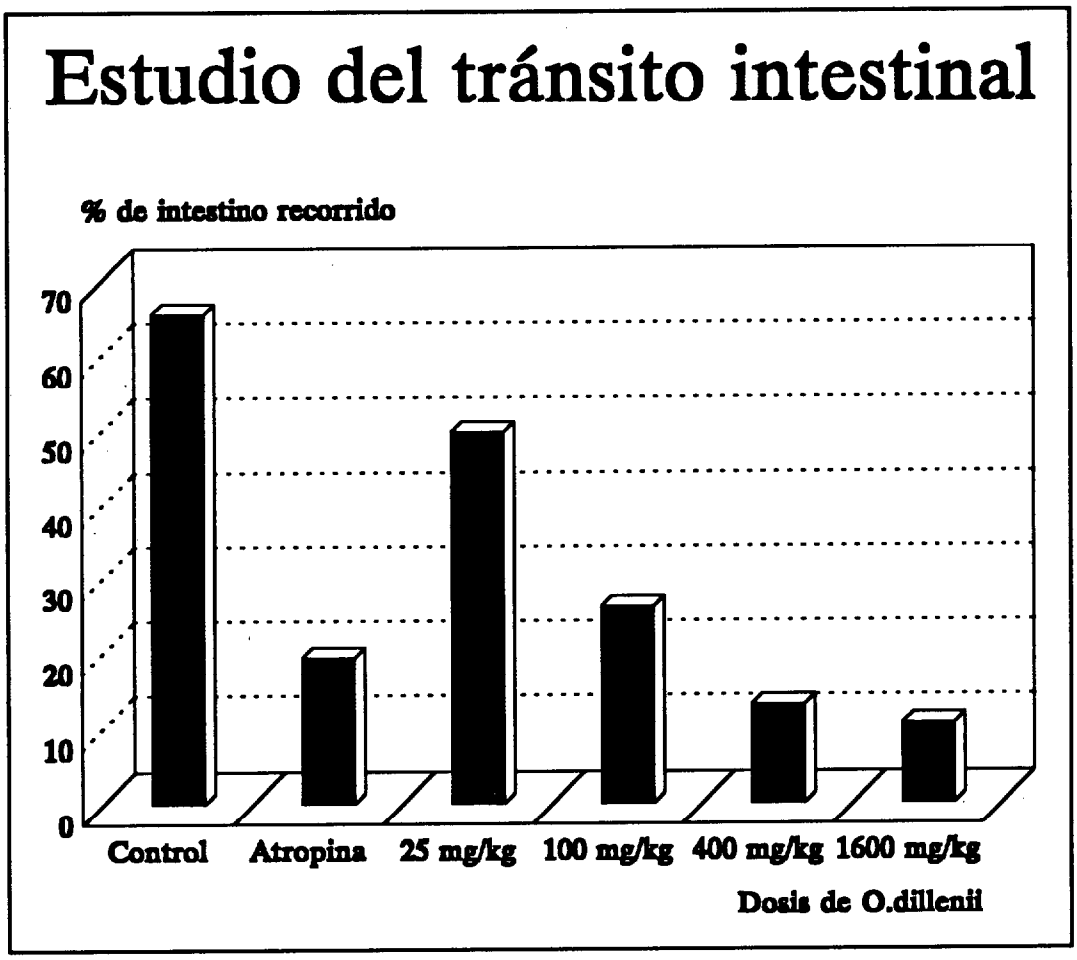

Figura 12: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre el tránsito intestinal, estudiado con carbón vegetal administrado por via oral en la rata. Cada barra representa la $\bar{x}$ para $n \geq 6$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.9.-*ESTUDIO BIOQUIMICO*

3.9.1.-INTRODUCCION

Siempre que se vaya a realizar un estudio farmacológico de un producto farmacológico es importante conocer en que forma se altera el equilibrio existente en el organismo de los parámetros bioquímicos sanguíneos, ya que estas alteraciones pueden producir descompensaciones funcionales y orgánicas en los diferentes sistemas y aparatos del organismo.

3.9.2.-MATERIAL Y METODO

Se realizó un estudio bioquímico de la sangre de ratas de raza Sprague-Dawley variedad albina norvegicus suministrados por Iffa Credo y posteriormente adaptados y criados en el bioterio de la Facultad de Medicina (Iffa Credo) de peso comprendido entre 160-195 g, a las que se administró diferentes dosis del extracto acuoso, según los siguientes grupos experimentales:

Grupo control: 0,5 ml de tampón fosfato IP (n=6)

Grupo I: 25 mg/kg de extracto acuoso IP (n=6)

Grupo II: 100 mg/kg de extracto acuoso IP (n=6)

Grupo III: 400 mg/kg de extracto acuoso IP (n=6)

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

30 minutos tras la administración de las diferentes dosis del EAOD, las ratas fueron anestesiadas con éter, y posteriormente se les extrajo unos 2 ml de sangre mediante punción cardíaca. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 3.000 rpm durante 5 min y se enviaron a analizar al laboratorio de urgencias del Hospital Insular. Los parámetros estudiados fueron los siguientes:

Glucosa

Urea

Creatinina

BUN/Creatinina

Proteínas totales

Albúmina

GOT

GPT

Triglicéridos

Colesterol

Ac. úrico

Al mismo tiempo se realizó un estudio de los principales electrolitos:

Cloro

Sodio

Potasio

Calcio

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Magnesio

3.9.3.-RESULTADOS

Los resultados del estudio bioquímico realizado en sangre arterial de rata, tras la administración IP de 1 ml de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. a las dosis de 25, 100 y 400 mg/kg, queda reflejada en las tablas 13, 14, 15 y 16 y en las figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 13

Efecto de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre diferentes variables bioquímicas en sangre arterial de rata.

	Control	25 mg/kg	100 mg/kg	400 mg/kg
Cloro	113,0±2,4[a]	113,0±1,0	117,0±2,6	120,0±2,3
Sodio	141,1±1,8	144,4±0,5	146,7±2,4	149,1±2,2
Potasio	4,6±0,9	4,2±0,1	3,7±0,5	3,8±0,1

[a] media ± desviación estándar
Los valores de la tabla se expresan en mMol/L

Tabla 14

Efecto de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre diferentes variables bioquímicas en sangre arterial de rata.

	Control	25 mg/kg	100 mg/kg	400 mg/kg
Calcio	11,5±0,1[a]	11,1±0,5	11,1±0,3	11,1±0,2
Magnesio	3,3±0,3	2,7±0,8	3,0±0,1	2,8±0,1
Urea	22,9±1,6	19,0±1,8	23,5±6,0	28,2±5,1
Creatinina	0,3±0,0	0,4±0,0	0,5±0,0	0,4±0,0
BUN	32,9±5,8	21,9±4,3	21,9±6,5	29,1±4,7
Ac. Urico	0,8±0,3	0,9±0,2	0,7±0,1	0,6±0,0
Triglicéridos	69,2±9,6	70,2±10,6	67,0±15,7	67,4±5,0
Colesterol	77,8±3,6	86,2±11,0	79,2±10,6	78,2±4,4
Glucosa	121,0±15,9	128,4±4,2	137,0±11,7	127,8±5,9

[a] media ± desviación estándar
Los valores de la tabla se expresan en mg/dL

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 15

Efecto de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre las variables bioquímicas en sangre arterial de rata.

	Control	25 mg/kg	100 mg/kg	400 mg/kg
Proteínas tot.	5,8±0,3[a]	5,8±0,2	5,7±0,2	5,9±0,2
Albúmina	3,3±0,1	3,5±0,2	3,6±0,3	3,6±0,2

[a] media ± desviación estándar
Los valores de la tabla se expresan en g/dL

Tabla 16

Efecto de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre diferentes variables bioquímicas en sangre arterial de rata.

	Control	25 mg/kg	100 mg/kg	400 mg/kg
GOT	208,0±26,4[a]	218,6±24,0	207,7±35,8	154,2±27,1
GPT	79,0±8,3	76,6±5,5	65,8±3,1	72,2±7,9

[a] media ± desviación estándar

Los valores de la tabla se expresan en U/L

De los resultados de las tablas 13, 14, 15 y 16, cabe resaltar la inexistencia de alteraciones metabólicas importantes. Fundamentalmente y para las dosis mas altas del extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw., se aprecia un ligero incremento de los niveles de cloro y sodio y un ligero descenso de los niveles de potasio. Los niveles de urea y creatinina también aumentan ligeramente, mientras que el ácido úrico parece descender. De las transaminasas la que más desciende es la GOT, principalmente para la dosis de 400 mg/kg.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

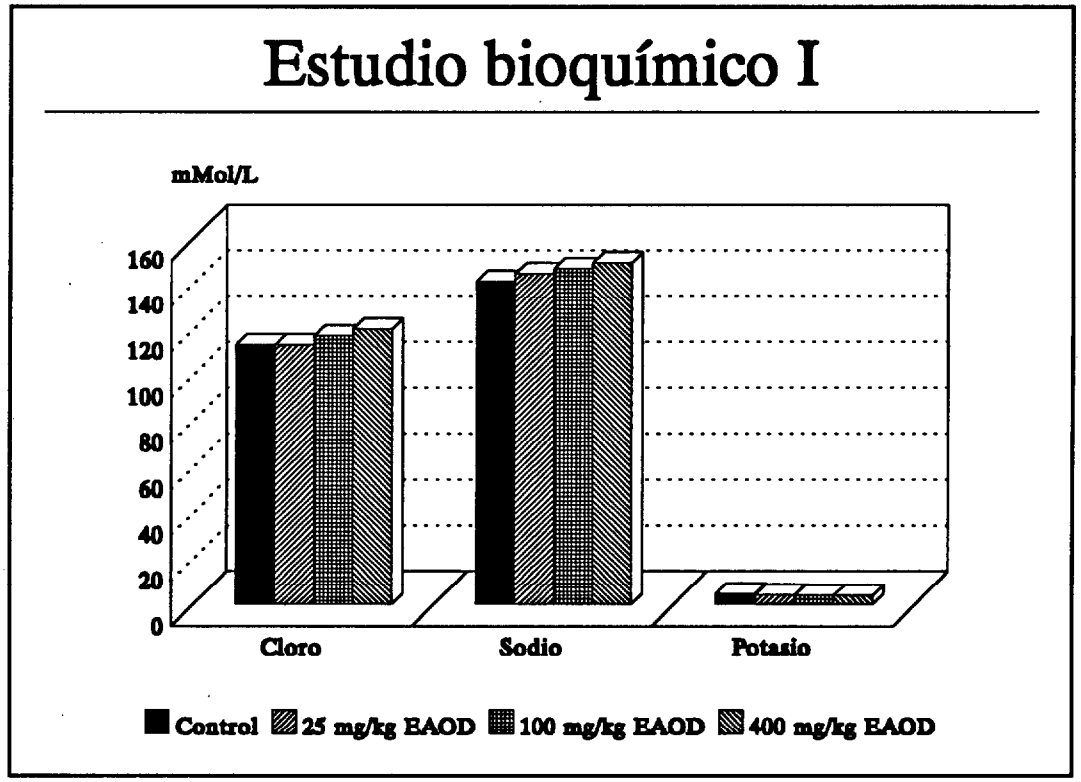

Figura 13: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre los niveles séricos de sodio, cloro y potasio en la rata. Cada barra representa la $\bar{x}$ para $n \geq 6$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

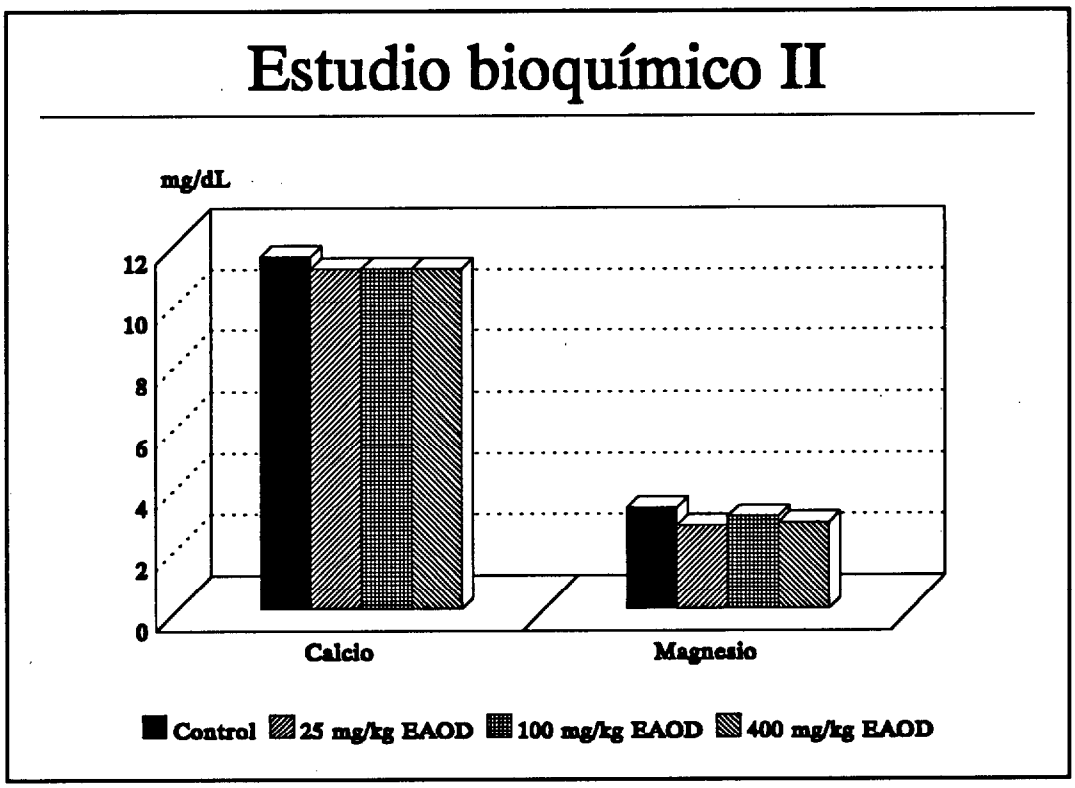

Figura 14: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre los niveles séricos de calcio y magnesio en la rata. Cada barra representa la $\bar{x}$ para $n \geq 6$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

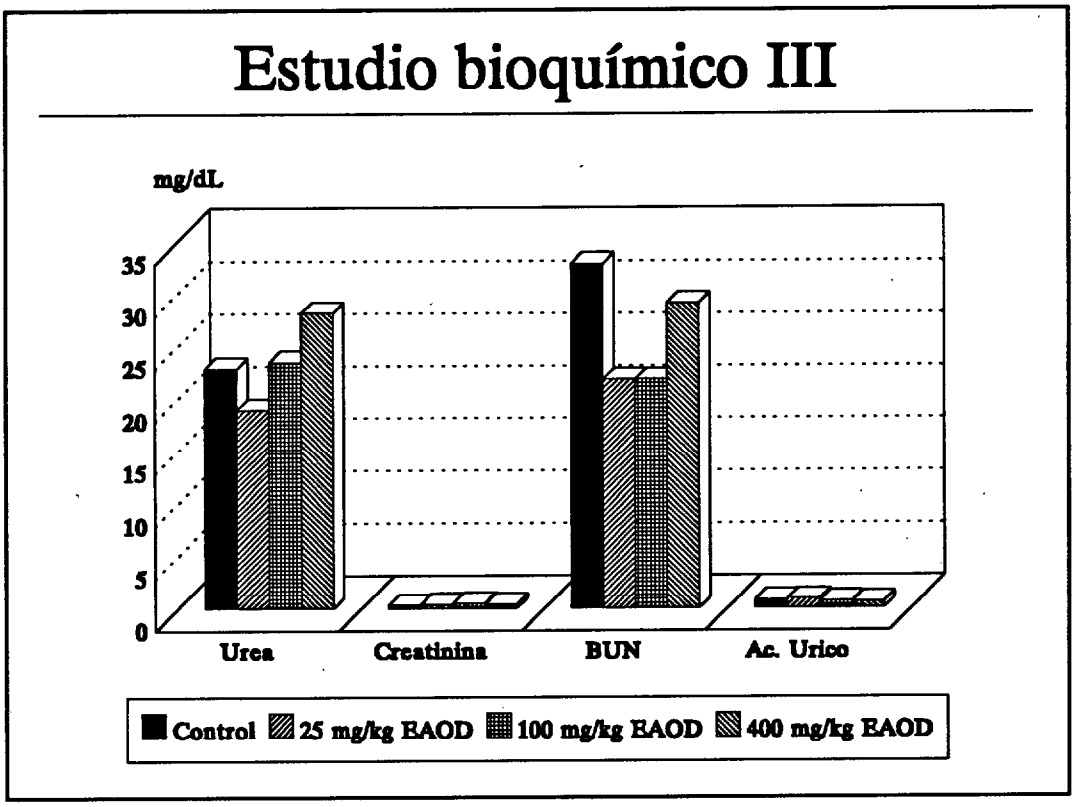

Figura 15: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre los niveles séricos de urea, creatinina, ácido úrico y BUN en la rata. Cada barra representa la $\bar{x}$ para $n \geq 6$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

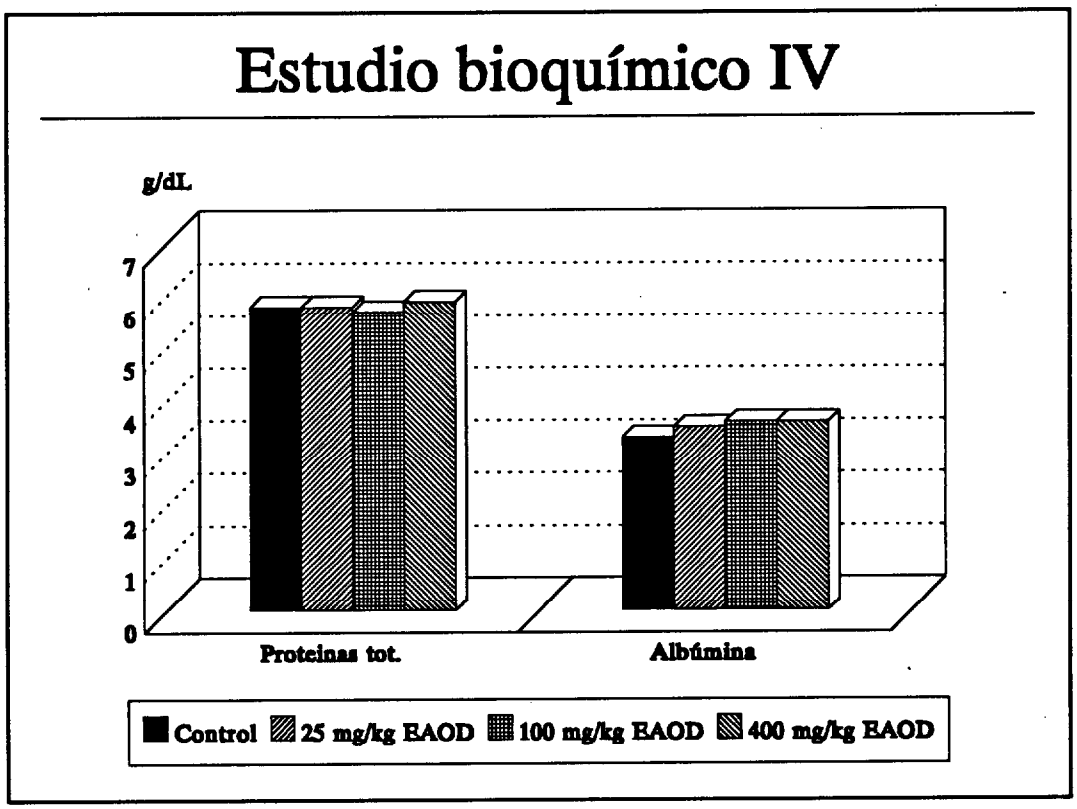

Figura 16: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre los niveles séricos de proteinas totales y albúmina en la rata. Cada barra representa la $\bar{x}$ para $n \geq 6$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

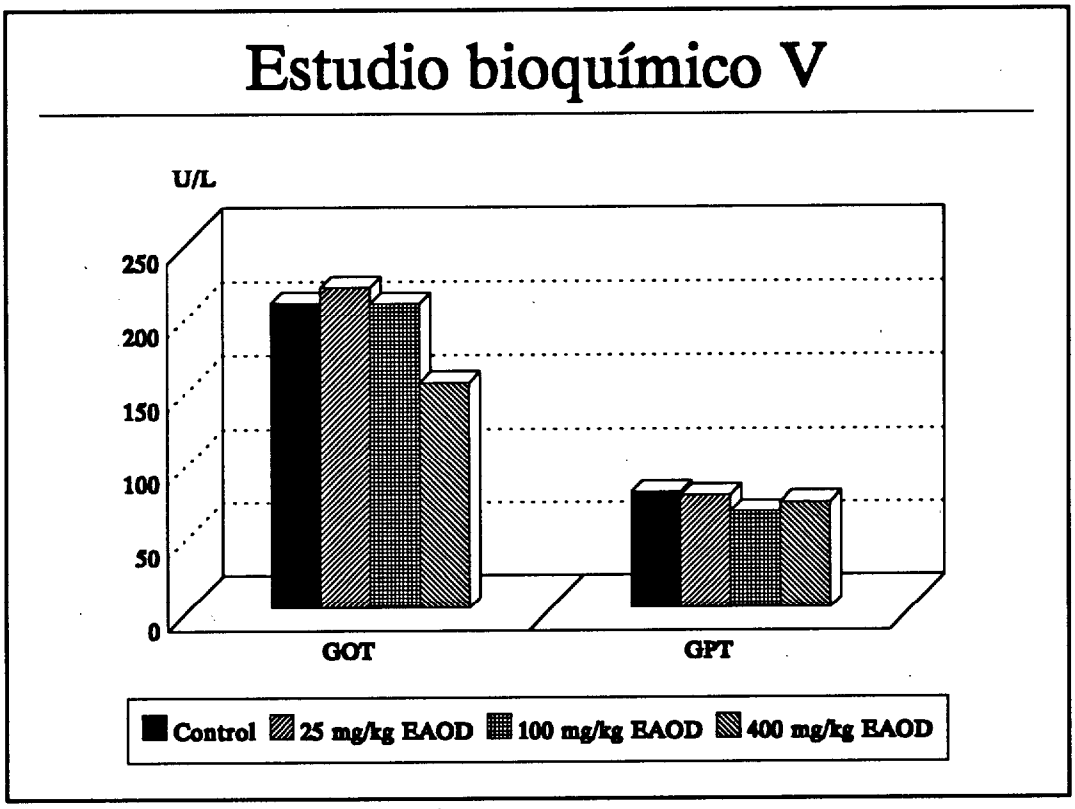

Figura 17: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre los niveles séricos de GOT Y GPT en la rata. Cada barra representa la $\bar{x}$ para $n \geq 6$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

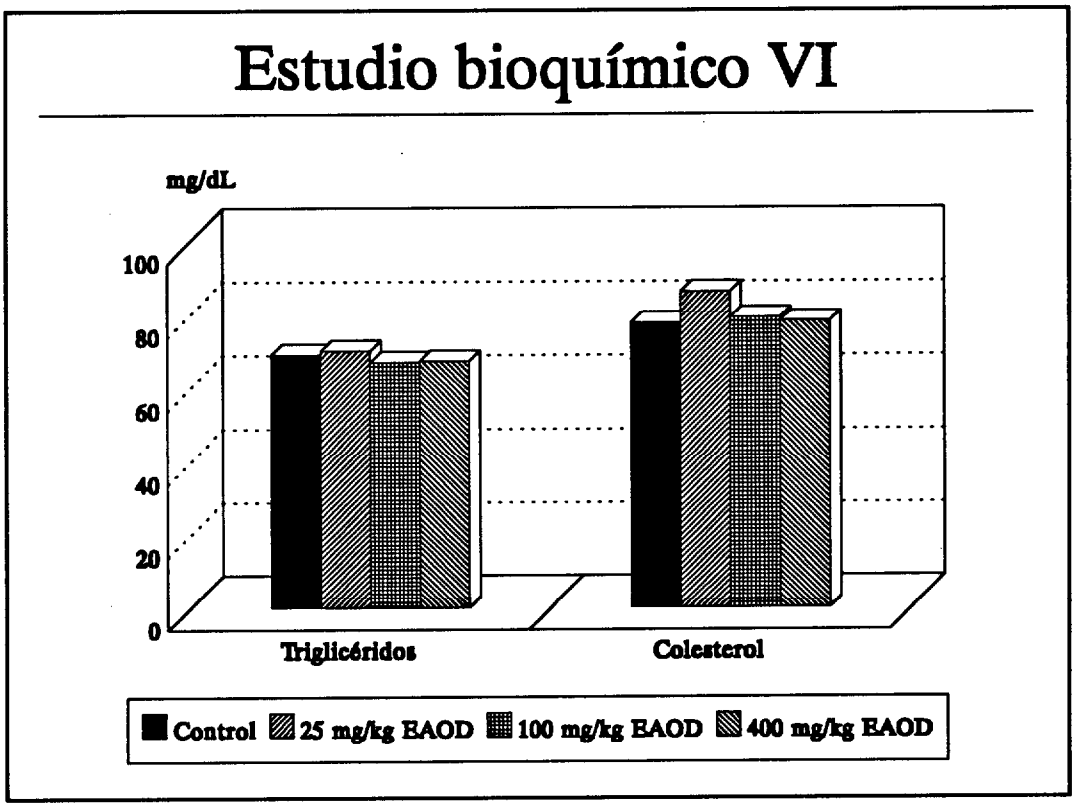

Figura 18: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre los niveles séricos de triglicéridos y colesterol en la rata. Cada barra representa la $\bar{x}$ para $n \geq 6$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

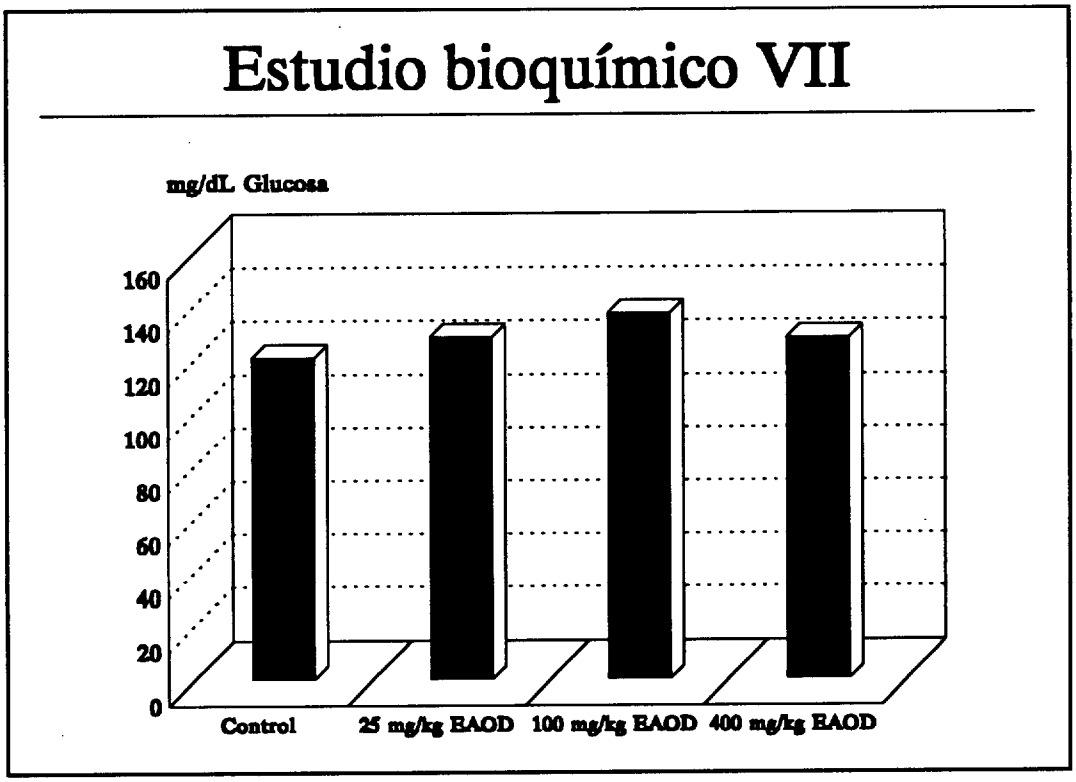

Figura 19: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre los niveles séricos de glucosa en la rata. Cada barra representa la $\bar{x}$ para n=6.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.10.-*ESTUDIO HIPOGLUCEMICO*

3.10.1.-INTRODUCCION

Los frutos de *Opuntia dillenii Haw.* tienen la reputación popular en las Islas Canarias de ser un agente hipoglucemiante. Es por lo que consideramos interesante el investigar la existencia de bases científicas para la utilización de los frutos de Opuntia dillenii Haw. como droga hipoglucemiante.

Varios autores (Roman-Ramos *et al.*, 1991; Frati-Munari *et al.*, 1989) han estudiado el efecto hipoglucemiante de diferentes plantas (*Opuntia streptacantha Lemaire, Psacalium peltatum, Curcubita ficifolia*) así como la duración de la acción hipoglucemiante de las mismas, comparando su efecto con la tolbutamida, fármaco de acción hipoglucemiante conocida, perteneciente al grupo de las sulfonilureas, que aumentan la secreción de insulina a nivel de las células β de los islotes pancreáticos.

3.10.2.-MATERIAL Y METODO

El estudio fue realizado en 20 conejos machos procedentes del bioterio de la Facultad de Medicina de peso comprendido entre 2-2.5 kg. Los animales se sometieron a 18 horas de ayuno, permitiéndoseles el libre acceso al agua.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Se tomaron muestras de sangre venosa durante 2 horas cada 30 min, para la determinación de glucosa sérica mediante un aparato Kodak Ektachem 700XR Analyzers. Las muestras empezaron a obtenerse 30 min después de la administración de diferentes dosis del extracto acuoso, según los siguientes grupos experimentales:

Grupo control: 0,5 ml de tampón fosfato IP (n=6)

Grupo I: 25 mg/kg de extracto acuoso IP (n=6)

Grupo II: 100 mg/kg de extracto acuoso IP (n=6)

Grupo III: 400 mg/kg de extracto acuoso IP (n=6)

Grupo IV: 20 mg/kg de tolbutamida (n=6)

Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena marginal de la oreja mediante la utilización de un catéter heparinizado.

El efecto hipoglucemiante del extracto acuoso fue comparado con el de un fármaco de efecto hipoglucemiante conocido como es la tolbutamida (Sigma). La suspensión de tolbutamida fue preparada de acuerdo con la dosis máxima utilizada para el tratamiento en humanos de la *diabetes mellitus* no insulín-dependiente. Al igual que el extracto, la suspensión de tolbutamida fue administrada por via IP 30 min antes de terminar el período de ayuno.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.10.3.-RESULTADOS

En los resultados de la tabla 17, se demuestra la ya conocida acción hipoglucemiante de la tolbutamida, mientras que, aunque se objetiva un descenso de la glucemia tras la administración del extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw., este descenso no es significativo al compararlo con la glucemia obtenida tras la administración de tampón fosfato en los animales control.

Los experimentos fueron realizados en animales con glucemia normal a los que no se les había producido lesión pancreática con alloxan (sustancia muy utilizada en estudios experimentales de la *diabetes mellitus*, que destruye las células beta de los islotes de Langerhans y causa *diabetes mellitus* permanente), lo que no quiere decir que en animales que cursen con una hiperglucemia inducida no se objetive un descenso de la glucemia significativo. Asimismo el experimento fue realizado mediante la administración de una única dosis del extracto a concentraciones diferentes, lo que no implica que la administración crónica del extracto no posea efectos hipoglucemiantes significativos.

La tolbutamida presenta una reducción de la glucemia del 14%, similar a los resultados de trabajos de autores anteriores (Roman-Ramos *et al.*, 1991).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 17

Efecto de la administración única IP de diferentes dosis del extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* y de tolbutamida sobre la concentración plasmática de glucosa.

		Glucosa Plasmática (mg/dL)				
Grupo	Dosis (mg/kg)	+0 min	+30 min	+60 min	+90 min	+120 min
Control	-	114.4±5.3	124.6±6.6	131.2±7.8	125.2±4.0	117.0±4.6
EAOD	400	112.8±6.8	127.0±4.1	118.5±4.2	113.5±5.9	114.2±3.8
	100	113.7±3.2	125.6±4.3	126.3±5.0	120.3±4.1	117.2±5.3
	25	113.9±4.5	125.0±5.7	128.7±5.4	124.6±3.9	118.3±6.3
Tolbutamida	20	110.9±6.3	112.1±1.9	112.8±6.8	102.6±4.6	099.4±3.8

Cada valor representa la media ± desviación estándar

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

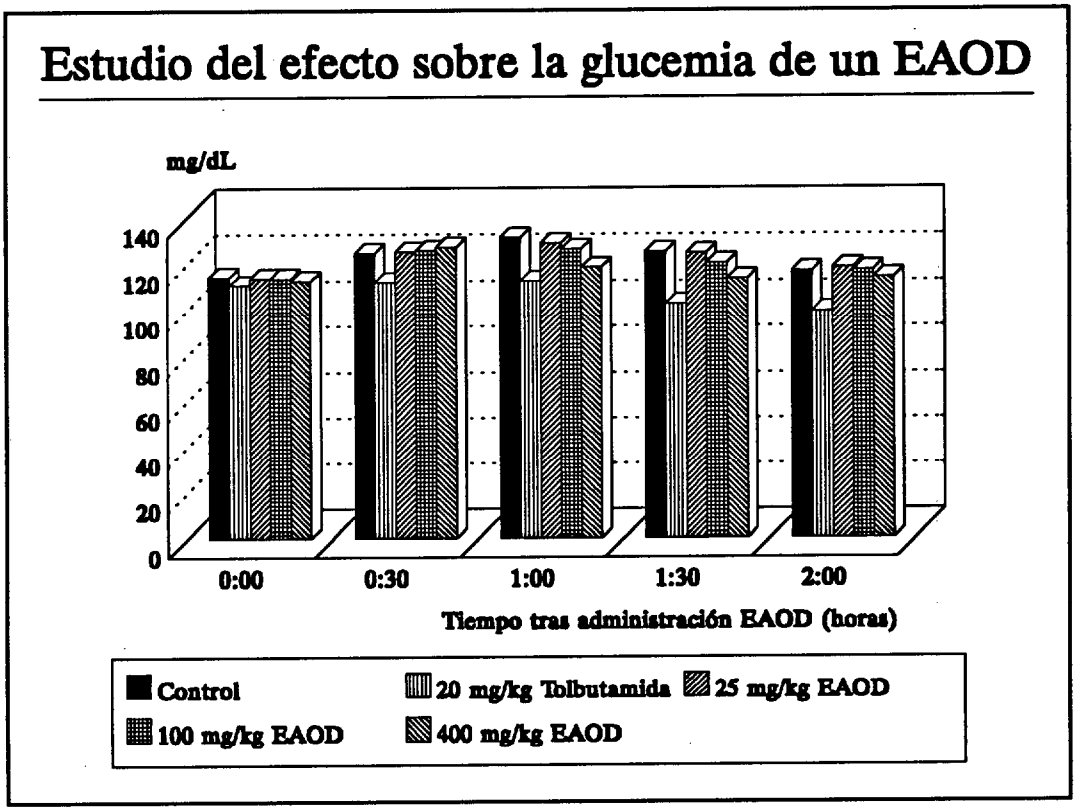

Figura 20: Influencia de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* y de la tolbutamida sobre los niveles de glucemia en conejos. Cada barra representa la $\bar{x}$ para $n \geq 4$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.11.-*ESTUDIO GASOMETRICO*

3.11.1.-INTRODUCCION

Una gran variedad de fármacos pueden producir alteraciones de los niveles gasométricos por diferentes mecanismos. Los que ejercen una depresión del SNC pueden provocar un descenso de la frecuencia respiratoria, induciendo un descenso de la pO_2 y un aumento de la pCO_2. Aquellos fármacos que posean un efecto analéptico provocarán un efecto totalmente inverso. Existen fármacos que ejercen su efecto directamente a nivel del músculo liso traqueobronquial, provocando broncodilatación o broncoconstricción, al mismo tiempo que se alteran también los niveles de O_2 y CO_2, así como los niveles de CO_3H^-. Otros fármacos pueden actuar impidiendo que el O_2 que se encuentra en los pulmones se una a la hemoglobina de la sangre y acceda a los tejidos del organismo.

3.11.2.-MATERIAL Y METODO

Se utilizaron 24 ratas de raza Sprague-Dawley variedad albina norvegicus suministrados por Iffa Credo y posteriormente adaptados y criados en el bioterio de la Facultad de Medicina, de peso comprendido entre 160-195 g, a las que se administró diferentes dosis del extracto acuoso, según los siguientes grupos experimentales:

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Grupo control: 0,5 ml de tampón fosfato IP (n=6)

Grupo I: 25 mg/kg de extracto acuoso IP (n=6)

Grupo II: 100 mg/kg de extracto acuoso IP (n=6)

Grupo III: 400 mg/kg de extracto acuoso IP (n=6)

30 minutos tras la administración de las diferentes dosis del EAOD, las ratas fueron anestesiadas con éter, y posteriormente se les extrajo unos 2 ml de sangre por punción cardíaca, mediante una jeringuilla, para realización de gasometría arterial (Quik A.B.G.). Las muestras de sangre fueron enviadas para analizar al laboratorio de urgencias del Hospital Insular. Los parámetros estudiados fueron los siguientes:

pH

PCO_2

pO_2

HCO_3s

tCO_2

EB(vt)

SAT O_2

3.11.3.-RESULTADOS

Los resultados obtenidos una vez realizado el estudio gasométrico para los distintos grupos experimentales se reflejan en las tablas 18, 19 y 20 y en

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

las figuras 21, 22 y 23.

Tabla 18

Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre el pH en la sangre arterial en rata.

	Control	400 mg/kg	100 mg/kg	25 mg/kg
pH	7,40±0,05[a]	7,34±0,07	7,36±0,04	7,41±0,03

[a] media ± desviación estándar

Tabla 19

Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre diversas variables en la gasometría de la sangre arterial en rata.

	Control	400 mg/kg	100 mg/kg	25 mg/kg
PCO_2	44,27±2,25	49,60±7,09	46,42±4,27	39,62±3,45
pO_2	82,85±1,72	66,67±7,21	64,30±5,08	76,48±5,18

[a] media ± desviación estándar
Los valores de la tabla se expresan en mm Hg

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 20

Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre diversas variables en la gasometría de la sangre arterial en rata.

	Control	400 mg/kg	100 mg/kg	25 mg/kg
HCO_3s	27,12±3,85	25,15±2,85	25,14±1,64	25,54±1,18
CO_2t	29,02±3,87	28,45±1,84	27,84±1,48	26,36±1,40
EB(vt)	3,30±4,21	1,62±2,61	1,36±1,71	1,02±1,33
SAT O_2	96,10±0,53	91,45±3,43	91,30±2,60	95,28±1,10

[a] media ± desviación estándar
Los valores de la tabla se expresan en mMol/L

De los resultados observados en las tablas 18, 19 y 20 cabe resaltar la existencia de un ligero descenso del pH para las dosis de 400 y 100 mg/kg, así como un aumento de la pCO_2 para la dosis mayor. En cuanto a la pO_2 se objetiva un descenso para las tres dosis.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

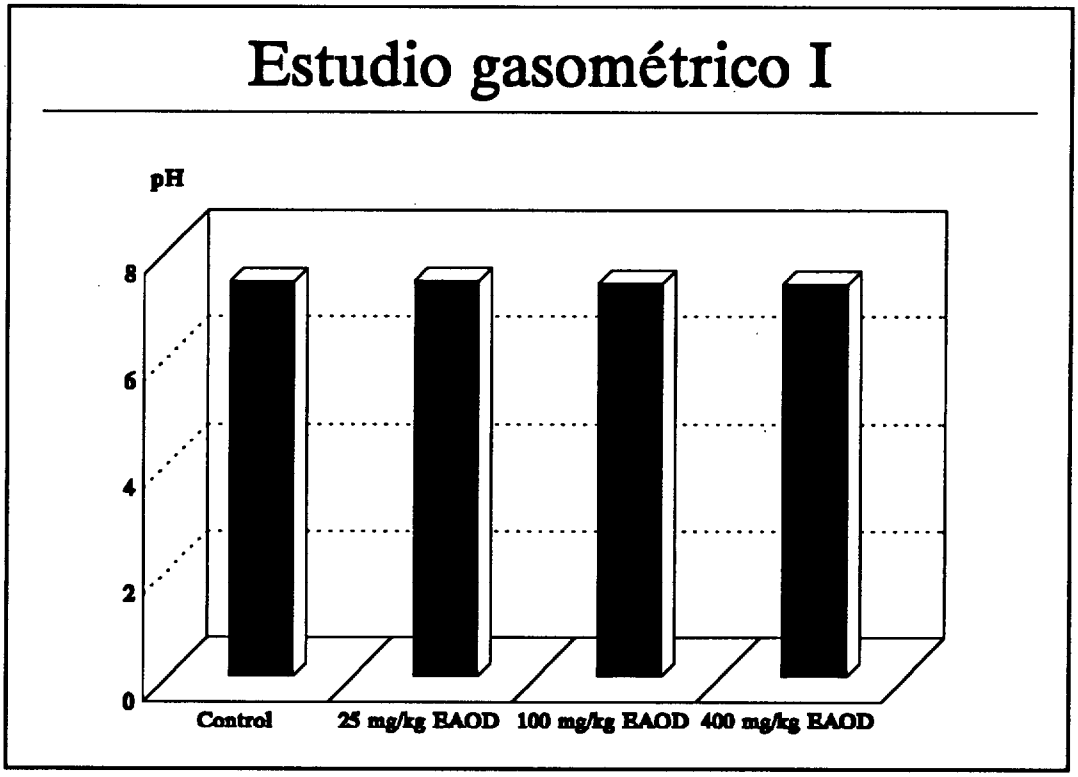

Figura 21: Influencia de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre el pH sanguíneo. Cada barra representa la $\bar{x}$ para n=6.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

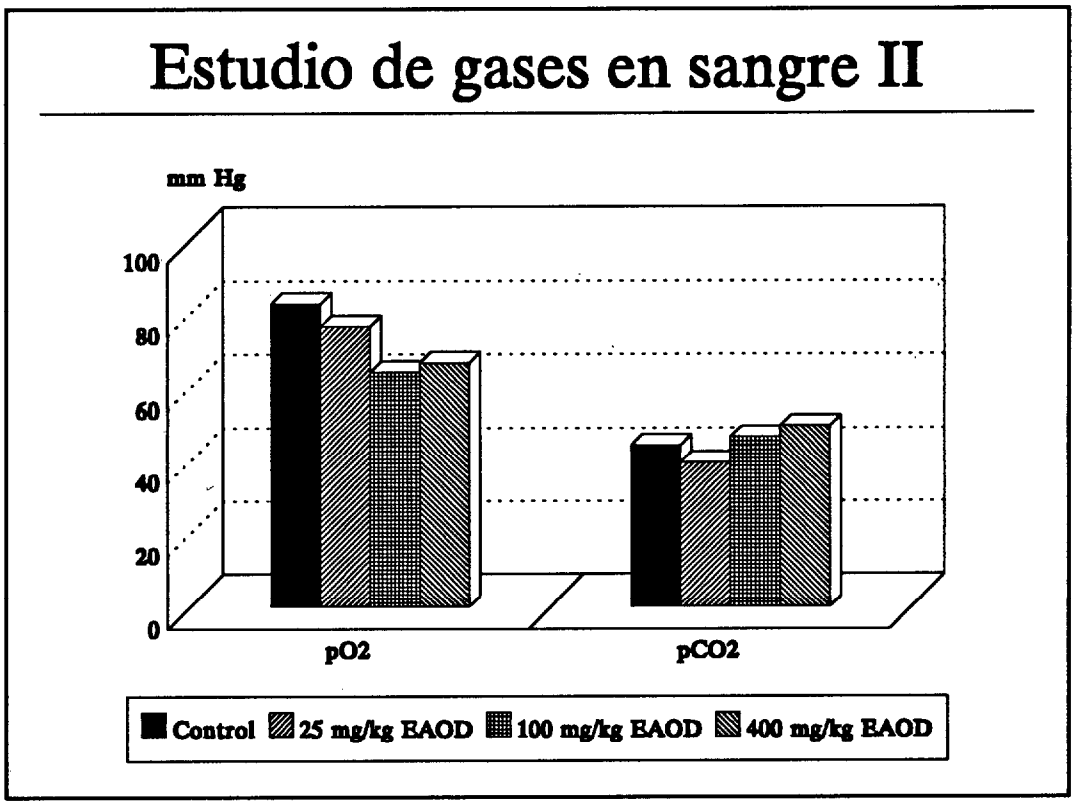

Figura 22: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre los niveles de pO_2 y de pCO_2 sanguíneos en la rata. Cada barra representa la $\bar{x}$ para n=6.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

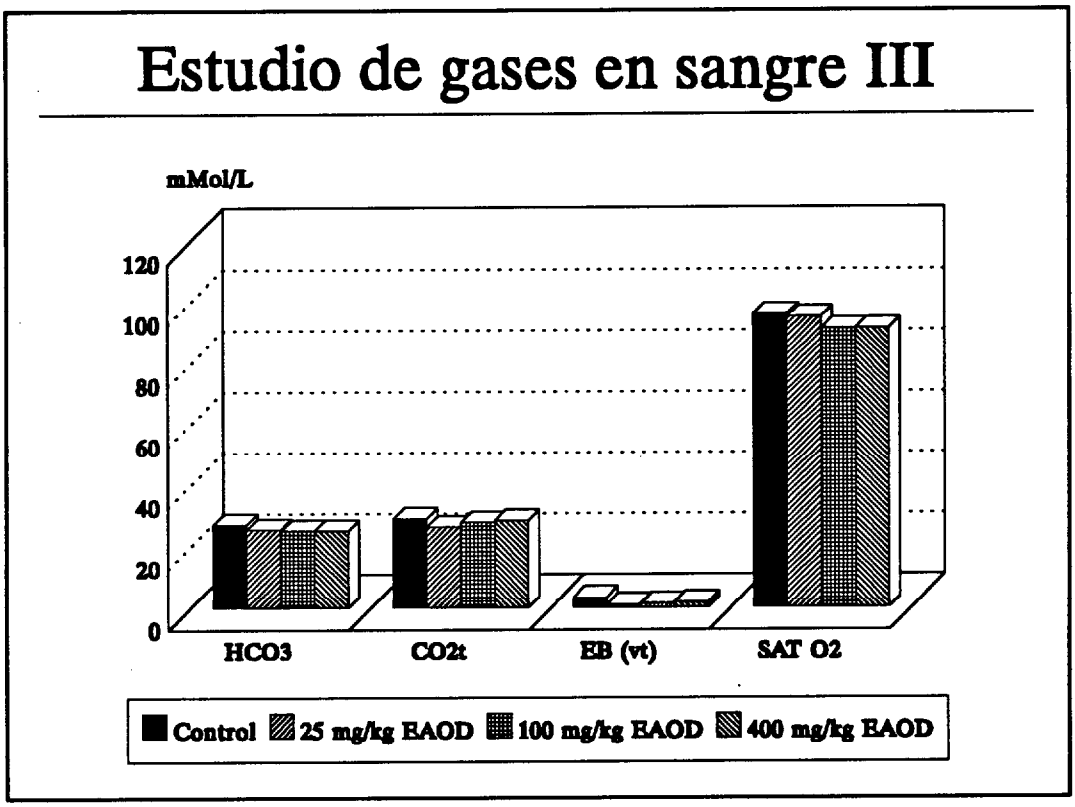

Figura 23: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre los niveles de HCO_3, CO_2t, EB (vt) y SAT O_2 sanguíneos en la rata. Cada barra representa la $\bar{x}$ para n=6.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.12.-*ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE UN EXTRACTO DE OPUNTIA DILLENII SOBRE LA COAGULACION SANGUINEA*

3.12.1.-INTRODUCCION

Es importante para determinar si una droga puede provocar una alteración funcional del hígado, el conocer de qué forma se influye sobre la síntesis de productos hepáticos. Así, estudiando la coagulación podemos averiguar si la síntesis de los factores de la coagulación y en cierta forma el funcionamiento normal hepático se ven alterados.

3.12.2.-MATERIAL Y METODOS

Se ha estudiado la coagulación global, siguiendo una aplicación del método de Lee-White (descrito por Caen *et al.*, 1977).

La sangre es recogida tras punción cardíaca. Se desecha el primer ml de sangre y se recolectan 4 ml en 2 tubos de ensayo, mediante una cánula, poniendo el cronómetro en marcha en el momento en que se comienza a verter la sangre en el tubo de ensayo. Los tubos de ensayo rigurosamente limpios, son flameados mediante un mechero Bunsen, siendo utilizados en un plazo máximo de 1 hora. Los dos tubos, conteniendo 2 ml de sangre, son

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

colocados inmediatamente al baño María a una temperatura de 37 °C. La lectura se hace por inclinación regular de 45° cada 30 segundos hasta que la coagulación sea completa (no hay desprendimiento cuando se gira el tubo).

En el estudio fueron utilizadas 30 ratas machos Sprague-Dawley, suministrados por Iffa Credo y posteriormente adaptados y criados en el bioterio de la facultad de Medicina, con un peso de un peso comprendido entre 160-200 g.

Se realizaron los siguientes grupos experimentales:

* Grupo control: tampón fosfato i.p. (n=6)
* Grupo I: 1600 mg/kg (n=6)
* Grupo II: 400 mg/kg (n=6)
* Grupo III: 100 mg/kg (n=6)
* Grupo IV: 25 mg/kg (n=6)

El tiempo de coagulación fue determinado a los 15 y 30 minutos tras la administración intraperitoneal de 0,5 ml del extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw., según los grupos experimentales anteriormente expuestos.

Asimismo, se utilizaron 3 ratas para estudios de la coagulación *in vitro*. Para ello, la sangre fue recogida en tubos preparados previamente con extracto al 30%.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.12.3.-RESULTADOS

Los resultados del estudio de los efectos del extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre la coagulabilidad sanguínea, pueden observarse en las tablas 21 y 22 y en la figura 24, donde se reflejan las variaciones en el tiempo de coagulación, expresadas en segundos, de dos muestras de sangre tomadas a cada animal. También se observa las diferencias en el tiempo de coagulación cuando las determinaciones se realizan a los 15 y 30 min de haber administrado el extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. por via i.p.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 21

Tiempo de coagulación a los 15 min tras la administración de diferentes dosis del extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw.

Dosis	T_1[a]	T_2[b]
Control	79,3±09,3[c]	205,8±10,1
1600 mg/kg	74,8±15,8	193,7±14,1
400 mg/kg	76,6±13,5	198,4±11,8
100 mg/kg	78,1±09,7	203,2±10,5
25 mg/kg	80,1±10,5	202,1±10,3

[a] Tiempo de coagulación del tubo 1
[b] Tiempo de coagulación del tubo 2
[c] media ± desviación estándar

Tabla 22

Tiempo de coagulación a los 30 min tras la administración de diferentes dosis del extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw.

Dosis	T_1	T_2
Control	78,7±12,1	202,7±12,3
1600 mg/kg	76,8±13,7	190,6±11,2
400 mg/kg	77,9±12,4	197,3±12,8
100 mg/kg	78,3±10,5	200,7±13,4
25 mg/kg	78,2±11,2	199,8±12,4

[a] Tiempo de coagulación del tubo 1
[b] Tiempo de coagulación del tubo 2
[c] media ± desviación estándar

En la tabla 21, en la que se refleja el tiempo de coagulación a los 15 min tras la inyección del extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw., se observa una disminución del tiempo de coagulación, aunque no presenta una diferencia significativa.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

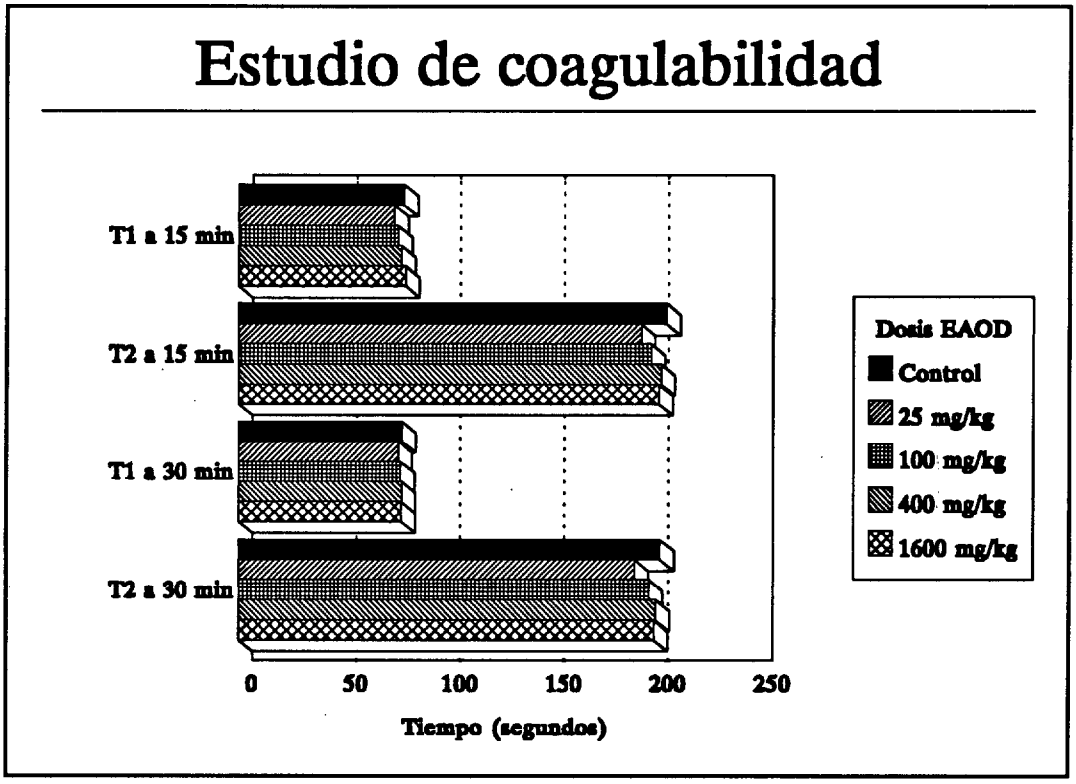

Figura 24: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre el estado de coagulabilidad de la sangre de rata. En la gráfica se representa el T1 y T2 a los 15 y 30 min tras la administración intraperitoneal del EAOD I. Cada barra representa la $\bar{x}$ para n=6.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.13.-*PROPIEDADES HEPATOPROTECTORAS*

3.13.1.-INTRODUCCION

La ingestión de frutos de Opuntia dillenii Haw. ha sido ampliamente recomendado en la medicina popular canaria para la reducción de la ictericia de diversa etiología.

Para evaluar estas afirmaciones, se realizaron diversas investigaciones farmacológicas para confirmar los efectos hepatoprotectores de frutos maduros de *Opuntia dillenii Haw*. Fue investigada la habilidad de extractos acuosos de esta planta para reducir la mortalidad del ratón después de la intoxicación con etanol, al igual que actividad plasmática de la glutámico pirúvico transaminasa (GPT) y de la glutámico oxalacético transaminasa (GOT) después de inducir hepatitis en ratas con tetracloruro de carbono. El propósito del presente trabajo es estudiar la acción hepatoprotectora de esta planta en diferentes modelos experimentales tras producir una lesión hepática. Una intoxicación aguda con etanol en ratones produce una importante, y bien conocida, perturbación de la via metabólica conduciendo a la muerte (Lieber, 1977; Comporti, 1978); y una intoxicación con tetracloruro de carbono (CCl4) en ratas produce una toxicidad metabólica que conduce a una necrosis reversible del hígado (Slater, 1978; Plaa y Hewitt,

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

1982).

3.13.2.-MATERIAL Y METODO

I.-Hepatotoxicidad inducida por etanol

Se utilizaron 30 ratones machos albinos de raza OF1 suministrados por Iffa Credo y posteriormente adaptados y criados en el bioterio de la facultad de Medicina, con un peso comprendido entre 35-40 g, los cuales fueron alimentados "ad libitum" y se les permitió el libre acceso al agua, hasta la administración de una única dosis intraperitoneal de etanol (6.4 g/kg en 0.9% de NaCl; 10 ml/kg) (Scharlau).

El extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw (25, 100 y 400 mg/kg) fue administrado intraperitonealmente 30 min antes de la intoxicación con alcohol. La mortalidad fue anotada 48 horas después de la administración del etanol.

II.-Hepatotoxicidad inducida con tetracloruro de carbono

Se utilizaron 30 ratas machos de la raza Sprague-Dawley variedad albina norvegicus suministrados por Iffa Credo y posteriormente adaptado y criados en el bioterio de la Facultad de Medicina, con un peso comprendido

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

entre 160-200 g, los cuales fueron alimentados "ad libitum" y se les permitió el libre acceso al agua hasta la administración del tetracloruro de carbono y, posteriormente, fueron puestos en ayuna durante 24 horas. El animal recibió intraperitonealmente una dosis única de tetracloruro de carbono (Panreac) (0.3 ml/kg en aceite de oliva; 5 ml/kg).

El extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw (25, 100 y 400 mg/kg) fue inyectado intraperitonealmente 30 min antes de la intoxicación con tetracloruro de carbono.

24 horas antes de la intoxicación con CCl_4 se tomaron muestras de sangre. El plasma se obtuvo por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min y fueron analizados los niveles de GOT, GPT y proteínas totales, por el laboratorio de bioquímica del Centro de Salud de Vecindario (Las Palmas de Gran Canaria).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.13.3.-RESULTADOS

En las tablas 23 y 24 y en las figuras 25 y 26, se muestran los resultados de los efectos hepatoprotectores de frutos maduros de Opuntia dillenii Haw. cuando es administrado por via intraperitoneal, para reduciendo la mortalidad del ratón después de la intoxicación con etanol, el cual se sabe produce una importante perturbación de la via metabólica; también se muestra la actividad plasmática de la glutámico pirúvico transaminasa (GPT), glutámico oxalacético transaminasa (GOT) y fosfatasa alcalina (FA) después de inducir hepatitis en ratas con tetracloruro de carbono, que sabemos produce una necrosis reversible del hígado (Slater, 1978; Plaa y Hewitt, 1982).

Tabla 23

Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre la intoxicación con etanol[a] por via IP.

Dosis (mg/kg)	N° de animales muertos
Control	6/6[b]
1600	6/6
400	6/6
100	6/6
25	6/6

[a] Se administraron 6.4 g/kg de peso de etanol por via IP.
[b] Relación de animales muertos por animales utilizados.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Tabla 24

Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre los niveles de proteínas plasmáticas y transaminasas tras la administración de tetracloruro de carbono[a] en rata por via IP en solución oleosa.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Prot. tot. (g/dL)	GOT (UI/L)	GPT (UI/L)
Control	-	6,1±0,1[b]	156,7±5,6	45,2±4,3
CCl_4	-	6,0±1,0	1170,0±53,5	990,0±10,5
EAOD+CCl_4	400	6,2±3,2	938,4±41,3	614,3±29,3
EAOD+CCl_4	100	6,1±3,5	1122,3±60,8	889,7±32,7
EAOD+CCl_4	25	6,0±2,3	1158,9±55,7	970,2±48,2

[a] Se administraron 0,3 ml/kg de peso de tetracloruro de carbono via IP.
[b] media ± desviación estándar

En los resultados de la tabla 24 no se aprecian variaciones significativas de los niveles de proteínas plasmáticas en los animales tratados con CCl_4, ni en los animales tratados con CCl_4 mas el extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. a diferentes dosis. Esto es debido probablemente a la larga vida media de las proteínas plasmáticas, no produciéndose cambios objetivables a este nivel tras la lesión aguda del hígado. Donde sí que aparecen cambios significativos es en los niveles de GOT y GPT, donde se observa una reducción importante de los niveles de los mismos cuando previamente a la intoxicación con CCl_4 se administraba una dosis de 400 mg/kg de peso del extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw.*

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

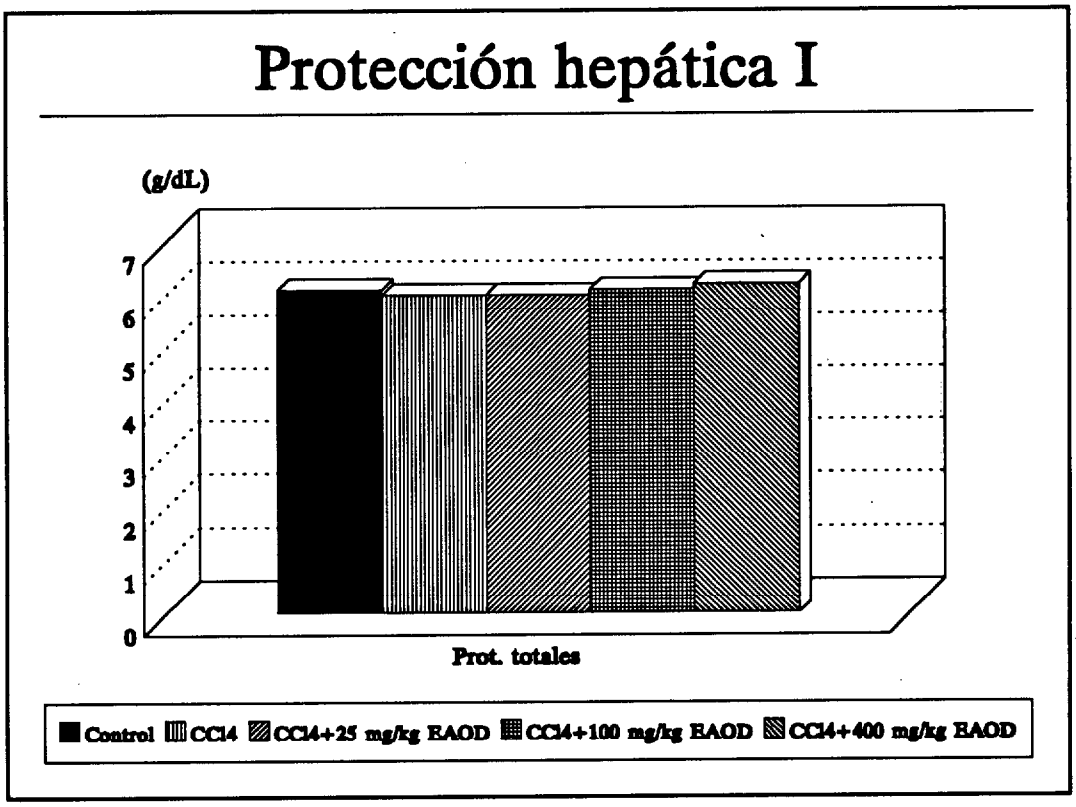

Figura 25: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre los niveles de proteinas totales plasmáticas en ratas a las que se indujo hepatotoxicidad con CCl_4. Cada barra representa la $\bar{x}$ para n=6.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

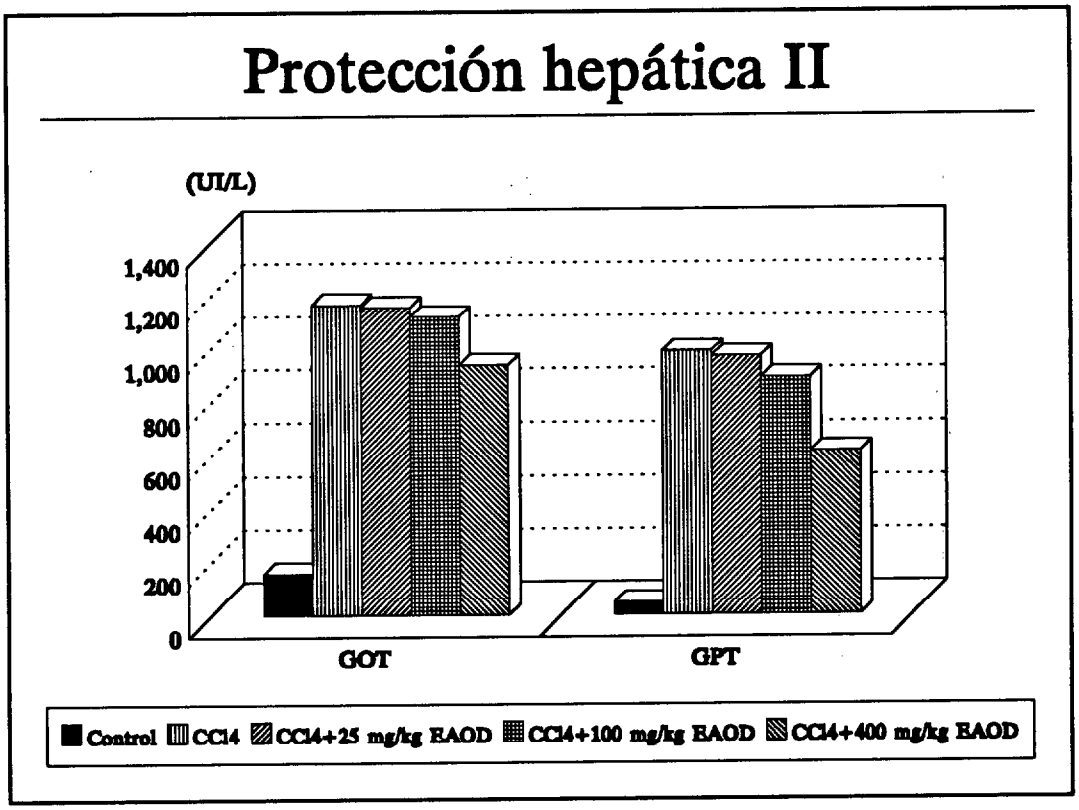

Figura 26: Efecto de diferentes dosis de un extracto acuoso de *Opuntia dillenii Haw* sobre los niveles de GOT y GPT plasmáticas en ratas a las que se indujo hepatotoxicidad con CCl_4. Cada barra representa la $\bar{x}$ para n=6.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.14.-*ESTUDIOS EN MUSCULO LISO TRAQUEAL*

3.14.1.-INTRODUCCION

La traquea humana posee escasas fibras musculares lisas que están distribuidas sobre la membrana elástica y que no son aptas para estudios *in vitro*, sin embargo, la musculatura bronquial, que tiene un diámetro de 5-8 mm, sí es adecuada. Debido a la dificultad práctica de la obtención de muestras de tejidos de las vías aéreas humanas para realizar ensayos *in vitro*, es por lo que los modelos animales son ampliamente empleados para el estudio de fármacos broncoactivos. La traquea de cobaya se obtiene fácilmente y es sensible a gran variedad de agonistas (acetilcolina, histamina, serotonina, leucotrienos,...). Es por esto que la traquea de cobaya se utiliza ampliamente para el estudio de sustancias broncodilatadoras y broncoconstrictoras, así como para la determinación de especificidad droga-receptor, siendo extrapolables en muchos de los casos los resultados obtenidos al músculo liso traqueal de los humanos. Los resultados obtenidos por diversos autores (Muccitelli *et al.*, 1987) indican que existen similitudes ante los efectos de agentes broncoconstrictores en las vías aéreas humanas y las vías aéreas de cobaya. Así, aunque con algunas diferencias, la histamina, la metacolina y los leucotrienos poseen potencia similar y producen una contracción máxima comparable en las dos preparaciones.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Una de las principales características en el asma humano es la existencia de un incremento de la sensibilidad traqueobronquial a varios estímulos inespecíficos. Este estímulo constrictor incluye a los agentes farmacológicos, los autacoides endógenos, materiales sólidos inertes aerosolizados, el aire frio y el ejercicio físico. Esta hipersensibilidad traqueobronquial es inespecífica en la mayor parte de los pacientes asmáticos con o sin hipersensibilidad inmediata a los alergenos. El estudio del tipo de asma alérgico y no alérgico es importante porque provee información sobre el sistema de control neural y miogénico que existe en la sensibilización (Mansour *et al.*, 1986).

De acuerdo con la clasificación de Ahlquist (1948, 1966), la broncodilatación mediada por las aminas simpaticomiméticas es mediada via receptores ß-adrenérgicos. Se ha demostrado que el propranolol inhibe la acción de las drogas agonistas ß en la traquea aislada de cobaya (Foster, 1966). En el transcurso de los experimentos realizados en presencia de propranolol, Foster observó que la adrenalina producía contracciones en el tejido. Esta observación sugiere que están implicados los receptores α-adrenérgicos.

Los efectos de la adrenalina, noradrenalina e isoprenalina han sido investigados en la traquea aislada de cobaya en presencia de 10^{-3} M de propranolol hidrocloride. Tanto la adrenalina como la noradrenalina

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

mostraron que producían contracciones del tejido. El orden relativo de potencia de las catecolaminas (adrenalina > noradrenalina > isoprenalina), junto con el antagonismo exhibido por la fenoxibenzamina, sugiere que las contracciones eran debidas a la intervención de los receptores α-adrenérgico (Persson y Johnson, 1970).

Aunque la traquea es sensible a la acetilcolina, no se ha encontrado sensibilidad frente a la nicotina. Ello es debido a que este músculo no posee células ganglionares. El magnesio no tiene un efecto directo, pero antagoniza la acción de la acetilcolina y del potasio. El calcio potencia la acción de la acetilcolina (Everitt *et al.*, 1969).

En 1947, Castillo y de Beer, utilizaron preparaciones de traquea de cobaya en anillo para estudiar el efecto de diversos agonistas sobre el músculo liso traqueal. Esta técnica fue perfeccionada por Akçasu (1959). Este autor cortaba el cartílago de cada segmento, uniendo diferentes segmentos entre si, con lo que se amplificaba la respuesta, ya que el anillo cerrado presentaba una resistencia elástica que reducía la respuesta.

El anillo cartilaginoso traqueal está incompleto dorsalmente. La abertura que queda, está ocupada por un puente membranoso de fibras musculares, que corren en sentido transversal al eje traqueal; esto quiere decir, que la traquea se contrae lateralmente, disminuyendo el diámetro de

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

su luz, sin producirse alteraciones a nivel de la longitud. Mediante la disección de la traquea, se puede conseguir que estas fibras musculares se contraigan longitudinalmente. Esto se puede conseguir mediante tres tipos de preparaciones:

a.-sección circular: cadena traqueal

b.-sección espiral

c.-sección zig-zag

3.14.2.-MATERIAL Y METODO

Los estudios sobre el músculo liso traqueal fueron realizados en cadenas de anillos traqueales en traquea de cobaya.

Los animales fueron sacrificados mediante golpe en la nuca y posterior exanguinación. La traquea fue rápidamente extraída del animal y colocada en una solución fisiológica con la siguiente composición (mM): NaCl, 118.3; KCl, 4.7; $CaCl_2$, 2.5; $MgSO_4$, 1.2; KH_2PO_4, 1.2; $NaHCO_3$, 25.0; y glucosa, 11.1. La grasa y el tejido conectivo fue removido de la traquea, dividiéndose en anillos (2 cartílagos por segmento) con la ayuda de un bisturí. En la figura 27 se observa un dibujo esquemático de la anatomía de la traquea en visión dorsal y ventral. Los anillos traqueales fueron abiertos por la zona cartilaginosa, uniéndose posteriormente por sus extremos (Akçasu, 1959) para magnificar la respuesta, colocando los segmentos fibromusculares de anillos

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

adyacentes en sentido opuesto, según se muestra en la figura 28. Se formaron cadenas con un máximo de 6 anillos y se tuvo especial cuidado en no dañar el tejido muscular mediante tracciones innecesarias. Mediante este método los autores consiguieron magnificar hasta 3 veces la respuesta obtenida por otros autores.

Se utilizaron 50 cobayas machos de raza Hartley suministrados por Iffa Credo y posteriormente adaptados y criados en Marzagán, con un peso comprendido entre 500 y 600 g para realizar los siguientes estudios:

* Grupo Carbacol: Se realizaron curvas acumulativas, según método de Van Rossum (1963), con dosis crecientes de carbacol que oscilaban entre $2.67*10^{-11}$ y $5.47*10^{-8}$ M. El volumen administrado con cada dosis fue de 25 μl.

* Grupo EAOD: 1 minuto antes de construir la curva dosis-respuesta con carbacol se administraron diferentes dosis del EAOD. Las dosis utilizadas del EAOD fueron de 0.5, 1 y 2 mg/ml (concentración final en la cubeta). Cada dosis fue administrada en un volumen de 0.2 ml.

* Grupo Atropina: El efecto obtenido con el EAOD se comparó con el bloqueo que provocaba la atropina (Sigma) a una concentración final en la cubeta de $2.9*10^{-11}$, $1.2*10^{-10}$ y $4.6*10^{-10}$ M cuando se inducía un aumento del

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

tono del músculo liso traqueal con carbacol.

* Grupo Papaverina: Los cromoalcaloides betalaínicos presentes en estas plantas tienen una similitud estructural con las Tetrahidroisoquinolinas, sustancias con una importante actividad β adrenérgica, por lo que también se realizó el estudio con papaverina (Sigma). El efecto obtenido con el EAOD se comparó con el efecto obtenido por la papaverina a una concentración final en la cubeta que oscilaba entre 10^{-4} y 10^{-7} M, cuando se realizaba una curva dosis-respuesta con carbacol.

Los anillos traqueales fueron suspendidos en una cámara de un baño de órgano conteniendo 10 ml de la solución salina fisiológica, mantenida a 37^0 C y oxigenada con una mezcla de 95% de O_2 y 5% de CO_2 (carbógeno) a un pH de 7.4. Uno de los extremos del tejido fue sostenido al fondo de la cámara mediante un alambre de acero y el otro fue atado a un transductor isométrico (Statham Gould UC 2).

Antes de empezar cada experimento, se permitió a los anillos traqueales equilibrarse durante 60 min , durante este período el tejido fue lavado a intervalos de 15 min. Los cartílagos traqueales fueron estirados progresivamente hasta alcanzar 1 g de tensión, que es la carga óptima para estas preparaciones (Rhoden y Barnes, 1989). Después de este proceder el tejido se dejó equilibrar durante un período de 30 min antes de comenzar los

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

experimentos. Este prolongado período de equilibración con lavados frecuentes de los tejidos minimizó el desarrollo de contracciones musculares espontáneas y aumentó la reproductibilidad de los experimentos (Tschirhart *et al.*, 1987).

La respuesta a los diferentes fármacos relajantes de la musculatura bronquial, así como del extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw., fue expresada como porcentaje de la máxima contracción producida con la dosis más elevada del agonista utilizado en cada experimento. Cuando se usaron antagonistas, estos fueron añadidos al baño de órgano 15 min antes de la construcción de la curva dosis-respuesta con carbacol (Mucitelli *et al.*, 1987). Cuando se administró el EAOD, éste fue añadido 5 min antes de iniciar la curva dosis respuesta con carbacol, dada la labilidad del mismo. Las curvas dosis-respuesta para el carbacol fueron generadas mediante incrementos sucesivos en la concentración del mismo en el baño de órgano, de acuerdo con el método de Van Rossum (1963), dejando cada concentración en contacto con el tejido durante un período de 4 min.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

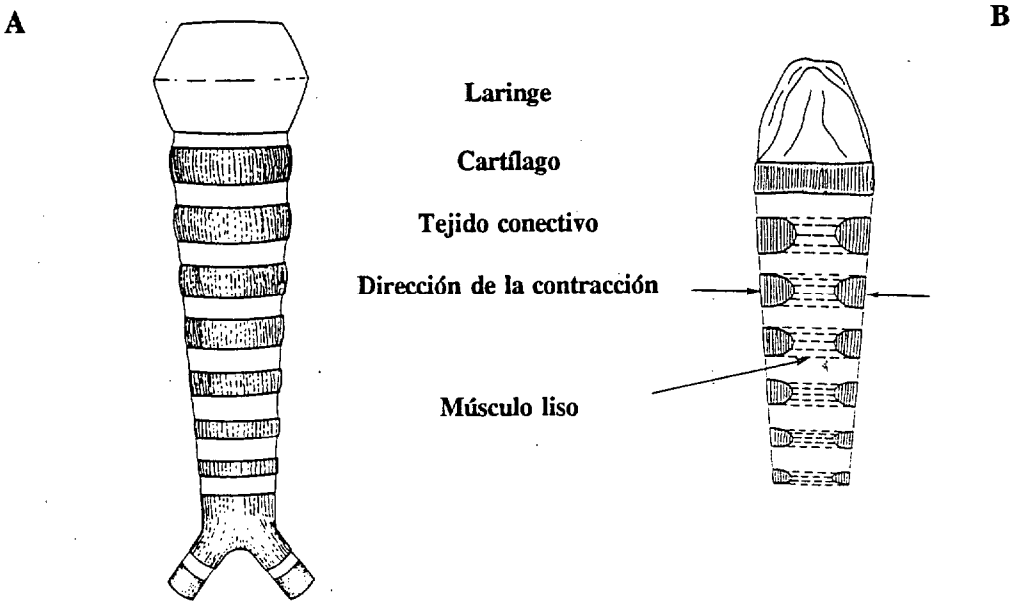

Figura 27: Esquema de la anatomía de la traquea. A.-Visión ventral, B.-Visión dorsal. Tomado de Blattner (1980).

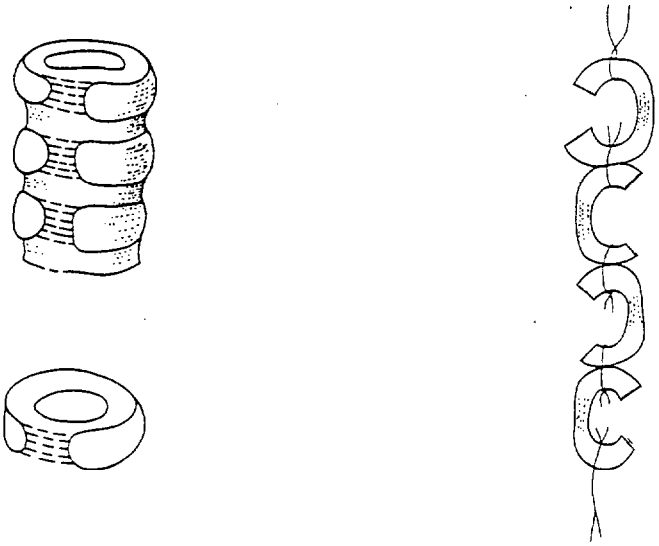

Figura 28: Esquema en el que se muestra el método para realizar la cadena de anillos cortados de la traquea. Observese la posición de las aberturas en los cartílagos, que están traspuestos 180° en los anillos adyacentes. Tomado de Blattner (1980).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

3.14.3.-RESULTADOS

En las figuras 29, 30 y 31 se muestran algunos de los experimentos *in vitro* realizados en la musculatura lisa traqueal de cobaya, para diferentes antagonistas del carbacol. En la figura 29 se observa como al administrar dosis crecientes del extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw., el inicio de la contractilidad de la musculatura lisa, se va retrasando en el tiempo, lo que indica un efecto bloqueante del extracto. Este efecto bloqueante es similar al producido por la papaverina, según se muestra en la figura 31, en el sentido de que con las dosis más bajas del extracto la contracción máxima llega a ser superior a la de la curva control, mientras que con la dosis mas alta del extracto, se retrasa la contracción, pero se alcanza aproximadamente el 100% de la contracción máxima para la curva control. En la figura 30 se muestran algunos de los experimentos en los que la preparación fue incubada con diferentes dosis de atropina. En las figuras 32, 33 y 34 se muestran las curvas dosis respuestas para diferentes dosis del EAOD, la atropina y la papaverina respectivamente.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

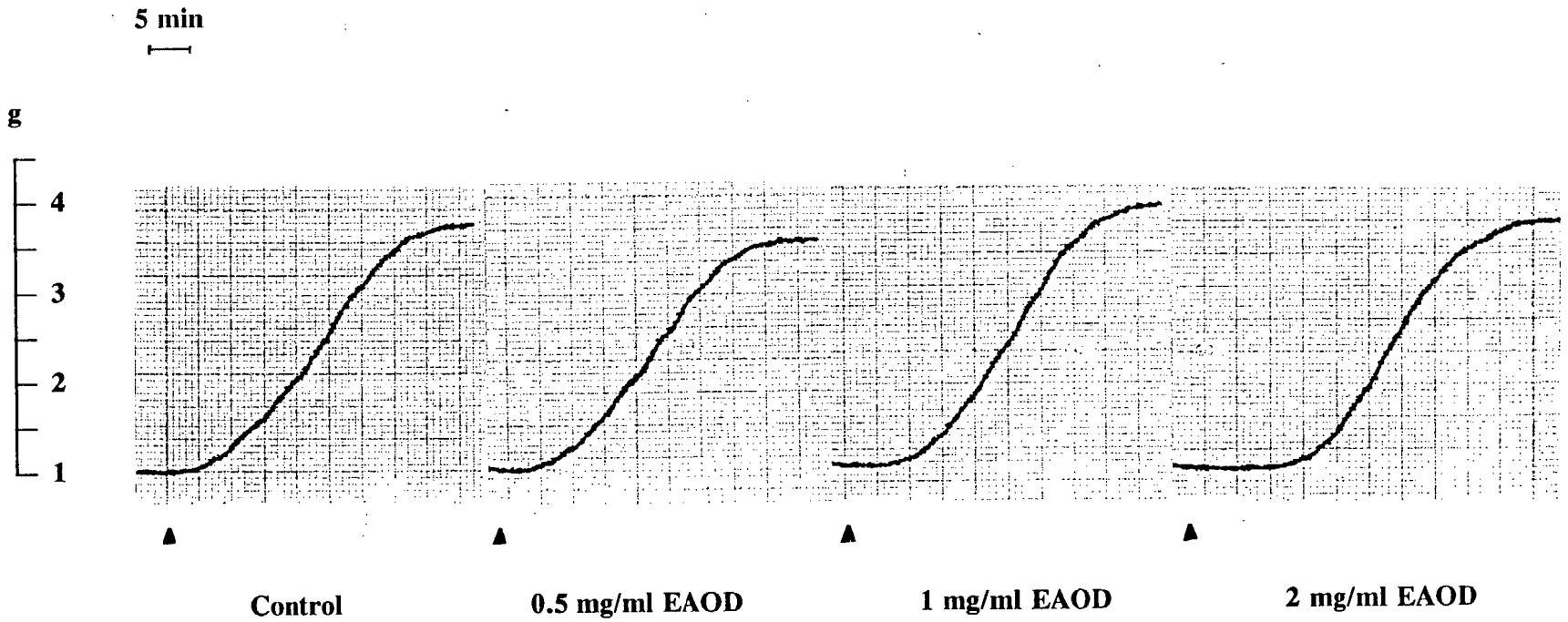

Figura 29: **Muestra de algunos de los experimentos *in vitro* en los que se observan los efectos de la incubación de diferentes dosis del extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw. sobre la contracción de la musculatura lisa traqueal de cobaya inducida por dosis sucesivas y crecientes de carbacol.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

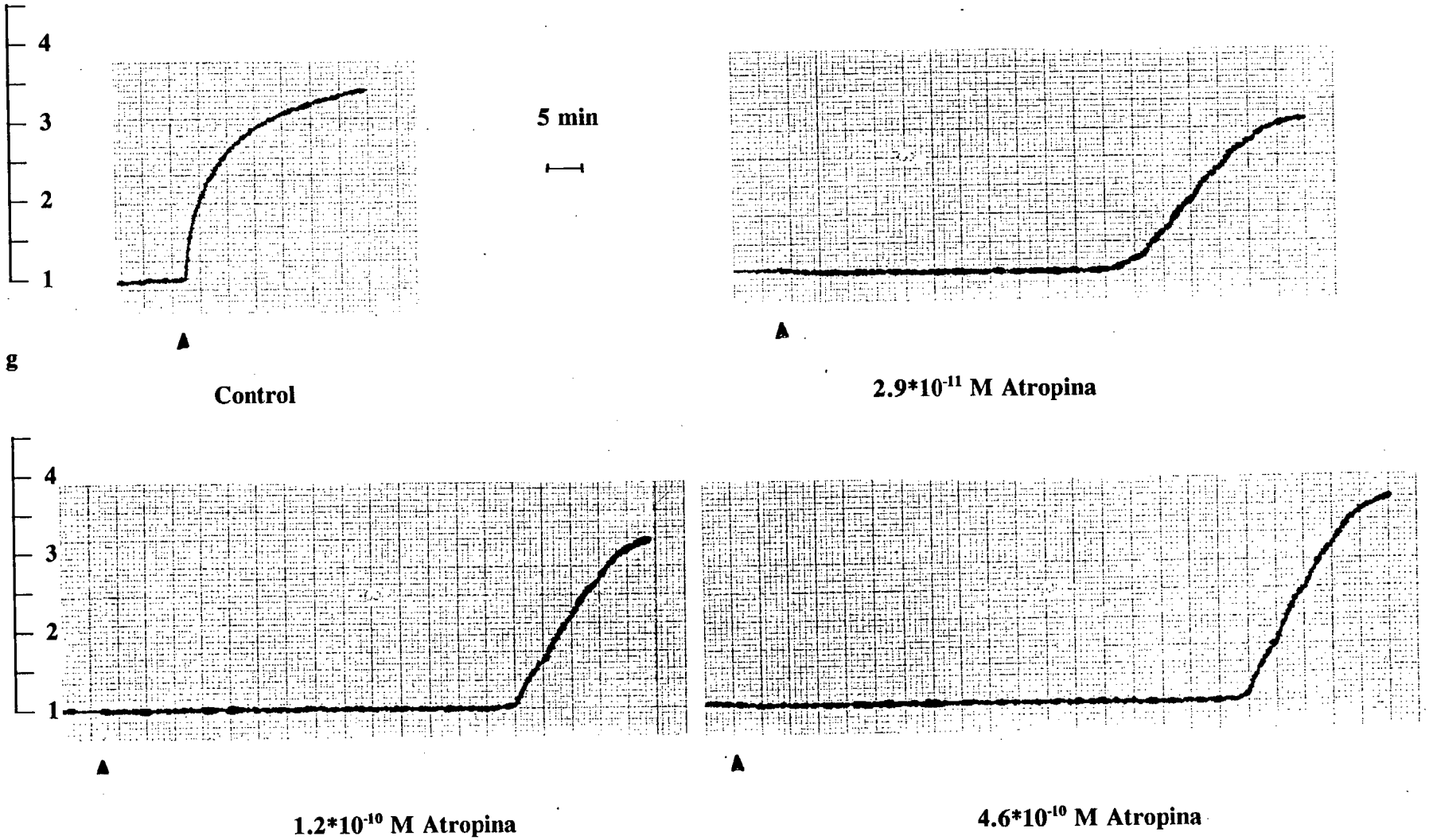

Figura 30: **Muestra de algunos de los experimentos *in vitro* en los que se observan los efectos de la incubación de diferentes dosis de atropina sobre la contracción de la musculatura lisa traqueal de cobaya inducida por dosis sucesivas y crecientes de carbacol.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

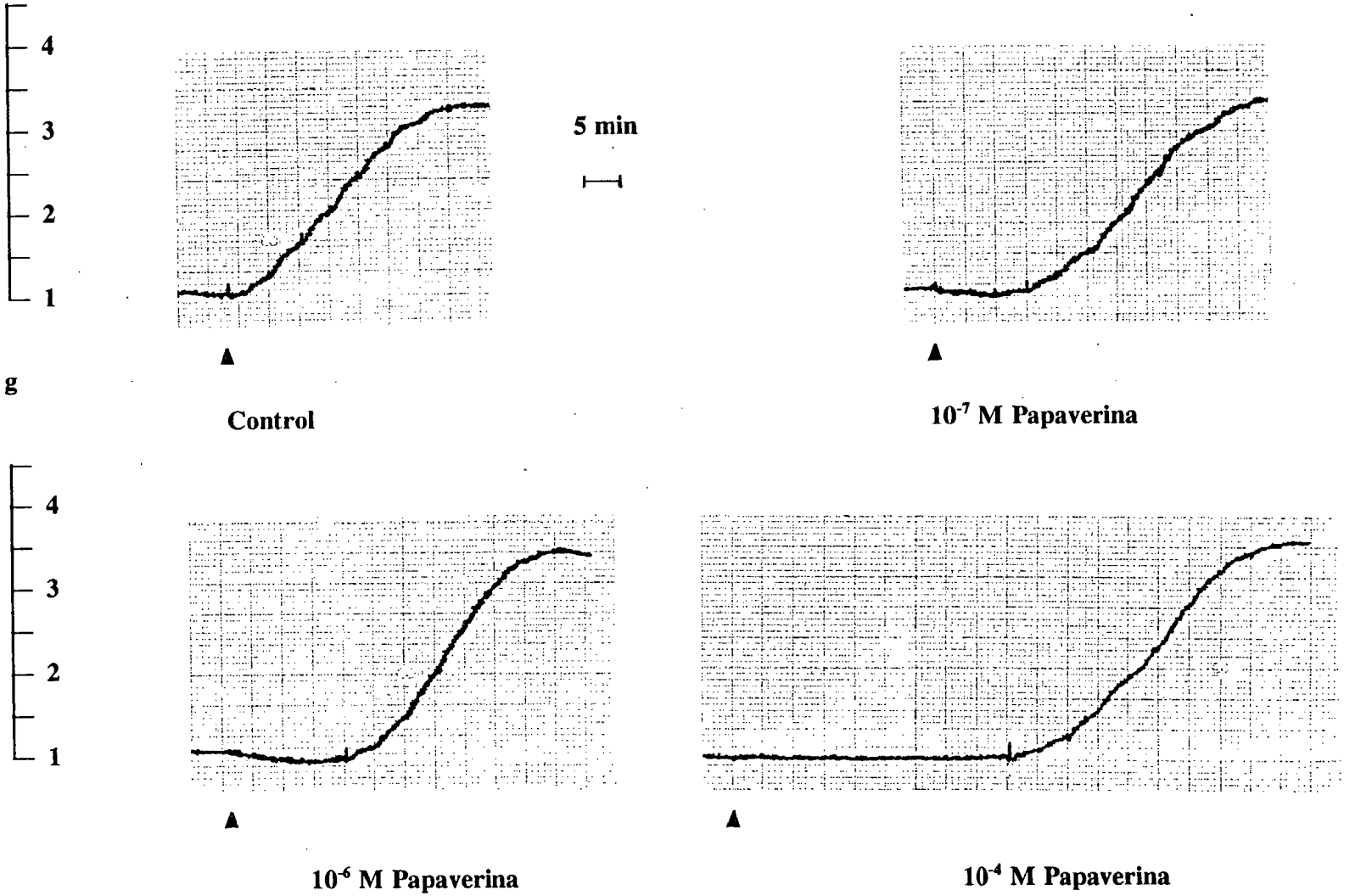

Figura 31: **Muestra de algunos de los experimentos *in vitro* en los que se observan los efectos de la incubación de diferentes dosis de papaverina sobre la contracción de la musculatura lisa traqueal de cobaya inducida por dosis sucesivas y crecientes de carbacol.**

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

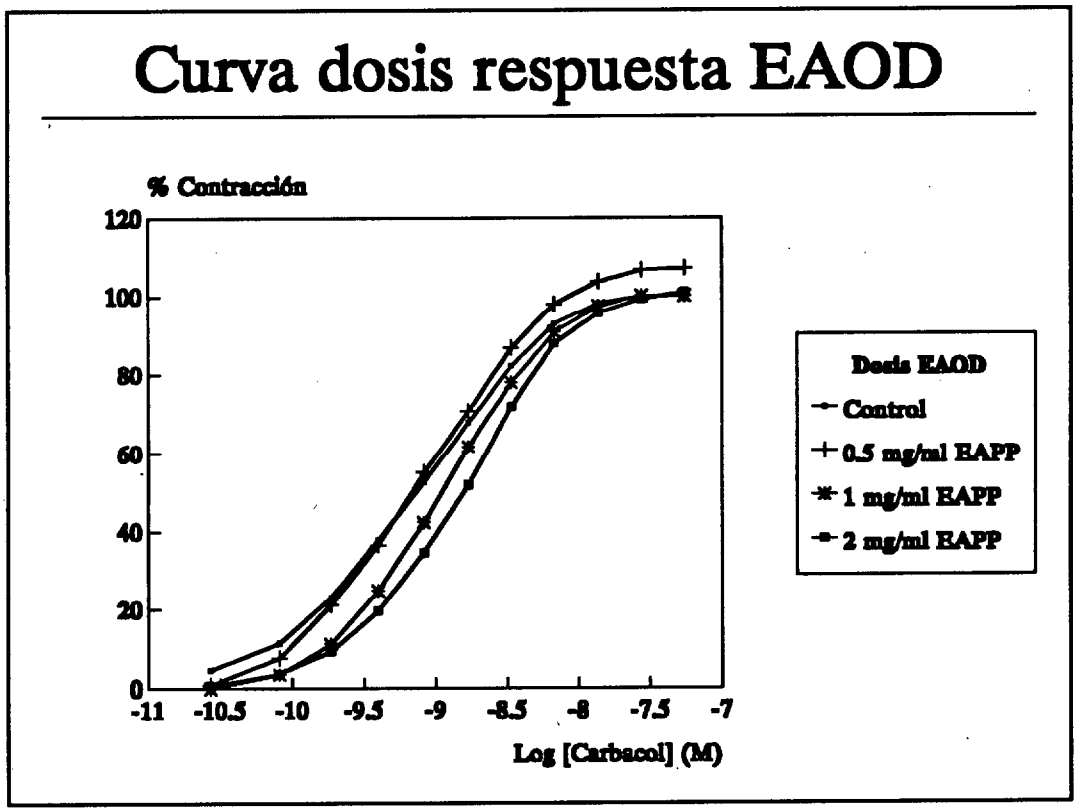

Figura 32: Contracción de la musculatura lisa traqueal del cobaya mediante concentraciones crecientes de carbacol en presencia de diferentes dosis de un extracto acuoso de frutos de *Opuntia dillenii Haw*. Los resultados están expresados como porcentaje de la máxima respuesta obtenida con una dosis de carbacol de 10^{-7} en cada experimento y representan la media para $n \geq 5$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

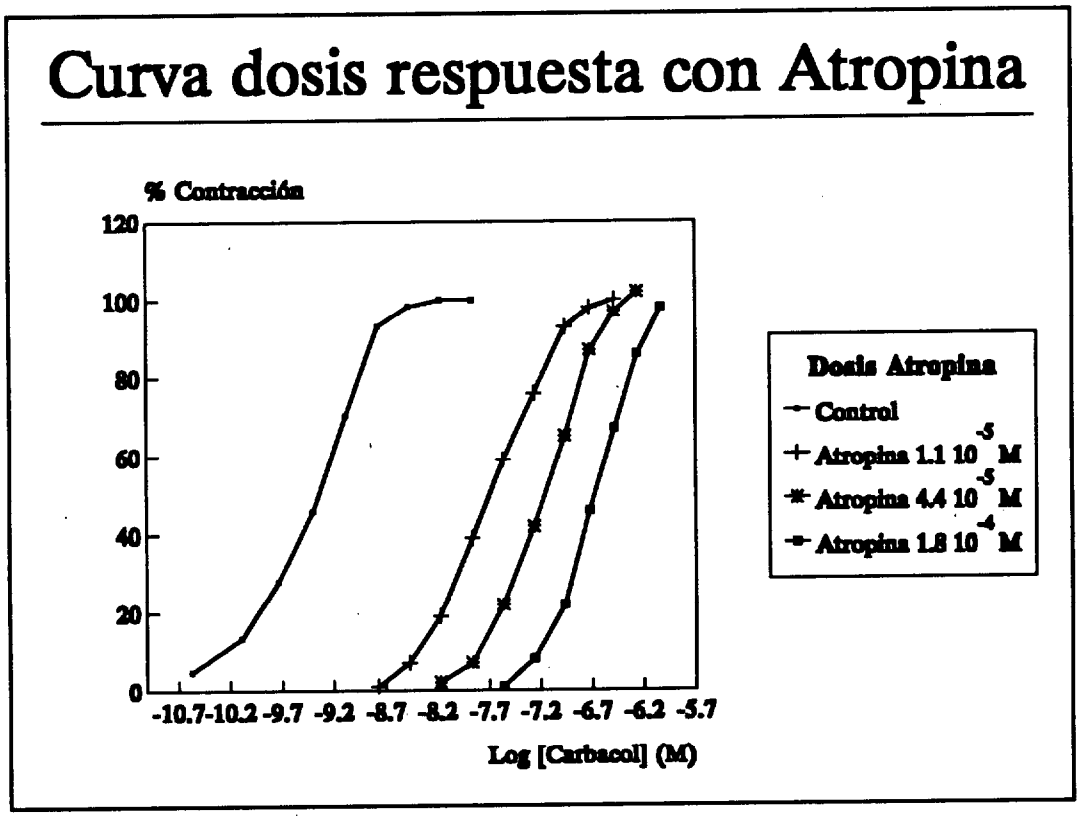

Figura 33: Contracción de la musculatura lisa traqueal del cobaya mediante concentraciones crecientes de carbacol en presencia de diferentes dosis de atropina. Los resultados están expresados como porcentaje de la máxima respuesta obtenida con una dosis de carbacol de 10^{-7} en cada experimento y representan la media para $n \geq 5$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

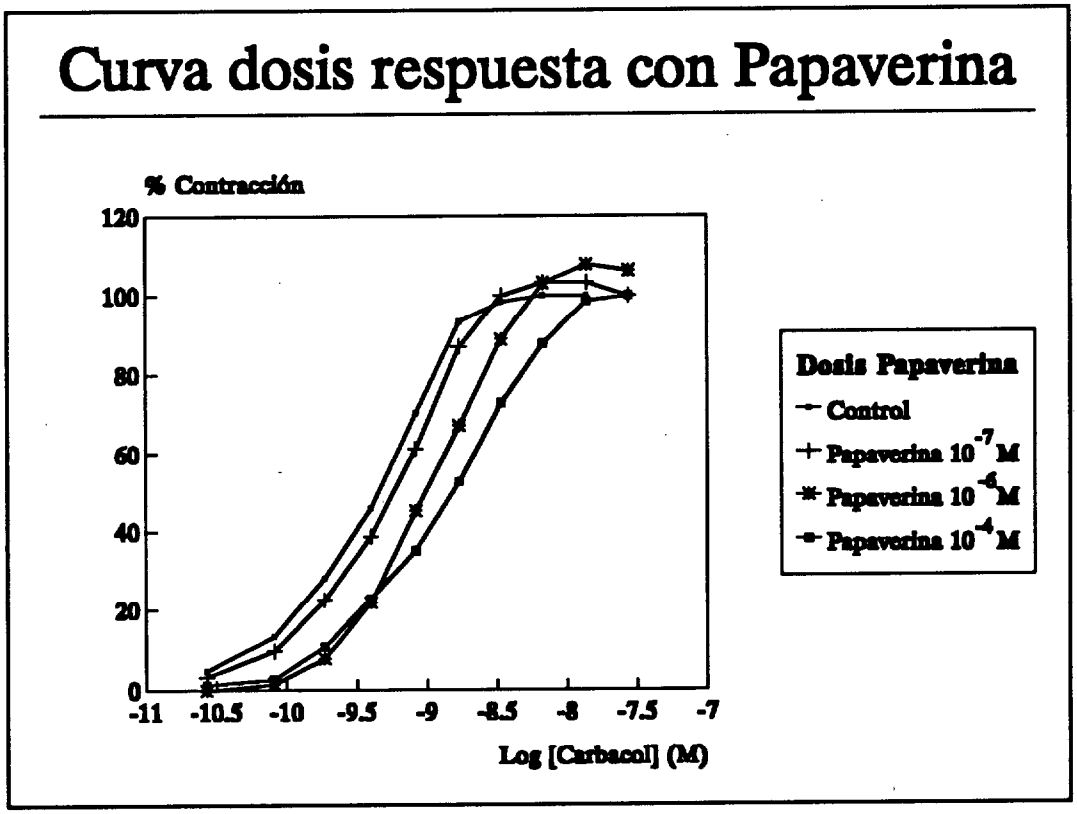

Figura 34: Contracción de la musculatura lisa traqueal del cobaya mediante concentraciones crecientes de carbacol en presencia de diferentes dosis de papaverina. Los resultados están expresados como porcentaje de la máxima respuesta obtenida con una dosis de carbacol de 10^{-7} en cada experimento y representan la media para $n \geq 5$.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

DISCUSION GENERAL

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

4.-*DISCUSION GENERAL*

Dado que el estudio farmacológico realizado en esta tesis ha sido bastante amplio, abarcando pruebas toxicológicas, estudios *in vitro* y estudios *in vivo*, también la discusión deberá incluir toda la variedad de pruebas realizadas en el presente trabajo.

Hemos centrado nuestro estudio en las fracciones rojas obtenidas mediante cromatografía líquida gravitatoria, por ser las que poseen una mayor concentración de betalaínas. No descartamos que las fracciones amarillas, presentes en el extracto y desechadas mediante la cromatografía líquida, también puedan ejercer efectos farmacológicos importantes. Asimismo, tampoco descartamos que en un futuro no muy lejano se realicen estudios farmacológicos con estas fracciones amarillas ricas en betaxantinas.

A pesar de la carencia de datos que nos permitan establecer una discusión comparativa, pensamos que dada la amplia utilización de estos frutos por la medicina popular canaria para el tratamiento de patologías diversas, se justifica el estudio de los efectos farmacológicos del extracto acuoso de frutos de *Opuntia dillenii Haw*.

Mediante este trabajo ha quedado confirmado, que los métodos para la

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

purificación de extractos vegetales descritos y utilizados por Kopelman *et al.* (1977), Wyley *et al.* (1978), Vergeront *et al.* (1980), Fernández (1989) y Fresen (1991) han resultado ser totalmente idóneos para la separación del extracto acuoso de frutos de *Opuntia dillenii Haw.* En nuestro estudio se redujeron el número de fracciones recogidas tras la separación con gel Sephadex G25M, resultando así un extracto de mayor pureza, evitándose la contaminación por betaxantinas, que en el estudio espectrofotométrico presentan un máximo de absorción próximo al de las betacianinas.

El rendimiento que se obtuvo para el extracto acuoso I de frutos de Opuntia dillenii Haw. fue similar al obtenido por Fernández (1989) y Fresen (1992). El extracto acuoso II (EAOD), que se obtuvo tras cromatografiar el extracto acuoso I mediante cromatografía líquida y ser liofilizadas las fracciones seleccionadas (52-80), arrojó un rendimiento, inferior al obtenido por Fernández (1989) y similar al obtenido por Fresen (1992), lo que estaba dentro de lo previsible, ya que el número de fracciones recolectadas fue menor.

En cuanto a la dosis letal 50 (DL_{50}), destaca la carencia de toxicidad del extracto acuoso cuando se administra por via oral, incluso a las dosis más elevadas utilizadas, lo que indica una baja biodisponibilidad del pigmento por via oral. Sin embargo cuando las dosis más elevadas se administran por via intraperitoneal, aunque no provocan ningún éxitus en los experimentos

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

realizados, sí que producen un aletargamiento e inhibición de la actividad motora, como también quedó patente cuando se realizó el test de Irwin.

Este efecto sedante observado al administrar dosis elevadas del extracto pensamos que puede ser provocado por diferentes motivos. Por un lado puede deberse al colapso circulatorio que produce la administración del extracto y que ya fue objetivado por Fernández (1989), quien al estudiar los efectos del extracto sobre la presión arterial observó que administrado por via intravenosa, producía una disminución brusca e inmediata de las presiones sistólicas y diastólicas. También esta sedación puede ser producida por una disminución del gasto cardíaco secundario a una disminución de la frecuencia cardíaca, lo cual también fue observado por Fernández (1989) al estudiar el efecto de un extracto rico en betalaínas, a nivel de la actividad mecánica espontánea de las aurículas de cobaya. Dicho autor observó que el extracto acuoso causaba una inhibición del inotropismo y del cronotropismo basal de las aurículas. Desconocemos si también produce una inhibición del automatismo, de la propagación de los impulsos o de la excitabilidad a nivel del tejido cardíaco, lo que reforzaría el hecho de que este efecto sedante observado fuese mas bien un efecto secundario a una hipotensión arterial.

Por otro lado, tal vez a elevadas dosis, alguno de los componentes del extracto, puede atravesar la barrera hematoencefálica y producir a nivel del SNC un efecto relajante y sedante. Sería necesario realizar estudios más

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

amplios y profundos para confirmar esta hipótesis, ya que nuestro trabajo se basa en el estudio de las acciones de un extracto acuoso y por lo tanto la penetración del extracto a través de la barrera hematoencefálica se ve dificultada por su naturaleza lipídica.

Al realizar el test de Irwin, confirmamos los resultados obtenidos respecto a la sedación que aparece cuando se estudia el efecto tóxico del extracto para determinar la dosis letal. En los resultados del test de Irwin quedó puesto de manifiesto una reducción importante de la actividad motora general, una ligera sedación, una reducción del estado de alerta y un aumento de la pasividad que aparece fundamentalmente en las primeras determinaciones, puestas de manifiesto cuando el animal debía reaccionar frente al investigador. Todo esto nos induce a pensar que el extracto podría estar actuando a nivel del SNC produciendo una depresión de la función cerebral.

Varios han sido los trabajos encontrados acerca del efecto hipoglucemiante de diferentes tipos de cactus. Así, Frati-Munari *et al.* (1989), en un estudio realizado con humanos con objeto de investigar la acción hipoglucemiante de extractos crudos de *Opuntia streptacantha Lemaire*, realizaron estudios con diferentes fracciones de un extracto, de las distintas partes del cactus, llegando a la conclusión de que los extractos crudos no causaban disminución significativa de la glucemia, actuando así en forma

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

similar a la prueba testigo con agua. En cambio se comprobó que la ingestión de los tallos asados de la planta causaban una disminución significativa de la glucemia. Posiblemente para obtener el efecto hipoglucemiante se requiere del calentamiento previo de *Opuntia streptacantha Lemaire*.

En nuestros experimentos con conejos sanos, tras administrar diferentes dosis únicas del EAOD, no encontramos un descenso significativo de los niveles de glucemia en relación a los niveles control. Faltaría por confirmar si en animales en los que se hubiese inducido una diabetes con alloxan (Perfumi *et al.*, 1991), se produce un descenso significativo de los niveles de glucemia, prueba que sería interesante realizar en un futuro. Estos datos parecen indicar que los frutos de Opuntia dillenii Haw. no influencian el metabolismo de la glucosa, pero en vista de su elevada utilización como hipoglucemiante por la medicina tradicional, sería interesante realizar el estudio repitiendo las dosis del extracto, varios días antes de la realización del experimento, ya que tal vez, y en vista del efecto que posee a nivel de la musculatura del intestino delgado, la supuesta acción hipoglucemiante podría residir a nivel del transporte de carbohidratos en el intestino, que podría ser bloqueado de alguna forma. En el trabajo realizado por Frati-Munari *et al.* (1989), se administraron los diferentes preparados de nopal por via oral, tomándose muestras de sangre a los 30, 60, 120 y 180 min de la administración sin haber realizado un tratamiento previo con el nopal.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Roman *et al.* (1991) también encontraron que el tallo de *Opuntia streptacantha Lemaire* provoca una reducción significativa de la curva de tolerancia a la glucosa (21.4%). Este autor compara el efecto hipoglucemiante de la tolbutamida con el producido con diferentes plantas. En nuestro estudio, los resultados obtenido para el efecto hipoglucemiante de la tolbutamida son similares a los obtenidos por estos autores.

Otros autores han realizado estudios de la glucemia tras la administración a pacientes de extractos deshidratados de *Opuntia ficus indica Mill.*, y así Frati-Munari *et al.* (1989) observaron como, aunque esta planta no mostraba una reducción aguda de la hiperglucemia secundaria a una sobrecarga de glucosa, ni tampoco reducía la glucemia en el paciente diabético, si que podría atenuar la hiperglucemia postprandial.

En oposición a los resultados obtenidos tras la realización del test de Irwin, donde se observó de una forma clara, una acción paralizante muscular, o mas bien un enlentecimiento muscular, cuando se experimentó con los animales en el rota-rod, se observó como con las dosis más altas de 1600 mg/kg del EAOD, se producía un importante descenso en el tiempo de permanencia del ratón sobre el rotor, mientras que con las dosis inferiores se observó un importante incremento del tiempo de permanencia sobre el rotor, en particular con la dosis de 100 mg/kg. Este incremento tal vez pueda ser debido a que el animal, al encontrarse ligeramente sedado, se encontrase

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

menos excitado y por tanto los movimientos que realizase fuesen más precisos.

Los efectos hepatoprotectores de un fármaco se miden por la habilidad para reducir los efectos lesivos o para preservar los mecanismos normales hepáticos fisiológicos que son perturbados por una hepatotoxina (Chandan *et al.*, 1991).

Las propiedades hepatoprotectoras de los frutos de Opuntia dillenii Haw. ingeridos en forma de zumos, han sido ampliamente difundidos por la medicina tradicional canaria, siendo frecuente la ingestión de estos frutos para el tratamiento de la ictericia de diversa etiología.

El presente estudio revela que aunque a las dosis de EAOD administradas no se observa una disminución de la mortalidad en ratones tras la intoxicación aguda con etanol, sí que se objetiva una mejoría en la analítica cuando se administran 0.3 ml/kg de CCl_4 en rata por via IP en solución oleosa; esta mejoría se localiza fundamentalmente en los niveles de GOT y GPT séricos; estos se reducen ostensiblemente cuando previamente a la intoxicación con CCl_4 se administraba una dosis de 400 mg/kg de peso del extracto acuoso de Opuntia dillenii Haw., en comparación con los niveles plasmáticos encontrados en los animales a los que sólo se les había administrado CCl_4, que eran muy superiores a los animales controles.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Han sido muchos los trabajos realizados sobre el mecanismo lesivo del CCl_4. De acuerdo con la hipótesis más seguida, la causa de las lesiones hepáticas causadas por el CCl_4 radica en el radical libre triclorometil (CCl_3) que deriva de la metabolización por el citocromo P-450 del CCl_4 (Zimmerman, 1978).

El incremento de los niveles séricos de ciertas enzimas, particularmente de la GOT y de la GPT, bajo la influencia del CCl_4 ha sido atribuida a una alteración o lesión a nivel de la integridad estructural del hígado (Chenoweth y Hake, 1962). La elevación de las concentraciones séricas de la gamma-glutamil transferasa es aceptada mayoritariamente como uno de los índices más sensibles de la existencia de un daño hepático (Szczeklik *et al.*, 1961). Sin embargo, Rees y Sinha (1960), afirman que no sólo con el examen de las enzimas séricas se puede establecer la extensión de las lesiones hepáticas en la rata.

El extracto acuoso, administrado previamente a la administración del CCl_4, parece preservar la integridad estructural de la membrana celular del hepatocito, lo cual es evidente por la reducción de los niveles de GOT y GPT que se incrementan tras la administración de CCl_4.

La síntesis de protrombina principalmente tiene lugar en el hígado, por tanto cualquier fármaco o sustancia que dañase la estructura o el

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

funcionamiento normal del hígado podría provocar una prolongación del tiempo de protrombina (Chandan *et al.*, 1991). En nuestros estudios realizados con el EAOD para observar el tiempo de coagulación, no se observó ningún incremento significativo del tiempo de coagulación global según el método de Lee-White (descrito por Caen *et al.*, 1977). En caso de verse alterada la síntesis de protrombina, así como la de los factores de la coagulación sintetizados a nivel hepático, el tiempo de coagulación se incrementaría de forma ostensible, cosa que no se observa en nuestros experimentos, con lo que concluimos que el EAOD no posee toxicidad hepática a este nivel, es más, en vista de la reducción de las transaminasas observado en nuestros experimentos, cabría pensar en un posible efecto hepatoprotector.

Existe un conocimiento ampliamente extendido en la medicina tradicional transmitido de forma oral y recogido en algunas referencias escritas (Juscafresca, 1975; Font Quer, 1983; Pérez de Paz *et al.*, 1988), que atribuye propiedades "astringentes" o antidiarréicas a los frutos de diversas especies de plantas del género Opuntia (*Opuntia ficus indica Mill., Opuntia dillenii Haw.*).

Muy escasos son los trabajos estrictamente científicos relacionados con los efectos de las betalaínas sobre la musculatura lisa intestinal. En este sentido, Nagase *et al.* (1975) e Ikekita *et al.* (1979) estudiaron el efecto de un

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

extracto acuoso obtenido de la remolacha roja sobre el íleon de cobaya. Estos autores encontraron en la remolacha (*Beta vulgaris L. var. rapa Dumont f. rubra DC*) una sustancia, no identificada entonces, que poseía una potente actividad anti-bradicinina. Además también tenía un efecto inhibitorio sobre el músculo liso del íleon del cobaya estimulado con serotonina o histamina. Esta es una de las especies del orden Centrospermae más ricas en betacianinas.

Recientemente Fernández (1989), en su tesis doctoral, observa que existe una clara relación entre la dosis del extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw. administrado y el efecto inhibitorio que este manifestaba sobre la actividad mecánica espontánea del yeyuno de conejo. Se conseguía una inhibición casi total de la amplitud de las contracciones espontáneas con una dosis de 0.8 mg/ml, que se mantenía durante un tiempo aproximado de 6-8 min tras los cuales se producía una recuperación espontánea de la motilidad intestinal. Ensayos adicionales permitieron a este autor observar cómo la inhibición de la actividad motora del intestino producida por el extracto podía revertirse con neostigmina, y que 800 μg/ml de extracto eran capaces de revertir los efectos del ioduro de acetilcolina y del cloruro de bario.

En nuestro estudio sobre la inhibición del tránsito intestinal del carbón vegetal en ratas, se confirman los resultados obtenidos por Fernández (1989)

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

en íleon de conejo, observándose un importante descenso del porcentaje de recorrido para la suspensión de carbón vegetal, incluso para la dosis más pequeña utilizada de 25 mg/kg, siendo máxima esta disminución del recorrido del carbón vegetal para la mayor dosis utilizada (1600 mg/kg), reduciéndose el porcentaje de intestino recorrido por la suspensión de carbón vegetal desde el 65,3%, para los animales control, hasta el 10,5%; obteniéndose para la dosis administrada de atropina un recorrido del 19,3% de la longitud total del intestino delgado. Con estos resultados se ratifican los conocimientos y la sabiduría popular en relación con el uso de los jugos de los frutos de esta planta en el tratamiento empírico de las diarreas.

En estudios cromatográficos en capa fina realizados por Fernández (1989), se descarta la presencia de adrenalina en los extractos de frutos de Opuntia dillenii Haw., por lo que, al tratarse de un extracto rico en betalaínas, nos permite sospechar la responsabilidad de las mismas en los efectos que el EAOD produce a nivel del tránsito intestinal, sin descartar el papel que pudieran jugar el resto de las sustancias presentes en el mismo y que no han sido identificadas en el presente trabajo.

En los resultados obtenidos en el estudio de la analgesia en la cola de la rata mediante analgesímetro de foco de calor se observa cómo para las dosis de 1600 mg/kg, a los 15 y 30 minutos de haber administrado el extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw. por via IP, se produce un efecto

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

analgésico de cierta consideración.

El efecto analgésico sobre estímulos dolorosos químicos (inyección de ácido acético para observar el retorcimiento del animal al ser inyectado intraperitonealmente) y sobre estímulos dolorosos térmicos (foco calorífico en la cola) son característicos de los analgésicos centrales como la morfina, mientras que los analgésicos periféricos (paracetamol, ácido acetilsalicílico) se sabe que son inactivos frente al estímulo doloroso provocado por el calor (Lanhers *et al.*, 1991). Según este criterio podríamos concluir que el EAOD exhibe propiedades de un analgésico de acción central, teniendo en cuenta que habría que realizar experimentos para objetivar el posible efecto analgésico frente a estímulos dolorosos químicos

El test más ampliamente utilizado para el estudio de los agentes antiinflamatorios no esteroideos es la medición de la habilidad del compuesto para reducir el edema local inducido en la pata de rata mediante la inyección de un irritante como la carragenina (Winter *et al.*, 1962). Este edema depende de la participación de cininas y los leucocitos polimorfonucleares con sus factores de la inflamación incluyendo las prostaglandinas (Damas *et al.*, 1986). Durante los procesos de inflamación se produce un característico sostenido incremento de la permeabilidad capilar, incrementándose por tanto la exudación de proteínas plasmáticas (Sen *et al.*, 1991).

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

En los estudios del efecto antiinflamatorio en los procesos de inflamación aguda inducida mediante carragenina en la pata de rata, permitió descubrir que con la dosis más alta utilizada (400 mg/kg) del extracto se produce un efecto inhibitorio aunque de escasa intensidad, y que sólo se mantiene durante las primeras horas tras la administración del agente flogístico, mientras que con la fenilbutazona se produce un descenso del diámetro desde los primeros momentos, que va aumentando en el tiempo. De los resultados del presente estudio se deduce que el extracto de frutos de Opuntia dillenii Haw. presenta una inhibición de la exudación de proteínas plasmáticas, presumiblemente ejerciendo una influencia inhibitoria de la permeabilidad capilar, al mismo tiempo que también se inhibe la migración de leucocitos al área inflamada.

La potencia relativa de la adrenalina, noradrenalina e isoprenalina necesaria para relajar la traquea aislada de cobaya según Foster (1966) sería en orden descendente isoprenalina > adrenalina > noradrenalina. De acuerdo con Ahlquist (1948 y 1966) este orden indica una estimulación de los receptores β. Persson y Johnson (1970) realizaron el bloqueo de los receptores β con propranolol, causando la adrenalina y la noradrenalina una contracción de la musculatura traqueal. En este caso la potencia relativa de los diferentes compuestos en orden descendente fue: adrenalina > noradrenalina > isoprenalina, indicando la estimulación de un receptor α. El pretratamiento con agentes bloqueantes de los receptores α y β antagoniza el efecto

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

constrictor de la adrenalina y de la noradrenalina. Este doble efecto de la adrenalina y noradrenalina en la traquea aislada de cobaya puede explicarse por el efecto de estos agentes sobre diferentes receptores adrenérgicos: una relajación debido a la estimulación de los receptores β y una contracción debido a la estimulación de los receptores α, siendo dominantes los β-receptores.

Van Amsterdam *et al.* (1989) demostraron que la aparente afinidad, y el efecto relajante máximo de la isoprenalina en el antagonismo funcional de la contracción del músculo liso traqueal debido a los agonistas de los receptores histamínicos y colinérgicos, depende fuertemente de la naturaleza y de la concentración del agonista contráctil y no del nivel de contracción *per se*.

Se sabe que los agonistas β-adrenérgicos llegan a ser menos efectivos en el tratamiento del asma en los episodios asmáticos más severos (Bouhuys, 1978; Barnes y Pride, 1986). Este fenómeno podría explicarse tras la observación de que la potencia y el grado de relajación inducida en varias preparaciones de vías aéreas aisladas con agonistas β-adrenérgicos, se reduce gradualmente en presencia de concentraciones crecientes de agonistas contráctiles o mediadores involucrados en la reacción asmática, como pueden ser los agonistas muscarínicos, la histamina, serotonina y leucotrienos D_4. La pérdida de relajación fue más prominente para los agonistas muscarínicos,

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

acetilcolina y metacolina y menor para la histamina, serotonina y leucotrienos D_4 (Russell, 1984; Torphy, 1984).

El mecanismo bioquímico del antagonismo funcional está todavía sin aclarar. Un lugar para la interacción entre la via que provoca contracción y relajación en el músculo liso de la via aérea, podría radicar a nivel de los procesos de acumulación del adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc). Ha sido demostrado que los estímulos contráctiles, tales como los inducidos por la acetilcolina, pueden causar inhibición de la adenilatociclasa mediante una proteína reguladora de carácter inhibidor dependiente del nucleótido guanina (G_i) (Jones *et al.*, 1987) la cual podría antagonizar la estimulación de la adenilato ciclasa por los agonistas β-adrenérgicos, estando el último proceso mediado por una proteína reguladora estimuladora (G_s).

En los resultados obtenidos tras la realización de los experimentos en musculatura lisa traqueal de cobaya se objetiva para las dosis más altas del extracto un efecto bloqueante del carbacol, con lo que mejoraría una posible broncoconstricción en estudios *in vivo*, lo cual confirmaría la creencia de la medicina popular acerca del efecto beneficioso que provoca la ingestión de zumos de frutos de Opuntia dillenii Haw. sobre patologías traqueobronquiales ("tosferina"). Dudamos que el efecto relajante a nivel de la musculatura lisa traqueal esté mediado por la estimulación de los receptores β adrenérgicos y, más bien, nos inclinamos a pensar en la posibilidad de que este efecto sea

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

debido al bloqueo de los receptores colinérgicos o serotoninérgicos, aunque este bloqueo parece ser escasamente duradero, revertíendo al aumentar la dosis del agonista, por lo que estaríamos hablando de un antagonismo competitivo.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

CONCLUSIONES

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

5.-*CONCLUSIONES*

1ª.- Del estudio toxicológico realizado, se deduce que el extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw. no es letal a la dosis máxima utilizada, existiendo una escasa toxicidad que se manifiesta como aturdimiento del animal.

2ª.- El extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw., reduce de forma significativa los valores de transaminasas (GOT y GPT) en animales en los que se ha inducido una hepatitis con tetracloruro de carbono. Asimismo, no provoca alteraciones del tiempo de coagulación, lo que induce a pensar en la inexistencia de toxicidad hepática

3ª.- La sustancia objeto del estudio posee efecto analgésico, y así, a la dosis de 400 mg/kg, posee un efecto analgésico similar al producido por una dosis de 30 mg/kg de metamizol magnésico administrado por via intraperitoneal.

4ª.- El extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw. a dosis bajas favorece la coordinación motora; a dosis altas tiene un efecto inhibidor de la misma.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

5ª.- La administración del extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw. reduce de forma importante la motilidad intestinal, disminuyendo el tránsito intestinal de carbón vegetal.

6ª.- De los estudios bioquímicos realizados en sangre se desprende que la administración del extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw. no provoca alteraciones significativas de los parámetros estudiados.

7ª.- A dosis altas, el extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw. provoca una ligera disminución de la glucemia cuando se administra a animales sanos.

8ª.- El efecto antiinflamatorio que se presenta con las dosis más elevadas del extracto es de escasa intensidad y duración.

9ª.- El extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii Haw. antagoniza el efecto del carbacol a nivel de la musculatura lisa bronquial, confirmando su utilidad en el tratamiento de afecciones traqueobronquiales, como bien señala la medicina tradicional canaria.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

BIBLIOGRAFIA

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

ADAMS, J.P., von ELBE, J.H. y AMUNDSON, C.H. (1976). Production of a betacyanine concentrate by fermentation of red beet juice with *Candida utilis*. Journal of Food Science, 41:78-81.

ADAMS, J.P. y von ELBE, J.H. (1977). Betanine separation and quantification by chromatography on gels. Journal of Food Science, 42(2):410-414

AGUWA, C.N. (1986). Pharmacologic effects of an aqueous extract of *Rhigiocarya racemifera*. Journal of Ethnopharmacology. 15:145-151.

AHLQUIST, R.P. (1948). A study of the adrenotropic receptors. Amer. J. Physiol., 153:586-599.

AHLQUIST, R.P. (1966). The adrenergic receptor. J. Pharm. Sci., 55:359-367.

AKÇASU, A. (1959). The physiologic and pharmacologic characteristics of the tracheal muscle. Arch. int. pharmacodyn., CXXII (1-2):201-207.

ANAND, K.K., SINGH, B., CHAND, D. y CHANDAN, B.K. (1992). An evaluation of *Lawsonia alba* extract as hepatoprotective agent. Planta Med., 58:22-25.

ANSARI, R.A., TRIPATHI, S.C., PATNAIK, G.K. y DHAWAN, B.N. (1991). Antihepatotoxic properties of picroliv: an active fraction from rhizomes of *Picrorhiza kurrooa*. Journal of Ethnopharmacology, 34:61-68.

ARONOFF, S. y ARONOFF, E.M. (1948). Thermal degradation of dehydrated beets-II. Chromatography separation of red beet- root pigments. Food Research, 13:59-65.

ATTOE, E.L. y von ELBE, J.H. (1981). Photochemical degradation of bet anine and selected anthocyanins. Journal of Food Science, 46(6):1934-1937.

ATTOE, E.L. y von ELBE, J.H. (1982). Degradation of betanine in solutions as influenced by oxigen. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 30(4):708-712.

ATTOE, E.L. y von ELBE, J.H. (1984). Oxygen involvement in betanin degradation. Z Lebensm Unters Forsch, 179:232-236.

BALAZS, T. (1970). Measurement of acute toxicity in Methods in Toxicology.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

Paget. Blackwell Scientific Publications. Great Britain.

BARNES, P.J. y PRIDE, N.B. (1986). Dose response curves to inhaled β-adrenoceptor agonists in normal and asthmatic subjects. Br. J. Pharmacol., 15:677-685.

BARZ, W. y HOSEL, W. (1975). Metabolism of flavonoids. En: The Flavonoids. Ed. J.B. Harborne y T.J. Mabry, 17:943.

BAUMGARTNER, R.A., WILLS-KARP, M., KAUFMAN, M.J., MUNAKATA, M. y HIRSHMAN, C. (1990) Serotonin induces constriction and relaxation of the guinea pig airway. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 255:165-173.

BIRCH, A. J. (1963). Biosynthetic pathways. En: Chemical Plant Taxonomy, 6:141-163. Edit. T. Swain, Academic Press.

BLATTNER, R., CLASSEN, H.G., DEHNERT, H. y DÖRING, H.J. (1980). Experiments on isolated smooth preparations. Edit. HSE, Alemania Federal.

BOADA, J., FERIA, M. y ALVAREZ, C. (1981). Efectos de los metabolitos 3-O-metilados de la adrenalina y de la noradrenalina sobre la presión arterial de la rata anestesiada. Archivos de Farmacología y Toxicología, 7(2):231-238.

BOSCH MILLARES, J. (1967). Siglo XVII. La ciudad de Las Palmas en este siglo: enfermedades cuyos remedios se conservan a través de los años. En: Historia de la Medicina en Gran Canaria, 1:215-216. Edit. Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria.

BOSCH MILLARES, J. (1967). Siglo XVIII. La ciudad de Las Palmas en este siglo : otros remedios caseros en el siglo XVIII. En: Historia de la Medicina en Gran Canaria, 1:270- 271. Edit. Excmo. Cabildo Insular de Gran Canaria.

BOUHUYS, A., (1978). Pharmacological basis for refractoriness, in:Status Asthmaticus, ed. E.B. Weiss (University Park Press, Baltimore) p. 49.

BRUHN, J.G. (1975). Pharmacognostic studies of Peyote and related psych oactive cacti. Abstracts of Uppsala Dissertation, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, p. 28-29.

BUCHI, G., FLIRI, H. y SHAPIRO, R. (1978). Synthesis of betalains. Journal of Org. Chem., 43(25):4765-4769.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

BUCKNER, C.K., DEA, D., LIBERATI, N. y KRELL, R.D. (1990). A pharmacologic examination of receptors mediating serotonin-induced bronchoconstriction in the anesthetized guinea pig. The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics, 257(1):26-34.

CADAHIA, A. (1986). Los colorantes en la patología alérgica del adulto. En: Aditivos y patología alergológica. Jornada Internacional de clausura curso 1984-85 de la Sociedad Catalana de Alergia e Inmunología Clínica. Ed. J. Botey y J.Mª. Calzada, Barcelona, 8:77-118.

CAEN J, LARRIEU M-J, SAMANA M. La hemostasia. Métodos de exploración y diagnóstico práctico. Barcelona, Toray-Masson 1977:103-105.

CAO, B.J., MENG, Q.Y. y JI, N. (1992). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Ranunculus japonicus extract*. Planta Medica. 58(6):496-498.

CASTILLO, J.C. y DE BEER, E. (1947). The tracheal chain. I. A preparation for the study of antispasmodics with particular reference to bronchodilator drugs. J. Pharmac. Exp. Ther., 90:104-109.

CHANDAN, B.K., SHARMA, A.K. y ANAND, K.K. (1991). Boerhaavia difussa: a study of its hepatoprotective activity. Journal of Etnopharmacology, 31:299-307.

CHENOWETH, M.B. y HAKE, C.L. (1962). The smaller halogenated alphatic hydrocarbons. Annual Review of Pharmacology, 2:363-398.

COLOMAS, J. y BULARD, C. (1975). Irradiations á faible énergie et biosynthesis d'amarantine chez des plantules *d'Amaranthus tricolor L. var. bicolor ruber Hort.*. Planta, 124:245-254.

COLOMAS, J. (1976). Etude des pigments bélataines chez les plantules *d'Amaranthus tricolor L. var. bicolor ruber Hort.*: mise en évidence de l'amarantine. C. R. Acad. Sc. Paris, 283 (9).

COLOMAS, J. y BULARD, C. (1977). Comportement en culture *in vitro* des tissus de tige de *Myrtillocactus geometrizans (Mart.) Cons. (T.)* et biosynthèse de betalaines. Bull. Soc. Bot. Fr., 124:385-393.

COLOMAS, J. (1977). Separation of betalains using a method based on Sephadex gel column chromatography applied to *Amarantus caudatus L. var. pendula* seedlings. Z. Plazenphysiol. Bd., 85 (3):227-232.

COLOMAS, J., BARTHE, PH y BULARD, C. (1978). Separation and

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

characterization of some betalains synthetized by *Myrtillocactus geometrizans* stem tissues cultivated *in vitro*. Z. Pflanzenphysiol. Bd., 87(4):341-346.

COLOMAS, J. (1984). Effect of a cytokinin antagonist on cytokinin and light-dependent amaranthin synthesis in *Amaranthus tricolor* seedlings. Journal of Plant Growth Regulation, 2:281-287.

COMITE MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS (1976). Evaluación de ciertos aditivos alimentarios. Ginebra, 20° Informe.

COMITE MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS (1984). Food additives data system. FAO-Food and Nutrition paper, 30(1):34.

COMITE MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS (1984). Specifications for identity and purity of food colours. FAO-Food an Nutrition paper, 31(1).

COMITE MIXTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS (1985). Informe de la 18ª Reunión del Comité del Códex sobre aditivos alimentarios. La Haya.

COMITE MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS (1986). Evaluación de ciertos aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos. Ginebra. 29 Informe.

COMPORTI, M. (1978) Ethano-induced liver injury. En: T.F. Slater (Ed.), Biochemical Mechanisms of Liver Injury, Academic Press, London, New York, San Francisco, pp.496-516.

COUTURE, R. (1980). The dog common carotid artery: a sensitive biossay for studing vasodilator effects of substance P and kinins. Can. J. Physiol. Pharmacol., 58:1234-1244.

DAMAS, J., REMACLE-VOLON, G. y DEFLANDRE, E. (1986) Further studies of the mechanism of counter irritation by turpentine. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 332:196-200.

DEL RIO, L. y FERNANDEZ, L. (1986). Anticholinergic and antihistaminic effects of betanine from beetroot (Beta vulgaris) and pryckly pears (Cactus Opuntia fruit) on isolated rabbit and rat jejunum. International Congress on "Attitudes to Toxicology in the E.E.C.". Comunicación

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

DHILLON, A.S. y MAURER, A.J. (1975). Evaluation of betalain pigments as colorants in turkey summer sausages. Poultry Science, 54:1272-1277.

DREIDING, A.S. (1961). En: Recent Develpments in the Chemistry of Natural Phenolic Compounds (W.D. Ollis, ed.), pág. 194, Pergamon Press, Oxford. Citado por MABRY, T.J. (1966). The Betacyanins and Betaxanthins. En: Comparative Phytochemistry. Edit. Swain. pág. 231-244.

DWIVEDI Y., RASTOGI R., SHARMA S.K., GARG N.K. y DHAWAN B.N. (1991). Picroliv affords protection against thioacetamide-induced hepatic damage in rats. Planta Med., 57:25-28.

ELLIOT, D.C. y MURRAY, A.W. (1975). Biochem. J. 146:333- 337. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. The Biochemistry of Plants 7:557-575.

ENDRESS, R. (1979). Evidence for the participation of phenylalaninhydroxilase and a tyrosinase in the accumulation of betacyanin in Portulacca callus. Biochem. Physiol. Pflanzen., 174:17-25.

ENDRESS, R. (1981). Conversion of phenylalanine into tyrosine by Portulacca callus. Plant Physiol., 68:272-274.

ENDRESS, R., JAGER, A. y KREIS, W. (1984). Cathecolamine biosynthesis dependent on the dark in betacyanin-forming Portulacca callus. Journal of Plant Physiology, 115(4):1984.

ESEVERRI, J.L., MARIN, A. y BOTEY, J. (1986). Colorantes en patología alérgica pediátrica. En: Aditivos y patología alergológica. Jornada Internacional de Clausura curso 1984-85 de la Sociedad Catalana de Alergia e Inmunología Clínica. Ed. J. Botey y J. M . Calzada, Barcelona, 10:131-144.

EVERITT, B.J. y CAIRNCROSS, J. (1969). Adrenergic receptors in the guinea-pig trachea. J. Pharm. Pharmac., 21:97-102.

FERNANDEZ, L. (1986). Estudios Farmacocinéticos y Farmacodinámicos de pigmentos extraídos de frutos de Opuntia comparados con los de la *Beta vulgaris var. rubra*. Tesina de Licenciatura. Universidad de La Laguna. Facultad de Medicina.

FERNANDEZ, L. (1989) Cromoalcaloides betalaínicos de *Beta vulgaris var.*

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

rubra y *Opuntia dillenii Haw*. Investigaciones farmacológicas y de estabilidad. Tesis. Universidad de La Laguna.

FERNANDEZ, L. y DEL RIO, I. (1985). Algunas propiedades de los colorantes betalaínicos extraídos de frutos de Opuntia. VI Jornadas Toxicológicas Españolas, Córdoba. Comunicación.

FERNANDEZ, L. y DEL RIO, I. (1987). Efectos dopaminérgicos de pigmentos betalaínicos extraídos de Beta vulgaris y frutos de Opuntia. VII Jornadas Toxicológicas Españolas, Mahón. Comunicación

FISCHER, N. y DREIDING, A.S. (1972). Helv. Chim. Acta 55:649-658. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. The Biochemistry of Plants 7:557-575.

FLEURENTIN, J., HOEFLER, C., LEXA, A., MORTIER, F. y PELT, J.M. (1986). Hepatoprotective properties of *Crepis rueppellii* and *Anisotes trisulcus*: two traditional medicinal plants of yemen. Journal of Ethnopharmacology, 16:105-111.

FONT QUER, P. (1983). Cactáceas. En: Plantas Medicinales. Ed. Labor, S. A., 8ª edición, Barcelona.

FORRAY, GY., VAGUJFALVI, A. y BOLCSKEY, P. (1968). Betaninuria in childhood. Acta Paediatrica Academiae Scientiarum Hungaricae, 9 (1):43-51.

FOSTER, R.W. (1966). The nature of the adrenergic receptors of the trachea of guinea-pig. J. Pharm. Pharmac., 18:1-12.

FRATII, A., ALTAMINARO, E., RODRÍGUEZ, N., ARIZA, R. Y LÓPEZ, R. (1989). Hypoglucemic effect of *Opuntia streptacantha Lemaire*: research with crude extracts. Rev. Archiv. Invest. Méd. (Méx.), 20:321-325.

FRATI, A., DE LEON, C., ARIZA, C.R, BAÑALES, M.B., LÓPEZ, R y LOZOYA, X. (1989). Effect of a dehydrated extract of nopal (*Opuntia ficus indica Mill.*) on blood glucose. Arch. Invest. Med. (Mex.), 20(3):211-216.

FRATI, A., RIOS, U., ARIZA, C.R., ISLAS, S. Y LÓPEZ, R. (1989). Duration of hypoglucemic action of *Opuntia streptacantha Lemaire*. Rev. Archiv. Invest. Méd. (Méx.), 20:297-300.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

FRESEN, P. (1992) Estudio farmacológico y microbiológico del extracto acuoso de frutos de *Opuntia dillenii Haw*. Tesis. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

FUJISAWA, H. y HAYAISHI, O. (1968). J. Biol. Chem. 243:2673. Citado por MABRY, T.J. (1972). The Betalains: structure, function and biogenesis, and the plant order Centrospermae. Structural and functional aspects of Phytochemistry 5:105-133.

FUNAKI, S. (1964). Electrical and mechanical activity of isolated vascular smooth muscle of the rat. Nature, 203 (4941):192-194.

FURCHGOTT, R.F. (1953). Reactions of strips of rabbit aorta to epinephrine, isopropylarterenol, sodium nitrite and other drugs. J. Pharmacol. Exp. Ther., 108:129-143.

GARCIA BARRIGA, H. (1975). Cactaceae. En: Flora Medicinal de Colombia. Botánica Médica. Ed. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional, Bogotá, Colombia, 2:274-284.

GAY, W. I. (1965). Methods of animal experimentation. London, Academic Press, Inc. p. 2-21.

GAYTON, C.A. (1971). Regulación del riego sanguíneo renal y de la intensidad de filtración glomerular. En: Tratado de Fisiología Médica. Edit. Interamericana, cuarta edición, pág.439

GEISSMANN, T.A. y CROUT, D.H.G. (1969). Miscellaneous oxidative processes. The betalains. En: Organic chemistry of secondary plant metabolism. Ed. Freeman, Cooper and Company, San Francisco, California, USA.

HALLE, M. (1938). Passage du pigment de la betterave rouge dans l'urine de l'enfant. Bull. Soc. Pediat. de París, 36:266-269.

HARBORNE, J. B. (1963). Distribution of Anthocyanins in higher plants. En: Chemical Plant Taxonomy. 13:359-387. Edit. T. Swain, Academic Press.

HARBORNE, J.B. (1965). Chemistry of plants pigments. Nature, 208 (5015):1051-1052.

HARBORNE, J.B. (1973). Phenolic compounds. En: Phytochemical Methods, 2:59-66. Ed. Chapman and Hall, Londres.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

HAWKES, J. G. (1968) The assessment of biochemical techniques in Plant Taxonomy. En: Chemotaxonomy and Serotaxonomy II, 20:239. Edit. J. G. Hawkes, Academic Press.

HEGNAUER, R. (1963). The taxonomic significance of alkaloids. En: Chemical Plant Taxonomy, 14:389-427. Edit. T. Swain, Academic Press.

HEGNAUER, R. (1966). Comparative Phytochemistry of Alkaloids. En: Comparative Phytochemistry, 13:211-230. Academic Press.

HEGNAUER, R. (1968). Chemical evidence for the classification of some planta taxa. En: Perspectives in Phytochemistry. Proceedings of the Phytochemical Society Symposium (Cambridge), 6:124. Edit. J. B. Harborne y T. Swain, Academic Press.

HIDEAKI MATSUDA, KEI-ICHI SAMUKAWA y MICHINORI KUBO (1991). Anti-hepatitic activity of Ginsenoside Ro. Planta Med., 57:523-526.

HORHAMMER, L.; WAGNER, H. y FRITZSCHE, W. (1964). Zur Biosynthese der Betacyane I. Biochem. Z. 339:398-400.

HORWITT, M.K. (1933). Observations on behavior of the anthocyan pigment from Concord Grapes in the animal body. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 30:949-953.

HUANG, A.S. y von ELBE, J.H. (1985). Kinetics of the degradation and regeneration of betanine. Journal of Food Science, 50 (4):1115-1120.

IBAÑEZ-CAMACHO, R.; MECKES-LOZOYA, M. y MELLADO-CAMPOS, V. (1983). The hypoglucemic effect of *Opuntia streptacantha* studied in different animal experimental models. Journal of Ethnopharmacology, 7(2):175-181.

IKEKITA, M., MORIYA, H., MORIWAKI, CH. y RURIKAWA, T. (1979). Some properties of anti-bradykinin substance from beet (*Beta vulgaris L. var. rapa Dumort. f. rubra DC.*) roots. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 99 (6):607- 611.

IMPELLIZZERI, G.; PIATTELLI, M. y SCIUTO, S. (1973). Phytochemistry 12:2293-2294. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. The Biochemistry of Plants 7:557-575.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

IRWIN, S. (1968). Comprehensive Observational Assessment: Ia. A system atic, quantitative Procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. Psychopharmacologia (Berl.), 13:222-257.

JAEN OTERO, J. (1984). Nuestras hierbas medicinales. Las Palmas de Gran Canaria, p.62.

JENKINSON, D.H. (1967). The role of alfa and beta adrenergic receptors in some actions of cathecolamines on intestinal smooth muscle. J. Physiol., 188:387-402.

JIMENO, D. (1966). Tiempo de máxima eliminación. En: Valoraciones biológicas. Editado por Paz-Montalvo, Madrid, p. 402-406.

JOHANSSON, B., JONSSON, O., AXELSSON, J. y WAHLSTROM, B. (1967). Electrical and mechanical characteristics of vascular smooth muscle response to Norepinephrine and Isoproterenol. Circulation Research, 21:619-632.

JONES, C.A., MADISON, M., TOM-MOY, M. y BROWN, J.K. (1987). Muscarinic cholinergic inhibition of adenylate cyclase in airway smooth muscle. Am. J. Physiol., 253:97-105.

JUSCAFRESCA, B. (1975). *Opuntia ficus indica*. En: Flora medicinal, tóxica, aromática y condimenticia. Edit. Dedos, Barcelona, p. 359.

KAIMAN, H. y SHIBATA, S. (1978). Calcium influx and spontaneous phasic contractions of portal veins after treatment with reserpine, 6-OH-dopamine and cocaine. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 56:199-201. Citado por ZOSTER, TH. y CHURCH, J. (1983). Calcium antagonists: Pharmacodynamic effects and mechanism of action. Drugs, 25:93-112

KAMANI H., TENNEKOON S. y JEEVATHAYAPARAN (1991). Possible hepatotoxicity of *Nigella sativa* seeds and *Dregea volubilis* leaves. Journal of Ethnopharmacology, 31:283-289.

KARAKI, H. y WEISS, G.B. (1984). Calcium channels in smooth muscle. Gastroenterology, 87:960-970

KEITH, J., MORRISON y VANHOUTTE P. Inhibition og airway smooth muscle tone by a phorbol ester in the guinea pig trachea: role of epithelium and receptor reserve of the contractile agent.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

KIMLER, L., LARSON, R.A., MESSENGER, L., MOORE, J.B. y MABRY, T.J. (1970). Betalamic acid, a new naturally occurring pigment. Chemical Communications, 12:1329-1330.

KOPELMAN, I.J. y SAGUY, I. (1977). Color stability of beet powders. Journal of Food Process and Preservation, 1:217-224.

KOPELMAN, I.J. y SAGUY, I. (1977). Drum dried beet powder. Journal of Food Technology, 12:615-621.

KRANTZ, C., MONIER, M. y WAHLSTROM, B. (1980). Absorption, excretion, metabolism and cardiovascular effects of beetroot extract in the rat. Food Cosmet. Toxicol., 18:363-366.

KRYZ, F. (1920). Oesterr. Chem. 23:55-56. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. The Biochemistry of Plants 7:557-575.

LANHERS, M., FLEURENTIN, J., DORFMAN, P., MORTIER, F. y PELT, J. (1991). Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory properties of *Euphorbia hirta*. Planta Medica 57(3):225-231.

LANHERS, M.C:, JOYEUX, M., SOULIMANI, R., FLEURENTIN, J. SAYAG, M, MORTIER, F. YOUNOS, C., y PELT, J.M. (1991). Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a traditional medicinal plant of Chile, *Peumus boldus*. Planta Med., 57:110-115.

LEMPKA, A. y KRAUZE, A. (1970). Separation of pigments of the red beet on polyamide columns. Chem. Abstr. Biochemical Methods, 75:126-139.

LIEBER, C.S. (1977) Pathogenesis of alcoholic liver disease, an overview. En: M.M. Fischer and J.G. Rankin (Eds.), Alcohol and the liver, Plenum Press, New York, London, pp. 197-256.

LIEBISCH, H.W., MATSCHINER, B. y SCHUETTE, H.R. (1969). Z. Pflanzenphysiol. 61:269. Citado por MABRY, T.J. (1972). The Betalains: structure, function and biogenesis, and the plant order Centrospermae. Structural and functional aspects of Phytochemistry 5:105-133.

LINDSTEDT, G. (1956). Electrophoresis of the red beet pigments. Acta Chem. Scand., 10(4):698-699.

LUSAS, E.W., RICE, A.C. y WECKEL, K.G. (1960). Changes in the color

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

of canning beets. Univ. Wis. Res. Bull, 218:1-16.

LUTTERODT, G.D. (1992). Inhibition of Microlax-induced experimental diarrhoea with narcotic-like extracts of *Psidium guajava* leaf in rats. Journal of Ethnopharmacology, 37:151-157.

MABRY, T.J. (1966). The Betacyanins and Betaxanthins. En: Comparative Phytochemistry. Edit. Swain, Academic Press, 14:231-245.

MABRY, T.J. (1970). En: Chemistry of the Alkaloids. Ed. T. Swain, Academic Pres, N.Y., p. 21.

MABRY, T.J. y DREIDING, A.S. (1968) The betalains. Recent Advances in Phytochemistry, 1:145-160.

MABRY, T.J., KIMLER, L. y CHANG, CH. (1972). The betalains: structure, function and biogenesis, and the plant order Centrospermae. Structural and functional aspects of Phytochemistry. Advances in Phytochemistry, 5:105-133.

MABRY, T.J.; TAYLOR, A. y TURNER, B.R. (1963). Phytochemistry 2:61-64. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. The biochemistry of Plants 7:557-575.

MABRY, T.J. y TURNER, B.L. (1964). Chemical investigations of the Batidaceae. Betaxanthins and their systematic implications. Taxon, 13:197-200.

MABRY, T.J.; WYLER, H.; SASSU, G. y DREIDING, A.S. (1962). Helv. chim. acta 45:640. Citado por MABRY, T.J. (1966). The Betacyanins and Betaxanthins. En: Comparative Phytochemistry. Edit. Swain, Academic Press, pág. 231-245.

MANSOUR, S. y DANIEL, E.E. (1987). Responsiveness of isolated tracheal smooth muscle from normal and sensitized guinea pigs. Canadian Journal of Physiology and pharmacology 65(9):1942-1950.

MARIN, A.; ESEVERRI, J.L. y BOTEY, J. (1985). Conservantes en patología alérgica. En: Aditivos y patología alergológica. Jornada Internacional de clausura curso 1984-85 de la Sociedad Catalana de Alergia e Inmunología Clínica. Edit. J. Botey y J.Mª Calzada, Barcelona, 9:121.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

MATHESON, A. (1936). Anthocyaninuria. American Journal of diseases of children, 51:226.

MILLER, H.E.; ROSLER, H.; WOHLPART, H. y DREIDING, A.S. (1968). Helv. Chim. Acta 51:1470. Citado por MABRY, T.J. (1972). The Betalains: structure, function and biogenesis, and the plant order Centrospermae. En: Structural and functional aspects of Phytochemistry 5:105-133.

MINALE, L., PIATTELLI, M. y NICOLAUS, R.A. (1965). Pigments of Centrospermae-IV. On the biogenesis of indicaxanthin and betanin in *Opuntia ficus indica Mill.*. Phytochemistry, 4:593- 597.

MINALE, L., PIATTELLI, M., DE STEFANO, S. y NICOLAUS, R.A. (1966). Pigments of Centrospermae-VI. Acylated betacyanins. Phytochemistry, 5:1037-1052.

MUCCITELLI, R.M., TUCKER, S.S., HAY, D.W., TORPHY, T.J. y WASSERMAN, M.A. (1987). Is the guinea pig trachea a good *in vitro* model of human large and central airways? Comparison on leukotriene-, methacholine-, histamine- and antigen-induced contractions. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 243(2):467-473.

MURAYAMA, M., MORI, T. BANDO, H. y AMIYA, T. (1991). Studies on the constituents of Aconitum species. IX: The pharmacological properties of pyro-type aconitine alkaloids, components of processed aconite powder 'kako-bushi-matsu': analgesic, antiinflammatory and acute toxic activities. J. of Ethnopharmacology 35(2):159-164.

NAGASE, H., HOJIMA, Y., MORIWAKI, CH. y MORIYA, H. (1975). Anti-bradykinin activity found in beet (*Beta vulgaris L. var. rapa Dumort. f. rubra DC*). Chem. Pharm. Bull., 23 (5):971- 979.

NERI, F. (1979) Sanos y jóvenes con las plantas medicinales. Editorial De Vecchi. Barcelona.

NILSSON, T. (1970). Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris L. ssp. vulgaris var. rubra L.*). Lantbrukshogskolans Annaler, 36:179-219.

PAGET, G.E.(1970). Methods in toxicology. Blackwell Scientific publications. England. p. 61-63

PASCH, J.H., von ELBE, J.H. (1975). Betanine degradation as

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

BIBLIOTECA GENERAL UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

influenced by water activity. Journal of Food Science, 40:1145-1146.

PASCH, J.H., von ELBE, J.H. y SELL, R.J. (1975). Betalains as colorants in dairy products. Journal Milk Food Technology, 38(1):25-29.

PASCH, J.H. y von ELBE, J.H. (1979). Betanine stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants or sequestrants. Journal of Food Science, 44(1):72-74.

PEREZ ARBELAEZ, E. (1946). Plantas útiles de Colombia. Ed. Imprenta Nacional, Bogotá, Colombia.

PEREZ DE PAZ, P.L., MEDINA M., I. (1988). Catálogo de Plantas Medicinales de la Flora Canaria (aplicaciones populares). Edit. Viceconsejería de Cultura y Deportes del Gobierno de Canarias e Instituto de Estudios Canarios, La Laguna, Tenerife.

PERFUMI, M., ARNOLD, N. y TACCONI, R. (1991). Hypoglycemic activity of *Salvia fructicosa* Mill. from Cyprus. Journal of Ethnopharmacology, 34:135-140.

PERSSON, H. y JOHNSON, B. (1970). Adrenergic receptors in the guinea pig trachea and lung. Acta pharmacol. et toxicol., 28:49-56.

PETERSON, R.G. y JOSLYN, M.A. (1959). The red pigment of the root of the beet (*Beta vulgaris*) as a pyrrole compound. Agricultural Chemistry, 14:429-441.

PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. The Biochemistry of Plants 7:557-575.

PIATTELLI, M. y IMPERATO, F. (1969). Pigments of Centrospermae-IX. Betacyanins of the family Cactaceae. Phytochemistry, 8:1503-1507.

PIATTELLI, M. y IMPERATO, F. (1971). Betacyanins of some Chenopodiaceae. Phytochemistry, 10:3133-3134.

PIATTELLI, M. y MINALE, L. (1964). Pigments of Centrospermae-II. Distribution of betacyanins. Phytochemistry, 3:547- 557.

PIATTELLI, M. y MINALE, L. (1964). Pigments of Centrospermae-I. Betacyanins from *Phyllocactus Hkybridus Hort.* and *Opuntia ficus indica Mill.*. Phytochemistry, 3:307-311.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

PIATTELLI, M., MINALE, L. y NICOLAUS, R.A. (1965). Pigments of Centrospermae-V. Betaxanthins from *Mirabilis jalapa L.* Phytochemistry, 4:817-823.

PIATTELLI, M., MINALE, L. y PROTA, G. (1964). Isolation, structure and absolute configuration of indicaxanthin. Tetrahedron, 20:2325-2329.

PIATTELLI, M., MINALE, L. y PROTA, G. (1965). Pigments of Centrospermae-III. Betaxanthins from *Beta vulgaris L.* Phytochemistry, 4:121-125.

PLAA, G.L. y HEWITT, W.R. (1982) Quantitative evaluation of indices of hepatotoxicity. En: G.L. Plaa and W.R. Hewitt (Eds.), Toxicology of the Lyver, Raven Press, New York, pp. 103-120.

POLI, A., NICOLAU, M., OLIVEIRA, C.M., RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. y ZANIN, M. (1992). Preliminary pharmacologic evaluation of crude whole plant extracts of *Elephantopus scaber*. Part I: in vivo studies. Journal of Ethnopharmacology, 37:71-76.

POOLE, M.W. (1927). Anthocyaninuria. American Journal Diseases Children, 33:784-785.

PORATH, J. y FLODIN, P. (1959). Gel filtration: a method for desalting and group separation. Nature, 183(4676):1657- 1659.

PORTOLANO, N. (1962). Il fico D'India. Ed. Edizioni Calderini, Bologna, Italia.

POWRIE, W.D., FENNEMA, O. (1962). Electrophoresis separation of beet pigments. Journal Food Science, 28:214-220.

PUCHER,G.W., CURTIS, L.C. y VICKERY, H.B. (1938). The red pigment of the root of the beet (*Beta vulgaris*).I. The preparation of betanin. Journal Biol. Chem, 123:61-70.

PUCHER, G.W., CURTIS, L.C. y VICKERY, H.B. (1938). The red pigment of the root of the beet (*Beta vulgaris*).II. A method to determine betanin. Journal Biol. Chem., 123:71-75.

RAUH, W. y REZNIK, H. (1961). Bot. Jahrb. 81:94-105. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. The Biochemistry of Plants 7:557-575.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

REES, K.R., SINHA, K.P. (1960) J. Pathol. Bacteriol. 80:47-56.

REZNIK, H. (1957). Planta 49:406-434. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. The Biochemistry of Plants 7:557-575.

RIBEREAM, P. y GAYON, (1972). Conspectus of the Phenolic Constituents. En: Plant Phenolics, 1:1-22. Edit. V. H. Heywood. Oliver y Boyd (Edinburgh).

RIBEREAM, P. y GAYON, (1972). Chemistry of Phenols. Application to Natural Products. En: Plant Phenolics, 2:23-53. Edit. V. H. Heywood. Oliver and Boyd (Edinburgh).

RIBEREAM, P. y GAYON, (1972). The Anthocyanins. En: Plant Phenolics, 6:135-168. Edit. V. H. Heywood. Oliver and Boyd (Edimburgh).

ROMAN R., FLORES J.L. PARTIDA G., LARA A. y ALARCON F. (1991). Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. Arch. Invest. Med. Jan-Mar. 22(1):87-93

ROSLER, H., ROSLER, U., MABRY, T.J. y KAGAN, J. (1966). The flavonoid pigments of *Opuntia lindheimeri*. Phytochemistry, 5:189-192.

RUSSELL, J.A. (1984). Diferential inhibitory effect of isoproterenol on contractions of canine airways. J. Appl. Physiol., 57:801-809.

SAGUY, I. (1979). Thermostability of red beet pigments (betanin and vulgaxanthin I): influence of pH and temperature. Journal of Food Science, 44:1554-1555.

SAGUY, I., KOPELMAN, I.J. y MIZRAHI,S. (1980). Computeraided prediction of beet pigment (betanin and vulgaxanthin I) retention during air-drying. Journal of Food Science, 45:230-235.

SAGUY, I., KOPELMAN, I.J. y MIZRAHI, S. (1978). Computer- aided determination of beet pigments. Journal of Food Science, 43:124-127.

SAGUY, I., KOPELMAN, I.J. y MIZRAHI, S. (1978). Thermal kinetic degradation of betanin and betalamic acid. Journal Agric. Food Chem., 26(2):360-362.

SAGUY, I., MIZRAHI, S. y KOPELMAN, I.J. (1978). Mathematical approach for the determination of dyes concentration in mixtures. Journal of Food Science, 43:121-134.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

SAINT BLANQUAT, S. (1988). Colores alimentarios. En: Aditivos y auxiliares de fabricación en las Industrias Agroalimentarias. Edit. Acribia, Zaragoza, p. 275-297.

SALDANHA, P.H., FORTA-PESSOA, O. y PEIXOTO, L. (1962). On the genetics of betanin excretion. The Journal of heredity, 53:296-298.

SALDANHA, P.H., MAGALAHAES, L.E. y HORTA, W.A. (1960). Race differences in the ability to excrete beetroot pigment (betanin). Nature, 187:806.

SAVOLAINEN, K. y KUUSI, T. (1978). The stability properties of Golden beet and Red beet pigments: influence of pH, temperature and some stabilizers. Z. Lebensm. Unters-Forsch, 166:19-22.

SCHILD, H.O. (1947). pA, a new scale for the measurement of drug antagonism. Brit. J. Pharmacol., 2:189-206.

SCHUDEL, G. (1918). Ph.D. Dissertation. Zurich-ETH. Citado por MABRY, T.J. (1968). The betalains. Recent advances in phytochemistry, 1:145-160.

SCHWARTZ, S.J., HILDENBRAND, B.E. y Von ELBE, J.H. (1981). Comparison of spectrophotometric and High Performance Liquid Chromatography methods to quantify betacyanins. Journal of Food Science, 46(1):296-297.

SCHWARTZ, S.J. y Von ELBE, J.H. (1980). Quantitative determination of individual betacyanin pigments by High Performance Liquid Chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 28(3):540-543.

SCHWARTZ, S.J. y Von ELBE, J.H. (1983). Identification of betanin degradation products. Z. Lebensm Unters Forsch, 176:448-453.

SCHWARTZ, S.J. y Von ELBE, J.H. (1983). Inhability of red beet betalain pigments to initiate or promote hepatocarcinogenesis. Food Chemical Toxicology, 21(5):531-535.

SCIUTO, S., ORIENTE, G. y PIATTELLI, M. (1972). Betanidin glucosylation in *Opuntia dillenii*. Phytochemistry, 11:2259- 2262.

SEN, T. y NAG, A. (1991). Antiinflammatory evaluation of a *Pluchea indica* root extract. J. of Ethnopharmacology, 33(1-2):135-141.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

SINGLETON, V.L. (1972). Common plant phenols other than anthocyanins, contribution to coloration and discolorations. En: The Chemistry of plant pigments. Ed. C. O. Chichester, Academic Press.

SLATER, T.F. (1978) Biochemical studies on liver injury. En: T.F. Slater (Ed.), Biochemical Mechanisms of Liver Injury, Academic Press, London, New York, San Francisco, pp. 1-44.

SOSNOVA, V. (1970). Biol. Plant. 12:425-427. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. The Biochemistry of Plants 7:557-575.

SPERELAKIS, N. (1959). Mechanical and electrical activity in intestinal smooth muscle. Am. J. Physiol, 196:850-856.

STENLID, G. (1976). Physiological effects of betalains upon higher plants. Phytochemistry, 15:661-663.

STRACK, D. y REZNIK, H. (1979). High Performance Liquid Chromatographic analysis of betaxanthins in Centrospermae (Caryophyllales). Z. Pflanzenphysiol. Bd., 94(2):163-167.

STRACK, D., ENGEL, U. y REZNIK, H. (1981). High Performance Liquid Chromatography of betalains and its application to pigment analysis in Aizoaceae and Cactaceae. Z. Pflanzenphysiol. Bd., 101(3):215-222.

SWAMY, V.C. (1971). Alfa adrenergic blocking agents. En: Screening methods in Pharmacology, 2(1):9. Editado por Robert A. Turner y Peter Hebborn. Academic Press, Inc.

SZCZEKLIK, E., ORLOWSKI, M. y SZEWESUK, A. (1961). Serum gamma glutamyl peptidase activity in liver disease. Gastroenterology, 41:353-359.

TAYFUN BERKAN, LEVENT ÜSTÜNES, FERZAN LERMIOGLU y ASLI ÖZER (1991). Antiinflammatory, analgesic, and antipyretic effects of an aqueous extract of *Erythraea centaurium*. Planta Med., 57(1):34-37.

TIMBERLAKE, C.F. y BRIDLE, P. (1975). The anthocyanins. En: The flavonoids,5:230.Ed. J.B. Harborne.Chapman and Hall (Londres).

TITS, M., DAMAS, J., QUETIN-LECLERCQ, J. y ANGENOT, L. (1991). From ethnobotanical uses of *Strychnos henningsii* to antiinflammatories, analgesics and antispaamodics. Journal of Ethnopharmacology, 34:261-267.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

TORPHY, T.J. (1984). Differential relaxant effects of isoproterenol on methacholine- versus leukotriene D_4-induced contraction of guinea-pig trachea. European J. Pharmacol., 102:549-557.

TOUCHSTONE,J.C. y DOBBINS, M.F. (1983). Practice of thin layer chromatography, 2ª edición. Edit. John Wiley, N.Y.

TRONCHET (1968). Citado por MABRY, T.J. (1972). The Betalains: structure, function and biogenesis, and the plant order Centrospermae. En: Structural and functional aspects of Phytochemistry 5:105-133.

VAN AMSTERDAM, R.G.M., MEURS, H., BROUWER, F., POSTEMA, J.B., TIMMERMANS, A. y ZAAGSMA, J. (1989). Role of phosphoinositide metabolism in functional antagonism of airway smooth muscle contraction by β-adrenoceptor agonists. European Journal of Pharmacology, 172:175-183.

VAN ROSSUM, J.N. (1963) Cumulative dose-response curves. II. Techniques for the making of dose-response curves in isolated organs and evaluation of drug parameters. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 143:299-315.

VERGERONT, T.A., Von ELBE, J.H. y AMUNDSON, C.H. (1980). Large scale isolation of betalains by gel filtration. Process Biochemistry, 15:2-6.

VIERA Y CLAVIJO, J. (1982). Diccionario de Historia Natural de Las Islas Canarias. Ed. Excma. Mancomunidad de Cabildos de Las Palmas.

VINCENT, K. R., SCHOLZ, R. G. (1978). Separation and quantification of red beets betacyanins and betaxanthins by High Performance Liquid Chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 26(4):812-816.

VON ELBE, J.H. (1977). The betalaines. En: Current aspects of Food Colorants, p. 29-39. Ed. T. E. Furia, CRC Press Inc., Cleveland.

VON ELBE, J.H., HUY, SY., MAING, I. y GABELMAN, W.H. (1972). Quantitative analysis of betacyanins in red table beets (*Beta vulgaris*). Journal of Food Science, 37:932-934.

VON ELBE, J.H., KLEMENT, J.T., AMUNDSON, C.H., CASSENS, R.G. y LINDSAY, R.C. (1974). Evaluation of betalain pigments as sausage colorants. Journal of Food Science, 39:128-132.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

VON ELBE, J.H. y MAING, I.Y. (1973). Betalains as possible food colorants of meat substitutes. Cereal Science Today, 18 (9):263-317.

VON ELBE, J.H., MAING, I.Y. y AMUNDSON, C.H. (1974). Color stability of betanin. Journal of Food Science, 39:334-337.

VON ELBE, J.H., PASCH, J.H. y ADAMS, J.P. (1974). Betalains as food colorants. Proceedings of the IV International Congress of Food Science and Technology, 1:485-492.

VON ELBE, J.H. y SCHWARTZ, S.J. (1981). Absence of mutagenic activity and a short-term toxicity study of beet pigments as food colorants. Arch. Toxicology, 49:93-98.

VON ELBE, J.H., SCHWARTZ, S.J. y HILDENBRAND, B.E. (1981). Los and regeneration of betacyanin pigments during processing of red beets. Journal of Food Science, 46 (6):1713-1715.

WATSON, W. C. (1964). The metabolism of betanin. Biochemical Journal, 90:3.

WATSON, W. C., LUKE, R. G. e INALL, J. A. (1963). Beeturia: its incedence and a clue to its mechanism. British Medical Journal, 2:971-973.

WILCOX, M. E. , WYLER, H. y DREIDING, A. S. (1965). Stereochemie von betanidin und isobetanidin. Helvetiva Chimica Acta, 45(5):1134-1147. Citado por NILSSON, T. (1970). Studies into the pigments in beetroot. Annaler Lantbrukshögskolans, 36:179-219.

WYLER, H. y DREIDING, A.S. (1959). Darstellung und abbauprodukte des Betanidins. Über die konstitution des Randenfarbstoffes Betanin. Helv. chim. acta 42(2):1699-1702. Citado por NILSSON, T. (1970). Studies into the pigments in beetroot. Lantbrukshögskolans annaler, 46:179-219.

WYLER, H.; MABRY, T.J. y DREIDING, A.S. (1963). Helv. chim. acta 48:1745-1748. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. The Biochemistry of Plants, 7:557-574.

WYLER, H.; WILCOX, M.E. y DREIDING, A.S. (1965). Helv. chim. acta. 48:361. Citado por MABRY, T.J. (1966). The Betacyanins and Betaxanthins. En: Comparative Phytochemistry. Edit. Swain, Academic Press, pág. 231-244.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003

WILLIAMS, K. W. (1972). Solute interactions in gel filtration. Laboratory Practice, 21:667-670.

WINTER C.A., RISLEY E.A. y NUSS G.W (1962). Carrageenin-Induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine, 111:544-547.

WYLEY, R. C. y LEE, Y. (1978). Recovery of betalaines from red beets by a diffusion extraction procedure. Journal of Food Science, 43:1056-1058.

WYLER, H. y MEUER, V. (1979). On the biogenesis of betacyanins. Expaiments with [2-14C] dopaxanthine. Helvetica Chimica Acta, 62(4):1330-1339.

ZIMMERMAN, H.J. (1978). The adverse effects of drugs and other chemicals on the liver. Appletion-Century-Crofts, New York, p. 198-219.

ZINDLER, G. A. y COLOVOS, G. C. (1950). Anthocyaninuria and beet allergy. Annals of Allergy, 8:603-617.

ZWEIG, G. y SHERMA, J. (1972). Gel filtration and Gel permeation column chromatography. En: Handbook of Chromatography, 2:44-53. CRC Press.

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital, 2003