

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLÍNICAS



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO FARMACOLÓGICO Y MICROBIOLÓGICO
DEL EXTRACTO ACUOSO DE FRUTOS DE OPUNTIA DILLENII HAW**

PILAR FRESEN CANSINO

Las Palmas de Gran Canaria, Mayo de 1992

23-1991/92

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. con la calificación de~~ *Apto. con la calificación de*

Las Palmas de G. C., a 18 de julio de 1992
El Presidente: Dr. D. Felipe Sánchez de la Cuesta y Alarcón,

El Secretario: Dr. D. Zoilo González Lama,

La Vocal: Dr. D. José Nicolás Boada Juárez,

El Vocal: Dr. D. Avelino Rodríguez Moure,

El Vocal: Dr. D. Hugo López Orge,

La Doctoranda: Dña. María del Pilar Fresen Cansino

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLINICAS
UNIDAD DE FARMACOLOGIA

**" ESTUDIO FARMACOLOGICO Y MICROBIOLOGICO DEL
EXTRACTO ACUOSO DE FRUTOS DE OPUNTIA DILLENII HAW. "**

**Memoria presentada para optar al Grado
de Doctor por la Licenciada en Biología
PILAR FRESEN CANSINO**

Las Palmas, Mayo, 1992

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de este trabajo.

En primer lugar a Isidoro, mi profesor, amigo y marido, quién tuvo que soportar los peores momentos de desaliento con una gran paciencia y apoyo incondicional y además me enseñó y ayudó a dar forma a este trabajo.

A mis hijos, que durante este tiempo se han sacrificado en muchas ocasiones para que yo alcanzara mi objetivo. Lo han hecho con resignación y cariño y por ello les estoy doblemente agradecida.

A mis padres, que siempre han creído en mi.

A todos mis amigos por su paciencia y apoyo continuos. A Lili porque siempre me animó a continuar.

A mis compañeros del Departamento de Farmacología: Juan Francisco, Luis, Javier, Leandro y Paco quienes además de ayudarme activamente, me escucharon y animaron en más de una ocasión.

Al personal del servicio de Microbiología y del Hospital Insular por su inestimable ayuda y consejos.

**Al Prof. Dr. D. Zoilo González Lama y al Prof. Dr. D. Hugo López
por sus enseñanzas en el campo de la Microbiología.**

A Pablo y Maite por sus enseñanzas, ayuda, consejos y amistad.

**A D. José Ramón Lamas por su ayuda en la elaboración de las gráficas
e impresión final de este trabajo.**

A D: José María Limiñana por su ayuda y enseñanzas en estadística.

**Finalmente y con el ánimo de no olvidar a nadie, a todas aquellas
personas que por uno u otro motivo me ayudaron durante este período que
ha sido sin lugar a dudas largo, difícil y lleno de altibajos. A todos muchas
gracias.**

A Isidoro, Cris, Pili y

Daniel.

ISIDORO DEL RIO LOZANO, Profesor Titular de Farmacología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

CERTIFICA:

Que la memoria para optar al Grado de Doctor que lleva por título " Estudio farmacológico y microbiológico del extracto acuoso de frutos de Opuntia Dillenii Haw.", ha sido realizada por la Licenciada en Biología Pilar Fresen Cansino, bajo mi dirección y la codirección de la Dra. Doña María Teresa Tejedor Junco y del Dr. D. Leandro Fernández Pérez en el Departamento de Ciencias Clínicas (Farmacología) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación y se ajusta a la legislación vigente en estos casos.

Y para que así conste, expido y firmo el presente Certificado en Las Palmas de Gran Canaria, Mayo de mil novecientos noventa y dos

Prof. Dr. Don Isidoro del Rio Lozano

Dra. Doña M^a Teresa Tejedor Junco

Dr. Don Leandro Fernández Pérez

INDICE

INDICE

	<u>Pag.</u>
INTRODUCCION -----	9
REVISION Y ANTECEDENTES -----	15
1.- JUSTIFICACION AL ESTUDIO DE EFECTOS ANTIMICRO- BIANOS -----	18
2.- QUIMICA DE LAS BETALAINAS.- Origen, tipos y química de las betalainas -----	21
2.1.- INTRODUCCION -----	21
2.2.- BIOSINTESIS DE LAS BETALAINAS -----	26
2.3.- CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DE LAS BETACIANINAS Y ASPECTOS TAXONOMICOS -----	32
2.4.- DIFERENCIAS FISICAS Y QUIMICAS DE LAS ANTO- CIANINAS Y DE LAS BETACIANINAS -----	43
2.5.- QUIMIOTAXONOMIA DE LAS BETALAINAS -----	46
3.- FUNCION DE LAS BETALAINAS EN LA NATURALEZA --	52
3.1.- RELACION DE LAS ESTRUCTURAS QUIMICAS DE LAS BETALAINAS CON LAS DE OTROS PRODUCTOS DE DEMOSTRADA ACCION FARMACOLOGICA -----	53
3.1.a.- RELACION CON SUSTANCIAS ANTIBIOTICAS -----	58
3.1.b.- RELACION CON SUSTANCIAS ANTIVIRICAS -----	66

3.1.c.- RELACION CON SUSTANCIAS ANTISEPTICAS -----	74
3.1.d.- RELACION CON ANTIPARASITARIOS -----	77
ESTUDIO EXPERIMENTAL -----	79
4.- OBJETIVOS -----	80
4.1.- PRIMER OBJETIVO -----	83
MATERIAL Y METODOS -----	84
RESULTADOS -----	91
DISCUSION -----	94
4.2.- SEGUNDO OBJETIVO -----	95
MATERIAL Y METODOS -----	95
RESULTADOS -----	96
DISCUSION -----	98
4.3.- TERCER OBJETIVO -----	99
MATERIAL Y METODOS -----	103
- APARTADO A -----	115
RESULTADOS -----	115
- APARTADO B -----	120
RESULTADOS -----	121
DISCUSION -----	124
- APARTADO C -----	126
1- ESTUDIO DE LA FRACCION 39-80 -----	126
a. Antibiogramas -----	126
Resultados -----	127
b. Sinergismo -----	133

Resultados -----	133
Discusión -----	135
c. CMI de las cepas de la ATCC -----	136
Resultados -----	137
d. CMI del primer grupo de la colección -----	138
e. CMI del segundo grupo de la colección -----	138
d. CMB -----	140
Resultados -----	141
Discusión -----	143
2- ESTUDIO DE LA FRACCION 52-80 -----	144
a. CMI -----	144
Resultados -----	144
b. Comparación parcial de los resultados obtenidos con las fracciones 39-80 y 52-80 -----	147
Discusión -----	151
3- ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS FRACCIONES 39-80 Y 52-80 -----	151
RESULTADOS -----	152
DISCUSION -----	154
4- ESTUDIO COMPARATIVO CON OTROS ANTI- BIOTICOS CONOCIDOS Y EL EXTRACTO ACUOSO PARCIALMENTE PURIFICADO FRACCIONES 39-80 Y 52-80 -----	158
RESULTADOS -----	158

1- Ciprofloxacina -----	158
2- Tetraciclina -----	163
3- Tobramicina -----	168
4- Ampicilina -----	173
5- Extracto acuoso fracción 39-80 -----	178
6- Extracto acuoso fracción 52-80 -----	183
DISCUSION -----	188
RESUMEN FINAL DE LOS RESULTADOS GENERALES OBTENIDOS CON EL EXTRACTO ACUOSO FRACCIONES 39-80 Y 52-80 -----	190
4.4.- CUARTO OBJETIVO -----	200
RESULTADOS -----	201
DISCUSION -----	202
DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES -----	203
BIBLIOGRAFIA -----	218

INTRODUCCION

INTRODUCCION.-

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. antibióticos no absorbidos por el tracto gastrointestinal) 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.

Hasta el momento hemos estado habituados a buscar fármacos que actúen como "proyectiles mágicos". Actualmente se tiende a la búsqueda de fármacos que actúen como "misiles dirigidos". Es decir, que en la actualidad se tiende a estimular por medio de estos misiles, los sistemas de curación presentes en todo organismo para que lleguen en la concentración adecuada a la zona afectada. Por regla general son ciertos péptidos y proteínas presentes en el organismo (interferona, insulina, zoladex, eminasa etc.) los encargados de ejercer esta acción y en la actualidad suelen ser productos de

la biotecnología.

Según SANCHEZ ALBORNOZ, 1980, reconociendo que la búsqueda de nuevos fármacos de origen vegetal ha disminuido considerablemente durante las últimas décadas, aún continúa 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 sólo 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".

La naturaleza ha proporcionado y lo seguirá haciendo, productos que son el punto de partida de medicamentos útiles. La industria farmacéutica ha sustituido (con sus productos y especialidades farmacéuticas) la labor del farmacéutico en las preparaciones galénicas de tabletas, jarabes, supositorios, etc., cuyos principios activos, en su mayoría, eran de origen natural.

Existen otros factores importantes que dan la pauta en la búsqueda de fármacos útiles. 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).

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 en forma paliativa con fármacos que controlan parcialmente los síntomas de la enfermedad. Ejemplos de todos conocidos serían: el corea de Huntington, la enfermedad de Paget, el síndrome de Tourette entre otros.

El interés por la búsqueda de fármacos que sean capaces de controlar, aliviar o curar estas enfermedades poco frecuentes, es muy diferente del interés que tiene para la industria farmacéutica la búsqueda de fármacos que actúen sobre el S.N.C. aunque las dificultades para encontrar "algo" efectivo sean iguales o mayores. Un número elevado de pacientes o usuarios, implica una mayor ganancia.

El desarrollo de un nuevo fármaco supone una inversión aproximada de 115 millones de dólares. Algo insólito para quien desconozca el funcionamiento de lo que (salvo raras excepciones) son compañías multinacionales donde prima el negocio y no la utilidad social, si ella no es negocio.

Bien es cierto que ciertas restricciones administrativas impuestas por los Gobiernos (con la finalidad de controlar fraudes, engaños, charlatanerismo, etc.), han encarecido considerablemente los costos, por el estricto control a que son sometidas estas industrias. Opinamos que el chantaje ha sido mutuo: Los gobiernos exigen calidad, las industrias con sus marcas registradas imponen el precio. El consumidor paga.

Hay que reconocer que la síntesis, semisíntesis y manipulaciones de las estructuras químicas de gran número de fármacos, han mejorado no solo la dosificación, sino los aspectos farmacocinéticos (absorción, distribución, biosíntesis y eliminación), los cuales van también a influenciar el efecto final, disminuyendo o aboliendo algunos efectos tóxicos y potenciando los terapéuticos.

Pero insistimos en que la búsqueda de efectos terapéuticos a partir de estructuras químicas sintéticas, no será nunca la única forma de encontrar fármacos útiles y sí seguirá siendo un buen complemento para desarrollar y mejorar nuevos productos a partir de aquellos que la naturaleza ofrece.

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

La biosíntesis de aminoácidos esenciales por las plantas se realiza de

forma semejante 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 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.

Esto justifica que se haga una revisión de las similitudes que pudieran existir entre la molécula de Betacianina, objeto de este estudio de investigación, y los de otras de efecto farmacológico conocido. 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.

REVISION Y ANTECEDENTES

REVISION Y ANTECEDENTES.-

El interés por la realización del presente trabajo se fundamenta en el conocimiento a partir de fuentes orales y escritas de la utilización tradicional y empírica de los frutos de dos especies de las plantas del género *Opuntia* (*Opuntia dillenii* Haw. y *Opuntia ficus indica* Mill.), en relación con determinados trastornos orgánicos tales como: regulación de la presión arterial (LEWIS y ELVIN LEWIS, 1977); diuréticos e hipoglucemiantes (PEREZ y MEDINA, 1988); antidiarréicos (PEREZ ARBELAEZ, 1982 y LEWIS ELVIN LEWIS, 1977); antitusígenos (FONT QUER, 1980).

Esta utilización es evidente en nuestro entorno geográfico en donde estas plantas abundan y lo es también, por idénticas razones, en la zona Mediterránea y Andalucía en donde el consumo de estos frutos es frecuente en la dieta habitual.

En la información bibliográfica recopilada, se comprobó que dos de las especies del género *Opuntia* más abundantes en nuestras islas presentaban, en las partes consumidas por la población (flores y frutos), un tipo de pigmento nitrogenado (cromoalcaloide) poco frecuente en la Naturaleza. Como veremos más adelante, estos cromoalcaloides poseen una biogénesis y estructura química similar a las catecolaminas, bencilisoquinolinas, tetrahidroisoquinolinas, etc. compuestos que, como sabemos, tienen un importante interés farmacológico. Tras observar que esta información

bibliográfica no aportaba ningún tipo de estudio farmacológico relacionado con estas especies en concreto, pensamos que nuestro interés en estudiar estos aspectos estaba plenamente justificado, al igual que lo había hecho FERNANDEZ PEREZ, 1989.

También del estudio de la bibliografía relacionada con estos cromoalcaloides, conocidos como Betalaínas (MABRY et al, 1972) se desprende que prácticamente todas las investigaciones estaban encaminadas a estudiar su papel como marcador quimiotaxonómico o bien su función y utilidad como colorante natural en las industrias alimentaria y farmacéutica. (PASCH et al, 1975, 1979).

Existe 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 (1985) aconsejaba la búsqueda de nuevas fuentes naturales de colorantes atóxicos utilizables como aditivos en productos de consumo humano. Aunque no eran muchos los estudios farmacológicos y toxicológicos relacionados con los extractos acuosos ricos en estos cromoalcaloides rojos obtenidos de la remolacha roja (actual fuente comercial de estos productos), aquellos apuntaban hacia una toxicidad nula.

1.-JUSTIFICACION AL ESTUDIO DE EFECTOS ANTIMICROBIANOS.-

La búsqueda al azar de sustancias antimicrobianas efectivas requiere una planificación en la que se incluyen factores tales como el tipo y origen de la sustancia, tipo de pruebas a realizar, medios y tiempo para ello. En principio no deberían existir resultados preconcebidos en un "screening" o cribado de estos posibles fármacos útiles.

Es obvio que el azar existe, pero también es cierto que, sobretudo en el tema que nos ocupa, con la ayuda de los conocimientos actuales en el campo de la quimioterapia, bioquímica, fitoquímica y en general la química médica, podemos orientar nuestras investigaciones hacia objetivos más claros y en ocasiones, perceptiblemente iluminados. De aquí que un enfoque racional para formular una tesis, sea lo más adecuado.

El planteamiento del trabajo deberá abarcar todos los aspectos que han inducido a su elaboración:

- 1) Antecedentes históricos, empirismo y estado actual de los conocimientos.
- 2) Origen, clasificación, estructura y características del compuesto a estudiar.
- 3) Relación de su estructura química con otros compuestos de reconocido efecto antimicrobiano. Por regla general estructuras químicas similares o íntimamente relacionadas, ejercen efectos también

cualitativamente similares, como mencionamos anteriormente.

- 4) Aún teniendo en consideración qué cambios mínimos en una estructura química, pueden dotar al compuesto de actividad biológica o hacerla desaparecer, esto no suele ser la regla, de aquí la necesidad de los ensayos para comprobarlo.**

Como en nuestro caso no disponemos más que de unos pocos datos en relación con la actividad antimicrobiana de las Betalaínas y en su mayoría han sido obtenidos de simples deducciones o tradiciones, nos vemos obligados a empezar por las pruebas preliminares en medios de cultivo sin considerar si el efecto observado sería el equivalente a pruebas realizadas "in vivo".

Además de que estas bases empíricas recogen la idea de la actividad antimicrobiana de Opuntia dillenii Haw la revisión de la literatura científica nos informa de estudios programados y francamente bien desarrollados que apuntan a la idea de efectos antifúngicos, bactericidas y virucidas de extractos de estas plantas.

Así, FRISBEY et al (1954), estudiaron la posible actividad antimicrobiana contra el Mycobacterium tuberculosis de los extractos de 284 especies de plantas no encontrando actividad alguna en 178 de ellos y una actividad variable de los extractos crudos parcialmente purificados en el resto, en diluciones inferiores a 1:20 y hasta diluciones de 1:80.

Mc CLEARLY y WALKINGTON (1964), estudiaron la actividad antimicrobiana de las Cactáceas con dos objetivos concretos:

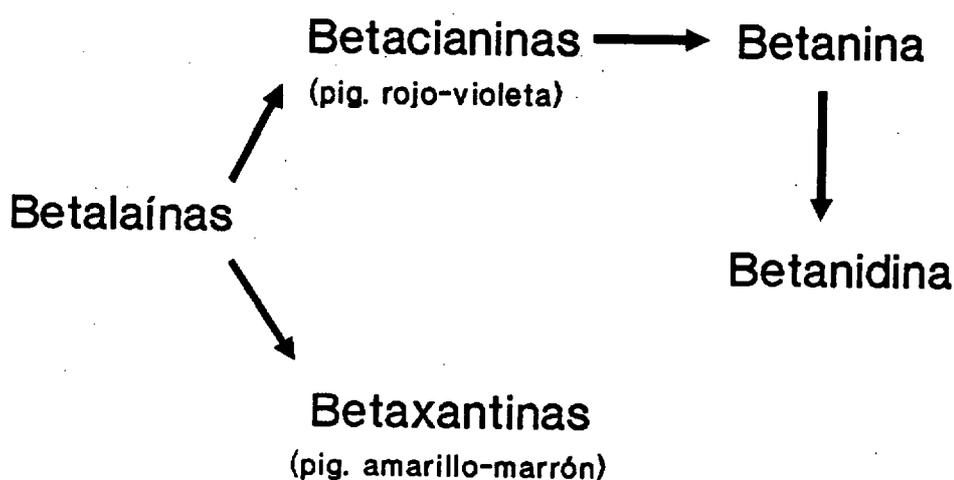
- 1- Determinar qué miembros de la Familia Cactaceae, por sus compuestos naturales, podrían tener actividad antibacteriana, después de realizar pruebas sobre un amplio espectro bacteriano.**
- 2- Determinar la influencia de la acidez y la presencia de ácidos orgánicos en la capacidad de estos extractos naturales para producir efectos antibacterianos.**

Después de estudiar la actividad de 115 especies de plantas de esta familia sobre 21 cepas bacterianas MC CLEARLY y WALKINGTON concluyeron que la tribu Opuntiae tenía el mayor efecto antibiótico sobre un amplio espectro bacteriano ya que con la mayoría de las especies estudiadas se obtuvieron buenos resultados. Su experiencia en el laboratorio les demostró que la mayor actividad antibacteriana se obtenía con las fracciones solubles en agua extraídas a primeras horas de la mañana. Con respecto a la influencia de la acidez en el efecto antibacteriano exponen que en algunas especies, principalmente en las más suculentas, este efecto "podría estar relacionado con el metabolismo del ácido crasulánico de la planta y la presencia de ácidos orgánicos aunque, en algunas especies el efecto inhibitorio se mantuvo después de ser neutralizada la acidez, posiblemente por poseer constituyentes adicionales, con capacidad inhibitoria de por sí".

2.-QUIMICA DE LAS BETALAINAS.- Origen, tipos y química de las betalaínas.

2-1.-INTRODUCCION.-

La química de las betalaínas ha sido revisada recientemente por FERNANDEZ PEREZ, (1989) y en síntesis es como sigue: Las antocianinas y los carotenoides son los colorantes naturales responsables de casi todos los colores rojos, rosados, escarlatas, malvas, azules y tonalidades amarillas presentes en los pétalos, hojas y frutos de las plantas vasculares superiores, con excepción de aquellas plantas pertenecientes al orden Centrospermae, en las cuales son reemplazados por un grupo de pigmentos diferentes llamados: Betacianinas (rojo-violeta) y Betaxantinas (amarillas), refiriéndose en este caso a los que se encuentran en la remolacha roja: Beta vulgaris.



Cuadro N°1

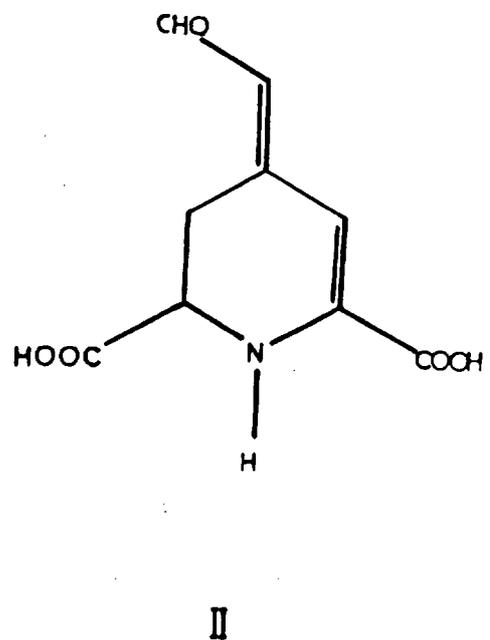
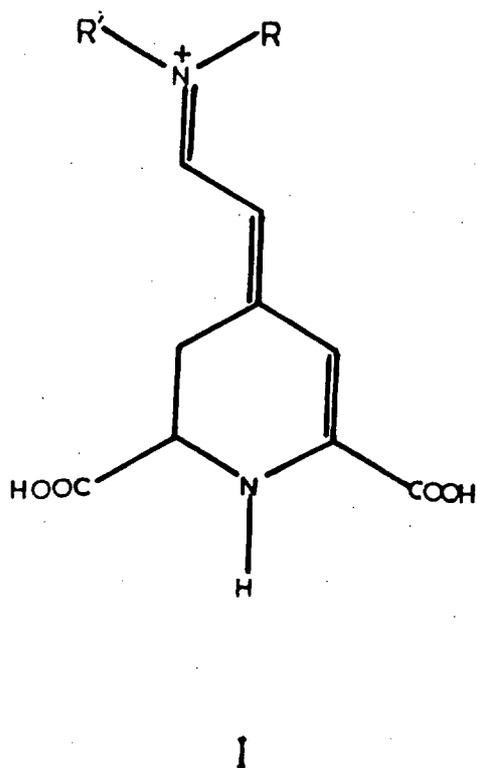


Fig.1: Estructura química general de las betalaínas, donde se representan a una amina primaria o secundaria (I) y el ácido betalámico (II). Los radicales sustituyentes R y R' son grupos amino, imino o indólico. Tomado de MABRY y DREIDING (1968).

Fue SHUDEL (1918) el primero en introducir el término general de betacianinas (por creerlos relacionados con los flavonoides) para designar los pigmentos que encontró en la raíz de la Beta vulgaris, en algunas especies de Chenopodium y en la planta Celosia Cristata. Las betacianinas de SCHUDEL comprenden los pigmentos rojo-violeta que denominó betaninas y los amarillos a los que llamó betaxantinas, todos ellos procedentes de la remolacha roja (Beta vulgaris).

Posteriormente según MABRY (1968), fueron aislados pigmentos de características similares en plantas de otras familias de este mismo Orden (Centrospermae) a los que se daban nombres con el prefijo de la planta de la que eran extraídos. (Amarantina de Amarantus, Bugainvilleina de la Buganvilla, Indicaxantina del tuno Ficus Indica etc.).

MABRY y DREIDING (1968) introdujeron el término de Betalaínas para denominar a todo este peculiar grupo de pigmentos rojo-violeta, amarillos y marrones nitrogenados e hidrosolubles que, casi con exclusividad, se encontraban en las plantas floreadas del Orden Centrospermae.

Desde el punto de vista químico, WYLER et al. (1965) consideraron a las Betalaínas como productos formados tras la condensación de una amina primaria o secundaria con el ácido betalámico. Posteriormente WILMER et al (1971) confirmaron estos resultados indicando que se derivan de aminoácidos esenciales, siendo el principal de ellos la fenil-alanina, y de aminas

primarias y secundarias (ácidos betalámico, aspártico y glutámico).

Según Albornoz (1980), los aminoácidos pueden agruparse en cuatro grandes familias:

- 1.-Derivados del ácido aspártico (lisina, metionina, etc.) y del oxalacetato.**
- 2.-Derivados del Piruvato: alanina, valina y leucina.**
- 3.-Derivados del ácido Shikímico: fenilalanina, tirosina y triptófano.**
- 4.-La ornitina, que es precursora de alcaloides simples: nicotina, cocaína, etc.**

BIRCH (1963) y ALBORNOZ, describen la síntesis de la fenilalanina a partir del ácido Shikímico que a su vez proviene de azúcares (eritrosa 6-fosfato); éste se transforma en ácido prefénico, posteriormente a ácido fenilpirúvico y por último en fenilalanina. (Fig.2).

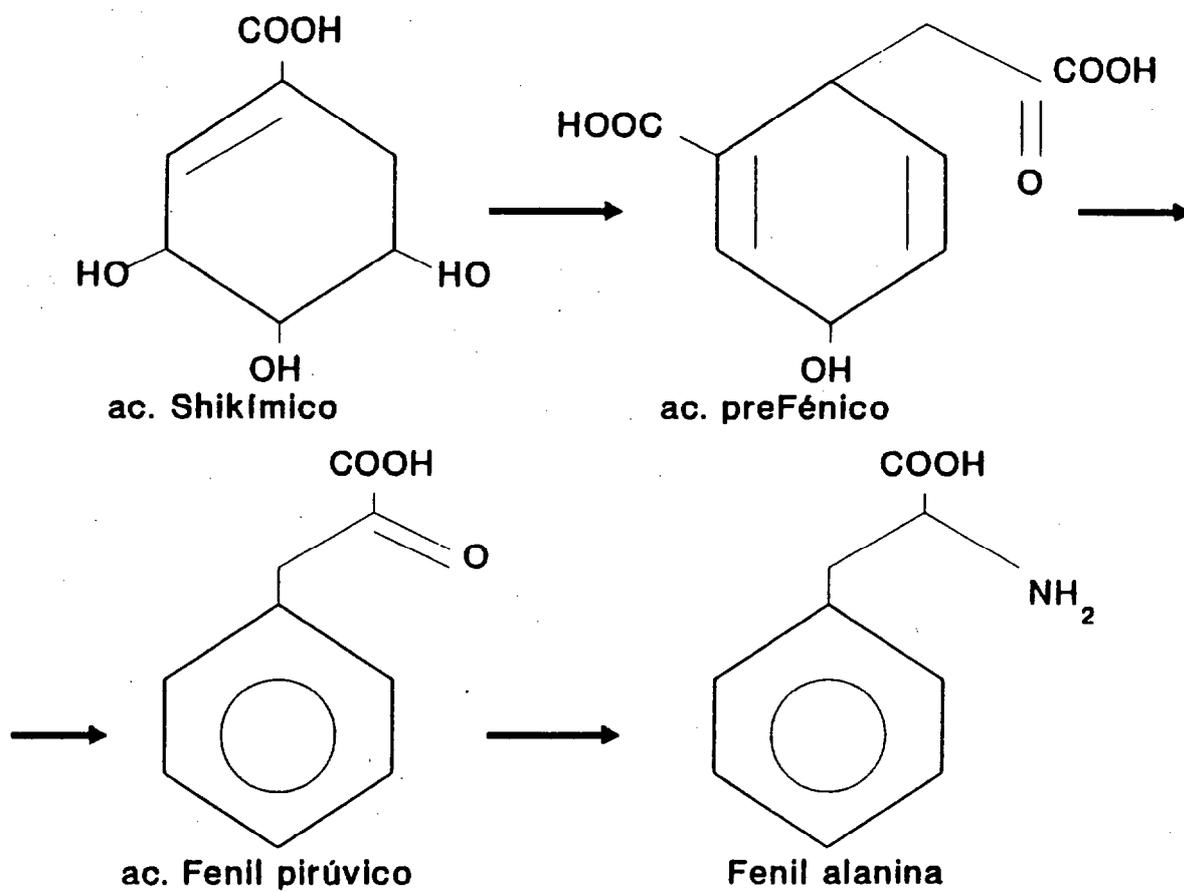


Fig.2 -Síntesis de la fenilalanina a partir del ácido Shikímico. (BIRCH, 1973).

2-2.-BIOSINTESIS DE LAS BETALAINAS.-

La síntesis de Betalaínas (Betacianinas y Betaxantinas) por los seres vivos se realiza a partir de la conversión por hidroxilación de fenilalanina en tirosina y, posteriormente, por una nueva hidroxilación en DOPA (3-4-hidroxifenilalanina). (Fig.3)

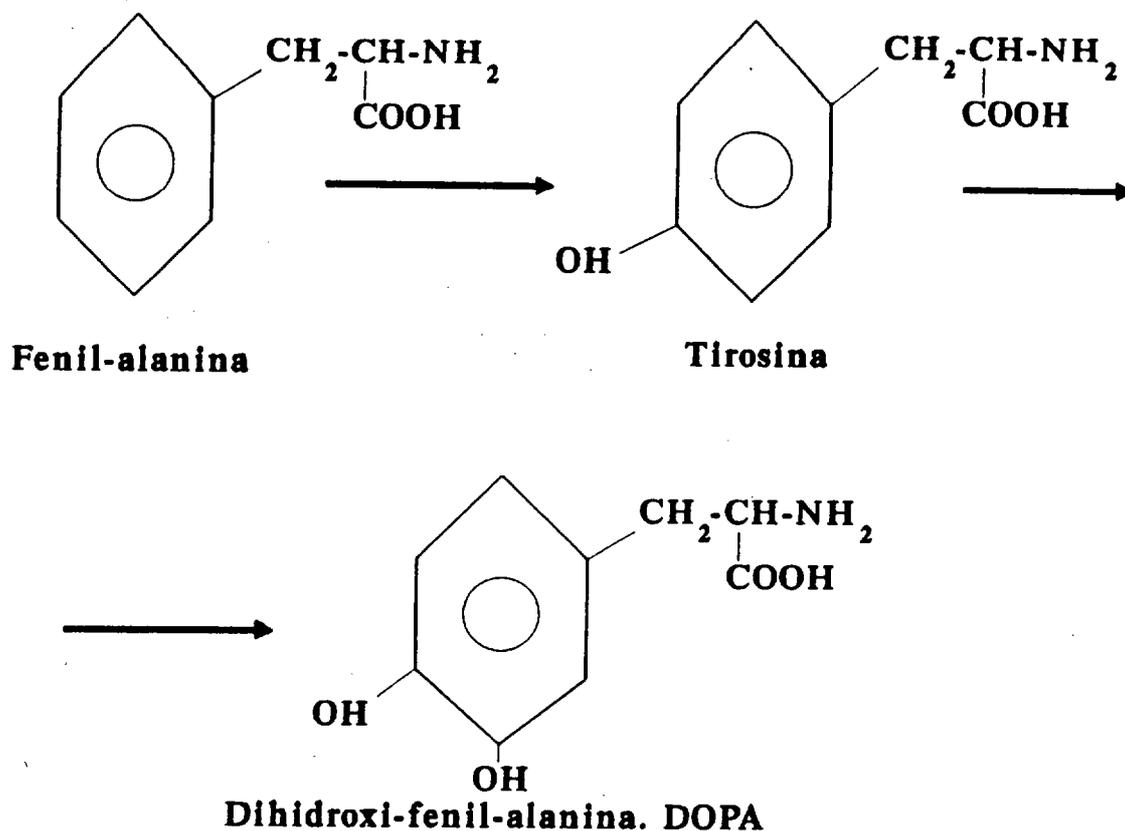


Fig.3 -Biosíntesis de la DOPA. (BOWMAN, 1984)

A partir de la tirosina PIATELLI (1981) describe la biosíntesis de la Betanidina (color rojo violáceo) y de la Betaxantina (color amarillo). (Fig.4)

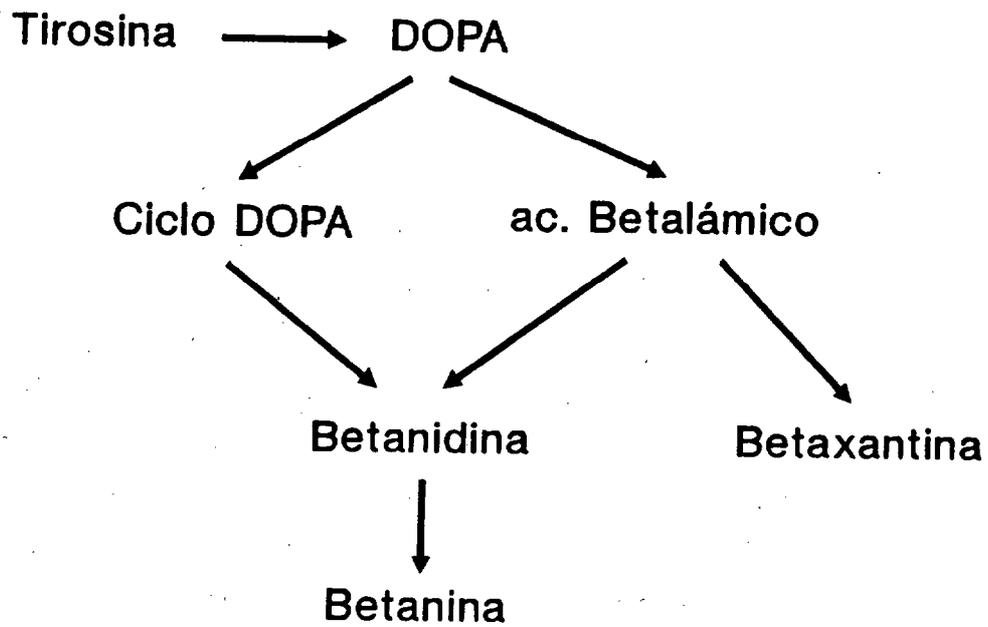


Fig.4 -Biosíntesis de la Betanidina y de la Betaxantina

Asimismo, basándose en los trabajos de VON ARDENE *et al* (1974) y de BARTH *et al* (1979), PIATELLI (1981) describe la síntesis de la dihidroazepina a partir de un intermediario de la DOPA. (Fig.5)

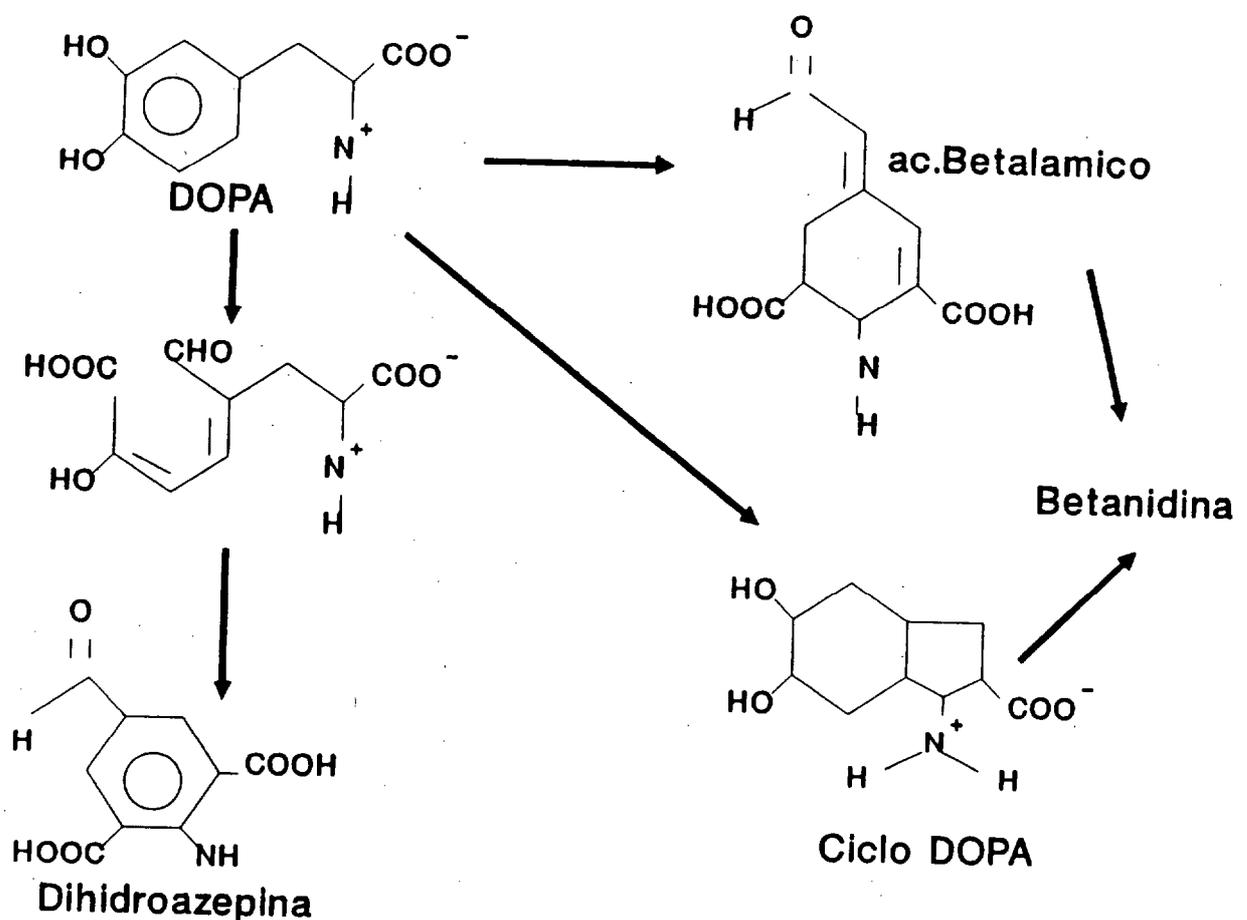


Fig.5 -Dihidroazepina. PIATELLI (1981)

Fueron PUCHER *et al.* (1938) los que consideraron a la Betanina un monoglucósido que al perder el azúcar por hidrólisis ácida, se convertía en Betanidina.

La distribución de los átomos en la molécula de Betanidina y la situación (ubicación) de la molécula de glucosa fue determinada por MABRY *et al.* (1962) y WILCOX *et al.* (1965). Dicha molécula tenía una fórmula molecular de $C_{24} H_{26} O_{13} N_2$. En ella había tres grupos carboxílicos y un átomo de nitrógeno cuaternario con carga positiva en la posición 1 que estaba neutralizado por el carboxilo de la posición 2. (Fig.6)

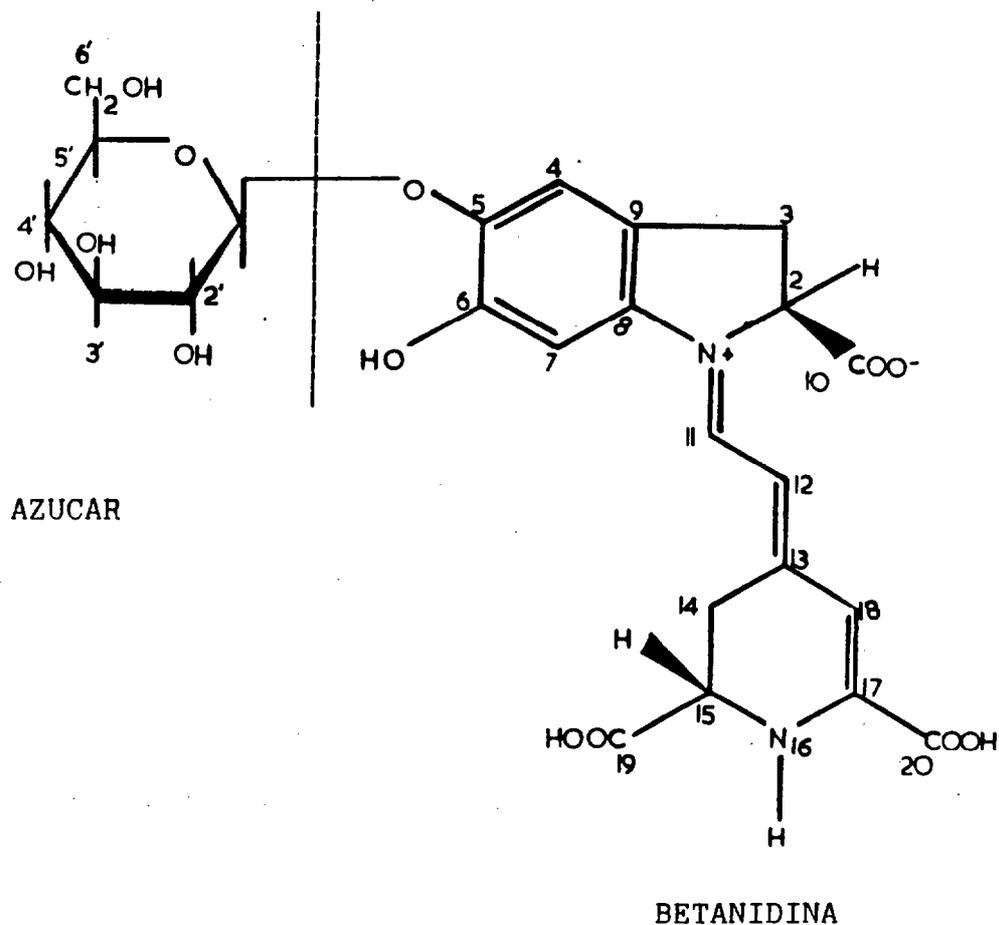


Fig.6 -Estructura química de la Betanina.

La Betanina posee una molécula azucarada en el C₅ (B-D) glucosil según PIATELLI (1964), y por la acción de la glucosidasa se convierte en Betanidina, con lo que se confirmaba la hipótesis de PUCHER *et al*, (1938) (Fig.7) y que fue ratificada por MABRY, (1966).

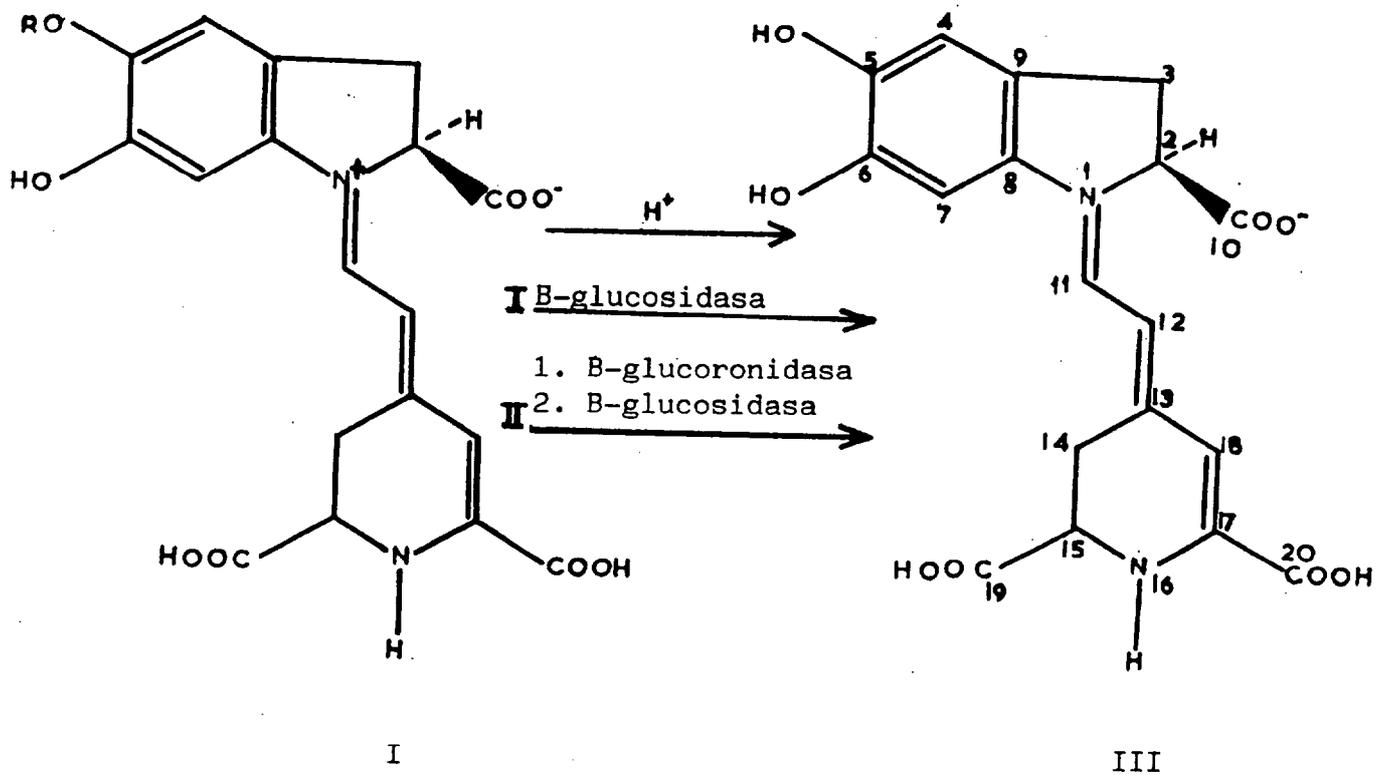


Fig.7 -Hidrólisis ácida y enzimática de las Betacianinas. I: Betanina, Isobetanina (R=B-D-glucosa). II: Amarantina, Isoamarantina (R=O-ácido B-D-glucosil-urónico)-B-D-glucosil. III: Betanidina, Isobetanidina. Tomado de MABRY (1966).

El tratamiento ácido de ambos compuestos, los transformaba en sus respectivos isómeros. Este hecho fue también confirmado por MABRY (1966). Por otra parte la degradación alcalina de la Betanidina daba lugar a tres tipos de compuestos: ácido dihidro-indólico, ácido fórmico y ácido 4-metil piridina 2-6 dicarboxílico. WYLER y DREIDING, (1962). (Fig 8)

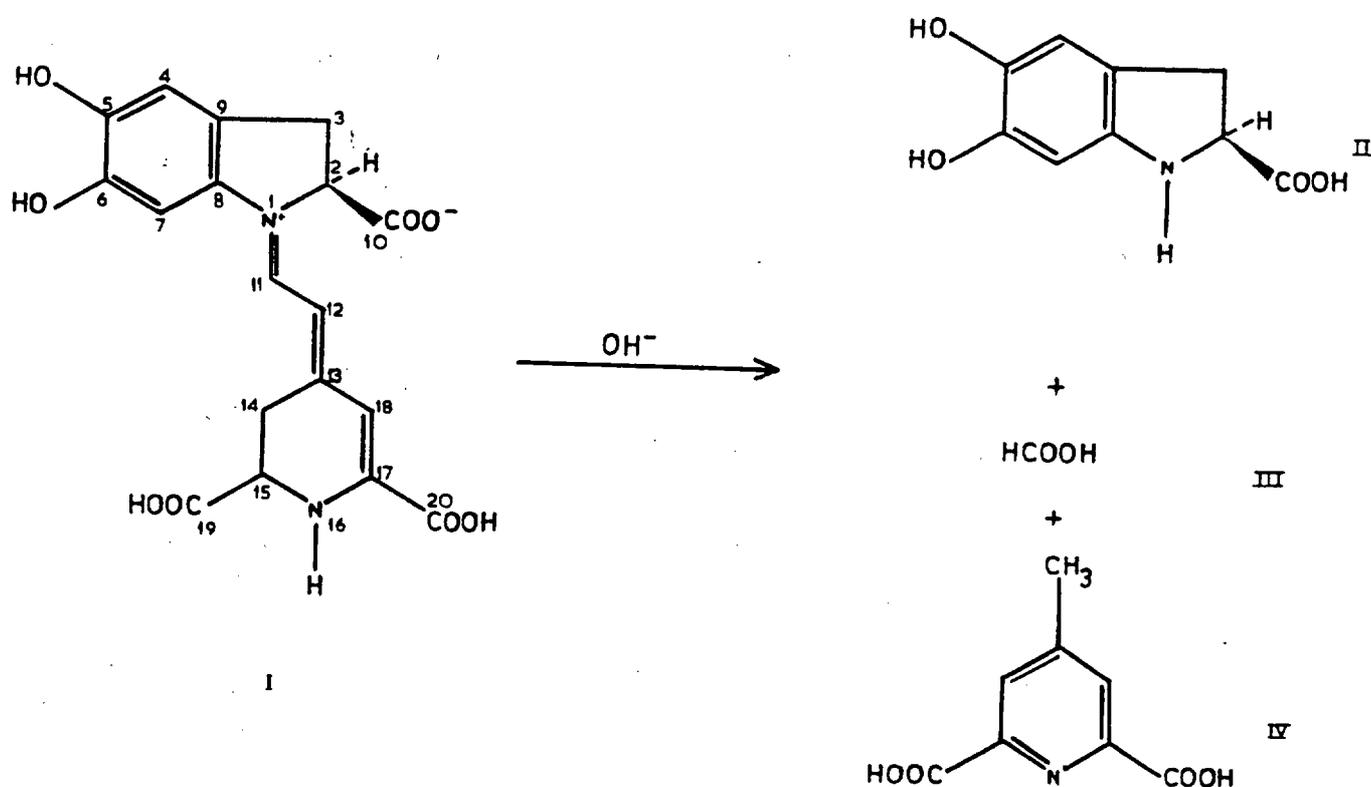


Fig.8 -Degradación alcalina de la Betanidina. I: Betanidina, Isobetanidina. II: Acido 5,6-dihidroxi-2,3-dihidroindol-2-carboxílico. III: Acido fórmico. IV: Acido 4-metilpirina-2,6-dicarboxílico. Tomado de MABRY (1966).

2-3.- CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DE LAS BETACIANINAS Y ASPECTOS TAXONOMICOS.-

WYLER y DREIDING (1957), y SCHMIDT y SCHOLEBEN (1957), prepararon por primera vez, una muestra de Betanina cristalina pura. Los datos que existían sobre la estructura química de las Betacianinas eran muy escasos. Hasta entonces se las había descrito como "antocianinas nitrogenadas", con lo cual se reconocía el contenido de nitrógeno de estos pigmentos pero, incorrectamente, se presumía una relación estructural directa con las antocianinas.

Dentro de las Betacianinas, la Betanina de la remolacha roja es la que ha sido objeto de la mayoría de los estudios. Su estructura se estableció en la década de los años sesenta. (ver Fig.6)

En 1938 PUCHER et al. comprobaron que la Betanina, era un monoglucósido que, por hidrólisis ácida, daba lugar a una aglicona denominada Betanidina. Combinando diferentes métodos: degradación alcalina, espectrofotometría, resonancia magnética nuclear, espectroscopía de masas, electroforesis, etc., MABRY et al. (1962) y WILCOX et al. (1965), obtuvieron un compuesto con una fórmula molecular de $C_{24}H_{26}O_{13}N_2$ que contenía tres grupos carboxílicos de los cuales dos tenían un $pK_s=3.4$, y un átomo de nitrógeno cuaternario ($=N+=$) con una débil carga positiva neutralizada por el grupo carboxílico en la posición dos, lo que le daba al pigmento

propiedades anfotéricas. Además, había dos grupos fenólicos ($pK_a=8.5$) en la posición 6 y 5. A esta última se unía, con un enlace beta, la molécula de glucosa (ver Fig.6). Según WYLER *et al.*(1959), la Betanina disuelta en agua, mostraba una densidad óptica máxima a 536-538 nm ($E = 1120$), una menor 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 (WYLER y DREIDING, 1959). Los pesos moleculares eran de 550.22 para la Betanina y de 388.14 para la Betanidina $C_{18} H_{16} O_8 N_2$.

WYLER y DREIDING (1959, 1962) identificaron tres productos de suma importancia a partir de la degradación alcalina de la Betanidina: el ácido 5,6-dihidroxi-2,3-dihidroindol-2-carboxílico (II), el ácido fórmico (III) y el ácido 4-metipiridina-2,6-dicarboxílico (IV).(ver Fig.8).

Gracias al estudio previo de un derivado metilado de la Betanidina denominado Neobetanidina, MABRY *et al.* en 1962, clarificaron algo más las características de la estructura química de esta nueva clase de pigmentos, (Fig.9); demostraron definitivamente que su estructura química no estaba relacionada con la de los antocianos y que, por lo tanto, pertenecía a una nueva clase de pigmentos. Su estructura, hasta este momento desconocida entre los pigmentos existentes en la naturaleza, no tenía ninguna similitud con el esqueleto $C_6 C_3 C_6$ de los antocianos que era flavonoide, pero, en cambio, contaba con un núcleo indol y uno piridínico parcialmente hidrogenados.

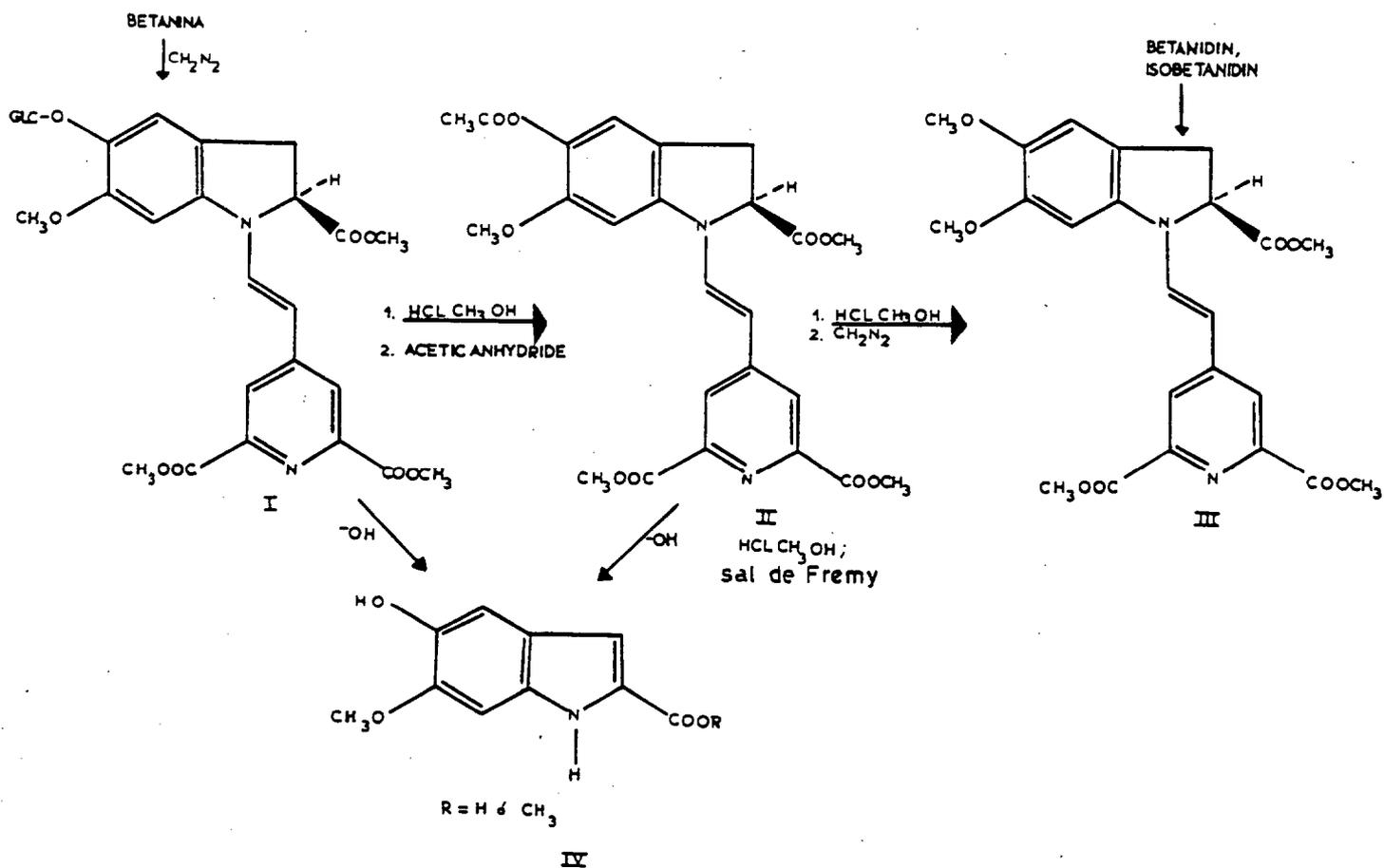


Fig.9 : Síntesis y degradación de los derivados Neobetannina y Neobetannidina.

I: Neobetannina. III: Ester 5,6-di-0-metil-2S-Neobetannidín trimetílico. IV:

Acido 5-hidroxi-6-metoxi-indol-2-carboxílico.(MABRY, 1966).

Químicamente, la Betanidina estaba relacionada con los alcaloides por lo que MABRY (1966) propuso para las Betalaínas la expresión de cromocaloides.

WYLER *et al.* (1963) definieron también, después de realizar el análisis del compuesto 5,6-di-O-acetilbetanidina, la estructura detallada de la Betanidina (aglicona), mostrando una combinación de estructuras químicas, hasta entonces poco usual, como era la de los anillos dihidroindol y dihidropiridínico, con un cromóforo. Además, propusieron una estructura resonante y alternativa para la Betanidina que llevaba una carga positiva en el nitrógeno dihidropiridínico.

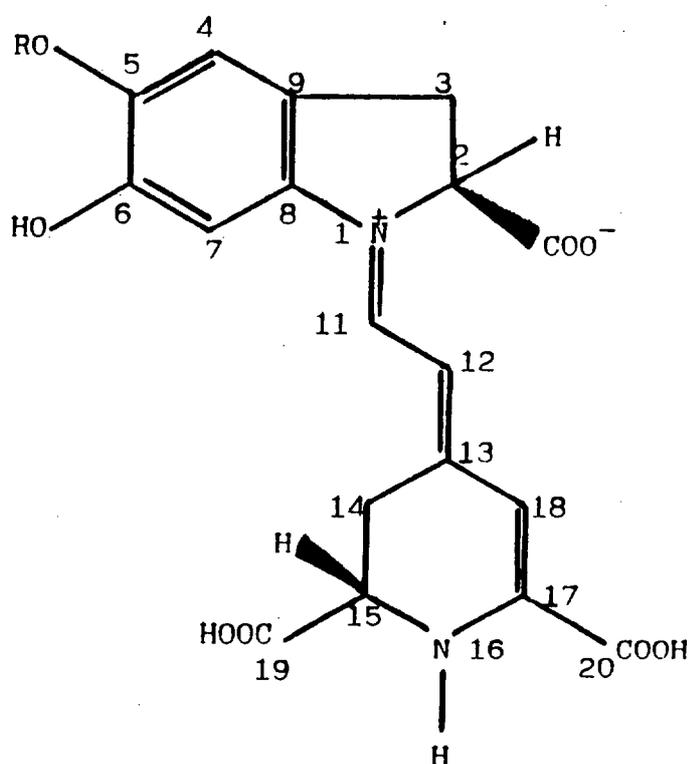
Aún quedaba por resolver cual era la estructura detallada de la porción glicosídica, así como de qué forma y en que posición se unía a la aglicona (WYLER *et al.* (1963)). Gracias a los estudios de hidrólisis con la enzima betaglucosidasa (PIATELLI *et al.* (1964) y de resonancia magnética nuclear (WILCOX *et al.* (1965), que se realizaron sobre el glucósido Betanina, se demostró que éste era un O-beta-glucopiranosido de su aglicona (ver Fig.7). PIATELLI *et al.* (1964) y WILCOX *et al.* (1965) determinaron la posición exacta del enlace de la glucosa en la Betanina. Para ello, usando diferentes procedimientos, rompieron por su mitad el derivado neobetánidínico para formar el ácido 5-hidroxi-6-metoxi-indol-2-carboxílico o su ester metílico (ver fig.7) 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 isobeta-

nina, se podían formular como 5-0-beta-glucopiranosil de Betanidina e Isobetanidina respectivamente.

Las fórmulas estructurales de la Betanina y Betanidina presentaban dos átomos de carbono asimétricos que eran el C₂ y el C₁₅, y también eran moléculas ópticamente activas. WYLER y DREIDING (1962, 1963), comprobaron que la betanina y la Isobetanina, tenían la misma configuración estereoquímica en el C₂ y que era de tipo S. Según WYLER *et al.* (1965), la diferencia entre ambas moléculas solamente dependía de la configuración en el C₁₅. La Betanidina también tenía en el C₂ una configuración S mientras que la de la Isobetanidina era R. Tanto la Betanina como la Betanidina se transformaban en sus respectivos isómeros mediante tratamiento ácido. En 1963 WYLER *et al.*, habían demostrado que tanto la Betanidina como su isómero podían transformarse en el mismo producto si se trataban con diazometano, esto es, con el ester 5,6-di-0-metil-2,5-neobetanidina trimetilico (Fig.9). Eran pues diastereoisómeros y epímeros (ver Fig.6). Aun no estaba claro si la forma isomérica la sintetizaba la célula vegetal o si surgía de la epimerización posterior del compuesto Betanina o Betanidina. Generalmente, con cada Betacianina había una pequeña cantidad de forma isomérica. NILSSON *et al.*, (1970).

Al comprobar que en todas las Betacianinas estudiadas se obtenían tanto Betanidina como Isobetanidina, PIATELLI *et al* (1964), establecieron la hipótesis de que en todas ellas se encontraban las mismas agliconas. Al

menos teóricamente, también admitían que otras Betacianinas tuviesen diferentes grupos unidos a los correspondientes grupos fenólicos y/o carboxílicos de la aglicona. Observaron que todas las Betacianinas estudiadas, solo se diferenciaban en su resto glicosídico. Más tarde WYLER *et al.*(1967), encontraron algunas excepciones como la prebetanina obtenida de la raíz de la remolacha que presentaba un grupo sulfato con carga negativa en la posición 6 de la porción glicosídica.



I: R=B-D-GLUCOSIL
 II: R=H

Fig.10: Betanina y Betanidina con sus respectivos isómeros: I Betanina, Isobetanina (R=B-D-glucosil) II Betanidina, Isobetanidina (R=H). Tomado de NILSSON (1970).

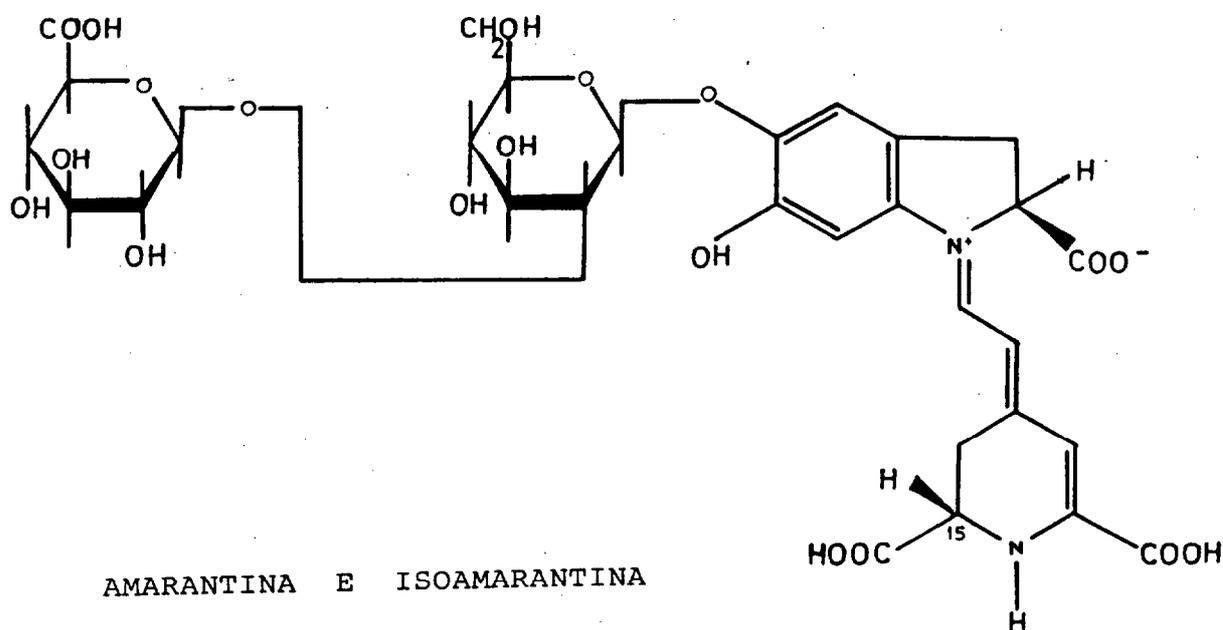


Fig.11: Amarantina e Isoamarantina (C₁₅ Isómero). Se observa la unión de una molécula de ácido B-D-Glucurónico en la posición 2' de la glucosa.

Tomado de Minale *et al* (1960)

Otro par de Betacianinas isoméricas, la amarantina e isoamarantina, aisladas de las hojas de la planta Amaranthus tricolor fueron descritas por PIATELLI *et al.* (1964), (Fig.11). Ambas, al ser hidrolizadas con la enzima betaglucoronidasa seguida de la beta-glucosidasa, se transformaban en Betanidina e Isobetanidina respectivamente. La Amarantina, al igual que la Betanina, podía ser fragmentada después de su metilación y de este modo se aclaró la posición de la molécula de glucosa.(Fig.9). Por lo tanto, estas Betacianinas podían formularse como 0-(ácido beta-D-glucopiranosilurónico) y 5-0-beta-D glucopiranosidos de Betanidina e Isobetanidina respectivamente.

PIATELLI *et al.* (1964), demostraron que la amarantina obtenida de Amaranthus tricolor, tenía unida a la posición 2 un ácido beta-D-glucurónico mientras que, las Betacianinas de plantas como Phyllocactus hybridus Hort., Celosia cristata e Iresine herbstii eran derivados acetilados de la Betanina e Isoamarantina. MINALE *et al.* (1966), caracterizaron ocho Betacianinas a partir de estas especies, y demostraron que esos pigmentos eran derivados acetilados de la Betanina, de la Amarantina o de sus correspondientes C(15) diastereoisómeros.

Además de las Betacianinas glucosídicas, Betanina e Isobetanina, se han detectado otras por cromatografía, métodos espectrales o electroforéticos (WYLER *et al.* 1959; WYLER y DREIDING, 1961; PIATELLI y MINALE, 1964). El más completo de estos informes describe 46 glicósidos de Betacianinas diferentes (tabla I) obtenidos a partir de 37 especies que

representan a siete familias pertenecientes al orden Centrospermae (PIATELLI y MINALE, 1964 y MINALE, 1972). De ellos, 29 fueron hidrolizados y producían tanto Betanidina como Isobetanidina .

Todos los glicósidos descritos por PIATELLI y MINALE (1964, 1972), fueron aislados por cromatografía en poliamida y caracterizados por espectroscopía visible y electroforesis. Todos los pigmentos mostraban un máximo de absorción entre 534-552 nm y una movilidad electroforética próxima a 1.3-1.8 en relación con la Betanina.

Resumiendo, por los datos de que se dispone hasta ahora, se sugiere que las Betacianinas se diferencian, solamente, en las modificaciones de sus patrones glicosídicos, en la configuración en el C(15) y en la esterificación de los grupos carboxílicos.

La tabla I a continuación, agrupa las Betacianinas existentes en la naturaleza. Esta tomada de T.J.MABRY (1968, 1972) Y M.PIATELLI (1981)

TABLA I

- 1. AMARANTINA**
- 2. ISOAMARANTINA**
- 3. BETANINA**
- 4. ISOBETANINA**
- 5. BETANIDINA**
- 6. ISOBETANIDINA**
- 7. 2-DECARBOXIBETANIDINA**
- 8. BOUGAINVILLEINA-I**
- 9. BOUGAINVILLEINA-II**
- 10. BOUGAINVILLEINA-III**
- 11. BOUGAINVILLEINA-IV**
- 12. BOUGAINVILLEINA-V**
- 13. BOUGAINVILLEINA-VI**
- 14. BOUGAINVILLEINA-VII**
- 15. BOUGAINVILLEINA-VIII**
- 16. BOUGAINVILLEINA-IX**
- 17. BOUGAINVILLEINA-X**
- 18. BOUGAINVILLEINA-XI**
- 19. BOUGAINVILLEINA-XII**
- 20. BOUGAINVILLEINA-XIII**
- 21. BOUGAINVILLEINA-XIV**
- 22. BOUGAINVILLEINA-XV**
- 23. CELOSIANINA**

TABLA I CONTINUACION

- 24. ISOCELOSIANINA**
- 25. GOMPHRENINA-I**
- 26. GOMPHRENINA-II**
- 27. GOMPHRENINA-III**
- 28. GOMPHRENINA-IV**
- 29. GOMPHRENINA-V**
- 30. GOMPHRENINA-VI**
- 31. GOMPHRENINA-VII**
- 32. GOMPHRENINA-VIII**
- 33. IRESININA-I**
- 34. IRESININA-II**
- 35. LAMPRANTHINA-I**
- 36. ISOLAMPRANTHINA-I**
- 37. LAMPHRANTINA-II**
- 38. ISOLAMPHRANTINA-II**
- 39. MESEMBRYANTHEMINA-I**
- 40. MESEMBRYANTHEMINA-II**
- 41. MESEMBRYANTHEMINA-III**
- 42. PHYLLOCACTINA**
- 43. ISOPHYLLOCACTINA**
- 44. PREBETANINA**
- 45. ISOPREBETANINA**
- 46. RIVINIANINA**

2-4.- DIFERENCIAS FISICAS Y QUIMICAS DE LAS ANTOCIANINAS Y BETACIANINAS.-

Dentro de los pigmentos del reino vegetal, las antocianinas constituyen el grupo más importante y extendido. Son hidrosolubles, intensamente coloreados y responsables de casi todos los colores rosas, escarlatas, rojos, malvas, violetas y azules de pétalos, hojas y frutos de plantas superiores. Químicamente están basados en una estructura aromática sencilla, y todos son derivados del pigmento cianidina por adición o sustracción de grupos hidroxílicos o por metilación o glicosilación de los mismos HARBORNE (1973),(Fig.12). Así como las antocianinas están repartidas casi universalmente en las plantas vasculares superiores, las Betacianinas se encuentran de manera exclusiva en el orden Centrospermae; según consta en el capítulo anterior, son químicamente diferentes a las antocianinas y además difieren en las siguientes propiedades: a) las Betacianinas son mucho más inestables a la hidrólisis ácida; b) los colores que adquieren a diferentes pH son distintos; c) sus propiedades cromatográficas y electroforéticas son diferentes. Estas peculiaridades quedan reflejadas en la Tabla II y, gracias a ellas, ambas clases de pigmentos son fácilmente distinguibles con simples ensayos de colores que se pueden realizar con los extractos crudos de las plantas. (HARBORNE ,1973).

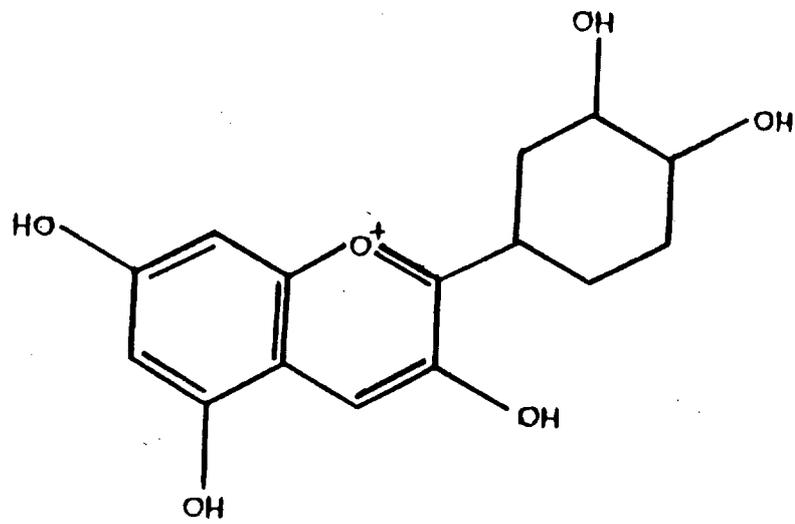


Fig.12: Estructura química general de las Antocianinas. Tomado de HARBORNE (1973).

TABLA II

TEST PARA DIFERENCIAR LAS ANTOCIANINAS DE LAS BETACIANINAS. TOMADO DE HARBORNE (1973).

<u>TEST</u>	<u>ANTOCIANINAS</u>	<u>BETACIANINAS</u>
Con 2M Hcl x 5 min x 100°C	color estable	desaparece el color
Con 2M NaOH añadido gota a gota	cambia a azul-verde y, lentamente, se decolora	cambia a amarillo
Cromatografía 1% Hcl en agua	R _f bajo a intermedio	R _f alto
Cromatografía BAW	R _f 10-40	R _f 00-10
Espectro visible en metanol-Hcl	Máximo en rango 505 a 535 nm.	Máximo en rango 532 a 554 nm.
Electroforesis en papel a un pH=2-4	Migra hacia cátodo	Migra hacia ánodo

BAW = n-butanol-ácido acético-agua (4:1:5,v:v:v)

2-5.- QUIMIOTAXONOMIA DE LAS BETALAINAS.-

Las Betacianinas, están restringidas a diez familias pertenecientes al orden Centrospermae (Tabla III). 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 IV). 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 PIATELLI (1981).

Para MABRY et al.(1976), el orden Centrospermae debe reconocerse como aquel que contiene a las diez familias de plantas productoras de Betaínas que se citan en la tabla III. 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); PIATELLI et al.,(1981).

TABLA III

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 PIATELLI, 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 siete el número de familias que poseían Betacianinas añadiendo a la lista la

Nyctaginaceae, la Aizoaceae y Basellaceae. KRYZ (1919, 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 electroforésis. RAUH y REZNIK (1961), añadieron a la lista de familias con Betacianinas la Didieaceae; 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 cromalcooides. DOPP y MUSSO (1973), descubrieron la presencia de 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. PIATELLI et al. (1981).

TABLA IV

**GENEROS DE LA FAMILIA CACTACEAE (CERCA DE 200 GENEROS,
2000 ESPECIES) QUE CONTIENEN BETACININAS 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)

TABLA IV CONTINUACION

REBUTIA*	(40:3)
SELINOCEREUS	(23:1)
THELOCACTUS	(20:1)

TOMADO DE MABRY (1968). *Contienen betaxantinas

(N° especies del género: N° que tienen betacianinas)

3.- 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 PIATELLI (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 hipótesis, SOSNOVA (1970) comprobó que las Betalaínas tenían un

efecto inhibitorio sobre la reproducción viral.

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 Betalainas puedan jugar algún papel "in vivo" como reguladores de la actividad del ácido indolacético, aunque han sido consideradas como modificadores potenciales del metabolismo auxínico.

3-1.- RELACION DE LAS ESTRUCTURAS QUIMICAS DE LAS BETALAINAS CON LAS DE OTROS PRODUCTOS DE DEMOSTRADA ACCION FARMACOLOGICA.-

Los alcaloides han aportado un gran número de fármacos útiles. Su estructura química es muy variada, y contiene uno o varios anillos nitrogenados. De aquí que su clasificación no haya sido tarea fácil y que continuamente, al descubrirse nuevos compuestos, se esté modificando. TREASE y EVANS (1990).

Algunos autores como HEGNAUER, (1963) consideraron a los aminoácidos fenilalanina, triptófano, ornitina, lisina, histidina y ácido antranílico como los puntos de partida de todos los alcaloides. Otros autores, entre ellos

TREASE y EVANS abogan por las clasificaciones a partir de estructuras más avanzadas. SANCHEZ ALBORNOZ (1980) también defiende el criterio anterior de clasificaciones a partir de estructuras más avanzadas y propone la siguiente clasificación: Piperidina, Piridina, Pirrolidina, Tropano, Quinolina, Quinoclidina, Quinazolina, Isoquinolina, Benzil-isoquinolina, Indol, Ergolina y Purina.

De estos núcleos, los que más nos interesan desde el punto de vista comparativo de estructura química con las Betalaínas, serían los de la Piperidina, Piridina, Quinolina, Pirrolidina e Indol.

Hemos visto cómo a partir del ácido Shikímico podrían sintetizarse los compuestos objeto de este estudio: las Betalaínas y de entre ellos, la Betanina obtenida de frutos de Opuntia dillenii.

Los alcaloides naturales, se sintetizan a partir de los núcleos de PIPERIDINA, PIRROLIDINA, QUINOLINA e INDOL cuyas fórmulas estructurales son las siguientes: (Fig.13)

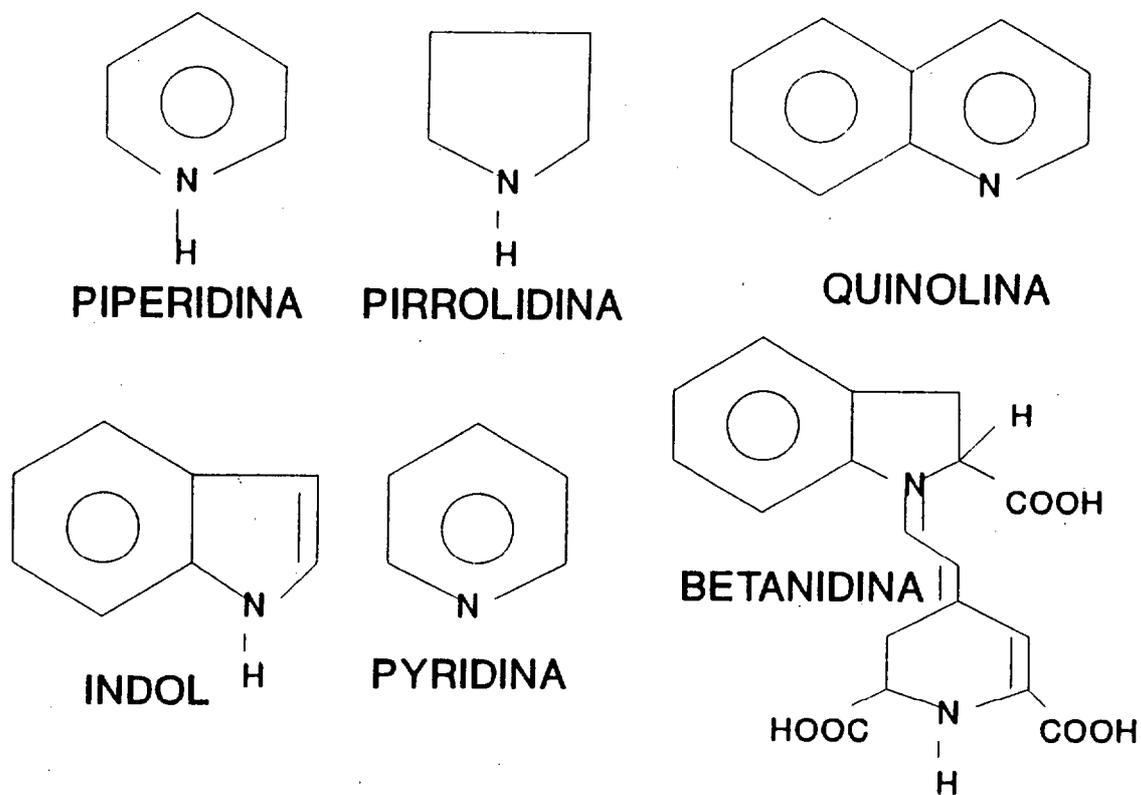


Fig.13: Fórmulas de PIPERIDINA, PIRROLIDINA, QUINOLINA, INDOL, PYRIDINA y BETANIDINA. Tomado de ALBORNOZ.

Vemos pues, que estos cromoalcaloides betalaínicos tienen en su molécula un núcleo piperidínico y otro Indol y, cómo se ve claramente, el núcleo de las quinolinas.

De este mismo origen, se formarían otros alcaloides naturales como la papaverina, berberina, morfina, colchicina, codeína, etc. los cuales se sintetizan a partir de la fenilalanina y tirosina tras la condensación de la amina primaria o secundaria con el ácido Betalámico. SANCHEZ ALBORNOZ, (1980).

A partir de los núcleos básicos mencionados anteriormente se obtienen bien por procesos naturales, de semisíntesis o síntesis, un gran número de compuestos con distintos efectos farmacológicos, en ocasiones principales y casi siempre secundarios que la síntesis no logra hacer desaparecer y que podrían clasificarse como perjudiciales, inútiles, útiles en parte o francamente útiles pues, ejerciendo efectos colaterales o secundarios en otros sistemas orgánicos, aumentan el efecto favorable o disminuyen efectos nocivos.

Tenemos el ejemplo de los antidepresivos tricíclicos (fenotiazinas) utilizados para el control de estados psicóticos pero que además tienen la propiedad de alterar la flora normal del intestino con la aparición de un síndrome patológico distinto. (BOUVRIOUX *et al.*,1990)

Como positivo sería aquella sustancia utilizada para el tratamiento de un síndrome diarréico de etiología infecciosa, que al mismo tiempo tuviese efectos paralizantes sobre el peristaltismo intestinal.

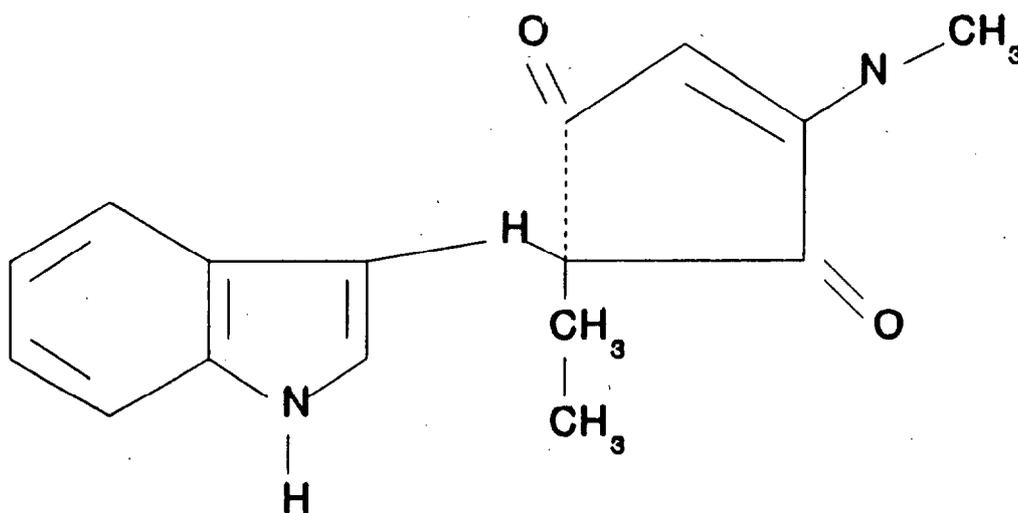
De aquí que, salvo alguna excepción, en la mayoría de los casos una

estructura química similar, debería ejercer con mayor o menor potencia o efectividad la misma función cuando se acopla a los receptores tisulares encargados de ejercerla. Esta molécula, por compartir parte de su estructura con otra podría ejercer su efecto aunque fuese solo en forma "colateral", secundaria.

En el presente trabajo nos hemos propuesto revisar esas moléculas. La mayoría de ellas, parecen tener una relación química extraordinaria, aunque sean utilizadas para tratar síndromes muy dispares: desde antimicrobianos, antivíricos, antiparasitarios, antineoplásicos, antihistamínicos, antisépticos, depresores del S.N.C., etc. Veamos a continuación ejemplos de esta relación o similitud.

3-1.a.- RELACION CON SUSTANCIAS ANTIBIOTICAS.-

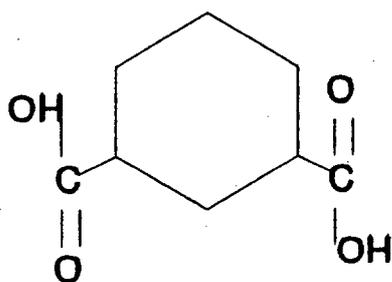
INDOLMICINA- Es un antibiótico producido por Streptomyces Albus (Merk, pag. 4880), y tiene en común el grupo indol. Fórmula de la INDOLMICINA (Fig.14)



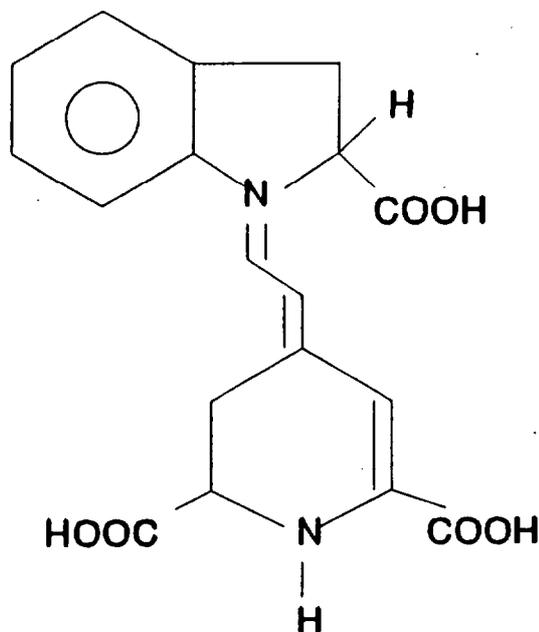
INDOLMICINA

Fig.14 -INDOLMICINA

ACIDO DIPICOLINICO- Es uno de los principales componentes de la pared de las esporas de ciertas bacterias del género *Bacillus* y *Clostridium*. La similitud estructural de estas moléculas permitiría su utilización como antimetabolito, alterando la síntesis normal de proteínas, impidiendo de esta manera la duplicación celular y por lo tanto causando la muerte a la bacteria.



Ac. DIPICOLINICO
Nucleo Pirimidico



BETANIDINA
Nucleo Piperidimico

Fig.15 -Fórmula del Acido Dipicolínico y de la Betanidina.

Otro fármaco de gran utilidad terapéutica y que también posee el núcleo piperidínico es el tuberculostático PAS (ácido p-amino salicílico).

(Fig.16)

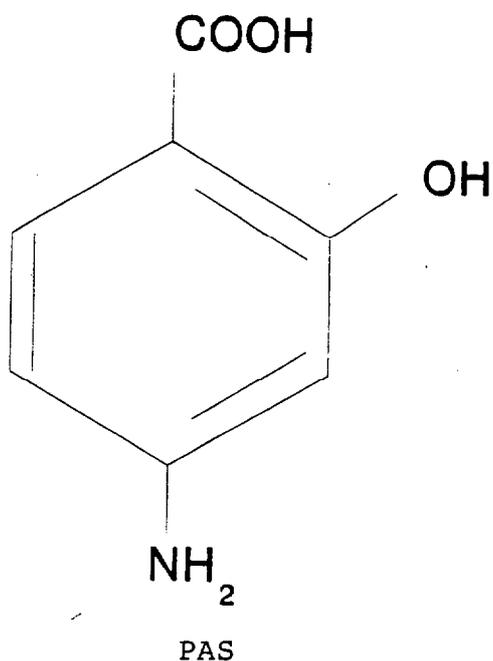


Fig.16 -PAS

Como otro ejemplo de estructuras de sustancias antibióticas relacionadas con las Betalaínas, mencionaremos al CLORANFENICOL. Al igual que ellas, su porción aromática se deriva del ácido SHIKIMICO, que tras unírsele el grupo carbonilo procedente del acetato y formato y la cadena tricarbonada a partir del glicerol, completa su molécula. ALBORNOZ, (1980).

Podemos apreciar que en el núcleo piperidínico, radicales oxidrilos y carboxilos, forman parte de la estructura química del cloranfenicol. (Fig.17).

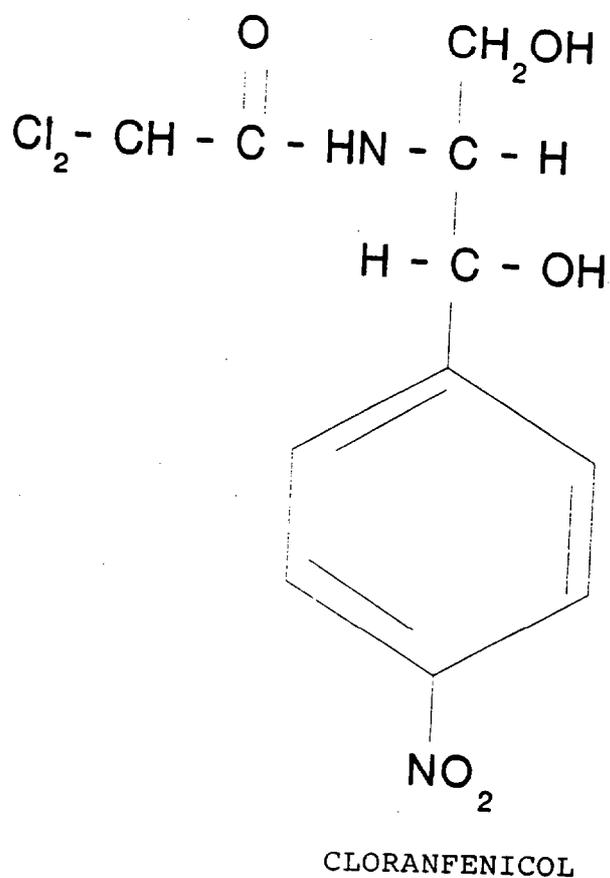
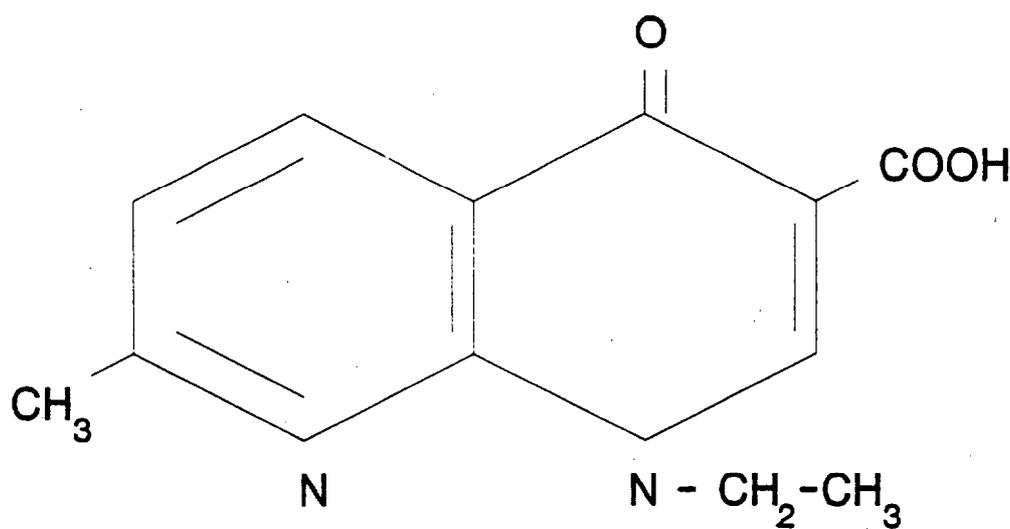


Fig.17 -Fórmula del CLORANFENICOL

QUINOLONAS.-

LESHER (1986), en el simposio sobre las quinolonas como antibióticos (citado por SIPORIN *et al*, 1990) describió los pasos que condujeron al descubrimiento de la primera quinolona útil como antibacteriano: el ácido Nalidíxico (Fig.18). Este producto fue obtenido como una de las impurezas en el proceso de la síntesis de la cloroquina (Fig.19) que, al igual que la Betalaína, tiene una estructura quinolínica, obteniéndose a partir de la dicloroquinolina tras reaccionar con una diamina.



ACIDO NALIDIXICO

Fig.18 -Acido Nalidíxico

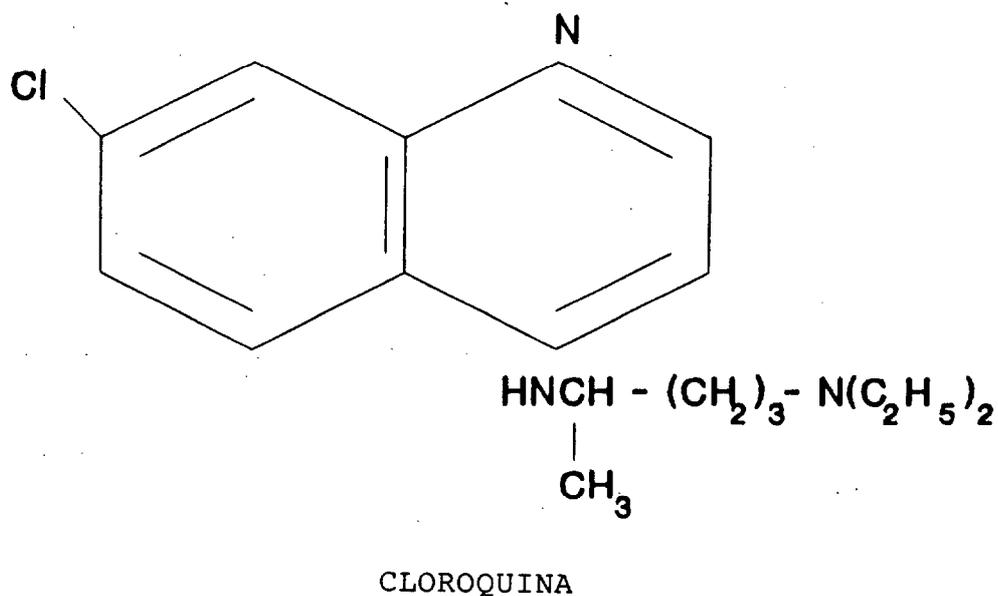


Fig.19 -Cloroquina

La cloroquina reemplazó a la quinina en el tratamiento y control de la malaria. (Fig.19)

Por alteración de la molécula del ácido nalidíxico se han obtenido numerosos compuestos con una eficaz acción antibacteriana: ácido oxolínico, acrosoxacina, flumequina, ciprofloxacina, norfloxacina etc. y otros muchos compuestos en desarrollo y prueba.

Las Quinolonas con una probada actividad antibacteriana son derivadas por un lado de la NAFTIRIDINA (ácidos pirimídico y pipemídico) y de la CINOLINA (cinoxacino) y el resto, los más importantes sin lugar a dudas, de la QUINOLINA. (Fig.20)

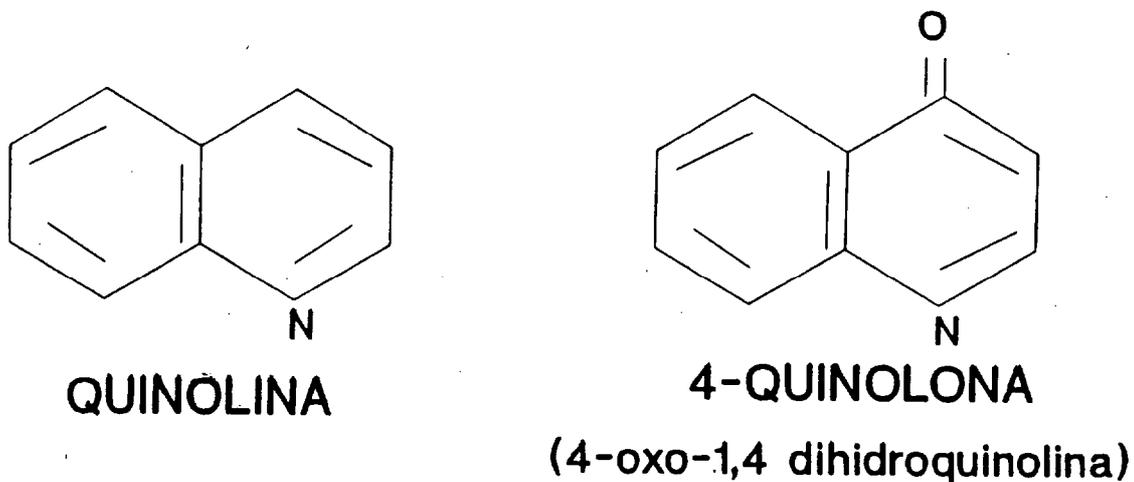
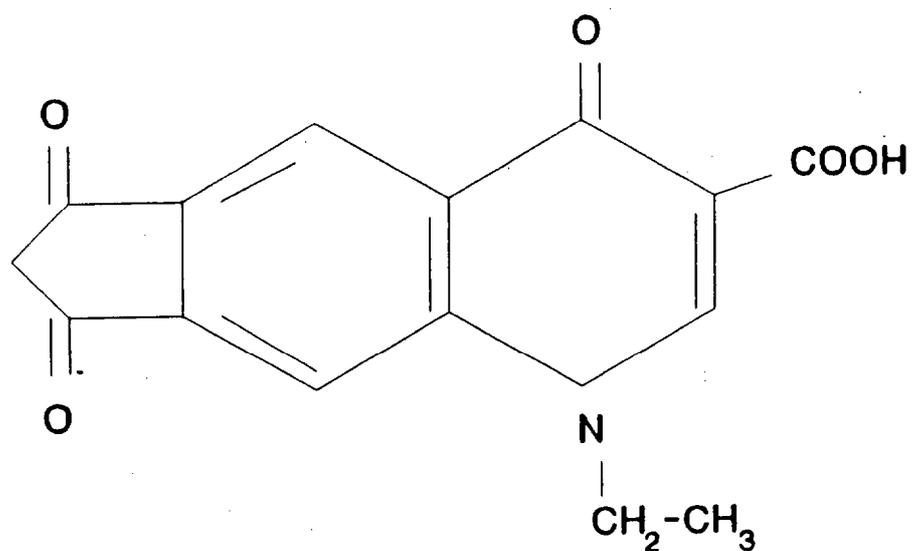


Fig.20 -Quinolina

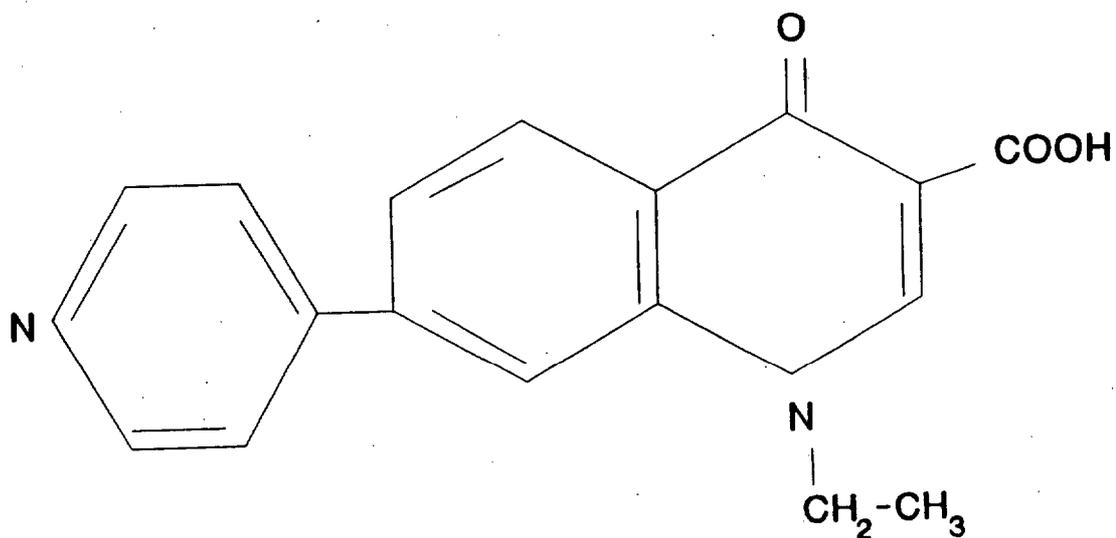
QUINOLONAS NO FLUORADAS.-

Aunque la inclusión de uno o más átomos de Flúor en las moléculas de estos compuestos les confieran mejores propiedades farmacocinéticas y de efectividad, los compuestos no fluorados son activos frente a un gran número de gérmenes patógenos. He aquí los más importantes derivados de la Quinoleína: Acido oxolínico (Fig.21), Acroxacino (Rosoxacino) (Fig.22), Tioxacino, Droxacino y Miloxacino.



ACIDO OXOLINICO

Fig.21 -ACIDO OXOLINICO.



ACROSAXACINO (ROSOXACINO)

Fig.22 -ACROSOXACINO (ROSOXACINO).

Podemos apreciar que la porción piridínica de la parte quinolínica de la molécula, tiene también un grupo carboxilo en la posición 3 y la Beta-nidina, lo tiene en la posición 2.

El incremento desde 1986 de las investigaciones sobre estructuras quinolónicas con posible efecto antibacteriano ha superado el de cualquier otro tipo, esperándose un aumento del crecimiento de las mismas en un 23%. (REUBEN y WITTCOFF, 1989)

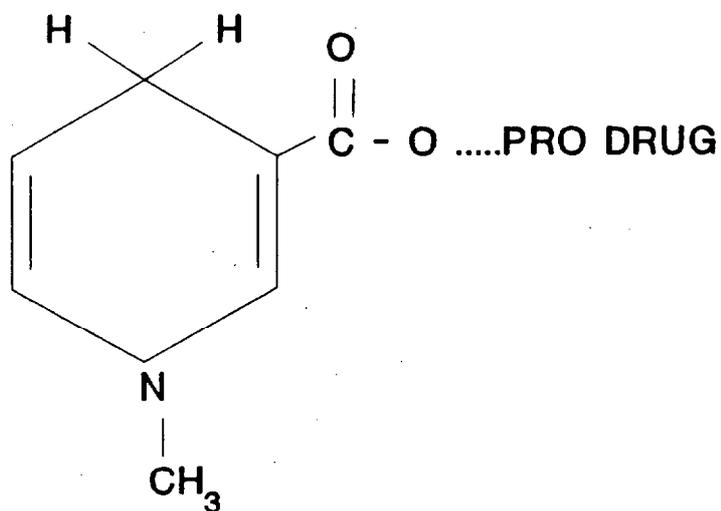
3-1.b.- RELACION CON SUSTANCIAS ANTIVIRICAS.-

PIATELLI (1981) considera, citando a SOSNOVA (1970), que las Betalaínas tendrían un efecto inhibitorio sobre la reproducción vírica, ya que su producción aumenta considerablemente en tejidos lesionados, siendo éste un mecanismo de defensa de la planta.

A) RELACION CON TRANSPORTADORES DIHIDRO PIRIDINICOS.-

PALOMINO (1990) en "Drugs of the future", describe en detalle la cinética de fármacos por transportadores dihidropiridínicos. Según él, los ésteres de la Dihidropiridina, podrían ser considerados "PRO-DRUGS", capaces de atravesar la barrera hematoencefálica con facilidad, transportando un principio activo y permitiéndole actuar en grandes concentraciones en el

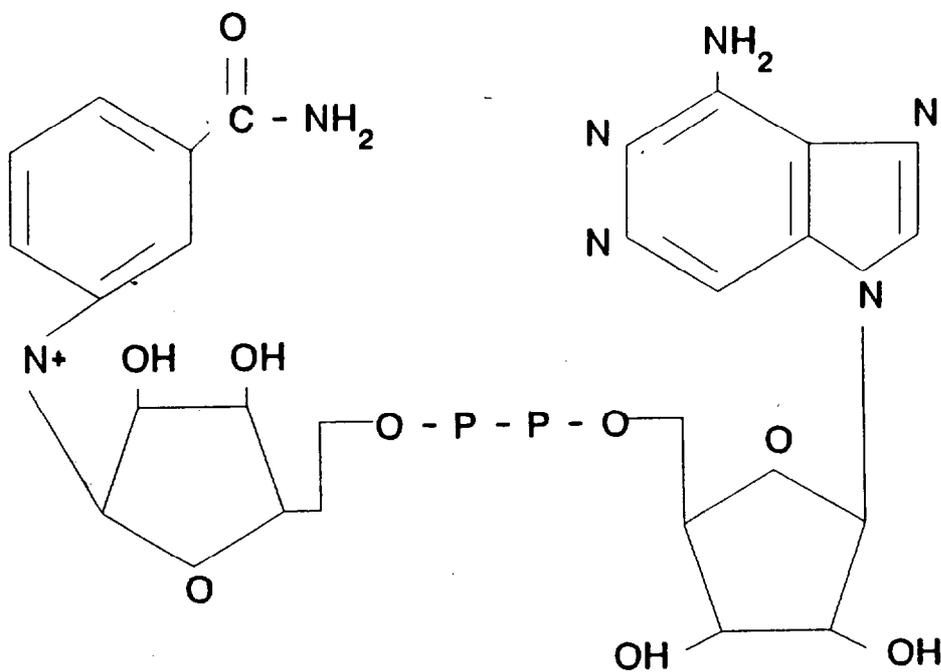
"locus" preciso, con lo que se evitaría la toxicidad para otros sistemas.(Fig.23)



ESTER DE DIHIDROPIRIDINA

Fig.23 -Ester de Dihidropiridina

Según BODOR y FARAG (1988), al igual que el coenzima natural NAD (Nicotinamida-adenina dinucleótido), el ester de dihidropiridina sería un sustrato involucrado en la transferencia de hidrógeno por un proceso REDOX. Este y otros coenzimas del nucleótido de piridina, asociados con diversas dihidrogenasas, están involucrados en la oxidación de alcoholes primarios y secundarios. (Fig. 24)



NICOTINAMIDA - ADENINA DINUCLEOTIDO (NAD)

Fig.24 -Nicotinamida-adenina Dinucleotido. (NAD)

La dihidropiridina atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica y los fármacos unidos a ella también lo harían. Esta sería hidrolizada en otro sistema enzimático, liberando el fármaco en altas concentraciones, y quedando transformada en TRIGONELLINA, la cual es atóxica. (Fig.25)

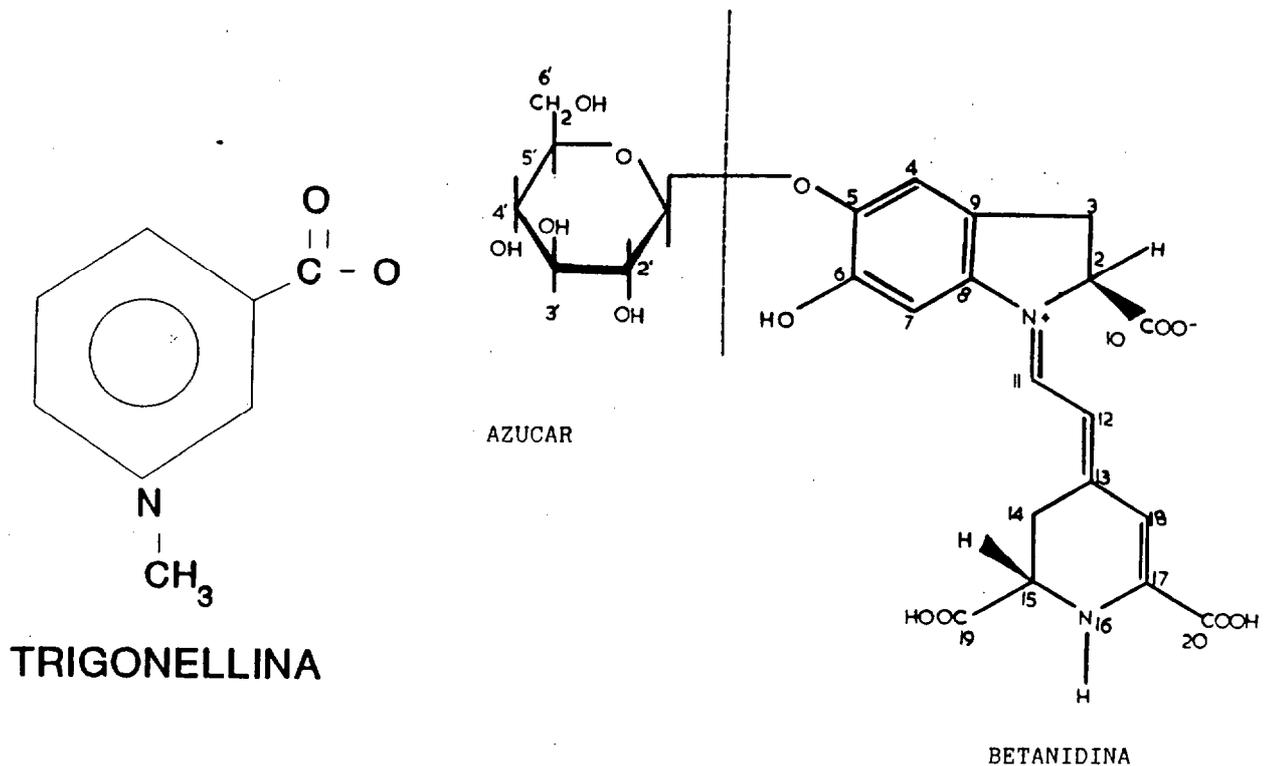
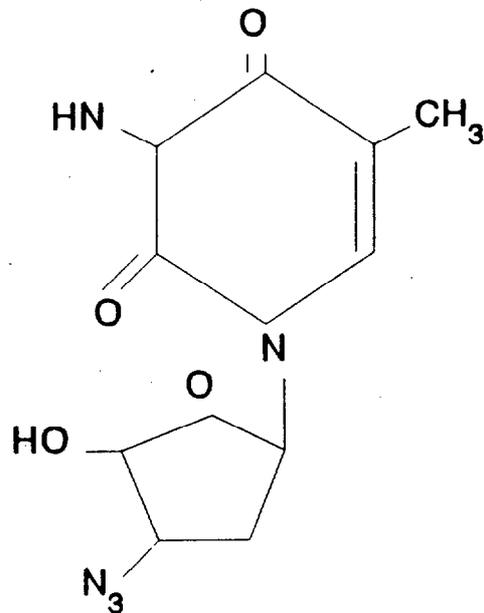


Fig.25 -Trigonellina. Fig.25A -Betanina

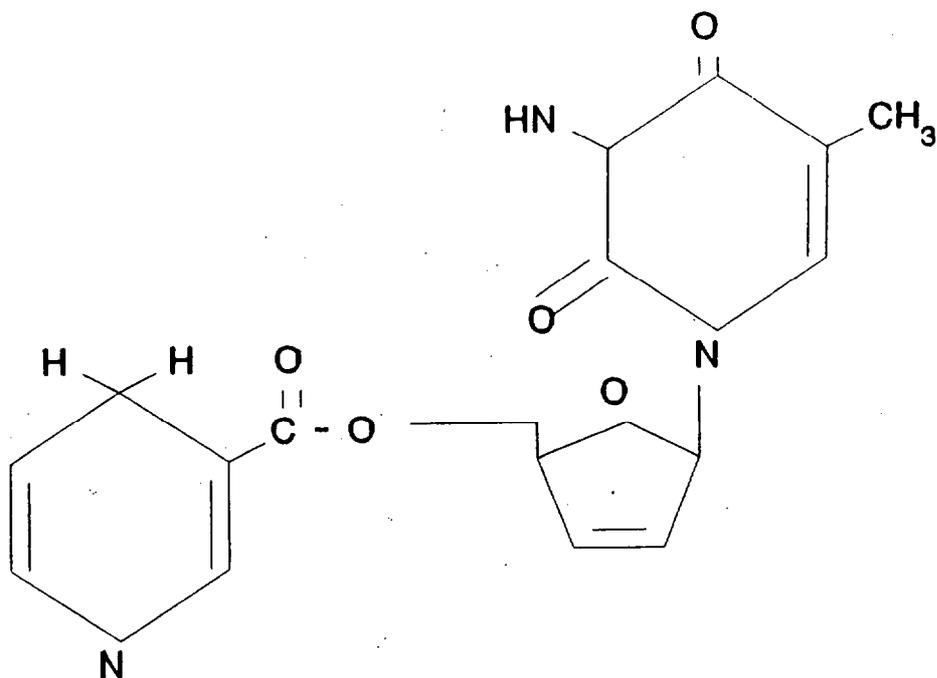
Parece ser que, aunque los nucleósidos no atraviesan la barrera hemato-encefálica, compuestos con un componente dihidropiridínico como el AZT (zidovudina), el DNT (Dihidronicotil timedinene) y otros anti-SIDA de la misma serie, alcanzan altas concentraciones en cerebro por difusión pasiva y allí serían liberados lentamente.



FORMULA DEL AZT

Fig.26 -Fórmula del AZT

Según TORRENCE *et al.* (1988), el dihidro-nicotil timedinene, con dos núcleos piridínicos, atraviesa la barrera hemato-encefálica cinco veces más fácilmente que el AZT. (Fig.27)



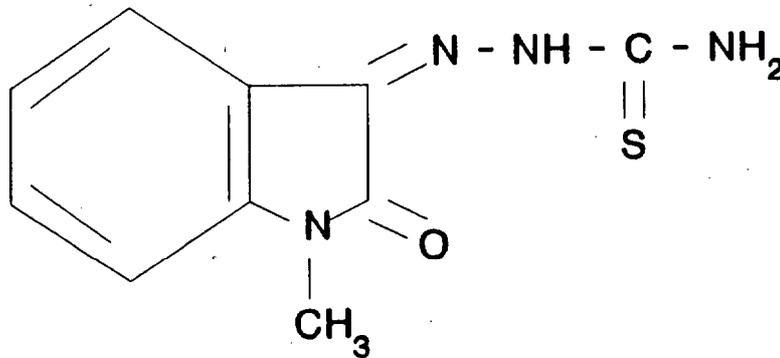
5'-(N-Metil-Dihidronicotil) THYMEDINENE

Fig.27: 5-(n-metil-dihidronicotil)thymédinene

Si observamos las estructuras químicas de los componentes mencionados, no cabe duda de que existe cierta similitud entre ellos. La molécula de Betanina (Fig.25A) está realmente formada por una estructura indólica unida a una estructura piridínica y ambas estructuras se encuentran en la molécula del NAD. También debemos observar en la estructura de la TRIGONELLINA (Fig.25) la existencia de un amonio cuaternario con carga positiva que también esta presente en la Betanina.

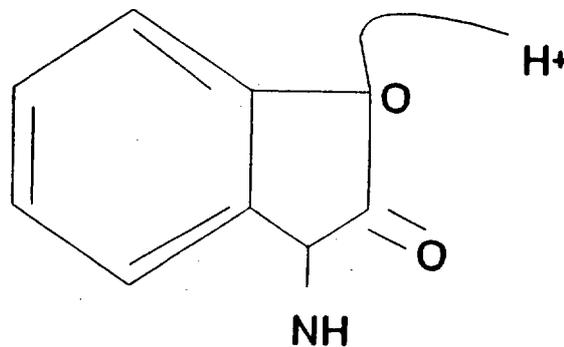
B) METHISAZONA.-

La Methisazona (fig.28) es una tiosemicarbazona derivada del Isatin (fig.29), utilizada inicialmente en el tratamiento de la tuberculosis y posteriormente en el tratamiento y profilaxis de las infecciones víricas (viruela, adenovirus, influenza etc.). Su estructura indólica, tiene cierta semejanza con la Betanina.



METHISAZONA

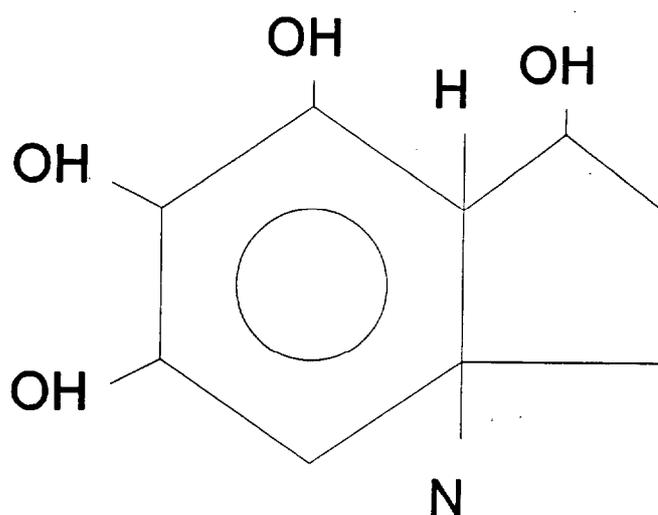
Fig.28 -Methisazona



ISATIN

Fig.29 -Isatin

CASTANOSPERMINA, que según REUBEN y WITTCOFF (1989) podría actuar como la azidotimidina (AZT), inhibiendo la infección experimental del VIH "in vitro". WALKER *et al* (1987), y GRUTERS *et al* (1987). Basándonos en estas relaciones estructurales bien pudiera ser que la aseveración de TRONCHET (1968) y los trabajos de SOSNOVA fueran correctos en relación con los efectos antivíricos de las Betalaínas.



CASTANOSPERMINA

Fig.30: Castanospermina.

3-1.c.- RELACION CON ANTISEPTICOS.-

A) COMPUESTOS DEL AMONIO CUATERNARIO

Es aceptado que la actividad antiséptica de los compuestos del amonio cuaternario se debe a las singulares cargas eléctricas de su molécula. Son ampliamente utilizados como detergentes catiónicos y tienen una gran afinidad por las membranas celulares. Estas membranas son afectadas por la interacción de las cargas catiónicas con las estructuras hidrofóbicas intracelulares y alterando las estructuras de superficie de la membrana, la destruye. MLYNARCIX *et al* (1990).

BLOCK (1968) en una amplia revisión de estos compuestos representa la fórmula general de la forma siguiente:

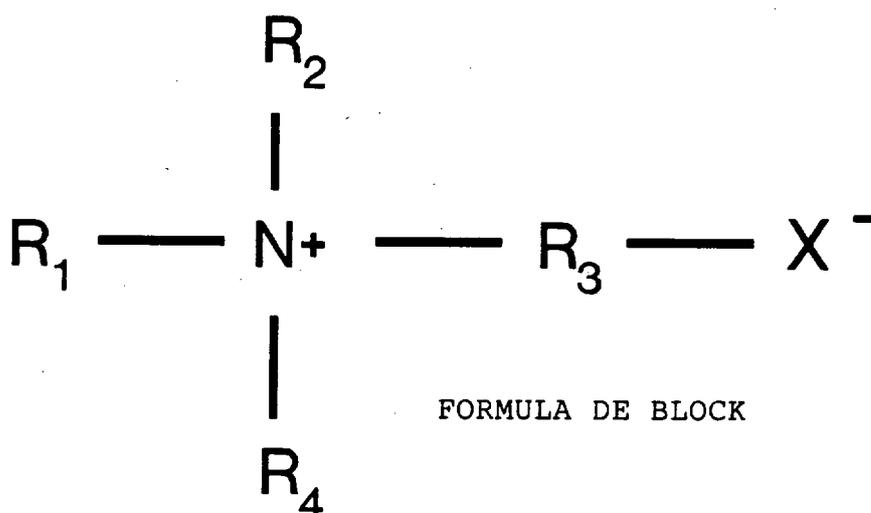


Fig.31 -Fórmula de Block

El átomo de nitrógeno con los grupos alquílicos unidos a él, forma el catión cargado positivamente, mientras que una unión electrocovalente con el N puede ser un anión (COO-), o una solución de Cloro o Bromo.

Los grupos alquílicos pueden ser cíclicos o acíclicos, aromáticos, ester o amidas. El nitrógeno cuaternario está presente también en un gran número de compuestos activos (vitaminas, relajantes musculares, antimicrobianos etc.)

Fue BOWNING (1926), el primero en describir los efectos antimicrobianos de los derivados cuaternarios de la piridina y la quinolina. DOMAGK (1935), describió el efecto antibacteriano de las sales del amonio cuaternario y a partir de entonces, se ha seguido investigando el efecto de dichos compuestos, ya que ha sido ampliamente demostrada su capacidad bactericida: Gram(+) y Gram(-), esporicidas y virucidas.

LINDSTEDT *et al* (1990), investigaron la actividad antimicrobiana y antifúngica de los esteres de la BETAÍNA (Trimetil-glicina, un protector hepático $\text{CH}_3 \text{N}^+ \text{CH}_2 \text{COO}^-$), y alcoholes grasos de cadena larga entre $(\text{CH}_2)_9 \text{CH}_3$ y $(\text{CH}_2)_{17} \text{CH}_3$. Por un lado encontraron que el más activo era el de 18 átomos de carbono y por otro, que estos compuestos de larga cadena alquílica se hidrolizaban rápidamente, con lo que su toxicidad se reducía al mínimo. Debemos recordar también que el fruto de Opuntia dillenii Haw. (tuno indio) es consumido por enfermos ictericos.

En la estructura química de la Betanina está también presente el nitrógeno cuaternario con carga positiva y un grupo carboxilo (COO-) con carga negativa. Además tiene un núcleo piridínico (Fig.32). Vemos pues que la Betanina posee la estructura básica de la Betaina, lo que justificaría su posible acción antimicrobiana.

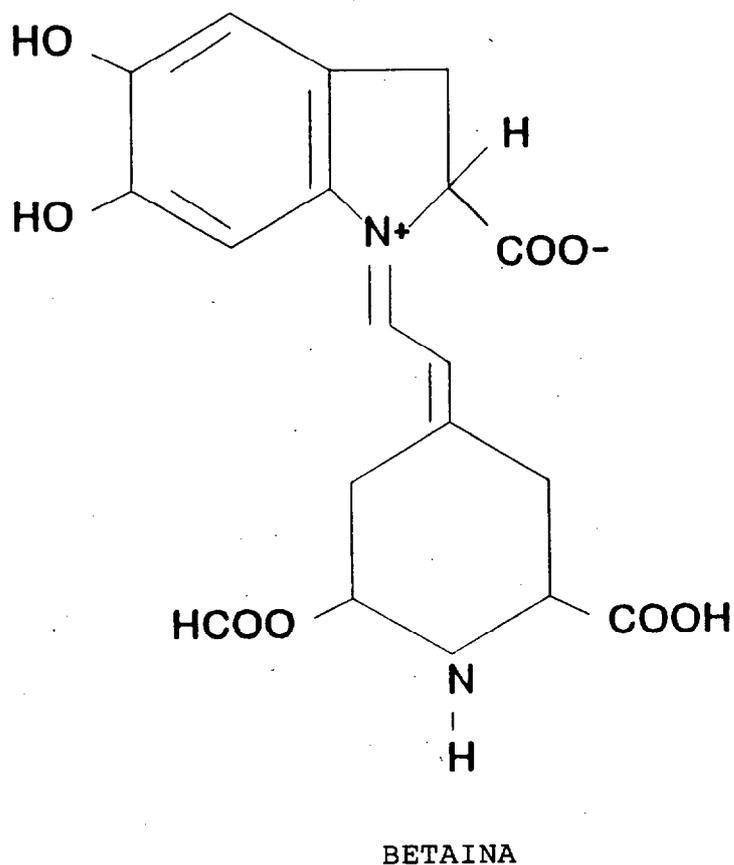


Fig.32 -Fórmula de la Betaina

3-1.d.-RELACION CON ANTIPARASITARIOS.-

Recientemente LOPEZ BREA y SANZ (1991), en una revisión sobre la quimioterapia de la equinococis, señalaban el avance en la eficacia del tratamiento de esta helmintiasis con el empleo de derivados benzimidazólicos: parbendazol, mebendazol y albendazol; isoquinolónicas: prazicuantel; e indiolindonas: isatina (Fig.29), considerándolos como fármacos de elección en el control y tratamiento y como coadyudantes de la resección quirúrgica de los quistes del *Echinococcus granulosus* y *Echinococcus multilocularis*. (Fig.33)

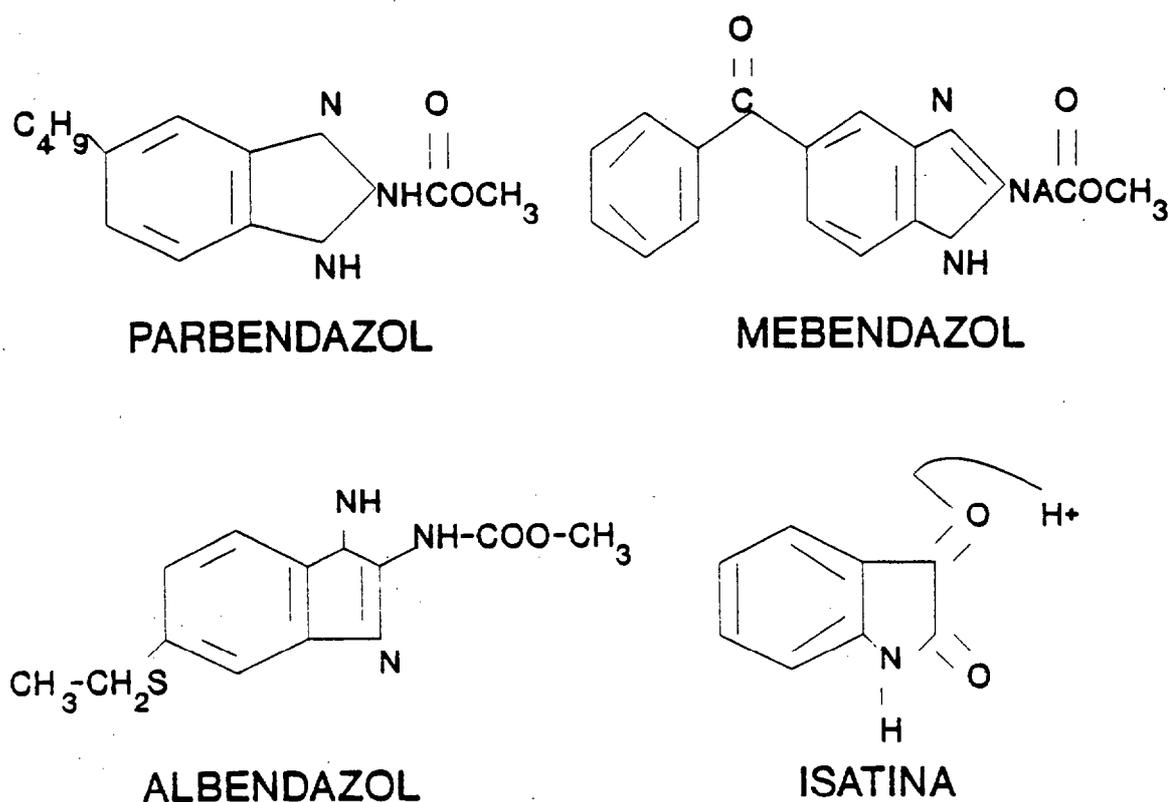


Fig.33: Fórmulas de: PARBENDAZOL, MEBENDAZOL, ALBENDAZOL e ISATINA.

Como antiparasitario clásico, debemos mencionar también a la nicotina con una estructura pirrolidin-piridina y activo frente a ectoparásitos y helmintos.

(Fig.34)

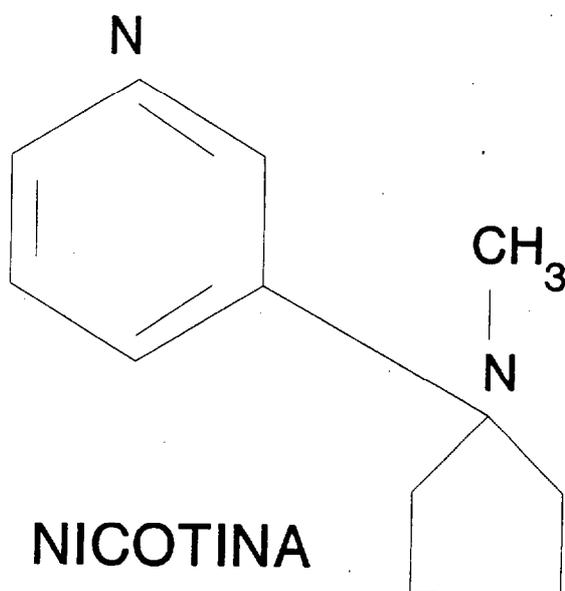


Fig. 34 -Nicotina

ESTUDIO EXPERIMENTAL

4.- OBJETIVOS.-

Basados en los antecedentes expuestos, se decidió abordar el estudio de algunos aspectos farmacológicos y físico-químicos del jugo obtenido de los frutos de la planta Opuntia dillenii Haw.. La razón por la cual se seleccionó esta especie de Opuntia y no otra, fue principalmente porque este fruto 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 biogénéticos y quimiotaxonómicos.

El presente trabajo de tesis doctoral se planificó con el propósito de abordar varios 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 y microbiológicos, que nos permitiera conocer la estabilidad y actividad de estos productos bajo determinadas condiciones de pH, luz y temperatura y así poder establecer las condiciones óptimas para nuestro trabajo evitando en lo posible la degradación del extracto.

3-Comprobar la existencia de principios con actividad biológica en el jugo obtenido de los frutos de la planta Opuntia dillenii Haw. que se utilizaban de manera empírica por sus propiedades antidiarréicas y posiblemente antibacterianas dado que, tras una ingesta masiva del fruto, se puede presentar un fecaloma no acompañado de sobreinfección bacteriana.

Con este propósito se realizaron estudios microbiológicos que se concretaron en los siguientes apartados:

A- Reunir el mayor número de especies y de cepas posible, para poder realizar un amplio muestreo de la actividad inhibitoria de las sustancias objeto de este estudio.

B- Determinar la influencia de la acidez del medio sobre el crecimiento normal de las cepas de la colección particular de este trabajo.

C- Realizar las pruebas necesarias para poder estimar la posible actividad antibacteriana del extracto acuoso rico en betalaína fracciones 39-80 y 52-80.

D- Realizar las mismas pruebas con otras sustancias de actividad antibacteriana conocida con el fin de poder establecer comparaciones sobre su actividad.

4- Determinar el contenido de betacianina en los extractos acuosos ricos en betalaínas.

4-1.-PRIMER OBJETIVO

El primer objetivo de este trabajo, la obtención de un extracto rico en betalaínas, se logró gracias a la técnica puesta en marcha por FERNANDEZ PEREZ, (1989), quién siguiendo los pasos propuestos por KOPELMAN, 1977; WYLEY, R., (1978) para la obtención del extracto "rojo de remolacha-beta-nina" (E-162) obtuvo de los frutos de Opuntia dillenii Haw, tras un proceso de maceración y extracción acuosa, un jarabe rojo oscuro el cuál deshidrató (liofilizó) hasta formar un polvo muy hidrosoluble denominado extracto acuoso bruto.

Con el propósito de prepurificar en lo posible este extracto acuoso bruto y siguiendo los pasos de VERGERONT et al. (1980) y SCHWARTZ et al. (1980), se utilizó la cromatografía separativa en Sephadex G25M, por ser éste un método muy eficaz para la prepurificación de extractos acuosos brutos ricos en betalaínas.

Una vez realizada la cromatografía, las fracciones ricas en betalaínas (nº39 al nº80, bandas I y II), se mezclaban y, al igual que con el extracto acuoso bruto, se liofilizaban y cuantificaban. La cuantificación se realizaba calculando la diferencia de peso existente entre el tubo de ensayo con la muestra liofilizada y el del tubo vacío antes de añadir el extracto. Esta muestra liofilizada constituye el "extracto acuoso bruto de frutos de Opuntia dillenii Haw, parcialmente purificado". De la misma manera se realizaba la

concentración, cuantificación y almacenamiento de las fracciones 52-80 banda II que es la más rica en betalaína desechándose las fracciones 39 a 51 las cuales contenían menor cantidad de betalaínas y que una vez mezcladas y liofilizadas constituyen la "fracción acuosa de frutos de Opuntia dillenii Haw. parcialmente purificado" fracciones 52-80.

- MATERIAL Y METODOS

1- EXTRACCION Y PURIFICACION PARCIAL DEL EXTRACTO.-

1-A. -PREPARACION DEL EXTRACTO ACUOSO BRUTO DE FRUTOS DE OPUNTIA DILLENII HAW.

a.-Fuentes de materia prima.

La Opuntia dillenii Haw es una cactácea silvestre muy abundante en nuestro entorno. Fue identificada por D. BRANWELL (Jardín Botánico "Viera y Clavijo", Las Palmas). Sus frutos maduros tienen un intenso color rojo-violeta y se incluyen en la dieta de los habitantes de la zona. Los frutos utilizados para este trabajo fueron recogidos durante los meses de octubre a enero de plantas que abundan en la zona de Montequemado (Marzagán), de Las Palmas de Gran Canaria.

b.-Conservación de la materia prima.

Los frutos de Opuntia dillenii Haw., se seleccionaban, se limpiaban, se pesaban y, finalmente, se almacenaban a una temperatura de -20°C hasta el momento de su procesamiento.

c.-Extracción del jugo.

Para cada extracción se utilizaban 200-220 g. de frutos maduros de Opuntia dillenii Haw. Las muestras congeladas se troceaban y trituraban en presencia 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 esta forma, se conseguía un extracto acuoso intensamente coloreado de rojo y muy viscoso. Este se centrifugaba a 10000 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 de Opuntia dillenii Haw). Finalmente, el sobrenadante se filtraba en papel Whatman n°4 a temperatura ambiente con la ayuda de una bomba de vacío (Milipore).

d.-Concentración del jugo.

El extracto acuoso filtrado se repartía en tubos de ensayo de 12 ml. y se llevaba a sequedad en un liofilizador Edwards High Vacuum modelo EF 03 (versión refrigerada). 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 Torr y una temperatura de condensador que se estabilizaba a -80°C.

e.-Cuantificación del extracto acuoso bruto.

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

1-B.-PURIFICACION PARCIAL DEL EXTRACTO ACUOSO BRUTO EN COLUMNA DE FILTRACION EN GEL SEPHADEX.-

Se utilizó la cromatografía separativa en Sephadex G25M por ser un método muy eficaz para realizar la prepurificación de los extractos acuosos ricos en betalainas tal como ya habían demostrado VERGERONT et al.

(1980) y SCHWARTZ et al.(1980).

a.-Preparación de la columna.

Se utilizó una columna de vidrio (Anorsa), con dimensiones de 3 X 50 cm., que se rellenó con una fase estacionaria de Gel tipo Sephadex G25 medium (Sigma) con un tamaño de partícula de 50-100 milimicras. 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, 4cc de agua por cada gramo de gel seco. Una vez fabricada la papilla de Gel, se desgasificaba y se mantenía a una temperatura de 4-5°C en la que se trabajaba 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 alcanzaba la altura, previamente establecida, de 43 cms. Una vez sedimentado, el lecho cromatográfico se equilibraba con ácido acético al 1% en agua desionizada que sería la fase móvil empleada posteriormente 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 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.

b.-Chequeo del lecho cromatográfico.

La integridad y correcto estado del lecho cromatográfico se chequeaba inmediatamente después de que era equilibrado con la fase móvil utilizada como eluyente (1% ácido acético en agua desionizada), y, también periódicamente, cada cinco o seis 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.

c.-Preparación de la muestra para cromatografiar.

Una cantidad de 600-640 mg. de extracto acuoso bruto de frutos de Opuntia dillenii Haw, obtenido y liofilizado según se ha expuesto en 1-A, se reconstituía con ácido acético al 1% en agua desionizada para dar una concentración de 15-16 mg/cc. Siguiendo las indicaciones de VERGERONT et al. (1980), estas soluciones se mantenían con una viscosidad siempre inferior a 2 en relación con la de la fase móvil. Las muestras se acidificaban hasta un pH igual a 2.80 con HCl 0.1 N y se centrifugaban 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 inferior al 25% del volumen total de la columna (PHARMACIA FINE CHEMICALS, 1979; VERGERONT et al., 1980), que en nuestro caso era siempre de 40cc.

d.-Condiciones cromatográficas.

La purificación del extracto acuoso bruto, se desarrollaba en oscuridad y a una temperatura de 4-5°C. Se utilizó una fase móvil formada por ácido acético (Scharlau) al 1% en agua desionizada (v:v) con una fuerza iónica superior a 0.8 (SCHWARTZ *et al.*, 1980). El flujo 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 agua. Las fracciones se recogían con un colector automático (LKB, Utrarac 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 la nueva muestra, la columna se lavaba por un tiempo de al menos de 24 horas con el propósito de eliminar cualquier sustancia incolora.

e.-Cuantificación y conservación del extracto acuoso bruto parcialmente purificado.

Como nuestros estudios estaban dirigidos al estudio de un extracto acuoso rico en cromoalcaloides betalaínicos, se seleccionaron las bandas coloreadas que se eluían de la columna de Sephadex G25M y que aportaban un mayor rendimiento (bandas I y II) ya que la cantidad de producto que se podía obtener de las fracciones superiores a la segunda banda era inapreciable e insuficiente para realizar los ensayos farmacológicos del presente trabajo. 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 bruto en las condiciones citadas en 1-B, las fracciones ricas en betalainas (nº39 al nº80, bandas I y II), se mezclaban y, en las mismas condiciones descritas en el apartado 1-A (d y e) para el extracto acuoso bruto, se liofilizaban y cuantificaban. Esta muestra formada por las fracciones citadas anteriormente constituía el "extracto acuoso bruto de frutos de Opuntia dillenii Haw parcialmente purificado fracciones 39-80" que se conservaba a una temperatura de -20°C.

f.-Cuantificación y conservación de la fracción 52-80.

Se procedía exactamente igual que en el apartado anterior salvo en que las fracciones seleccionadas iban de la nº 52 a la nº 80, bandas I y II. Estas se mezclaban y, en las mismas condiciones descritas en el apartado 1-A (d y e) para el extracto acuoso bruto, se liofilizaban y cuantificaban. Esta muestra, formada por las fracciones citadas anteriormente, constituía lo que denominamos "fracción acuosa de frutos de Opuntia dillenii Haw parcialmente purificado fracciones 52-80" y era conservada a -20°C hasta el momento de ser utilizada.

- RESULTADOS

La tabla V, ilustra de manera resumida los pasos dados hasta la obtención de los extractos ricos en betalaínas utilizados para este estudio. El rendimiento obtenido al aplicar esta técnica se puede resumir con la tabla VI partiendo de un peso de 200-220 gramos de frutos frescos de Opuntia dillenii Haw. que representa el 100% del peso original.

TABLA V

**PREPARACION DEL EXTRACTO ACUOSO PARCIALMENTE
PURIFICADO OBTENIDO DE FRUTOS DE OPUNTIA DILLENII HAW.
(EX.AC.O.D.)**

MATERIA PRIMA (FRUTOS O.DILLENII HAW) (100%)

TRITURACION Y EXTRACCION CON AGUA DESIONIZADA

10.000 RPM X 30 MIN. X 0-5°C.

FILTRACION

LIOFILIZACION

AGUA	EXTRACTO ACUOSO BRUTO (EX.BR)	RESIDUOS***
(84.15±1.76%)	(8.59±0.28%)	(8.05±0.28%)

2000 RPM X 20 MIN X 0-5°C.

CROMATOGRAFIA LIQUIDA

(SEPHADEX G25M)

FRACCIONES N° 39-80

FRACCIONES N° 52-80

(BANDAS I Y II)**

(BANDAS I Y II)**

LIOFILIZACION

**EXTRACTO ACUOSO PARCIAL-
MENTE PURIFICADO**

**FRACCION ACUOSA PARCIAL-
MENTE PURIFICADO**

(2.63±0.85%)*

(2.63±0.85%)*

*** Porcentaje obtenido a partir de la cantidad total de muestra.**

**** Banda II=corresponde con 1.45±0.39% (n=3) del EX.AC.O.D.**

***** Residuos= todos los restos sólidos (cáscaras, etc.)**

TABLA VI

RENDIMIENTO OBTENIDO DE LA MATERIA PRIMA (FRUTOS DE O. DILLENII HAW.) EXPRESADO EN % RESPECTO AL PESO ORIGINAL.

MATERIA PRIMA (200-220 G. DE FRUTOS FRESCOS)	100%
AGUA	84.15 % \pm 1.76
RESIDUOS* (SEMILLAS, CASCARA, ETC.)	8.05 % \pm 0.28
EX.BR.** (LIOFILIZADO)	8.59 % \pm 0.40

Nota: el rendimiento del EX.AC.O.D. corresponde al $2.63 \pm 0.85\%$ (n=10) del peso de EX.BR. ($8.59\% \pm 0.40$ del 100% de materia prima) que se aplica sobre el lecho de Sephadex G25M.

- DISCUSION

Con el propósito de confirmar la presencia de betalaínas en las fracciones obtenidas por cromatografía líquida en Sephadex G25M FERNANDEZ PEREZ (1989), puso en práctica las técnicas de espectrofotometría, cromatografía y electroforesis descritas por varios autores, entre ellos PIATELLI (1964), HARBORNE (1973), NILSSON (1970) y VERGERONT (1980). Utilizó como patrón de las betacianinas un producto comercializado como "concentrado rojo-remolacha" (E-162) (Trades, S.A Barcelona), con una riqueza de 1% en betanina-isobetanina sin la presencia de ningún tipo de compuesto añadido según certificado del fabricante y que constituía un extracto bruto de raíces de Beta vulgaris var. rubra. Este concentrado lo sometía al mismo procedimiento de purificación parcial empleado para el extracto bruto obtenido de frutos de Opuntia dillenii Haw. y, de esta forma, se disponía de un extracto rico en betacianinas que servía como referencia. El estudio comparativo de los resultados de aplicar las técnicas antes mencionadas sobre los dos extractos el de la Beta vulgaris var rubra y el obtenido de los frutos de Opuntia dillenii Haw. le llevaron a confirmar ampliamente la presencia de betalaínas en el extracto en estudio.

Por ello y dado que en este trabajo se ha utilizado la misma técnica descrita y puesta en marcha por FERNANDEZ PEREZ, (1989) se puede confirmar el primer objetivo: Obtener a partir de frutos de Opuntia dillenii Haw un extracto rico en betalaínas.

4-2. SEGUNDO OBJETIVO

El segundo objetivo era concretar las condiciones óptimas de temperatura, luz y pH para trabajar con el extracto acuoso rico en betalaína sin que sufra, en lo posible, degradación alguna durante su manipulación. Para ello, en base a las indicaciones de VON ELBE *et al.* (1974), quienes investigaron cómo algunos factores físicos y químicos afectaban la estabilidad de la betacianina extraída de raíces de remolacha roja, se estableció un estudio comparativo entre la estabilidad del extracto de frutos de Opuntia dillenii Haw frente a extractos de raíces de Beta vulgaris var. rubra.

- MATERIAL Y METODOS

Se pesaron cantidades iguales de remolacha roja (200 gms) y de frutos de Opuntia (200 gms); se sometieron al proceso descrito anteriormente de maceración y extracción acuosa (4-1-A y 4-1-B); se centrifugaron, filtraron y liofilizaron y, a continuación, se reconstituyeron con ácido acético al 1% para obtener una concentración de 17,7 mg/ml. Una vez reconstituídas las muestras se procedió a pasarlas por la columna de gel (Sephadex G25M), recolectando las fracciones correspondientes a las bandas I y II en un recipiente de plástico y liofilizándolas a continuación.

El peso obtenido se disolvió en solución tampón fosfato de pH 4,06 hasta un volumen de 350 ml para repartir en baterías de 50 tubos con 7 ml

cada tubo. El proceso anterior se repitió las veces necesarias para obtener baterías de 50 tubos cada una, a un pH de 4,06, 5,07 y 7,1 respectivamente, tanto de extracto de frutos de Beta vulgaris, como de extracto de frutos de Opuntia dillenii.

Cada batería de 50 tubos con su pH correspondiente se sometió a las siguientes condiciones:

10 tubos (1-10)	Tª ambiente	luz de Neón
10 tubos (11-20)	Tª ambiente	luz ultra-violeta
10 tubos (21-30)	Tª ambiente	luz solar
10 tubos (31-40)	Tª ambiente	oscuridad
10 tubos (41-50)	Tª ambiente	oscuridad

Tiempo indefinido.

A intervalos de tiempo establecidos se hicieron lecturas de cada tubo en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 535 nm y de esta manera se valoró la degradación de la betacianina.

- RESULTADOS

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla VII a continuación:

TABLA VII

ESTABILIDAD DE LAS BETACIANINAS DEL EXTRACTO ACUOSO DE O. DILLENII HAW EN DIFERENTES CONDICIONES EXPERIMENTALES

CONDICIONES AMBIENTALES	pH (± 0.01)		
	4.06	5.06	7.11
4°C			
oscuridad	8639.06 \pm 148.9	8274.72 \pm 189	1388.92 \pm 64.28
21\pm2°C			
oscuridad	841.35 \pm 33.21	1124.00 \pm 61.85	200.98 \pm 47.54
21\pm2°C			
neón	664.08 \pm 22.88	666.94 \pm 25.81	171.89 \pm 41.33
21\pm2°C			
UV	206.00 \pm 70.19	401.76 \pm 76.46	139.62 \pm 32.35
22\pm2°C			
solar	43.27 \pm 21.16	64.65 \pm 18.76	46.73 \pm 13.35
50\pm2°C			
neón		14.20 \pm 1.93	
70\pm2°C			
neón		0.99 \pm 0.17	

Cada valor representa el tiempo en horas \pm error estándar que las betacianinas tardan en alcanzar el 50% de su absorbancia inicial (0.96 \pm 0.01), calculado a partir de la ecuación de regresión de cada grupo experimental.

- DISCUSION

Las condiciones ambientales para la óptima conservación y posterior utilización de los pigmentos es de primordial importancia tanto para fines alimentarios como colorantes, como para realizar estudios farmacológicos.

Los resultados obtenidos concuerdan con los de PASCH *et al.* (1975), VON ELBE (1974), ATOE *et al.* (1982), aunque los nuestros, aun teniendo en cuenta los mismos factores que podrían alterar la degradación de los extractos de betacianina, se realizaron con un mayor número de muestras y por períodos mas prolongados de sometimiento a pruebas.

Vemos pues que la estabilidad del principio activo objeto de este estudio es afectada negativamente por las altas temperaturas, el calor y la luz, factores que habrá que tener en cuenta a la hora de su manipulación.

De todo ello se desprende que las condiciones óptimas para trabajar con el extracto serían las de un pH de 4.06, oscuridad y una temperatura de 4°C.

4-3. TERCER OBJETIVO

ESTUDIOS SOBRE EL EFECTO ANTIMICROBIANO.

Una vez establecidos los antecedentes del posible efecto antimicrobiano de la betanina, tanto en el aspecto Etnofarmacológico como en las relaciones de su estructura química con otras de reconocido efecto en la lucha y control de un gran número de enfermedades, se abordó el objetivo, para nosotros más importante de este trabajo de Tesis: investigar el posible efecto antimicrobiano del extracto sobre el mayor número de cepas posible.

Antecedentes de la búsqueda de productos de origen natural con efectos antimicrobianos han sido revisados y no resultan ser infrecuentes los hallazgos positivos.

El primer congreso Internacional sobre "Antimicrobial activity of NON-ANTIBIOTICS", se celebró en Copenhagen, Dinamarca en 1990. Allí entre más de ochenta comunicaciones, presentamos dos, anticipando algunos de los resultados que se exponen en el presente trabajo.

Como en un principio se pensó que la ingestión de frutos podría tener un efecto sobre la microflora del tubo digestivo se hizo una revisión bibliográfica sobre la misma (Microbiología y Parasitología. Ediciones Salvat, 1986) con el fin de, en lo posible, reunir el mayor número de especies y cepas. Esta

recolección fue posible gracias a la colaboración y ayuda del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Clínicas y de la Salud de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, que a su vez trabaja para el Hospital Insular de Las Palmas, que puso a nuestra disposición las muestras de laboratorio de los pacientes, enviadas allí para su análisis.

La flora bacteriana del tubo digestivo comprende entre otras:

Bacterias:

Bacteroides, Fusobacterium

Peptococcus, Peptoestreptococcus

Eubacterium, Bifidobacterium

Clostridium perfringens

Staphylococcus aureus

Staphylococcus epidermidis

Streptococcus faecalis

Lactobacillus Gram(+)

Corynebacterium sp.

Enterobacteriaceae

Pseudomonas

Treponema sp.

Mycobacterium sp.

Mycoplasma sp.

Chlamidia

Hongos:

Candida, Actinomyces

Protozoos:

Amebas, flagelados (trichomona, giardia)

Virus:

Enterovirus, Rotavirus, Adenovirus, Herpesvirus

La distribución varía en las distintas partes que componen el tubo digestivo encontrando que por ejemplo en el Esófago hay un predominio de las bacterias procedentes de los alimentos y de las secreciones de la boca y de la faringe.

En el Estómago el pH es de 2-3 y hay presencia de oxígeno con lo cual se limita la flora a estas condiciones permitiendo la presencia de anaerobios facultativos como son los **Lactobacillus, Streptococcus** y **Levaduras**.

En el Intestino grueso la relación entre gérmenes aerobios y anaerobios es de 1-10. En general los anaerobios son Gram(-) no esporulados tipo bacteroides. Entre los cocos Gram(+) más frecuentes están los: **Peptococcus, Peptoestreptococcus**. Entre los bacilos Gram(+) los **Eubacterium** y **Bifidobacterium**. Entre los bacilos esporulados Gram(+) el **Clostridium perfringens**. Como anaerobios facultativos están: **S. faecalis, S. aureus, Lactobacillus, Enterobacterias (E. coli, Klebsiella, Enterobacter, Proteus), y Pseudomonas**. Entre los hongos: **Cándida**; Protozoos: **Amebas-flagelados intestinales**; Virus: **rotavirus, enterovirus, adenovirus**.

Como quedó expresado en el apartado de OBJETIVOS considerando los diversos factores que pudieran influenciar en los resultados de este tercer objetivo, se planificaron diversos tipos de estudio, cuyo desarrollo fue el siguiente:

A- Reunir el mayor número de especies y de cepas posible, para poder realizar un amplio muestreo de la actividad inhibitoria de las sustancias objeto de este estudio.

B- Determinar la influencia de la acidez del medio sobre el crecimiento normal de las cepas de la colección particular de este trabajo.

C- Realizar las pruebas necesarias para poder estimar la posible actividad antibacteriana del extracto acuoso rico en betalaína fracciones 39-80 y 52-80.

D- Realizar las mismas pruebas con otras sustancias de actividad antibacteriana conocida con el fin de poder establecer comparaciones sobre su actividad.

- MATERIAL Y METODOS. Para el tercer objetivo y sus apartados.

**1- CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO,
PROPAGACION Y ESTUDIO DEL EXTRACTO.-**

1-A IDENTIFICACION DE LAS ESPECIES.

a.- Sistemas Api 20E y Api Staph

La identificación de las especies se realizó utilizando los sistemas Api 20E y Api Staph. El sistema Api 20E es una versión miniaturizada y estandarizada de los procedimientos convencionales para la identificación bioquímica de Enterobacteriaceae y otras bacterias Gram negativas. El Api Staph se utilizó para la identificación de Staphylococcus y se complementó con la prueba de la coagulasa.

El sistema Api consiste en una combinación de microtubos a los que se ha añadido una serie de reactivos, que permiten llevar a cabo un mínimo de veinte pruebas bioquímicas diferentes a partir de una sola colonia bacteriana.

b-Cepas control de referencia.

Estas cepas control, que pertenecen a la American Type Culture Collection, tienen las características bioquímico serológicas indicadas en su catálogo de procedencia . La cepas ATCC se presentan en discos microtrol solubles en agua. Siguiendo las instrucciones de manipulación estipuladas por los fabricantes, se obtuvieron las cepas puras, las cuales fueron utilizadas como control en las pruebas realizadas.

La utilización de cepas puras de referencia como control es de gran ayuda y garantiza la corrección de las distintas pruebas realizadas a lo largo del estudio, así como la exactitud en la repetición de las mismas.

1-B MEDIOS DE CULTIVO.

a-Medios de aislamiento.

Agar de MacConkey.(Difco)

Composición:

Peptona	17,000 g.
Proteosa-peptona	3,000 g.
Lactosa	10,000 g.
Sales biliares	1,500 g.
Cloruro sódico	5,000 g.

Agar 13,500 g.

Rojo neutro 0,030 g.

Cristal violeta 0,001 g.

pH (25°C) = 7,1

Preparación del medio:

Se rehidratan 50 g. del medio en un litro de agua destilada, calentando hasta su total disolución. A continuación, se esteriliza en un autoclave a 121°C durante 15 minutos. Una vez esterilizado el medio se dispensa en placas de 10 cms. de diámetro, se espera a que se solidifique y se incuba a 37°C durante 24 horas para asegurar se esterilidad.

Agar sangre.

Composición:

Como base se utilizó Agar con soja tróptica. (Difco)

Triptona 15,0 g.

Peptona de soja 5,0 g.

Cloruro sódico 5,0 g.

Agar 15,0 g.

pH (25°C) = 7,3

Preparación del medio:

Se rehidratan 40 g. del medio en un litro de agua destilada, calentando hasta su total disolución; a continuación se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Cuando el medio está aproximadamente a 45°C se le añade la sangre en condiciones asépticas. Se dispensa el medio en placas de Petri de 10 cm. de diámetro y se espera a que se solidifique. Las placas se incuban en estufa a 37°C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

Agar chocolate.

La composición y preparación de este medio es igual que el del Agar sangre variando solamente la temperatura del medio en el momento de añadir la sangre. En este caso la sangre se añade nada más sacar el medio del autoclave, a unos 90°C aproximadamente, consiguiendo con ello que los hematíes se rompan variando el color final del medio a un tono parecido al chocolate.

b-Medios de propagación.

Agar infusión de cerebro y corazón.(Difco)

Composición:

Infusión de cerebro de ternera	200,00 g.
Infusión de corazón de buey	250,00 g.
Proteosa-peptona	10,00 g.
Dextrosa	2,00 g.
Cloruro sódico	5,00 g.
Fosfato disódico	2,50 g.
Agar	15,00 g.

Preparación:

Se rehidratan 52 g. del medio en un litro de agua destilada calentando hasta su total disolución, a continuación se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se distribuye en placas de 10 cms. de diámetro las cuales, una vez solidificadas, se incuban en estufa a 37°C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

Caldo de infusión de cerebro y corazón.

Composición:

Infusión de cerebro de ternera	200,00 g.
Infusión de corazón de buey	250,00 g.
Proteosa-peptona	10,00 g.
Dextrosa	2,00 g.

Cloruro sódico 5,00 g.

Fosfato disódico 2,50 g.

pH (25°C) = 7,4

Preparación:

Se rehidratan 37 g. del medio en un litro de agua destilada calentando hasta su total disolución; a continuación se dispensa la cantidad deseada en tubos de ensayo, se tapan y se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Posteriormente se incuban a 37°C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

c- Medios para el estudio de la sensibilidad al pigmento.

Agar de Mueller-Hinton. (Difco)

Composición:

Infusión de carne 300,00 g.

Acidos de Casamino (técnicos) 17,50 g.

Almidón 1,50 g.

Agar 17,00 g.

pH (25°C) = 7,4

Preparación:

Se rehidratan 38 g. del medio en un litro de agua destilada, calentando hasta su total disolución; a continuación se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se distribuye el medio asépticamente en placas de Petri de 14 cms. de diámetro. Una vez solidificadas, las placas se incuban a 37°C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

Caldo de Mueller-Hinton. (Difco)

Composición:

Infusión de carne	300.00 g.
Acidos de Casamino (técnicos)	17,50 g.
Almidón	1,50 g.

Preparación:

Se rehidratan 21 g. del medio en un litro de agua destilada y se calienta suavemente hasta su total disolución. Se dispensa la cantidad deseada en tubos de ensayo se tapan y se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 minutos. A continuación se incuban a 37°C durante 24 horas para asegurar su esterilidad.

Agar de Mueller-Hinton. (Difco) + Acido clorhídrico.

Composición y preparación igual que el Agar de Mueller-Hinton. Una vez disuelto el medio en el agua correspondiente se calienta hasta su total disolución y se deja enfriar agitándolo para impedir su solidificación y de esta manera poder medirle el pH que en este medio es de 7,2. A continuación se le va añadiendo ácido clorhídrico diluido al 1% hasta llegar a pH = 5,12. Se esteriliza en el autoclave a 121°C por 15 minutos y se dispensa en placas de Petri de 10 cms. de diámetro, dejando una pequeña cantidad sin dispensar a la cual le mediremos el pH final antes de que se enfríe totalmente. En nuestro caso concreto el pH final quedó en 4,12 calculado a una temperatura de 45°C antes de solidificarse el medio.

2- TECNICAS PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD AL EXTRACTO.-

2-A ANTIBIOGRAMA

Se intentó determinar la sensibilidad bacteriana al extracto acuoso parcialmente purificado fracción 39-80 empleando el medio estandarizado de agar de Mueller-Hinton (Difco). El procedimiento utilizado fue el método de Kirby y Bauer de dilución en placa.

A partir de una colonia aislada se preparó una suspensión bacteriana en solución salina estéril, hasta obtener un inóculo de 5×10^8 U.F.C./ml aproximadamente utilizando como referencia el patrón de Mac Farland. Con un hisopo estéril humedecido en la solución se impregna uniformemente toda la placa. Una vez seca, se colocan los discos estériles impregnados con diferentes concentraciones de extracto acuoso fracción 39-80, las concentraciones empleadas fueron: 1.09, 1.19, 1.62 y 2.187 mg/disco. Después se incuban a temperatura ambiente y oscuridad durante 24 horas; finalmente se miden los halos de inhibición que se hayan originado alrededor de los discos.

El estudio del extracto, bien sea el extracto acuoso fracción 39-80 o la fracción 52-80, requiere temperaturas bajas y ausencia de luz ya que es termolábil y fotosensible, como hemos descrito anteriormente.

2-B CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACION MINIMA BACTERICIDA (CMB).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) para una cepa y un antibiótico dados se define como la menor concentración del producto a la que no hay crecimiento visible. La concentración mínima bactericida (CMB) es la concentración del antibiótico capaz de matar al menos al 99.9% de las bacterias presentes en el inóculo inicial. (FINEGOLD Y MARTIN, 1983)

a- CMI por macrodilución en caldo.

El cálculo de las CMIs se lleva a cabo por el método de macrodilución en caldo (SCHOENKNECHT, F.D., THORNSBERRY C. (1985). Se preparan diluciones seriadas del extracto, tal que cada concentración sea la mitad de la anterior. Se numeran tubos que contengan 1 ml. de caldo Mueller- Hinton y a cada uno de ellos se le añade una de las soluciones del antibiótico en estudio, en este caso del extracto, tanto del extracto acuoso fracción 39-80 como de la fracción 52-80, en orden decreciente con respecto a la concentración (dilución seriada). A continuación se agrega a cada uno de los tubos 1 ml. de inóculo preparado diluyendo 1/1500 una suspensión bacteriana cuya turbidez coincida con la del patrón de Mac Farland del 0.5.

El intervalo de concentraciones de extracto (extracto acuoso fracción 39-80 y fracción 52-80) empleado varía de 3.24 mg/ml a 0.1mg/ml.

Los tubos se incuban en estufa a 37°C durante 24 horas. Como se ha dicho, la menor concentración de extracto que, pasado este tiempo, no presente crecimiento visible, se tomará como CMI.

b- CMI por macrodilución en placa con el replicador de Steer.

Se preparan diluciones seriadas de extracto (extracto acuoso fracción 39-80 y fracción 52-80) de forma que cada concentración sea la mitad de la anterior. Cada una de las soluciones del extracto (extracto acuoso fracción 39-80 y fracción 52-80) se añade a matraces con 18 ml. de agar de Mueller-Hinton esterilizado y enfriado hasta 55-60°C. Una vez agitado el medio y el extracto se vierte en placas de Petri de 10 cms. de diámetro. El intervalo de concentraciones varía de 6,50 mg/ml hasta 0,1 mg/ml.

Por otro lado se preparan suspensiones bacterianas en solución salina estéril hasta obtener una turbidez que coincida con la del patrón Mac Farland de 0,5. A continuación se rellenan los pocillos del replicador con 400 ml de cada una de estas suspensiones y mojando el cabezal del replicador en los pocillos se va inoculando cada placa. Todo este proceso se realiza en condiciones asépticas.

Las placas se incuban en una estufa a 37°C durante 18-24 horas. Pasado este tiempo, la menor concentración de antibiótico que no presenta crecimiento se toma como CMI. Se considera como crecimiento visible cuando aparecen tres o más colonias.

c- Determinación de la CMB

Para determinar la CMB se realizan resiembras en placas de muestras tomadas de los tubos con concentraciones a las que no hay crecimiento visible. Para ello se toma una alícuota del medio con asa calibrada o pipeta automática, y se transfiere a una placa con un medio nutritivo y carente de extracto. Se lleva a cabo esta operación con cada uno de los tubos que no presentan turbidez, se extienden las gotas de caldo y se incuban las placas en estufa a 37°C durante 24 horas. Se aconseja realizar previamente un recuento de colonias en el inóculo inicial. Transcurrido el tiempo indicado, se efectúa la lectura de resultados y, como se definió inicialmente, se toma como CMB la menor concentración de extracto que es capaz de reducir el número de bacterias viables al 0,1% o menos del existente en el inóculo inicial.

TERCER OBJETIVO. APARTADO A

Reunir el mayor número de especies y de cepas posible, para poder realizar un amplio muestreo de la actividad inhibitoria de las sustancias objeto de este estudio.

- RESULTADOS

La mayoría de las cepas objeto de este estudio fueron obtenidas a partir de cultivos de exudados de heridas de pacientes del Hospital Insular de Las Palmas de Gran Canaria. Las cepas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus faecalis* ATCC 29212 y *Neisseria gonorrhoeae* CDC 98 empleadas como control a lo largo de este trabajo proceden como su referencia lo indica, de la American Type Culture Collection

La colección de cepas procedentes del Hospital Insular se fue haciendo gradualmente y por grupos, hasta quedar constituida en su totalidad como sigue a continuación:

TABLA VIII

C. freundii (1)

C. freundii (2)

C. freundii (3)

C. freundii (4)

C. freundii (5)

E. cloacae (1)

E. cloacae (2)

E. cloacae (3)

E. cloacae (4)

E. cloacae (5)

E. cloacae (6)

E. cloacae (7)

E. aerogenes (1)

E. aerogenes (2)

E. aerogenes (3)

E. aerogenes (4)

E. aerogenes (5)

E. sakazakii (1)

E. sakazakii (2)

E. coli (1)

E. coli (2)

E. coli (3)

E. coli (4)
E. coli (5)
E. coli (6)
E. coli (7)
E. coli (8)
E. coli (9)
E. coli (10)
E. coli (11)
E. coli (12)
E. coli (13)
E. coli (14)
E. coli (15)
E. coli (16)
E. coli (17)
E. coli (18)
E. coli (19)
E. coli (20)
E. coli (21)
K. oxytoca (1)
K. ozaenae (1)
K. pneumoniae (1)
K. pneumoniae (2)
K. pneumoniae (3)
K. pneumoniae (4)

K. pneumoniae (5)
K. pneumoniae (6)
P. mirabilis (1)
P. mirabilis (2)
P. mirabilis (3)
P. mirabilis (4)
P. mirabilis (5)
P. mirabilis (6)
P. mirabilis (7)
P. mirabilis (8)
P. mirabilis (9)
Pseudomonas sp. (1)
Pseudomonas sp. (2)
Pseudomonas sp. (3)
Pseudomonas sp. (4)
Pseudomonas sp. (5)
Pseudomonas sp. (6)
Pseudomonas sp. (7)
Salmonella (1)
Salmonella (2)
M. morgani (1)
Pasteurella sp. (1)
A. calcoaceticus (1)
S. aureus ATCC 29213

S. aureus (1)
S. aureus (2)
S. aureus (3)
S. aureus (4)
S. epidermidis ATCC 12228
S. epidermidis (1)
S. epidermidis (2)
S. epidermidis (4)
S. epidermidis (8)
B. cereus (1)
B. cereus (2)
Str. pyogenes ATCC 19615
Str. faecalis ATCC 29212
S. marcescens (1)
P. stuartii (1)
N. gonorrhoeae CDC 98

El número () es la identificación de la cepa.

Una vez que llegaban las muestras al laboratorio se sembraban en Agar sangre y Agar MacConkey y se incubaban en estufa a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se escogían colonias aisladas y se procedía a su identificación bioquímica y al análisis de su sensibilidad frente a los extractos acuosos parcialmente purificados de frutos de Opuntia dillenii Haw (fracciones 39-80 y 52-80).

El criterio de elección de estas cepas, fue el de trabajar con el mayor número posible de especies, para así poder hacer un amplio "muestreo" de la posible actividad inhibitoria de las sustancias objeto de este estudio.

Al formar esta colección consideramos suficiente el número y la variedad y dimos por cumplido el apartado A del tercer objetivo.

TERCER OBJETIVO. APARTADO B

Determinar la influencia de la acidez del medio sobre el crecimiento normal de las cepas de la colección particular de este trabajo

Para lograr este objetivo se prepararon tres medios a diferentes pHs:

1-Medio Mueller-Hinton normal a pH 7.2

2-Medio Mueller-Hinton a pH 5.2 con ácido clorhídrico

3-Medio Mueller-Hinton a pH 4.06 con ácido clorhídrico

El primer medio constituye el medio patrón en el cual el crecimiento bacteriano es normal y sirve de referencia.

El segundo medio a pH 5.2 equivale a la acidez que tiene el extracto

acuoso parcialmente purificado : la fracción 39-80 pH = 5.22 ; la fracción 52-80 pH = 5.03.

El pH 4.06 del tercer medio corresponde a las condiciones óptimas para trabajar con el pigmento que se determinaron al principio de este trabajo.

- RESULTADOS

En estos tres medios se hicieron siembras de todas las cepas de la colección particular de este trabajo. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla IX a continuación:

TABLA IX

++ = crecimiento normal

+ = crecimiento débil

- = ningún crecimiento

<u>Cepa</u>	<u>pH 7.2</u>	<u>pH 5.2</u>	<u>pH 4.06</u>
C. freundii (1)	++	++	++
C. freundii (2)	++	++	++
C. freundii (3)	++	++	++
E. cloacae (1)	++	++	++
E. cloacae (2)	++	++	++

TABLA IX CONTINUACION

<u>Cepa</u>	<u>pH 7.2</u>	<u>pH 5.2</u>	<u>pH 4.06</u>
E. cloacae (3)	++	++	++
E. cloacae (4)	++	++	++
E. aerogenes (1)	++	++	++
E. aerogenes (2)	++	++	++
E. aerogenes (3)	++	++	++
E. aerogenes (4)	++	++	-
E. sakazakii (1)	++	++	++
E. sakazakii (2)	++	++	++
E. coli (1)	++	++	++
E. coli (2)	++	++	++
E. coli (3)	++	++	++
E. coli (4)	++	++	++
E. coli (5)	++	++	++
E. coli (6)	++	++	++
E. coli (7)	++	++	++
E. coli (8)	++	++	++
E. coli (9)	++	++	++
E. coli (10)	++	++	++
E. coli (11)	++	++	++
E. coli (12)	++	++	++
E. coli (13)	++	++	++
E. coli (14)	++	++	++

TABLA IX CONTINUACION

Cepa	pH 7.2	pH 5.2	pH 4.12
E. coli (15)	++	++	++
E. coli (16)	++	++	++
E. coli (17)	++	++	++
E. coli (18)	++	++	++
E. coli (19)	++	++	++
E. coli (20)	++	++	++
E. coli (21)	++	++	++
K. oxytoca (1)	++	++	++
K. pneumoniae (1)	++	++	++
K. pneumoniae (2)	++	++	++
K. pneumoniae (3)	++	++	++
K. pneumoniae (4)	++	++	++
P. mirabilis (1)	++	++	+
P. mirabilis (2)	++	++	++
P. mirabilis (3)	++	++	++
P. mirabilis (4)	++	++	++
P. mirabilis (5)	++	++	++
P. mirabilis (6)	++	++	++
Pseudomonas sp. (1)	++	++	++
Pseudomonas sp. (2)	++	++	+
Pseudomonas sp. (3)	++	++	+
Pseudomonas sp. (4)	++	++	-

TABLA IX CONTINUACION

<u>Cepa</u>	<u>pH 7.2</u>	<u>pH 5.2</u>	<u>pH 4.12</u>
Salmonella (1)	++	++	++
M. morganii (1)	++	++	++
Pasteurella sp. (1)	++	++	++
A. calcoaceticus (1)	++	++	++
S. aureus ATCC 292	++	++	+
S. aureus (1)	++	++	+
S. aureus (2)	++	++	+
S. aureus (3)	++	++	+
S. aureus (4)	++	++	+
S. epidermidis ATCC 12228	++	++	-
S. epidermidis (1)	++	++	+
S. epidermidis (2)	++	++	-
B. cereus (1)	++	++	+
B. cereus (2)	++	++	+
Str. pyogenes ATCC 19615	++	++	-
Str. faecalis ATCC 29212	++	++	-

- DISCUSION

De los resultados anteriores se desprende que:

- Todas las cepas sembradas en el medio normal Mueller-Hinton a pH 7.2 crecieron satisfactoriamente.

- Todas las cepas sembradas en el medio Mueller-Hinton a pH 5.2 crecieron igual que las sembradas en el medio normal.

- De las cepas de gérmenes Gram(-) sembradas en el medio a pH 4.06 las Pseudomonas y una cepa de E. aerogens vieron afectado su crecimiento.

- Los gérmenes Gram(+) sembrados en el medio a pH 4.06 vieron en general afectado su crecimiento.

- Las condiciones de trabajo a partir de este momento se mantienen en un pH de 5.12 en donde todas las bacterias crecieron satisfactoriamente y en donde la estabilidad del pigmento es alta por ser el pH que tiene al reconstituirse.

TERCER OBJETIVO. APARTADO C

Realizar las pruebas necesarias para poder estimar la posible actividad antibacteriana del extracto acuoso rico en betalaína fracciones 39-80 y 52-80

Una vez estudiada la influencia del pH en el crecimiento normal bacteriano y determinadas las condiciones del trabajo, el objetivo más importante era realizar las pruebas necesarias para poder establecer la posible actividad antibacteriana del extracto acuoso parcialmente purificado de frutos de Opuntia dillenii Haw ricos en betalaína, fracciones 39-80 y 52-80. Las pruebas consistieron en antibiogramas, de sinergismo, CMI y CMB sobre cepas de la colección (2 grupos) y cepas control de la ATCC.

1- ESTUDIO DE LA FRACCION 39-80

a. Antibiogramas

Los primeros experimentos realizados fueron antibiogramas con diferentes concentraciones de extracto acuoso fracción 39-80 sobre varias cepas identificadas previamente.

Los antibiogramas realizados dieron una orientación sobre la posible

actividad inhibitoria del extracto acuoso parcialmente purificado; se utilizó una primera concentración y a continuación se fue elevando obteniéndose resultados más significativos. En primer lugar se exponen los resultados parciales a las distintas concentraciones para finalmente hacer un cuadro resumen en donde se puede observar el aumento de esta inhibición a concentraciones más altas.

- RESULTADOS

Tablas X, XI, XII, XIII y XIV a continuación

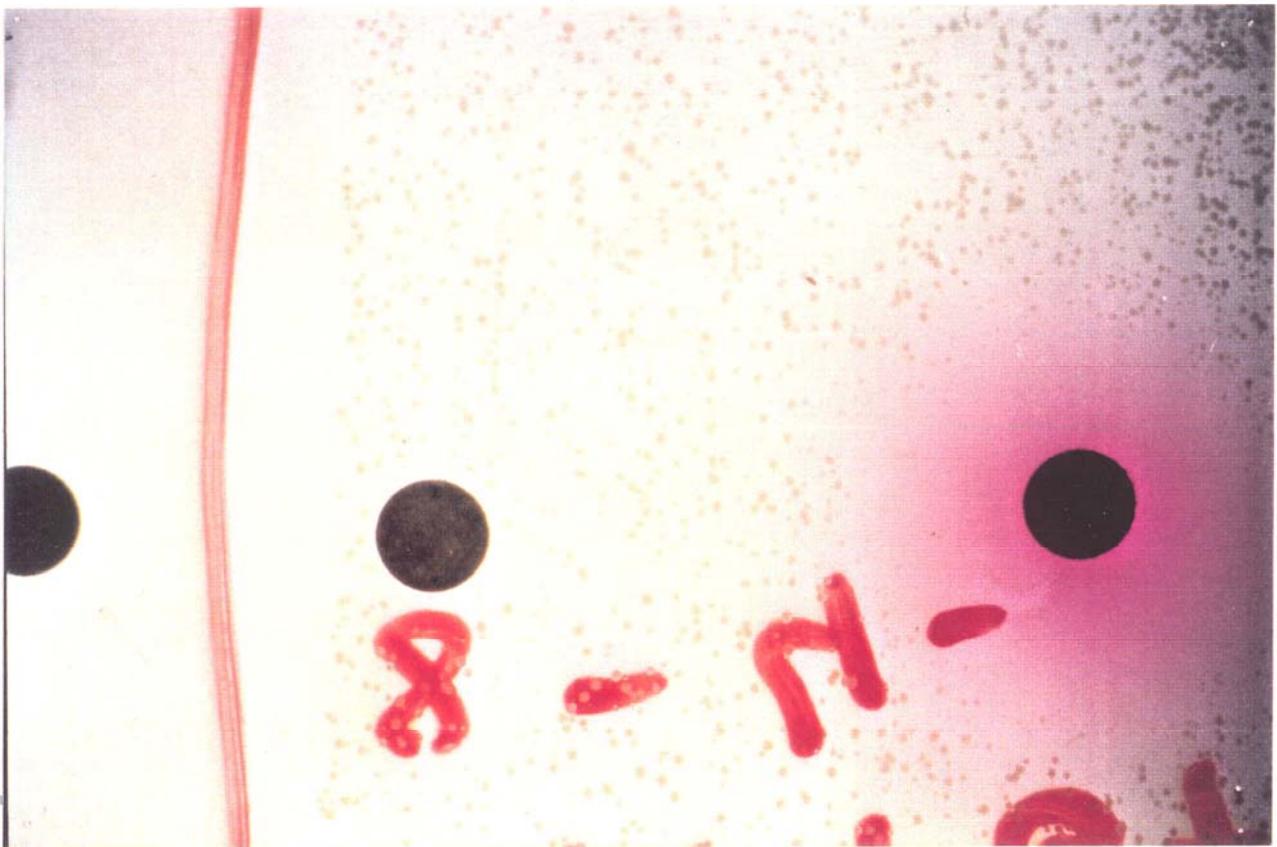


TABLA X

Antibiograma realizado con discos impregnados con 1.09 mg de extracto acuoso parcialmente purificado fracción 39-80 por disco.

<u>Cepa</u>	<u>Halo de inhibición*</u>
P. mirabilis (1)**	(-)
S. epidermidis (1)	(-)
S. epidermidis (2)	(-)
S. epidermidis (3)	(-)
S. epidermidis (4)	12 mm.
S. epidermidis (5)	(-)
S. epidermidis (6)	(-)
S. epidermidis (7)	(-)
S. epidermidis (8)	12 mm.
E. aerogenes (1)	(-)
E. aerogenes (2)	(-)
E. cloacae (1)	5 mm.
E. cloacae (2)	5 mm.
E. cloacae (3)	3 mm.
E. cloacae (4)	4 mm.
E. cloacae (5)	(-)
B. cereus (1)	14 mm.
B. cereus (2)	15.7 mm.
S. aureus ATCC 29213	11 mm.

*** Halo de inhibición promedio ** (Nº) identificación**

TABLA XI

Antibiograma realizado con discos impregnados con 1.19mg. de extracto acuoso parcialmente purificado fracción 39-80 por disco.

<u>Cepa</u>	<u>Halo de inhibición*</u>
P. mirabilis (1)**	(-)
S. epidermidis (1)	5 mm.
S. epidermidis (2)	5 mm.
S. epidermidis (3)	(-)
S. epidermidis (4)	12 mm.
S. epidermidis (5)	(-)
S. epidermidis (6)	(-)
S. epidermidis (7)	(-)
S. epidermidis (8)	12 mm.
E. aerogenes (1)	(-)
E. aerogenes (2)	(-)
E. cloacae (1)	5 mm.
E. cloacae (2)	5 mm.
E. cloacae (3)	5 mm.
E. cloacae (4)	4 mm.
E. cloacae (5)	(-)
B. cereus (1)	14 mm.
B. cereus (2)	16 mm.
S. aureus ATCC 29213	11 mm.

*** Halo de inhibición promedio ** (Nº) identificación**

TABLA XII

Antibiograma realizado con discos impregnados con 1.62mg de extracto acuoso parcialmente purificado fracción 39-80 por disco.

<u>Cepa</u>	<u>Halo de inhibición*</u>
P. mirabilis (1)**	(-)
S. epidermidis (1)	5 mm.
S. epidermidis (2)	5 mm.
S. epidermidis (3)	(-)
S. epidermidis (4)	14 mm.
S. epidermidis (5)	5 mm.
S. epidermidis (6)	(-)
S. epidermidis (7)	(-)
S. epidermidis (8)	13.7 mm.
E. aerogenes (1)	(-)
E. aerogenes (2)	(-)
E. cloacae (1)	7 mm.
E. cloacae (2)	7 mm.
E. cloacae (3)	7 mm.
E. cloacae (4)	6 mm.
E. cloacae (5)	(-)
B. cereus (1)	15 mm.
B. cereus (2)	19.2 mm.
S. aureus ATCC 29213	17.4 mm.

*** Halo de inhibición promedio ** (Nº) identificación**

TABLA XIII

Antibiograma realizado con discos impregnados con 2.187 mg de extracto acuoso parcialmente purificado fracción 39-80 por disco.

<u>Cepa</u>	<u>Halo de inhibición*</u>
P. mirabilis (1)**	(-)
S. epidermidis (1)	8 mm.
S. epidermidis (2)	8 mm.
S. epidermidis (3)	(-)
S. epidermidis (4)	19 mm.
S. epidermidis (5)	8 mm.
S. epidermidis (6)	(-)
S. epidermidis (7)	(-)
S. epidermidis (8)	18.1 mm.
E. aerogenes (1)	(-)
E. aerogenes (2)	(-)
E. cloacae (1)	9 mm.
E. cloacae (2)	9 mm.
E. cloacae (3)	8 mm.
E. cloacae (4)	8 mm.
E. cloacae (5)	(-)
Bacillus cereus (1)	23.7 mm.
Bacillus cereus (2)	30.5 mm.
S. aureus ATCC 29213	19.1 mm.

*** Halo de inhibición promedio ** (Nº) identificación**

TABLA XIV

CUADRO RESUMEN

<u>Cepa</u>	<u>Halo promedio de inhibición</u>				
	(mg/disco)	<u>1.09</u>	<u>1.19</u>	<u>1.62</u>	<u>2.187</u>
P. mirabilis (1)*	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
S. epidermidis (1)	(-)	5 mm.	5 mm.	8 mm.	
S. epidermidis (2)	(-)	5 mm.	5 mm.	8 mm.	
S. epidermidis (3)	(-)	(-)	(-)	(-)	
S. epidermidis (4)	12 mm.	12 mm.	14 mm.	19 mm.	
S. epidermidis (5)	(-)	(-)	5 mm.	8 mm.	
S. epidermidis (6)	(-)	(-)	(-)	(-)	
S. epidermidis (7)	(-)	(-)	(-)	(-)	
S. epidermidis (8)	12 mm.	12 mm.	13.7 mm.	18.1 mm.	
E. aerogenes (1)	(-)	(-)	(-)	(-)	
E. aerogenes (2)	(-)	(-)	(-)	(-)	
E. cloacae (1)	5 mm.	5 mm.	7 mm.	9 mm.	
E. cloacae (2)	5 mm.	5 mm.	7 mm.	9 mm.	
E. cloacae (3)	3 mm.	5 mm.	7 mm.	8 mm.	
E. cloacae (4)	4 mm.	4 mm.	6 mm.	8 mm.	
E. cloacae (5)	(-)	(-)	(-)	(-)	
B. cereus (1)	14 mm.	14 mm.	15 mm.	23.7 mm.	
B. cereus (2)	15.7 mm.	16 mm.	9.2 mm.	30.05 mm.	
S. aureus ATCC 29213	11 mm.	11 mm.	17.4 mm.	19.1 mm.	

* (Nº) identificación en esta colección

b- Sinergismo

Las dos pruebas a continuación se realizaron para estudiar un posible sinergismo para ello en las placas se utilizaron :

- discos de antibióticos solos
- discos de antibióticos a los cuales se les añadió pigmento en concentración de 2.187 mg /disco
- discos impregnados solo con pigmento (extracto acuoso parcialmente purificado fracción 39-80) a una concentración de 2.187 mg/disco
- discos blanco que consistían en discos estériles impregnados con agua bidestilada igual a la utilizada en la reconstitución del extracto acuoso parcialmente purificado.

A continuación se escogieron las cepas que habían demostrado mayor sensibilidad al pigmento (extracto acuoso parcialmente purificado fracción 39-80) y se les realizaron antibiogramas con tres antibióticos conocidos: Gentamicina (10 μ gr.)*, Ampicilina (10 μ gr.) y cefalotina (30 μ gr.).

- RESULTADOS

A continuación Tablas XV y XVI

TABLA XV

<u>Cepa</u>	<u>Halo de inhibición*</u>		
	<u>Gentamicina</u>	<u>Ampicilina</u>	<u>Cefalotina</u>
S. epidermidis (4)**	50 mm.	(-)	54 mm.
S. epidermidis (8)	49 mm.	(-)	51 mm.
B. cereus (1)	37.1 mm.	(-)	15.2 mm.
B. cereus (2)	35.3 mm.	16.9 mm.	17.5 mm.
S. aureus ATCC 29213	32 mm.	32.2 mm.	49.4 mm.

*** Halo de inhibición promedio**

**** (Nº) identificación en la colección particular de este trabajo.**

En el siguiente cuadro se incluyen los halos de inhibición obtenidos con discos impregnados con extracto acuoso parcialmente purificado fracción 39-80 junto con los halos obtenidos con los antibióticos antes expuestos

TABLA XVI

<u>Cepas</u>	<u>2.187 mg/disc.</u>	<u>10μg Gent.</u>	<u>10 μg Amp.</u>	<u>30μg Cefa</u>
<u>fracción 39-80</u>				
S. epidermidis (4)	19 mm.	50 mm.	(-)	54 mm.
S. epidermidis (8)	18.1 mm.	49 mm.	(-)	51 mm.
B. cereus (1)	23.7 mm.	37.1 mm.	(-)	15.2 mm.
B. cereus (2)	30.05 mm.	35.3 mm.	16.9 mm.	17.5 mm.
S. aureus ATCC29213	19,1 mm.	32 mm.	32.2 mm.	49.4 mm.

Podemos apreciar que:

- El halo de inhibición de los discos con antibiótico solo fue igual al halo de inhibición de los discos con antibiótico más pigmento.
- El halo de los discos con pigmento solo se mantuvo igual que en los resultados ya expuestos.
- Alrededor de los discos blanco impregnados con agua, no hubo inhibición alguna.

- DISCUSION

Los resultados anteriores confirmaron la idea del efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano que tiene el extracto acuoso parcialmente purificado

rico en betalaína fracción 39-80, efecto que hasta este momento es más notorio sobre los gérmenes Gram(+) de todas las cepas estudiadas. Por ello se decidió aumentar el número de cepas en general y de Gram (-) en particular y realizar pruebas de CMI, a la vista de que en los antibiogramas influyen factores como la mejor o peor dilución del antibiótico o sustancia en prueba en el medio de cultivo donde se está realizando el ensayo con lo que no siempre se consiguen las concentraciones deseadas pudiendo variar el resultado.

c- CMI de las cepas de la ATCC

A continuación se estableció la CMI de las cepas de la American Type Culture Collection que se utilizarían como referencia y de las cuales no se disponía antes, exceptuando el *S. aureus* ATCC 29213 con la cual ya se había trabajado en los antibiogramas. (Tabla XVI)

La técnica empleada en las CMI viene ampliamente descrita en material y método y las condiciones especiales fueron las establecidas para la manipulación del pigmento que garantizaban su mayor estabilidad.

- RESULTADOS

TABLA XVII

Determinación de la CMI a las cepas de la ATCC realizada con las fracciones 39-80 del extracto acuoso parcialmente purificado

<u>Cepas</u>	<u>CMI (mg/ml)</u>
S. Aureus ATCC 29213	1.08
S. epidermidis ATCC 12228	1.08
Str. pyogenes ATCC 19615	3.24
Str. faecalis ATCC 29212	3.24
N. gonorrhoeae CDC 98	1.08

El rango de concentraciones utilizadas para estas CMI fue de 0.004 a 9.72 mg/ml de extracto acuoso parcialmente purificado fracciones 39-80

Tanto para éstas CMI como para las sucesivas de las realizadas con el extracto acuoso parcialmente purificado fracciones 39-80 las concentraciones utilizadas fueron:

0.004 mg/ml	0.36 mg/ml
0.013 mg/ml	1.08 mg/ml
0.04 mg/ml	3.24 mg/ml
0.12 mg/ml	9.72 mg/ml

Una vez establecidos los valores de CMI para las cepas control se continuó trabajando con las cepas aisladas de las muestras que llegaban al laboratorio, las cuales, previa identificación, se incorporaban a la colección particular de este estudio por grupos.

d- CMI del Primer grupo de la colección

A este primer grupo corresponden las cepas a las que se les había hecho antibiograma con el extracto acuoso parcialmente purificado fracciones 39-80 y con otros antibióticos.

TABLA XVIII

<u>Cepas</u>	<u>CMI (mg./ml)</u>
S. epidermidis (4)*	3.24
S. epidermidis (8)	3.24
B. cereus (1)	1.08
B. cereus (2)	1.08

* () número interno de la colección particular de este trabajo.

e- CMI del Segundo grupo de la colección

A este segundo grupo corresponden las cepas incorporadas a la colección, todas previamente identificadas y numeradas

TABLA XIX

Determinación de la CMI de extracto acuoso parcialmente purificado
fracciones 39-80 para el 2º grupo de cepas.

<u>Cepas</u>	<u>CMI rango 1.08-3.24 mg/ml</u>
Ps. aeruginosa (1)*	3.24
Ps. aeruginosa (2)	1.08
P. mirabilis (1)	1.08
P. mirabilis (2)	1.08
P. mirabilis (3)	1.08
E. coli (1)	3.24
E. coli (2)	3.24
E. coli (3)	1.08
K. pneumonie (1)	3.24
E. cloacae (6)	3.24
E. cloacae (7)	3.24
E. cloacae (8)	1.08
S. marcescens (1)	3.24
P. stuartii (1)	1.08
C. freundii (1)	3.24
C. freundii (2)	3.24
K. ozaenae (1)	3.24
K. pneumoniae (2)	1.08
E. aerogenes (3)	3.24

TABLA XIX CONTINUACION

S. aureus (1)	1.08
Salmonella sp. (1)	1.08
S. aureus ATCC 29213	1.08
Str. faecalis ATCC 29212	3.24

Una vez establecida la CMI para las cepas de la ATCC y para los otros dos grupos, se pasó a determinar la CMB

d- CMB

Teniendo en cuenta que el inóculo inicial es de 500.000 UFC (unidades formadoras de colonias) por ml, y que la CMB es la concentración del antibiótico o sustancia en estudio capaz de matar al menos al 99.9% de las bacterias presentes en el inóculo inicial, tenemos que: el 0.1% equivale a 500 colonias; si después de la resiembra de una alícuota, que en nuestro caso fue 1 ml, del tubo donde no hubo crecimiento visible (ver Tablas CMI XVII y XVIII) el número de colonias formadas es de 500 o menor, se puede considerar que esa concentración es la CMB.

- RESULTADOS

TABLA XX

Determinación de la CMB del extracto acuoso fracción 39-80 para las cepas de la ATCC y para el primer grupo de cepas estudiado

<u>Cepas</u>	<u>Nº de colonias formadas</u>
S. aureus ATCC 29213	66 < 500 ; CMI=CMB
S. epidermidis ATCC 12228	> 500
Str. pyogenes ATCC 19615	348 < 500 ; CMI=CMB
Str. faecalis ATCC 29212	120 < 500 ; CMI=CMB
N. gonorrhoeae CDC 98	> 500
S. epidermidis (4)	> 500
S. epidermidis (8)	> 500
B. cereus (1)	144 < 500 ; CMI=CMB
B. cereus (2)	140 < 500 ; CMI=CMB

Como se puede apreciar en algunas cepas la concentración inhibitoria (Tablas XVII y XVIII) es a su vez bactericida. En otras la concentración inhibitoria es diferente de la CMB por lo cual habría que hacer ensayos con dosis más elevadas.

TABLA XXI

Determinación de la CMB de la fracción 39-80 para el 2º grupo de cepas de la colección

<u>Cepas</u>	<u>CMI rango 1.08-3.24 mg/ml N° de colonias</u>	
Ps. aeruginosa (1)*	3.24	> 500
Ps. aeruginosa (2)	1.08	> 500
P. mirabilis (1)	1.08	> 500
P. mirabilis (2)	1.08	> 500
P. mirabilis (3)	1.08	> 500
E. coli (1)	3.24	> 500
E. coli (2)	3.24	> 500
E. coli (3)	1.08	120 < 500 ; CMI=CMB
K. pneumoniae (1)	3.24	> 500
E. cloacae (6)	3.24	> 500
E. cloacae (7)	3.24	> 500
E. cloacae (8)	1.08	60 < 500 ; CMI=CMB
S. marcescens (1)	3.24	> 500
P. stuartii (1)	1.08	> 500
C. freundii (1)	3.24	> 500
C. freundii (2)	3.24	80 < 500 ; CMI=CMB
K. ozaenae (1)	3.24	> 500
K. pneumoniae (2)	1.08	70 < 500 ; CMI=CMB
E. aerogenes (3)	3.24	> 500

TABLA XXI CONTINUACION

S. aureus (1)	1.08	> 500
Salmonella sp. (1)	1.08	90 < 500 ; CMI=CMB
S. aureus ATCC 29213	1.08	78 < 500 ; CMI=CMB
Str. faecalis ATCC 29212	3.24	200 < 500 ; CMI=CMB

- DISCUSION

De los resultados obtenidos hasta esta parte del trabajo se podía deducir claramente que el extracto acuoso rico en betalainas fracciones 39-80 tenía una capacidad inhibitoria sobre un amplio espectro bacteriano. Si bien las dosis de inhibición resultaban un tanto elevadas es importante recordar que se trata de un extracto acuoso compuesto por varias fracciones según se pudo apreciar en la cromatografía de capa fina realizada por FERNANDEZ PEREZ, (1988), de las fracciones 39-80, en donde era evidente la presencia mayoritaria de tres manchas: 1 amarilla débil, 1 violeta intensa y 1 amarilla intensa.

Era importante plantearse cual de los compuestos de este extracto podía ser el responsable de ésta inhibición. Para ello se redujeron las fracciones utilizadas a las obtenidas de la banda II que corresponden a las fracciones 52-80; en estas fracciones se sabía que había una mayor concentración de betacianina lo cual se puede confirmar aplicando el test de NILSSON y haciendo lecturas espectrofotométricas.

2- ESTUDIO DE LA FRACCION 52-80

A continuación el estudio se programó para trabajar con estas fracciones (52-80), repitiendo los ensayos realizados hasta el momento y estableciendo una comparación de efectividad con las fracciones (39-80) si fuese posible. También se programó el utilizar como blanco del experimento el extracto acuoso fracciones 52-80 desnaturalizado de tal manera que se inactivaran los pigmentos y se pudiera comprobar si era otra sustancia presente en el compuesto y diferente a los pigmentos la responsable de la inhibición.

a-CMI

- RESULTADOS

TABLA XXII

Determinación de la CMI a las cepas de la ATCC realizada con las fracciones 52-80 del extracto acuoso parcialmente purificado

<u>Cepas</u>	<u>CMI (mg/ml)</u>
S. Aureus ATCC 29213	0.36
S. epidermidis ATCC 12228	0.36
Str. pyogenes ATCC 19615	1.08
Str. faecalis ATCC 29212	1.08
N. gonorrhoeae CDC 98	0.36

El rango de concentraciones utilizadas para estas CMI fue de 0.004 a 9.72 mg/ml de extracto acuoso parcialmente purificado fracciones 52-80

Determinación de la CMI con las fracciones 52-80 al primer grupo de cepas estudiadas. A este primer grupo pertenecen las cepas a las que se les había hecho antibiograma con el extracto acuoso parcialmente purificado fracciones 39-80 y con otros antibióticos.

TABLA XXIII

<u>Cepas</u>	<u>CMI (mg./ml)</u>
S. epidermidis (4)	1.08
S. epidermidis (8)	1.08
B. cereus (1)	0.36
B. cereus (2)	0.36

El rango de concentración de extracto fue el mismo que en las CMIs anteriores de 0,004 a 9,72 mg/ml.

TABLA XXIV

Determinación de la CMI del extracto acuoso parcialmente purificado
fracciones 52-80 para el 2º grupo de cepas.

<u>Cepas</u>	<u>CMI rango 0.36-1.08 mg/ml</u>
Ps. aeruginosa (1)*	1.08
Ps. aeruginosa (2)	0.36
P. mirabilis (1)	0.36
P. mirabilis (2)	0.36
P. mirabilis (3)	0.36
E. coli (1)	1.08
E. coli (2)	1.08
E. coli (3)	0.36
K. pneumoniae (1)	1.08
E. cloacae (6)	1.08
E. cloacae (7)	1.08
E. cloacae (8)	0.36
S. marcescens (1)	1.08
P. stuartii (1)	0.36
C. freundii (1)	1.08
C. freundii (2)	1.08
K. ozaenae (1)	1.08
K. pneumoniae (2)	0.36
E. aerogenes (3)	1.08

TABLA XXIV CONTINUACION

S. coagulasa (+) (1)	0.36
Salmonella sp. (1)	0.36
S. aureus ATCC 29213	0.36
Str. faecalis ATCC 29212	1.08

***()Nº interno de la colección de este trabajo.**

Para estar seguros de que el efecto antimicrobiano era debido al extracto acuoso estabilizado y no a algún subproducto del mismo que pudiera degradarse en el medio de cultivo, provocamos la desnaturalización del extracto por medio de ebullición durante el tiempo necesario hasta la total desaparición del color rojo-violeta

En las anteriores pruebas para determinar la CMI se utilizó como blanco el extracto desnaturalizado. Al cabo de 24 horas de incubación se apreció una clara turbidez en el medio debida al crecimiento de los gérmenes sembrados en él. Se identificaron nuevamente estos gérmenes correspondiendo a los sembrados 24 horas antes, descartándose con ello una posible contaminación o efecto del pigmento desnaturalizado.

b- COMPARACION PARCIAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LAS FRACCIONES 39-80 Y 52-80.

A continuación se expondrán unas tablas con los resultados de las CMI

realizadas hasta este momento con las fracciones 39-80 y 52-80 en donde se puede apreciar una mayor efectividad por parte de la fracción 52-80

TABLA XXV

Comparación de las CMI obtenidas con las fracciones 39-80 y 52-80 en las cepas procedentes de la ATCC y el primer grupo de cepas.

<u>Cepas</u>	<u>CMI rango 0.36-3.24 mg/ml</u>	
	<u>frac. 39-80</u>	<u>frac. 52-80</u>
S. Aureus ATCC 29213	1.08	0.36
S. epidermidis ATCC 12228	1.08	0.36
Str. pyogenes ATCC 19615	3.24	1.08
Str. faecalis ATCC 29212	3.24	1.08
N. gonorrhoeae CDC 98	1.08	0.36
S. epidermidis (4)	3.24	1.08
S. epidermidis (8)	3.24	1.08
B. cereus (1)	1.08	0.36
B. cereus (2)	1.08	0.36

TABLA XXVI

Comparación entre las CMI de las fracciones 39-80 y 52-80

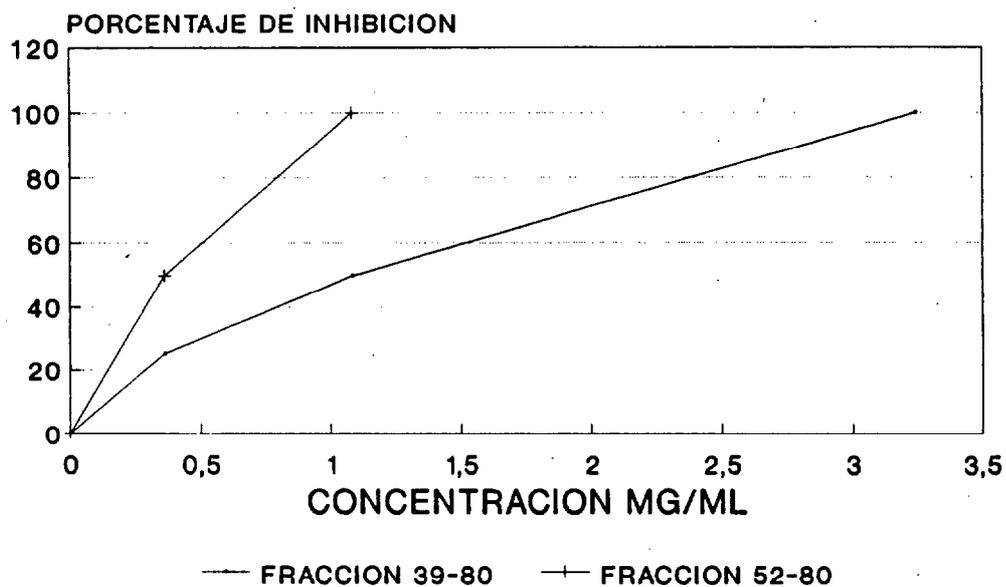
<u>Cepas</u>	<u>CMI rango 0.36-3.24 mg/ml</u>	
	<u>frac. 39-80</u>	<u>frac. 52-80</u>
Ps. aeruginosa (1)	3.24	1.08
Ps. aeruginosa (2)	1.08	0.36
P. mirabilis (1)	1.08	0.36
P. mirabilis (2)	1.08	0.36
P. mirabilis (3)	1.08	0.36
E. coli (1)	3.24	1.08
E. coli (2)	3.24	1.08
E. coli (3)	1.08	0.36
K. pneumonie (1)	3.24	1.08
E. cloacae (6)	3.24	1.08
E. cloacae (7)	3.24	1.08
E. cloacae (8)	1.08	0.36
S. marcescens (1)	3.24	1.08
P. stuartii (1)	1.08	0.36
C. freundii (1)	3.24	1.08
C. freundii (2)	3.24	1.08
K. ozaenae (1)	3.24	1.08
K. pneumoniae (1)	1.08	0.36
E. aerogens (3)	3.24	1.08

TABLA XXVI CONTINUACION

S. aureus (1)	1.08	0.36
Salmonella sp. (1)	1.08	0.36
S. aureus ATCC 29213	1.08	0.36
Str. faecalis ATCC 29212	3.24	1.08

Gráfica N°1 comparación de los valores de la CMI entre las fracciones 39-80 y 52-80. Tabla XXVI.

**GRAFICA COMPARATIVA CMI
FRACCIONES:39-80 52-80**



- DISCUSION

De la comparación de los resultados anteriores se desprende de forma evidente la mayor eficacia del extracto acuoso fracción 52-80 con respecto a la fracción 39-80 en la inhibición del crecimiento bacteriano. A continuación se programó un estudio comparativo algo más exhaustivo con el ánimo de establecer cuantitativamente esa mayor eficacia.

3- ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS FRACCIONES 39-80 Y 52-80

Para este estudio se prepararon cuatro grupos, compuesto cada uno de ellos por diez cepas, a los cuales se les realizaron las pruebas para conocer su CMI con la fracción 39-80 y 52-80.

Las concentraciones usadas de fracción 39-80 y 52-80 fueron: blanco, 0.101, 0.202, 0.404, 0.81, 1.62, 3.24 mg/ml.

Los grupos se componían:

1º 10 cepas de *Pseudomonas* sp.

2º 10 cepas de *E.coli*

3º 10 cepas de *Staphylococcus*

4º 10 cepas Gram(-) Enterobacteriaceae

- 1- *M. morgani*
- 2- *K. pneumoniae*
- 3- *E. cloacae*
- 4- *Salmonella sp.*
- 5- *C. freundii*
- 6- *E. aerogenes*
- 7- *S. marcescens*
- 8- *K. oxytoca*
- 9- *P. mirabilis*
- 10- *P. stuartii*

-RESULTADOS

Las CMI's obtenidas del estudio anterior fueron:

TABLA XXVII

	<u>Fracción 39-80*</u>	<u>Fracción 52-80**</u>
	<u>% cep. inh.- conc. pig.</u>	<u>% cep. inh.- conc. pig.</u>
1º Grupo		
10 <i>Pseudomonas sp.</i>	100% - 3.24 mg/ml	100% - 1.62 mg/ml
	20% - 1.62 "	40% - 0.81 "

TABLA XXVII CONTINUACION

	<u>Fracción 39-80*</u>	<u>Fracción 52-80**</u>
	<u>% cep. inh.- conc. pig.</u>	<u>% cep. inh.- conc. pig.</u>
<u>2º Grupo</u>		
10 E. coli	20% - 3.24 mg/ml	80% - 1.62 mg/ml
	10% - 1.62 "	10% - 0.81 "
<u>3º Grupo</u>		
10 Staphylococcus	100% - 3.24 mg/ml	100% - 1.62 mg/ml
	60% - 1.62 "	100% - 0.81 "
		40% - 0.40 "
		20% - 0.20 "
<u>4º Grupo</u>		
1- M. morganii (1)	3.24 mg/ml	0.40 mg/ml
2- K. pneumonie (1)	1.62 "	0.80 "
3- E. cloacae (6)	3.24 "	1.62 "
4- Salmonella sp. (1)	1.08 "	0.40 "
5- C. freundii (1)	3.24 "	1.62 "
6- E. aerogens (1)	3.24 "	0.80 "
7- S. marcescens (1)	3.24 "	1.62 "
8- K. oxytoca (1)	3.24 "	0.80 "
9- P. mirabilis (1)	1.08 "	0.80 "
10- P. stuartii (1)	1.08 "	0.20 "

39-80 * rango de concentraciones empleadas 0.202 a 6.50 mg/ml

52-80** rango de concentraciones empleadas 0.10 a 3.24 mg/ml

- DISCUSION

Los datos obtenidos en la Tabla XXVII están representados en las gráficas 2, 3, 4 y 5. Puede apreciarse claramente que la sustancia con poder antibacteriano en relación con la dosis, se encuentra en mayor proporción en la fracción 52-80 que en la fracción 39-80, o sea que se encuentra en la Banda II a la derecha del espectro y, cuantificando este mayor poder inhibitorio, se puede observar que:

1-En el primer grupo formado por 10 cepas de Pseudomonas sp.

la CMI_{50} para la fracción 39-80 es 2,285 mg/ml

la CMI_{50} para la fracción 52-80 es 0,8 mg/ml

por lo tanto el poder inhibitorio de la fracción 52-80 es 2,856 veces mayor que el de la fracción 39-80.

2-En el segundo grupo formado por 10 cepas de E. coli

la CMI_{50} para la fracción 39-80 es mayor que la concentración máxima utilizada y la CMI_{50} de la fracción 52-80 es 1.3 mg/ml. No se puede establecer cuanto mayor es este poder inhibitorio pero se deduce que es significativamente mayor.

3-En el tercer grupo formado por 10 cepas de Staphylococcus

la CMI_{50} para la fracción 39-80 es 1.418 mg/ml

la CMI_{50} para la fracción 52-80 es 0.454 mg/ml

por lo tanto el poder inhibitorio de la fracción 52-80 es 3,12 veces mayor que el de la fracción 39-80.

4-En el cuarto grupo formado por 10 cepas de diferentes gérmenes

Gram(-) Enterobacteriaceae

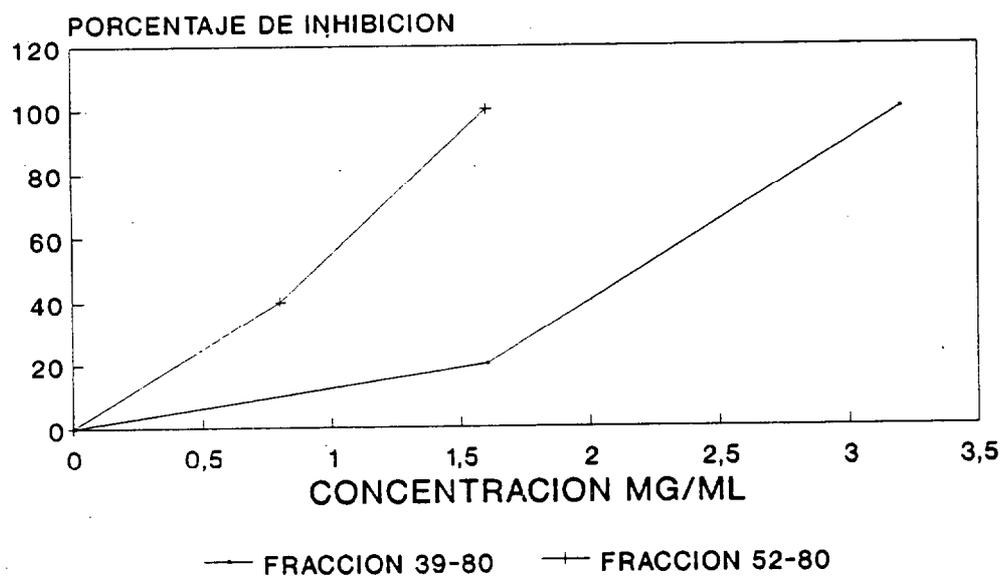
la CMI_{50} para la fracción 39-80 es 2.069 mg/ml

la CMI_{50} para la fracción 52-80 es 0.654 mg/ml

por lo tanto el poder inhibitorio de la fracción 52-80 es 3,16 veces mayor que el de la fracción 39-80

Gráficas 2, 3, 4 y 5 a continuación

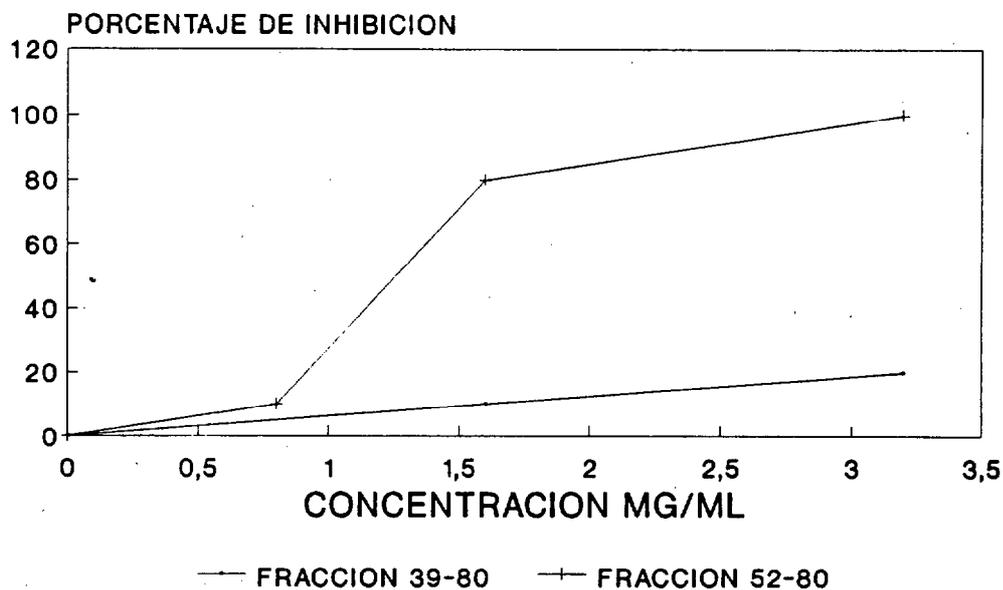
COMPARACION CMI PSEUDO. FRACCIONES:39-80 52-80



Gráfica N°2

COMPARACION CMI E.COLI

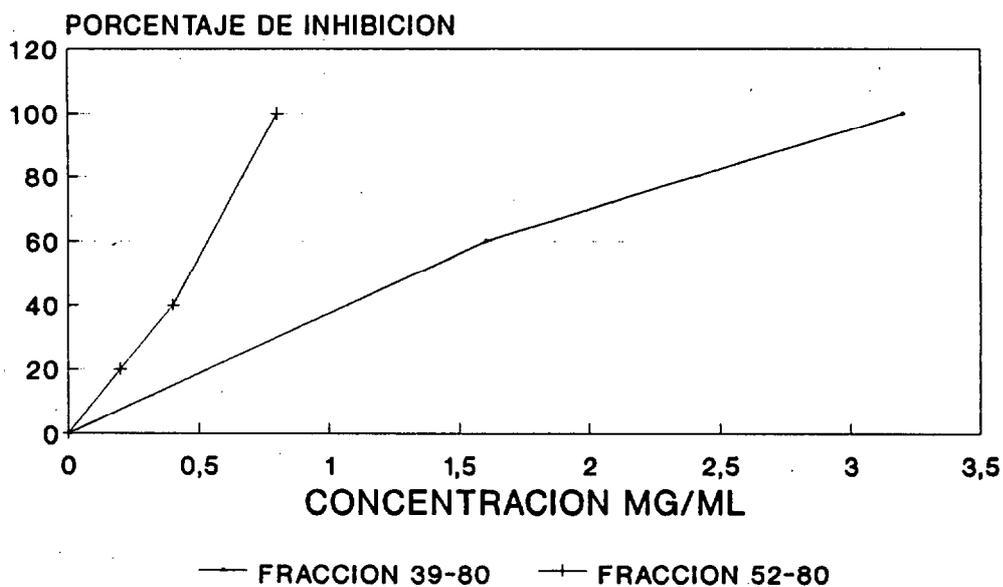
FRACCIONES:39-80 52-80



Gráfica N°3

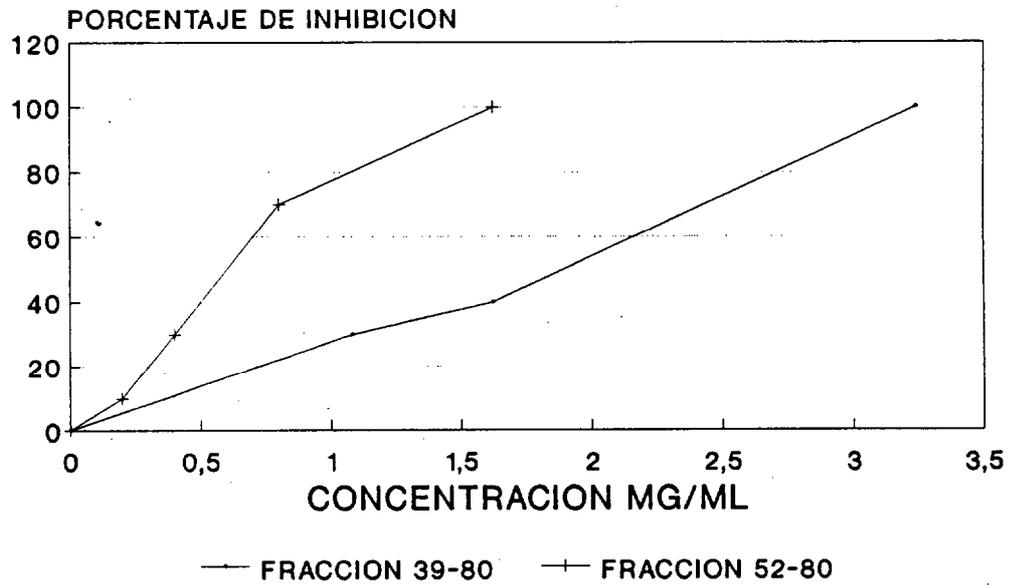
COMPARACION CMI STAPHYL.

FRACCIONES:39-80 52-80



Gráfica N°4

COMPARACION CMI GRAM(-) FRACCIONES:39-80 52-80



Gráfica N°5

4- ESTUDIO COMPARATIVO CON OTROS ANTIBIOTICOS CONOCIDOS Y EL EXTRACTO ACUOSO PARCIALMENTE PURIFICADO (FRACCIONES 39-80 Y 52-80)

Realizar pruebas con otras sustancias de actividad antibiótica conocida y con las fracciones 39-80 y 52-80 simultáneamente, nos permitiría establecer gráficos comparativos que podrían orientar sobre el tipo de inhibición producido por el extracto. Para este trabajo se utilizaron: Ciprofloxacina, Tetraciclina, Tobramicina, Ampicilina, fracción 39-80 , fracción 52-80 y se realizaron pruebas de CMI por macrodilución en placa empleando el replicador de Steer con cepas de la colección particular de este estudio. A continuación se presentan las tablas con los resultados y las gráficas comparativas:

- RESULTADOS

TABLA XXIX

1-CIPROFLOXACINA (BAYCIP)

Concentraciones usadas: 0.032, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 12.5, 25, 50, 100, microgramos/ml.

<u>Cepa</u>	<u>CMI de ciprofloxacina rango 0.032-0.125</u>
C. freundii (1)	0.032
C. freundii (2)	0.032

TABLA XXIX CONTINUACION

C. freundii (3)	0.032
E. cloacae (1)	0.032
E. cloacae (2)	0.032
E. cloacae (3)	0.032
E. cloacae (4)	0.0625
E. aerogenes (1)	0.125
E. aerogenes (2)	0.032
E. aerogenes (3)	0.032
E. aerogenes (4)	0.032
E. sakazakii (1)	0.032
E. sakazakii (2)	0.032
E. coli (1)	0.032
E. coli (2)	0.032
E. coli (3)	0.032
E. coli (4)	0.032
E. coli (5)	0.032
E. coli (6)	0.250
E. coli (7)	0.032
E. coli (8)	0.032
E. coli (9)	0.032
E. coli (10)	0.032
E. coli (11)	0.032
E. coli (12)	0.0625

TABLA XXIX CONTINUACION

E. coli (13)	0.032
E. coli (14)	0.032
E. coli (15)	0.032
E. coli (16)	0.032
E. coli (17)	0.032
E. coli (18)	0.032
E. coli (19)	0.032
E. coli (20)	0.032
E. coli (21)	0.032
K. oxytoca (1)	0.032
K. pneumoniae (1)	0.032
K. pneumoniae (2)	0.125
K. pneumoniae (3)	0.032
K. pneumoniae (4)	0.032
P. mirabilis (1)	0.032
P. mirabilis (2)	0.032
P. mirabilis (3)	0.032
P. mirabilis (4)	0.250
P. mirabilis (5)	0.032
P. mirabilis (6)	0.032
Pseudomonas sp. (1)	0.125
Pseudomonas sp. (2)	0.0625
Pseudomonas sp. (3)	0.032

TABLA XXIX CONTINUACION

Pseudomonas sp. (4)	0.032
Salmonella (1)	0.032
M. morganii (1)	0.0625
Pasteurella sp. (1)	0.032
A. calcoaceticus (1)	0.0625
S. aureus ATCC 29213	0.032
S. aureus (1)	0.0625
S. aureus (2)	0.032
S. aureus (3)	0.032
S. aureus (4)	0.032
S. epidermidis ATCC 12228	0.125
S. epidermidis (1)	0.125
S. epidermidis (2)	0.0625
B. cereus (1)	0.032
B. cereus (2)	0.032
Str. pyogenes ATCC 19615	0.032
Str. faecalis ATCC 29212	0.032

Valor medio	0.0491
Valor máximo	0.2500
Valor mínimo	0.0320
Desviación	0.0440
Varianza	0.0019

CMI₅₀ 0.0320

CMI₉₀ 0.1250

Total de cepas 65:

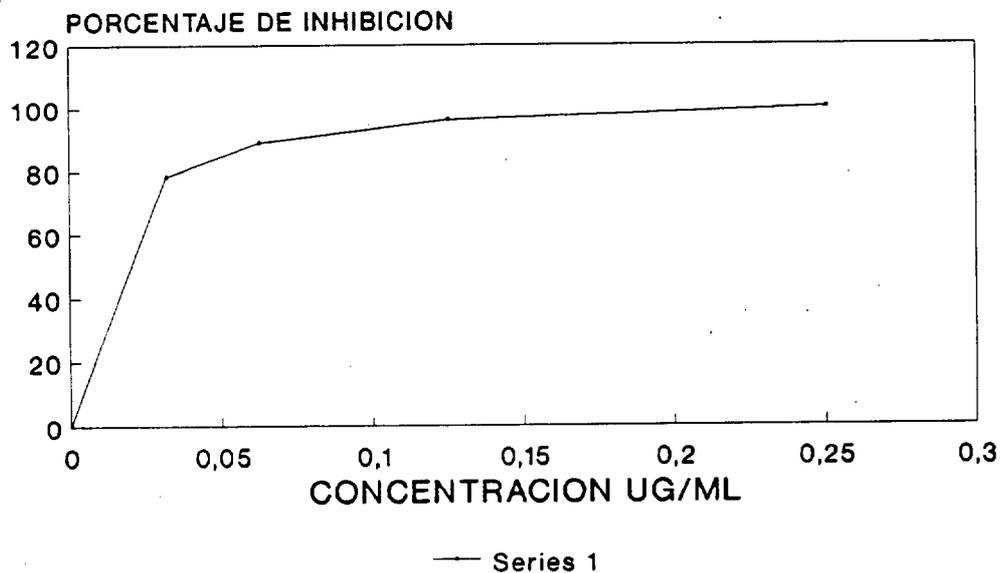
a 0.0320 se inhibieron 51, total acumulado 51 = 78.46%

a 0.0625 se inhibieron 7, total acumulado 58 = 89.23%

a 0.1250 se inhibieron 5, total acumulado 63 = 96%

a 0,2500 se inhibieron 2, total acumulado 65 = 100%

CMI CIPROFLOXACINA COLECCION DE CEPAS



Gráfica N°6

TABLA XXX

2- TETRACICLINA

Concentraciones usadas: blanco, 0.06, 0.129, 0.25, 0.5, 1.29, 2.59, 5.18, 10.375, 26.25, 52.5, 104.5, 207, microgr./ml.

<u>Cepa</u>	<u>CMI de Tetraciclina-rango 0.06-207</u>
C. freundii (1)	207
C. freundii (2)	52.5
C. freundii (3)	0.5
E. cloacae (1)	1.29
E. cloacae (2)	1.29
E. cloacae (3)	1.29
E. cloacae (4)	26.25
E. aerogenes (1)	52.50
E. aerogenes (2)	0.50
E. aerogenes (3)	1.29
E. aerogenes (4)	0.50
E. sakazakii (1)	1.29
E. sakazakii (2)	> 207
E. coli (1)	207
E. coli (2)	0.50
E. coli (3)	0.50
E. coli (4)	1.29
E. coli (5)	207

TABLA XXX CONTINUACION

E. coli (6)	> 207
E. coli (7)	0.50
E. coli (8)	0.50
E. coli (9)	10.375
E. coli (10)	0.50
E. coli (11)	0.50
E. coli (12)	0.50
E. coli (13)	0.50
E. coli (14)	> 207
E. coli (15)	52.50
E. coli (16)	0.25
E. coli (17)	52.50
E. coli (18)	> 207
E. coli (19)	52.50
E. coli (20)	52.50
E. coli (21)	> 207
K. oxytoca (1)	> 207
K. pneumoniae (1)	5.18
K. pneumoniae (2)	26.25
K. pneumoniae (3)	0.50
K. pneumoniae (4)	2.59
P. mirabilis (1)	207
P. mirabilis (2)	207

TABLA XXX CONTINUACION

P. mirabilis (3)	52.50
P. mirabilis (4)	52.50
P. mirabilis (5)	2.59
P. mirabilis (6)	0.25
Pseudomonas sp. (1)	52.50
Pseudomonas sp. (2)	52.50
Pseudomonas sp. (3)	52.50
Pseudomonas sp. (4)	2.59
Salmonella (1)	52.50
M. morgani (1)	10.37
Pasteurella sp. (1)	52.50
A. calcoaceticus (1)	52.50
S. aureus ATCC 29213	0.06
S. aureus (1)	0.06
S. aureus (2)	0.06
S. aureus (3)	0.06
S. aureus (4)	0.06
S. epidermidis ATCC 12228	0.06
S. epidermidis (1)	0.06
S. epidermidis (2)	0.06
B. cereus (1)	0.06
B. cereus (2)	0.06
Str. pyogenes ATCC 19615	0.06

TABLA XXX CONTINUACION

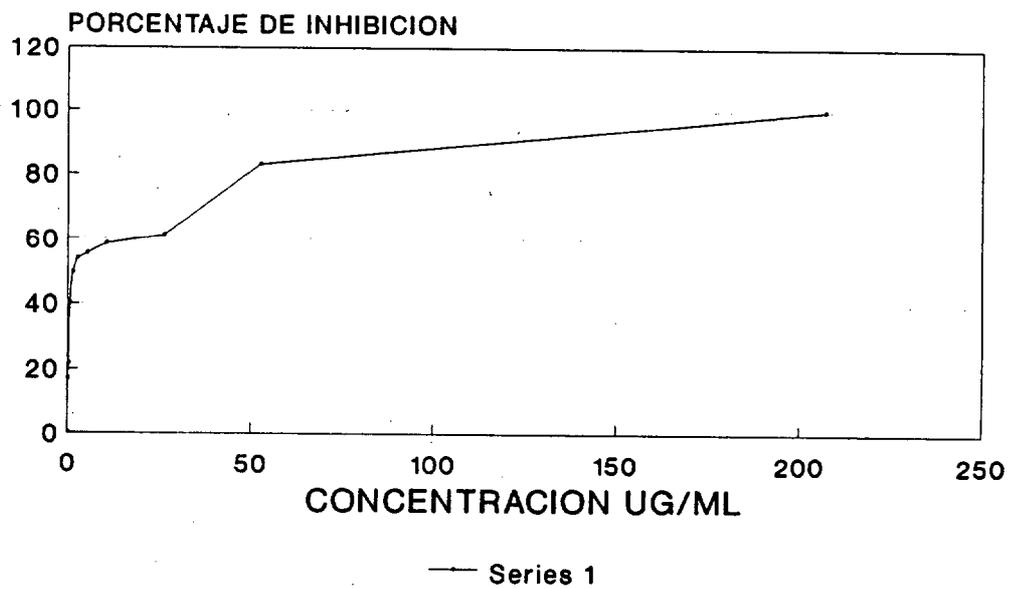
Str. faecalis ATCC 29212 0.25

Valor medio 87.8784
Valor máximo 2625.0
Valor mínimo 0.0600
Desviación 325.8019
Varianza 106146.8650
CMI₅₀ 1.2900
CMI₉₀ 207.00

Total de cepas 65 :

a 0.0600 se inhibieron 11, total acumulado 11= 16.92%
a 0.2500 " " 3, total acumulado 14= 21.53%
a 0.5000 " " 12, total acumulado 26= 40%
a 1.2900 " " 6, total acumulado 32= 49.23%
a 2.5900 " " 3, total acumulado 35= 53.84%
a 5.1800 " " 1, total acumulado 36= 55.38%
a 10.375 " " 2, total acumulado 38= 58.46%
a 26.250 " " 2, total acumulado 40= 61%
a 52.500 " " 14, total acumulado 54= 83%
a 207.00 y mayor " 11, total acumulado 65= 100%

CMI TETRACICLINA COLECCION DE CEPAS



Gráfica N°7

TABLA XXXI

3- TOBRAMICINA

Concentraciones usadas: Blanco, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 31.25, 62.5, 125, 250 microgramos/ml.

<u>Cepa</u>	<u>CMI de Tobramicina-rango 0.30-25</u>
C. freundii (1)	1.25
C. freundii (2)	12.50
C. freundii (3)	0.60
E. cloacae (1)	0.30
E. cloacae (2)	0.30
E. cloacae (3)	0.30
E. cloacae (4)	1.25
E. aerogenes (1)	12.50
E. aerogenes (2)	6.25
E. aerogenes (3)	0.30
E. aerogenes (4)	0.30
E. sakazakii (1)	0.30
E. sakazakii (2)	0.30
E. coli (1)	25
E. coli (2)	6.25
E. coli (3)	1.25
E. coli (4)	0.30
E. coli (5)	6.25

TABLA XXXI CONTINUACION

E. coli (6)	25
E. coli (7)	0.30
E. coli (8)	0.30
E. coli (9)	0.30
E. coli (10)	0.30
E. coli (11)	0.30
E. coli (12)	0.30
E. coli (13)	0.30
E. coli (14)	0.30
E. coli (15)	0.60
E. coli (16)	0.30
E. coli (17)	0.30
E. coli (18)	0.30
E. coli (19)	0.60
E. coli (20)	0.30
E. coli (21)	0.30
K. oxytoca (1)	12.50
K. pneumoniae (1)	0.30
K. pneumoniae (2)	0.60
K. pneumoniae (3)	0.30
K. pneumoniae (4)	0.30
P. mirabilis (1)	0.30
P. mirabilis (2)	0.30

TABLA XXXI CONTINUACION

P. mirabilis (3)	1.25
P. mirabilis (4)	0.30
P. mirabilis (5)	0.60
P. mirabilis (6)	0.30
Pseudomonas sp. (1)	1.25
Pseudomonas sp. (2)	0.30
Pseudomonas sp. (3)	0.30
Pseudomonas sp. (4)	0.30
Salmonella (1)	2.50
M. morganii (1)	0.60
Pasteurella sp. (1)	0.30
A. calcoaceticus (1)	0.30
S. aureus ATCC 29213	0.30
S. aureus (1)	0.30
S. aureus (2)	0.30
S. aureus (3)	0.30
S. aureus (4)	0.30
S. epidermidis ATCC 12228	0.30
S. epidermidis (1)	0.30
S. epidermidis (2)	0.30
B. cereus (1)	0.30
B. cereus (2)	0.30
Str. pyogenes ATCC 19615	0.30

TABLA XXXI CONTINUACION

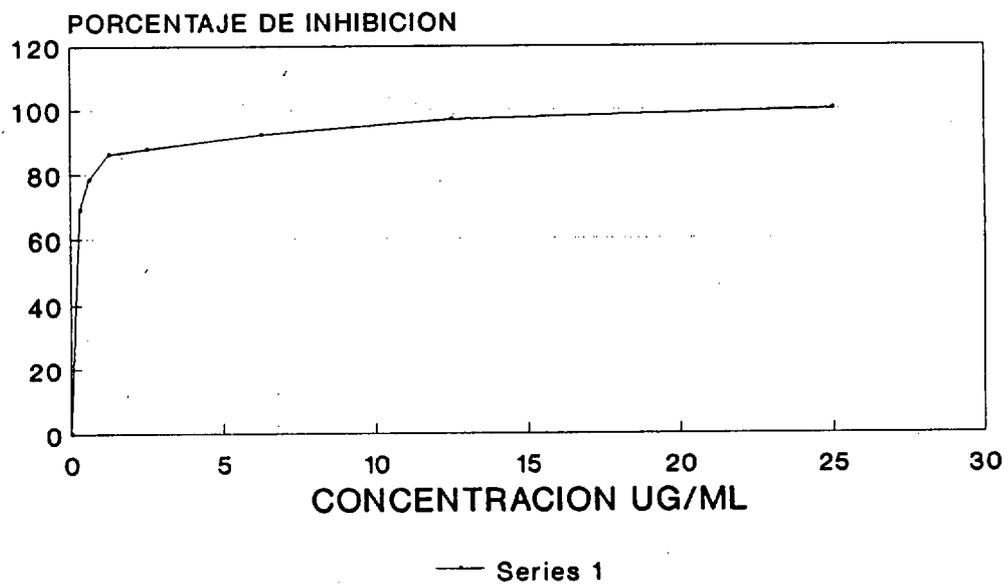
Str. faecalis ATCC 29212 0.30

Valor medio	2.0323
Valor máximo	25.000
Valor mínimo	0.3000
Desviación	4.9423
Varianza	24.4268
CMI₅₀	0.300
CMI₉₀	6.25

Total de cepas 65:

a 0.3000	se inhibieron 45,	total acumulado 45= 69.23%
a 0.6000	" " 6,	total acumulado 51= 78.46%
a 1.2500	" " 5,	total acumulado 56= 86.15%
a 2.5000	" " 1,	total acumulado 57= 87.69%
a 6.2500	" " 3,	total acumulado 60= 92.30%
a 12.500	" " 3,	total acumulado 63= 96.92%
a 25	" " 2,	total acumulado 65= 100%

CMI TOBRAMICINA COLECCION DE CEPAS



Gráfica N°8

TABLA XXXII

4-AMPICILINA

Concentraciones usadas: blanco, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 3.125, 6.25, 12.5, 31.25, 62.5, 125, 250 microgramos/ml.

<u>Cepa</u>	<u>CMI de Ampicilina-rango 0.30- > 250</u>
C. freundii (1)	> 250
C. freundii (2)	2.50
C. freundii (3)	125
E. cloacae (1)	250
E. cloacae (2)	> 250
E. cloacae (3)	> 250
E. cloacae (4)	> 250
E. aerogenes (1)	> 250
E. aerogenes (2)	0.30
E. aerogenes (3)	6.25
E. aerogenes (4)	1.25
E. sakazakii (1)	250
E. sakazakii (2)	250
E. coli (1)	> 250
E. coli (2)	125
E. coli (3)	250
E. coli (4)	250
E. coli (5)	> 250
E. coli (6)	> 250

TABLA XXXII CONTINUACION

E. coli (7)	62.50
E. coli (8)	12.50
E. coli (9)	125
E. coli (10)	3.125
E. coli (11)	31.25
E. coli (12)	6.25
E. coli (13)	250
E. coli (14)	1.25
E. coli (15)	2.50
E. coli (16)	2.50
E. coli (17)	250
E. coli (18)	250
E. coli (19)	250
E. coli (20)	> 250
E. coli (21)	250
K. oxytoca (1)	250
K. pneumoniae (1)	12.5
K. pneumoniae (2)	125
K. pneumoniae (3)	3.125
K. pneumoniae (4)	25
P. mirabilis (1)	> 250
P. mirabilis (2)	2.5
P. mirabilis (3)	62.50

TABLA XXXII CONTINUACION

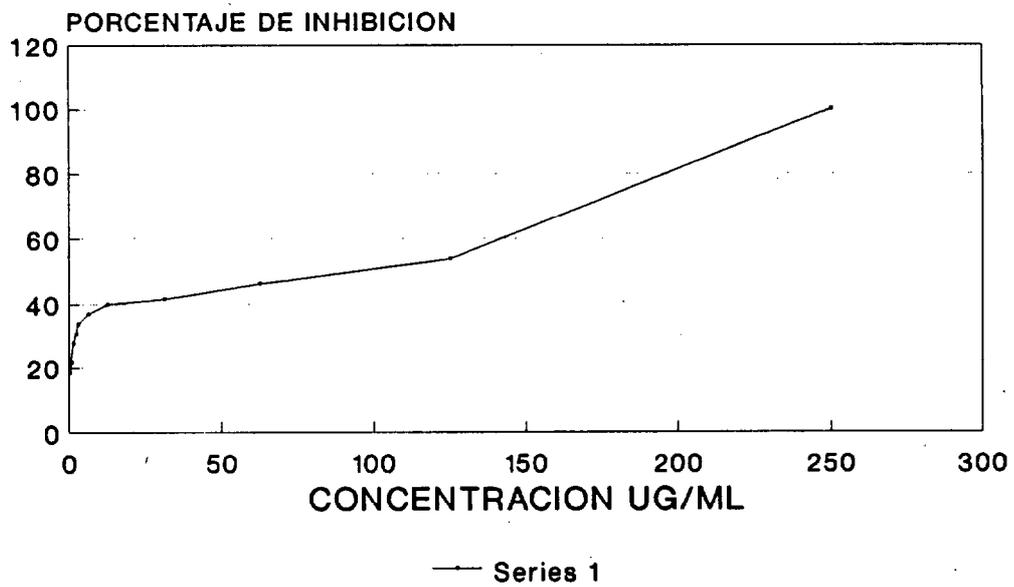
P. mirabilis (4)	62.50
P. mirabilis (5)	250
P. mirabilis (6)	250
Pseudomonas sp. (1)	250
Pseudomonas sp. (2)	> 250
Pseudomonas sp. (3)	> 250
Pseudomonas sp. (4)	250
Salmonella (1)	25
M. morgani (1)	> 250
Pasteurella sp. (1)	250
A. calcoaceticus (1)	250
S. aureus ATCC 29213	0.30
S. aureus (1)	0.30
S. aureus (2)	0.30
S. aureus (3)	0.30
S. aureus (4)	0.30
S. epidermidis ATCC 12228	0.30
S. epidermidis (1)	0.30
S. epidermidis (2)	0.30
B. cereus (1)	0.30
B. cereus (2)	0.30
Str. pyogenes ATCC 19615	0.30
Str. faecalis ATCC 29212	125

Valor medio 330.0554
Valor máximo 1250.00
Valor mínimo 0.3000
Desviación 470.4602
Varianza 221332.8227
CMI₅₀ 125
CMI₉₀ 250

Total de cepas 65:

a 0.3000 se inhibieron 12, total acumulado 12= 18.46%
a 1.2500 " " 2, total acumulado 14= 21.53%
a 2.5000 " " 4, total acumulado 18= 27.69%
a 3.1250 " " 2, total acumulado 20= 30.7%
a 6.2500 " " 2, total acumulado 22= 33.8%
a 12.500 " " 2, total acumulado 24= 36.9%
a 25 " " 2, total acumulado 26= 40%
a 31.250 " " 1, total acumulado 27= 41.53%
a 62.500 " " 3, total acumulado 30= 46.15%
a 125 " " 5, total acumulado 35= 53.84%
a 250 " " 30, total acumulado 65= 100%

CMI AMPICILINA COLECCION DE CEPAS



Gráfica N°9

TABLA XXXIII

5-EXTRACTO ACUOSO PARCIALMENTE PURIFICADO FRACCION 39-

80

Concentraciones usadas: blanco, 0.101, 0.203, 0.406, 0,812, 1.625, 3.24
mg/ml

<u>Cepa</u>	<u>CMI de la fracción 39-80-rango0.203-3.24</u>
C. freundii (1)	0.203
C. freundii (2)	3.24
C. freundii (3)	1.625
E. cloacae (1)	3.24
E. cloacae (2)	3.24
E. cloacae (3)	3.24
E. cloacae (4)	3.24
E. aerogenes (1)	3.24
E. aerogenes (2)	3.24
E. aerogenes (3)	3.24
E. aerogenes (4)	3.24
E. sakazakii (1)	3.24
E. sakazakii (2)	3.24
E. coli (1)	1.625
E. coli (2)	0.406
E. coli (3)	3.24
E. coli (4)	3.24

TABLA XXXIII CONTINUACION

E. coli (5)	1.625
E. coli (6)	3.24
E. coli (7)	3.24
E. coli (8)	3.24
E. coli (9)	3.24
E. coli (10)	3.24
E. coli (11)	1.625
E. coli (12)	1.625
E. coli (13)	3.24
E. coli (14)	3.24
E. coli (15)	3.24
E. coli (16)	3.24
E. coli (17)	3.24
E. coli (18)	3.24
E. coli (19)	3.24
E. coli (20)	3.24
E. coli (21)	1.625
K. oxytoca (1)	1.625
K. pneumoniae (1)	3.24
K. pneumoniae (2)	3.24
K. pneumoniae (3)	3.24
K. pneumoniae (4)	3.24
P. mirabilis (1)	3.24

TABLA XXXIII CONTINUACION

P. mirabilis (2)	3.24
P. mirabilis (3)	1.625
P. mirabilis (4)	0.812
P. mirabilis (5)	1.625
P. mirabilis (6)	3.24
Pseudomonas sp. (1)	1.625
Pseudomonas sp. (2)	1.625
Pseudomonas sp. (3)	3.24
Pseudomonas sp. (4)	3.24
Salmonella (1)	3.24
M. morgani (1)	1.625
Pasteurella sp. (1)	1.625
A. calcoaceticus (1)	1.625
S. aureus ATCC 29213	1.080
S. aureus (1)	1.080
S. aureus (2)	1.620
S. aureus (3)	1.620
S. aureus (4)	3.24
S. epidermidis ATCC 12228	1.080
S. epidermidis (1)	1.080
S. epidermidis (2)	1.625
B. cereus (1)	1.080
B. cereus (2)	1.080

TABLA XXXIII CONTINUACION

Str. pyogenes ATCC 19615	3.24
Str. faecalis ATCC 29212	1.080

Valor medio 2.4632

Valor máximo 3.2500

Valor mínimo 0,2030

Desviación 0.9682

Varianza 0.9373

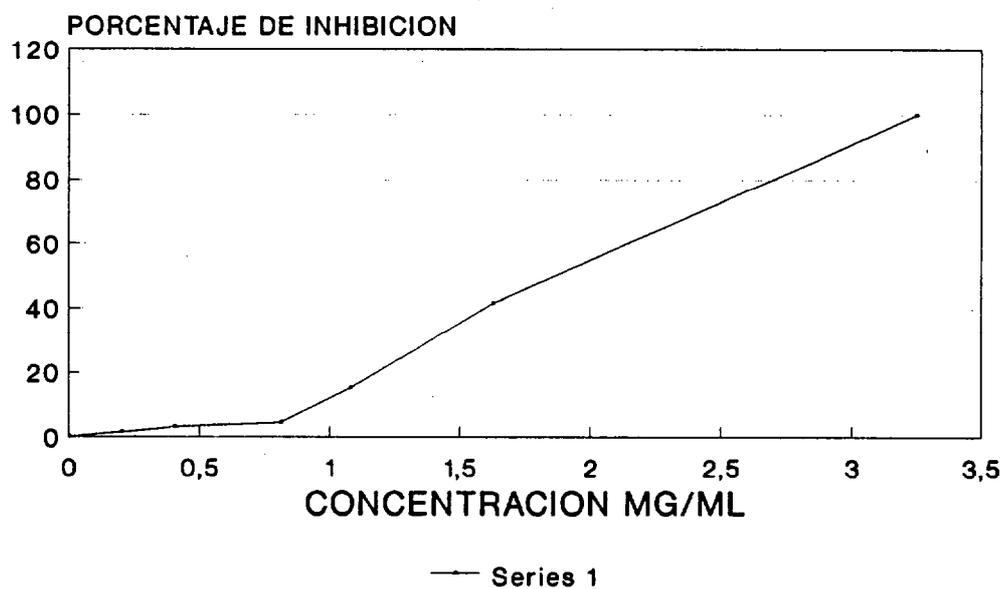
CMI₅₀ 1.625

CMI₉₀ 3.24

Total de cepas 65:

a 0.203	se inhibieron	1,	total acumulado 1 = 1.53%
a 0.406	" "	1,	total acumulado 2 = 3.07%
a 0.812	" "	1,	total acumulado 3 = 4.615%
a 1.08	" "	7,	total acumulado 10 = 15.38%
a 1.625	" "	17,	total acumulado 27 = 41.53%
a 3.25	" "	38,	total acumulado 65 = 100%

CMI FRACCION 39-80 COLECCION DE CEPAS



Gráfica N°10

TABLA XXXIV

6-EXTRACTO ACUOSO PARCIALMENTE PURIFICADO FRACCION 52-80

Concentraciones usadas: blanco, 0.101, 0.203, 0.406, 0.812, 1.625, 3.24 mg/ml.

<u>Cepa</u>	<u>CMI de la fracción 52-80-rango 0.101-1.625</u>
C. freundii (1)	0.101
C. freundii (2)	1.625
C. freundii (3)	0.812
E. cloacae (1)	1.625
E. cloacae (2)	3.24
E. cloacae (3)	1.625
E. cloacae (4)	1.625
E. aerogenes (1)	3.24
E. aerogenes (2)	1.625
E. aerogenes (3)	1.625
E. aerogenes (4)	1.625
E. sakazakii (1)	1.625
E. sakazakii (2)	1.625
E. coli (1)	0.812
E. coli (2)	0.203
E. coli (3)	1.625
E. coli (4)	1.625

TABLA XXXIV CONTINUACION

E. coli (5)	0.812
E. coli (6)	0.812
E. coli (7)	0.812
E. coli (8)	0.812
E. coli (9)	1.625
E. coli (10)	1.625
E. coli (11)	0.812
E. coli (12)	0.812
E. coli (13)	1.625
E. coli (14)	1.625
E. coli (15)	1.625
E. coli (16)	1.625
E. coli (17)	1.625
E. coli (18)	1.625
E. coli (19)	1.625
E. coli (20)	0.812
E. coli (21)	0.812
K. oxytoca (1)	0.812
K. pneumoniae (1)	1.625
K. pneumoniae (2)	1.625
K. pneumoniae (3)	1.625
K. pneumoniae (4)	1.625
P. mirabilis (1)	1.625

TABLA XXXIV CONTINUACION

P. mirabilis (2)	1.625
P. mirabilis (3)	0.812
P. mirabilis (4)	0.203
P. mirabilis (5)	0.812
P. mirabilis (6)	1.625
Pseudomonas sp. (1)	0.812
Pseudomonas sp. (2)	0.812
Pseudomonas sp. (3)	1.625
Pseudomonas sp. (4)	1.625
Salmonella (1)	1.625
M. morgani (1)	1.625
Pasteurella sp. (1)	0.101
A. calcoaceticus (1)	1.625
S. aureus ATCC 29213	0.360
S. aureus (1)	0.360
S. aureus (2)	0.360
S. aureus (3)	0.360
S. aureus (4)	1.625
S. epidermidis ATCC 12228	0.360
S. epidermidis (1)	0.360
S. epidermidis (2)	0.812
B. cereus (1)	0.360
B. cereus (2)	0.360

TABLA XXXIV CONTINUACION

Str. pyogenes ATCC 19615	1.080
Str. faecalis ATCC 29212	1.080

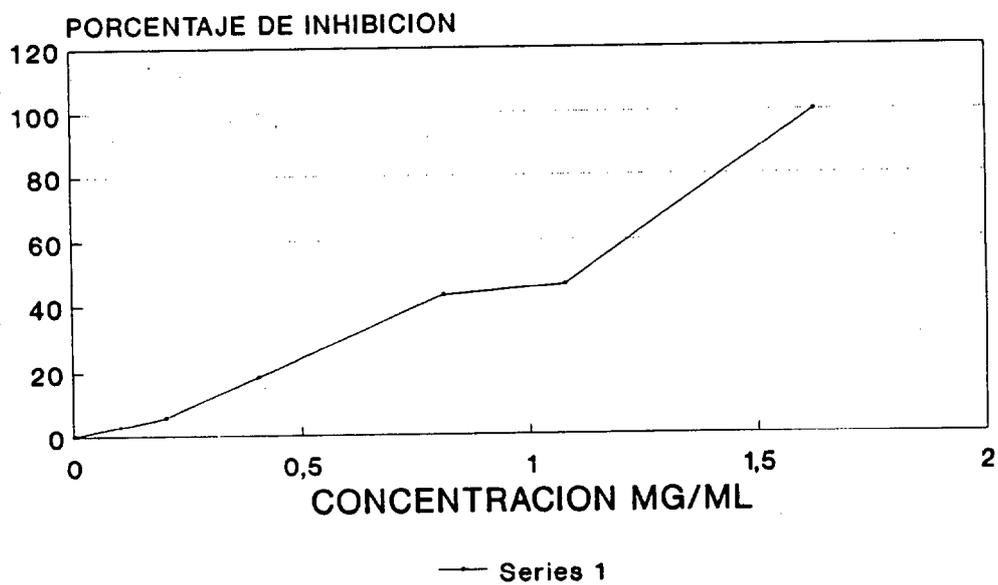
Valor medio	1.2062
Valor máximo	3.2500
Valor mínimo	0.1010
Desviación	0.6406
Varianza	0,4103
CMI₅₀	1.08
CMI₉₀	1.625

Total de cepas 65:

a 0.101	se inhibieron	2,	total acumulado 2= 3.07%
a 0.203	" "	2,	total acumulado 4= 6.15%
a 0.360	" "	8,	total acumulado 12= 18.46
a 0.812	" "	16,	total acumulado 28= 43.07%
a 1.080	" "	2,	total acumulado 30= 46.15%
a 1.625	" "	33,	total acumulado 63= 96.92%
a 3.250	" "	2,	total acumulado 65= 100%

CMI FRACCION 52-80

COLECCION DE CEPAS



Gráfica N°11

- DISCUSION

Al realizar el análisis estadístico del estudio comparativo observamos que:

a) Si dividimos la colección de cepas estudiadas en dos grupos:

1= Gram (-) y 2= Gram (+), y aplicamos el análisis de la varianza en

donde: $p < 0.05$ = significativo y $p < 0.01$ = muy significativo

a los resultados de las CMI's, se demuestra que existen diferencias significativas entre ambos grupos en el caso de:

- Tetraciclina mayor efecto frente a Gram (+)

significativo $p = 0.035$

- Tobramicina mayor efecto frente a Gram (+)

significativo $p = 0.006$

- Ampicilina mayor efecto frente a Gram (+)

muy significativo $p = 0.001$

- Fracción 52-80 mayor efecto frente a Gram (+)

muy significativo $p = 0.001$

- Fracción 39-80 mayor efecto frente a Gram (+)

muy significativo $p = 0.001$

No se observa diferencia significativa entre ambos grupos para la Ciprofloxacina, $p = 0.777$

Este resultado nos sorprende dada la similitud estructural existente entre la Ciprofloxacina (Betaina) y la Betacianina. Esta discrepancia puede

deberse a que la betacianina está presente en el extracto acompañada de otras sustancias que pueden condicionar su actividad antibacteriana

b) Dividiendo la colección de cepas estudiadas en tres grupos:

1= enterobacterias, 2= no enterobacterias y 3= Gram (+), y aplicando el análisis de la varianza como en a), el comportamiento de los antibióticos y de las fracciones frente a estos tres grupos es: la Ampicilina, la fracción 39-80 y la fracción 52-80 se comportan de manera diferente frente a estos tres grupos siendo en todos los casos mayor su efecto frente al grupo tres, un poco menor frente al grupo dos y menor frente al grupo uno, con lo cual podemos deducir que son los gérmenes Gram (+) los más sensibles y las enterobacterias los menos sensibles al efecto antibacteriano de estas sustancias. En cualquier caso estas diferencias no son estadísticamente significativas.

**- RESUMEN FINAL DE LOS RESULTADOS GENERALES OBTENIDOS
CON EL EXTRACTO ACUOSO FRACCIONES 39-80 Y 52-80.**

Las siguientes dos tablas recogen los resultados generales obtenidos a lo largo de este trabajo en las CMI realizadas con Fracción 39-80 y 52-80

TABLA XXXV

<u>Cepa</u>	<u>CMI de la fracción 39-80</u> <u>rango 0.203-3.24</u>
C. freundii (1)	0.203
C. freundii (2)	3.24
C. freundii (3)	1.625
C. freundii (4)	3.24
C. freundii (5)	3.24
E. cloacae (1)	3.24
E. cloacae (2)	3.24
E. cloacae (3)	3.24
E. cloacae (4)	3.24
E. cloacae (5)	3.24
E. cloacae (6)	3.24
E. cloacae (7)	1.08
E. aerogenes (1)	3.24

TABLA XXXV CONTINUACION

E. aerogenes (2)	3.24
E. aerogenes (3)	3.24
E. aerogenes (4)	3.24
E. aerogenes (5)	3.24
E. sakazakii (1)	3.24
E. sakazakii (2)	3.24
E. coli (1)	1.625
E. coli (2)	0.406
E. coli (3)	3.24
E. coli (4)	3.24
E. coli (5)	1.625
E. coli (6)	3.24
E. coli (7)	3.24
E. coli (8)	3.24
E. coli (9)	3.24
E. coli (10)	3.24
E. coli (11)	1.625
E. coli (12)	1.625
E. coli (13)	3.24
E. coli (14)	3.24
E. coli (15)	3.24
E. coli (16)	3.24
E. coli (17)	3.24

TABLA XXXV CONTINUACION

E. coli (18)	3.24
E. coli (19)	3.24
E. coli (20)	3.24
E. coli (21)	1.625
K. oxytoca (1)	1.625
K. ozaenae (1)	3.24
K. pneumoniae (1)	3.24
K. pneumoniae (2)	3.24
K. pneumoniae (3)	3.24
K. pneumoniae (4)	3.24
K. pneumoniae (5)	3.24
K. pneumoniae (6)	1.08
P. mirabilis (1)	3.24
P. mirabilis (2)	3.24
P. mirabilis (3)	1.625
P. mirabilis (4)	0.812
P. mirabilis (5)	1.625
P. mirabilis (6)	3.24
P. mirabilis (7)	1.08
P. mirabilis (8)	1.08
P. mirabilis (9)	1.08
Pseudomonas sp. (1)	1.625
Pseudomonas sp. (2)	1.625

TABLA XXXV CONTINUACION

Pseudomonas sp. (3)	3.24
Pseudomonas sp. (4)	3.24
Pseudomonas sp. (5)	3.24
Pseudomonas sp. (6)	1.08
Pseudomonas sp. (7)	1.08
Salmonella (1)	3.24
Salmonella (2)	1.08
M. morganii (1)	1.625
Pasteurella sp. (1)	1.625
A. calcoaceticus (1)	1.625
S. aureus ATCC 29213	1.08
S. aureus (1)	1.08
S. aureus (2)	1.625
S. aureus (3)	1.625
S. aureus (4)	3.24
S. epidermidis ATCC 12228	1.08
S. epidermidis (1)	1.08
S. epidermidis (2)	1.625
S. epidermidis (4)	3.24
S. epidermidis (8)	3.24
B. cereus (1)	1.08
B. cereus (2)	1.08
Str. pyogenes ATCC 19615	3.24

TABLA XXXV CONTINUACION

Str. faecalis ATCC 29212	1.08
S. marcescens (1)	3.24
P. stuartii (1)	1.08

Total de cepas estudiadas 85:

100% se inhiben a 3.24		Valor medio 2.4632
42.35% "	1.625	Valor máximo 3.2500
22.35% "	1.08	Valor mínimo 0.2030
3.53% "	0.812	Desviación 0.9682
2.35% "	0.406	Varianza 0.9373
1.176% "	0.203	

CMI₅₀ 1.625

CMI₉₀ 3.24

TABLA XXXVI

<u>Cepa</u>	<u>CMI de la fracción 52-80</u> <u>rango 0.101-3.24</u>
C. freundii (1)	0.101
C. freundii (2)	1.625
C. freundii (3)	0.812
C. freundii (4)	1.08
C. freundii (5)	1.08
E. cloacae (1)	1.625
E. cloacae (2)	3.24
E. cloacae (3)	1.625
E. cloacae (4)	1.625
E. cloacae (5)	1.08
E. cloacae (6)	1.08
E. cloacae (7)	0.36
E. aerogenes (1)	3.24
E. aerogenes (2)	1.625
E. aerogenes (3)	1.625
E. aerogenes (4)	1.625
E. aerogenes (5)	1.08
E. sakazakii (1)	1.625
E. sakazakii (2)	1.625

TABLA XXXVI CONTINUACION

E. coli (1)	0.812
E. coli (2)	0.203
E. coli (3)	1.625
E. coli (4)	1.625
E. coli (5)	0.812
E. coli (6)	0.812
E. coli (7)	0.812
E. coli (8)	0.812
E. coli (9)	1.625
E. coli (10)	1.625
E. coli (11)	0.812
E. coli (12)	0.812
E. coli (13)	1.625
E. coli (14)	1.625
E. coli (15)	1.625
E. coli (16)	1.625
E. coli (17)	1.625
E. coli (18)	1.625
E. coli (19)	1.625
E. coli (20)	0.812
E. coli (21)	0.812
K. oxytoca (1)	0.812
K. ozaenae (1)	1.080

TABLA XXXVI CONTINUACION

K. pneumoniae (1)	1.625
K. pneumoniae (2)	1.625
K. pneumoniae (3)	1.625
K. pneumoniae (4)	1.625
K. pneumoniae (5)	1.08
K. pneumoniae (6)	0.36
P. mirabilis (1)	3.24
P. mirabilis (2)	3.24
P. mirabilis (3)	1.625
P. mirabilis (4)	0.203
P. mirabilis (5)	1.625
P. mirabilis (6)	3.24
P. mirabilis (7)	0.36
P. mirabilis (8)	0.36
P. mirabilis (9)	0.36
Pseudomonas sp. (1)	1.625
Pseudomonas sp. (2)	1.625
Pseudomonas sp. (3)	3.24
Pseudomonas sp. (4)	3.24
Pseudomonas sp. (5)	1.080
Pseudomonas sp. (6)	0.360
Pseudomonas sp. (7)	0.360
Salmonella (1)	3.24

TABLA XXXVI CONTINUACION

Salmonella (2)	0.360
M. morgani (1)	1.625
Pasteurella sp. (1)	0.101
A. calcoaceticus (1)	1.625
S. aureus ATCC 29213	0.101
S. aureus (1)	0.101
S. aureus (2)	0.101
S. aureus (3)	0.101
S. aureus (4)	0.812
S. epidermidis ATCC 12228	0.101
S. epidermidis (1)	0.101
S. epidermidis (2)	0.812
S. epidermidis (4)	1.080
S. epidermidis (8)	1.080
B. cereus (1)	1.625
B. cereus (2)	1.625
Str. pyogenes ATCC 19615	0.101
Str. faecalis ATCC 29212	0.101
S. marcescens (1)	1.080
P. stuartii (1)	0.360

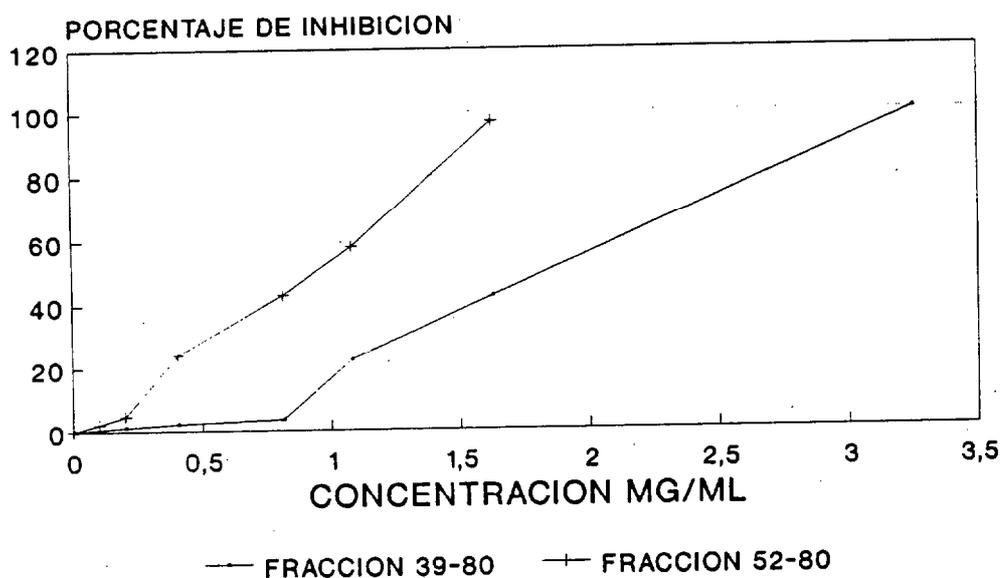
Total de cepas estudiadas 85:

100% se inhiben a	3.24	Valor medio	1.2062
97.6%	"	1.625	Valor máximo 3.2500
58%	"	1.08	Valor mínimo 0.1010
43%	"	0.812	Desviación 0.6406
24%	"	0.36	Varianza 0.4103
4.7%	"	0.203	
2.35%	"	0.101	

CMI₅₀ 1.08

CMI₉₀ 1.625

CMI ESTUDIO COMPARATIVO TOTAL COLECCION DE CEPAS



Gráfica N°12 estudio comparativo de las CMI de las fracciones 39-80 y 52-80

4-4 CUARTO OBJETIVO

Era necesario establecer el contenido de betacianina de las concentraciones de extracto acuoso parcialmente purificado (fracciones 39-80 y 52-80) utilizadas. Como se ha expresado anteriormente, la proporción de betacianina es la mayor dentro de las sustancias que componen el extracto y de la que, por lo tanto, se sospecha una actividad inhibitoria frente a los gérmenes, además de que presenta una gran similitud estructural con diversos antibióticos.

Para determinar el contenido de betacianina se hicieron diluciones del extracto acuoso parcialmente purificado (fracciones 39-80 y 52-80) iguales a las que se utilizaron en las pruebas efectuadas y se diluyeron de manera que pudieran ser leídas en el espectrofotómetro. A continuación se calculó la correspondencia entre la dilución realizada y la concentración inicial para, según las lecturas realizadas a diferentes longitudes de onda, aplicar el test de Nilsson para la determinación del contenido de betacianina.

Test de Nilsson:

$$\% \text{ Betacianina} = A \times V / 1.120 \times L \times W$$

A = Máximo de absorción de la solución a 530 nm

V = Volúmen de la solución en ml.

L = Longitud de la celdilla (paso de luz) en cm. = (1cm.)

W = Peso de la muestra en gramos

De esta manera pudimos establecer el contenido de betacianina de las concentraciones de extracto acuoso parcialmente purificado fracciones 39-80 y 52-80 utilizadas a lo largo de este trabajo en las diferentes pruebas realizadas

- RESULTADOS

FRACCIONES 39-80

<u>Conc. dosis antibiogramas</u>	<u>Contenido de betacianina</u>
1.09 mg	0.01757 mg=17.5 μ g
1.19 mg	0.01918 mg=19.1 μ g
1.62 mg	0.02545 mg=25.4 μ g
2.187 mg	0.03526 mg=35.2 μ g

<u>Concentración dosis CMI</u>	<u>Contenido de betacianina</u>
3.24 mg/ml	0.052405 mg=52.4 μ g
1.62 mg/ml	0.025450 mg=25.4 μ g
0.81 mg/ml	0.012800 mg=12.8 μ g
0.406 mg/ml	0.006550 mg=6.55 μ g
0.203 mg/ml	0.003350 mg=3.35 μ g

FRACCIONES 52-80

<u>Concentración dosis</u>	<u>Contenido de betacianina</u>
1.62 mg/ml	0.06610 mg=66.1 µg
0.81 mg/ml	0.03475 mg=34.7 µg
0.405 mg/ml	0.01820 mg=18.2 µg
0.202 mg/ml	0.00705 mg=7.05 µg
0.1014 mg/ml	0.00397 mg=3.97 µg

- DISCUSION

Como se puede apreciar las concentraciones de Betacianina son considerablemente pequeñas por lo que su actividad antimicrobiana en relación con la dosis resulta ser notablemente alta.

DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

DISCUSION GENERAL.-

Con los estudios farmacológicos llevados a cabo en el laboratorio de Farmacología de La Universidad de Las Palmas de G. C. sobre efectos de extractos de frutos de O. dillenii, se han confirmado algunos de los supuestos mencionados en la introducción de este trabajo.

Debemos recordar que FERNANDEZ PEREZ (1989) demostró el efecto miorrelajante sobre la fibra lisa intestinal y de la vena porta. El efecto paralizante sobre el intestino, explicaría el síndrome clínico del estreñimiento provocado tras la ingestión de los frutos del género *Opuntia*.

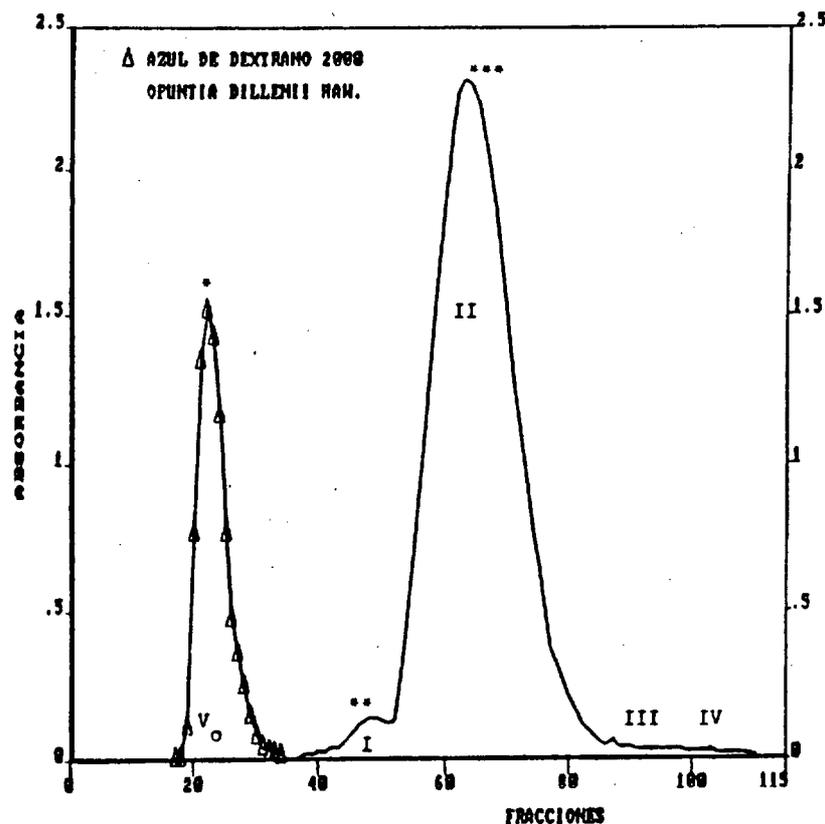
Por quedar fuera del contexto de este trabajo no hemos revisado las similitudes estructurales de la Betanina con otros fármacos con efectos miorrelajantes, antiinflamatorios, analgésicos, etc. aunque algunos de ellos ya han sido iniciados (relajación de la musculatura lisa bronquial, analgesia, efecto antiinflamatorio, etc.)

No queremos significar con ello que pensemos que la Betanina posee todos estos efectos de forma importante, sino solo si los tiene o no. Efectos que aún siendo secundarios podrían clasificarse en inocuos, útiles o perjudiciales.

Debemos tener en cuenta, como dijimos al principio de esta exposición,

que un fármaco puede actuar sobre muy variados receptores, siendo su efecto el o los cambios que produce en las estructuras biológicas sobre los que se asientan. De aquí la importancia de conocer, cuanto más mejor, los sitios donde actúa.

Somos conscientes de que los extractos con los que se ha realizado este trabajo, no son puros. Es más, se ha demostrado que eliminando del eluyente de la columna cierto número de muestras, las situadas a la izquierda de la banda del espectro de máxima absorción, se aumenta considerablemente la potencia del efecto antimicrobiano.



Gráfica N° 13 Volúmenes de elución de las bandas que contiene el extracto acuoso de los frutos de *Opuntia dillenii*.

Este trabajo, el aislamiento de un producto de mayor potencia, se ha relegado para posteriores investigaciones.

Es evidente que las afirmaciones de SANCHEZ ALBORNOZ (1980) en relación con la existencia en la naturaleza de productos farmacológicamente activos y potencialmente útiles en terapéutica siguen vigentes.

También lo es la de REUBEN y WITTCOFF (1989) al considerar las dificultades, de tipo económico principalmente, que conlleva la búsqueda de nuevos fármacos potencialmente útiles en terapéutica.

De aquí que la investigación de productos naturales solo sea posible realizada en la Universidad, donde el factor "ganancia" o rendimiento económico no se tiene en cuenta y si lo tiene al máximo el interés científico, que a la larga redundará en el bien social.

Ha quedado claro que los métodos utilizados para la purificación de los extractos propuestos y utilizados por KOPELMAN (1977), WYLEY (1978), VERGERONT et al (1980) y SCHWARTZ et al (1980) y puestos en práctica en este laboratorio por FERNADEZ PEREZ (1989), han resultado ser idóneos para tal finalidad.

La cantidad total (rendimiento) de extracto obtenido de los frutos de

Opuntia dillenii (8.5 %) así como el porcentaje del mismo tras su purificación cromatográfica (2.63 % para ambos grupos de fracciones 39-80 y 52-80) concuerdan con los resultados de **FERNANDEZ PEREZ (1989)**.

Si bien para muchos investigadores, entre ellos **VON ELBE (1979)** y para la industria alimentaria, la estabilidad o mínima degradación del extracto eran de primordial importancia, este hecho para nosotros implicaba factores de efectividad farmacológica. De aquí el asegurarnos de las condiciones en las que se evitara tal degradación.

Los resultados de las pruebas realizadas con tal finalidad, también coinciden con las descritas por **FERNANDEZ PEREZ (1989)** cerciorandonos de que las condiciones óptimas para evitar la degradación eran: **T^a 4°C**, oscuridad y **pH 4.06**. A las mismas conclusiones habían llegado **PASCH et al (1975)**, y **ATOE (1982)**.

Una vez confirmada la bondad de la utilidad de las técnicas para aislar el extracto y conocidas las condiciones ambientales en las que se conservaba estable, se iniciaron los que para nosotros, era la parte más importante de este trabajo de Tesis: demostrar si poseía algún efecto antimicrobiano.

Como ha quedado expuesto en la introducción y planteamiento del trabajo, otros autores hicieron valoraciones de posibles efectos antimicrobianos de extractos acuosos u alcohólicos de ciertas plantas

(FRISBEY et al, 1954, Mc CLEARY y WALKINGTON, 1964).

Mc CLEARY y WALKINGTON además de estudiar el posible efecto del pH en el desarrollo de las bacterias en los medios de cultivo, determinaron el efecto antimicrobiano de extractos de 115 especies de Cactáceas sobre 21 diferentes cepas bacterianas, llegando a la conclusión de que los extractos de plantas de la familia Opuntiae eran los que poseían un efecto inhibitorio más marcado. Estos autores utilizaban para sus experimentos extractos de las hojas o palas de las plantas de Opuntia.

En el presente trabajo hemos demostrado que el pH idóneo para la mejor conservación del extracto es de 4.06. Las fracciones cromatográficas de los extractos tenían un pH medio de 5.22 para la 39-80 y de 5.03 para la 52-80. El crecimiento bacteriano no se vio afectado en los medios de cultivo a pH normal 7.2 ni a pH 5.2; a pH 4.06 algunas cepas si se vieron afectadas.

Este hecho nos indujo a realizar todas las pruebas posteriores en medios de cultivo a un pH de 5.2, al cual el extracto conservaba una gran estabilidad en el lapsus de tiempo requerido para las pruebas.

La recolección y selección de bacterias patógenas llevada a cabo paulatinamente durante el desarrollo del trabajo de Tesis, a partir de las muestras de exudados remitidos al laboratorio de Microbiología para su análisis e identificación, nos permitió disponer de un gran número de cepas

para desarrollar nuestro trabajo. Un total de 86 cepas de gérmenes fueron obtenidos de esta forma.

Los resultados que se describen en las Tablas XI, XII y XIII así como el cuadro resumen de la Tabla XIV muestran claramente el poder de inhibición del crecimiento bacteriano que tiene el extracto parcialmente purificado de la fracción 39-80, observándose un efecto más marcado sobre los gérmenes Gram (+).

Así mismo se realizaron pruebas para el estudio del posible sinergismo con antibióticos de espectro conocido: Ampicilina, Gentamicina y Cefalotina, cuyos resultados se exponen en las Tablas XV y XVI en las que puede observarse la ausencia de efecto sinérgico alguno.

Deseando confirmar estos resultados se obtuvieron cepas control de la American Type Culture Collection y se planificó el estudio de las CMI sobre los mismos para compararlos con los de las cepas de la colección particular conseguida por nosotros.

En la Tabla XVII se representa las CMI de la fracción 39-80, observándose que la concentración de extracto necesaria para producir inhibición del crecimiento es considerablemente alta. Al igual que el necesario para producir la inhibición sobre el crecimiento de las bacterias del primer grupo de la colección Tabla XVIII. Algo similar ocurrió con las cepas del

segundo grupo (Tabla XIX).

Estudios para establecer la CMB de las cepas control de la ATCC utilizando concentraciones de pigmento idénticas a las usadas para la determinación de la CMI Tabla XVII, nos dieron los resultados expuestos en la Tabla XX, donde puede apreciarse que en algunos casos (5 de 9) la CMI es igual a la CMB, sugiriéndonos que habría que utilizar concentraciones más altas de extracto en el medio. En el grupo de cepas tratadas con extracto 39-80 en concentraciones de 1.08 a 3.24 mg/ml se obtuvieron CMBs también variables Tabla XXI observándose que las CMI para algunas bacterias, era considerablemente inferior a la CMB (7 de 23).

Por no considerar una medida práctica el aumentar la dosis o concentración de extracto en el medio para aumentar su potencia, se abordó la idea de reducir, eliminándolos, el número de muestras que componían el extracto, ignorando aquellos que aparecían en una longitud de onda inferior. (Ver Gráfica N°13).

De esta forma se excluyeron las muestras 39-51 y con las restantes 52-80 se repitieron las pruebas de CMI. Con la finalidad de excluir factores inherentes al extracto que pudieran influenciar el efecto descrito, se utilizó como control una concentración igual de extracto que había sido expuesto a un proceso de degradación (se llevó a ebullición por el tiempo necesario hasta la pérdida total del color rojo) con lo que adquirió un color amarillento. Las

bacterianas estudiadas, se reproducían de forma normal en el medio.

Solo necesitamos una mirada para comparar los resultados de la Tabla XXIII con los de la Tabla XVIII para observar una gran diferencia entre los efectos de ambos extractos sobre las cepas del grupo 1º; el extracto de la fracción 52-80 es más potente que el de la fracción 39-80.

Con las CMI del segundo grupo de cepas de la colección particular de este trabajo ocurrió algo parecido. Comparar Tablas XXIV y XIX

En las Tablas XXV y XXVI se expresan comparativamente los resultados del efecto antimicrobiano de ambos extractos, lo que nos da a entender claramente, que la parte más activa se encuentra a la derecha del espectro de máxima absorción.

Los resultados descritos pueden también apreciarse claramente en la gráfica N°1.

Por último y con la única finalidad de evidenciar aún mas la mayor potencia y eficacia antimicrobiana del extracto fracción 52-80, se realizaron nuevos estudios sobre un grupo de bacterias mas reducidos: 10 cepas de Pseudomonas, 10 de E. coli, 10 de Staphylococcus y 10 de Gram (-) Enterobacterias.

Los resultados expresados en la Tabla XXVII y representados en las Gráficas 2, 3, 4 y 5 muestran claramente la diferencia en la eficacia entre ambas fracciones, la cual, siendo significativamente importante para todos los grupos, destaca la sensibilidad para los estafilococos (0.4 mg/ml y los gérmenes Gram(-) 0.654 mg/ml)

Por último, se expusieron al efecto antimicrobiano de fármacos de reconocido efecto y uso frecuente en terapéutica antibacteriana, para hacer una relación dosis efecto con las fracciones objeto de este trabajo.

Los resultados están plasmados en las Tablas XXIX, XXX, XXXI y XXXII, los referidos a los antibióticos Ciprofloxacina, Tetraciclina, Tobramicina y Ampicilina y los correspondientes a los extractos acuosos de las fracciones 39-80 y 52-80 en las Tablas XXXIII y XXXIV.

Del análisis estadístico de los resultados de esta última prueba se deduce que los extractos de ambas fracciones (39-80 y 52-80) son altamente significativos frente a las bacterias gram(+) frente a las Gram(-).

Los resultados expuestos demuestran de forma inequívoca la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii parcialmente purificado. También se demuestra que una mayor separación o selección de la porción del pigmento rojo-violáceo que aparece a la derecha del pico de máxima absorción del espectro a 535 nm, ejerce un efecto significativamente

mayor. Ello nos sugiere que, eliminando más fracciones a la izquierda o puede que a la derecha del pico de absorción máxima, podríamos disponer de un producto de una gran potencia antimicrobiana contra cierto número de gérmenes patógenos.

No podemos dejar de mencionar en esta discusión general, la posible relación existente entre la estructura química de la Betanina con otras de reconocido efecto terapéutico beneficioso para el hombre. A ello dedicamos una parte de este trabajo y ello debe justificarse.

La estructura química de la Betanina de la remolacha roja, de los frutos de Opuntia dillenii o de otros del género Centrospermae, por su origen y características especiales (grupo piridina, indol y amonio cuaternario) dentro de la molécula, podría tener estos efectos, hasta ahora desconocidos. Incluso otros que pueden constatarse fácilmente interrogando a residentes en la zona de donde fueron recogidos los frutos: preguntar para que son buenos los tunos indios (frutos de O. dillenii). Afirmamos que contestarían que son buenos para la "Ictericia" y ellos se los dan al enfermo icterico.

¿Por que no comparamos nosotros la estructura química de la Betanina con la de Trimetil-glicina y vemos si hay cierta similitud con la presencia en ambas del Nitrógeno con carga positiva y el COO- con la negativa?. Podríamos incluso, en este aspecto relacionarlo con el FLUMACENIL, antagonista de las benzodiazepinas y también útil en el

tratamiento del coma hepático.

Dejando al juicio del tribunal el considerar la relación de la estructura de la Betanina con otros fármacos antimicrobianos (Indolmicina, Cloranfenicol, Quinolonas, etc.), queremos recordar la posible actividad antivírica de este compuesto apuntado por PIATELLI quien basado en los estudios de TRONCHET (1968) y SOSNOVA (1990) atribuyeron a la Betanina un efecto antivírico. Considerando la relación de la estructura piridínica e indólica de la Betanina con los fármacos utilizados en la actualidad en el tratamiento y control del SIDA que describimos en el apartado 3-1.b.,podría explicarse este efecto.

Sin querer mezclar la discusión de los resultados con la proyección de esta revisión y estudio experimental de los efectos farmacológicos de la Betacianina de la O. dillenii casi puede llegarse al planteamiento de otro u otros trabajos de igual o superior envergadura e importancia.

Nuestro mayor deseo sería llegar a:

- 1- Purificar al máximo el pigmento (extracto) con el que se han realizado estos trabajos.**
- 2- Comprobar que a mayor pureza mayor efecto antibacteriano.**
- 3- Ampliar el ámbito del estudio antibacteriano.**
- 4- Probar su posible efecto antivírico.**

Por otra parte también sería grato para nosotros que se hicieran investigaciones sobre otros efectos: Recordemos que es un derivado de la DOPA, y que esta sustancia esta repartida por todo nuestro organismo y sobre todo en el S.N.C.

Si bien es cierto que hay productos naturales muy tóxicos, también lo es que la relación dosis/eficacia puede ser altamente favorable, y en este caso, el extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii resultando ser eficaz, esta exento prácticamente de toxicidad, puesto que se le considera un fruto alimentario.

CONCLUSIONES.-

1- El extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii, es un extracto rico en Betacianinas como se desprende de su estudio espectrofotométrico.

2- Las condiciones de estabilidad óptimas para su correcta manipulación son: pH = 4.06 , T^a = 4°C y oscuridad.

3- Las fracciones 39-80 y 52-80 del extracto acuoso de frutos de Opuntia dillenii tienen actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano.

4- La fracción 52-80 tiene un mayor poder inhibitorio del crecimiento bacteriano que la fracción 39-80.

5- El efecto inhibidor del extracto tanto de la fracción 39-80 como de la fracción 52-80 es significativamente mayor sobre los gérmenes Gram(+) que sobre los gérmenes Gram (-).

6- Entre las cepas Gram (+) estudiadas las que mostraron tener una mayor sensibilidad fueron en orden decreciente: *B. cereus*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Str. pyogenes* y *Str. faecalis*.

7- Entre los gérmenes Gram (-), las no enterobacterias muestran una mayor sensibilidad en conjunto que las enterobacterias.

8- Entre las no enterobacterias estudiadas las que mostraron tener una mayor sensibilidad fueron en orden decreciente: Pasteurella, Pseudomonas y A. calcoaceticus.

9- Entre las enterobacterias estudiadas las que mostraron tener una mayor sensibilidad fueron en orden decreciente: K. oxytoca, C. freundii, P. mirabilis, E. coli, Salmonella, M. morgani, E. sakazakii, K. pneumoniae, E. aerogens y E. cloacae.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

ANONIMO (1973). Beet color adds pure red to natural color spectrum. *Food Processing*, 34:24-25.

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

ALLINSON, A. y McWHIRTER, K. (1959). Two unifactorial characters for which man is polymorphic. *Nature (London)* 178:748. Citado por FORRAY, Gy. (1968). Betaninuria in childhood. *Acta Paediatrica Academic Scientiarum Hungariae* 9(1):43-51.

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 betanine 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 oxygen. *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.

AURSTAD, K. y DAHLE, H.K. (1973). The effects of heat treatment, UV and gamma radiation on some beet root pigments. *Z. Lebensm-Unters, Forsch.* 151:171. Citado por KOPELMAN, I. (1977). Color stability of beet powders. *J. Food Process and Preservation* 1:217-224.

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

BIDDINGTON, N.L. y THOMAS, T.H. (1977). *Physiol. Plant.* 40:312-314. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-575.

BIRCH, A. J. (1963). Biosynthetic pathways. En: *Chemical Plant Taxo-*

nomy, 6:141-163. Edit. T. Swain, Academic Press.

BISCHOFF, H. (1876). Inaugural Dissertation, University of Tübingen. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-575.

BLATTNER, R., CLASSEN, H.G., DEHNERT, H., DÖRING, H.J. (1978). Experiments on isolated smooth preparations. Edit. HSE, Alemania Federal.

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.

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

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

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

CATHALA, J.; MARTROU, P. y GRAS, L. (1939). Sur le passage du pigment de la betterave rouge dans les urines. *Bull. Soc. Pediat. de Paris* 37:88. Citado por ZINDLER, A. (1950). Anthocyaninuria and beet allergy. *Annals of Allergy*, 8:603-617.

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 bélatines 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 biosynthese 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. Pflanzenphysiol. Bd.*, 85 (3):227-232.

COLOMAS, J., BARTHE, PH y BULARD, C. (1978). Separation and characterization of some betalains synthesized 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, 20º 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 and 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.

CONSTABEL, F. y NASSIF-MAKKI, H. (1971). *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 84:629-636. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-575.

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

DEL RIO, I.; FRESEN, P. y FERNANDEZ, L. (1990). Antimicrobial effect of an water extract of fruits from Opuntia Dillenii Haw (Cactaceae) on some gram(+) and gram (-) germs. Comunicación presentada en la 1. International conference on antimicrobial activity of non-antibiotics. Copenhagen, Dinamarca.

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

DOOP, H. y MUSSO, H. (1973). *Chem. Ber.* 106:3473-3482. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-575.

DREIDING, A.S. (1961). En: *Recent Developments 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.

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 phenylalanine hydroxylase 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). Catecholamine 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.

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

FINEGOLG, S.M., MARTIN, W.J. (1983). Determinación de la susceptibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos. En "Diagnóstico microbiológico". Ed. Panamericana. Buenos Aires pp 513-553.

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.

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.

FRENCH, C.J.; PECKET, R.C. y SMITH, H. (1974). *Phytochemistry* 13:1505-1511. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-575.

FRESEN, P.; DEL RIO, I. (1989). Actividad antibacteriana de un extracto acuoso del fruto de *Opuntia Dillenii* Haw. Comunicación a la XIV Reunión Nacional de Farmacología. Badajoz.

FRESEN, P.; DEL RIO, I.; FERNANDEZ, L.; LORO, J.F.(1990). Comparative antimicrobial effect of Betanine rich sephadex fractions from fruits of *Opuntia Dillenii* Haw. (Cactaceae). Comunicación al 1. International conference on antimicrobial activity of non-antibiotics. Copenhagen, Dinamarca

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.

GARAY, A.S. y TOWERS, G.H.N. (1966). *Can. J. Bot.* 44:231- 236. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-575.

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

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.

GERTZ, O. (1906). Dissertation, University of Lund. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-575.

GJERSTAD, G. (1971). Naturally occurring hallucinogens.II. *Quart. J.*

Crude Drug Res., 11:1797. Citado por BRUHN (1975).

GRUTERS *et al*; (1987). Nature: 330: 74

HALLE, M. (1938). Passage du pigment de la betterave rouge dans l'urine de l'enfant. Bull. Soc. Pediat. de Paris, **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.

HAVELAND-SMITH R. (1981). Evaluation of the genotoxicity of some natural food colours using bacterial assays. Mutation Res. **91**:285. Citado por SCHWARTZ, S. (1983). Inability of red beet betalain pigments to initiate or promote hepatocarcinogenesis. Food Chem. Toxic. **21**(5):531-535.

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.

HERMANN, K. y DREIDING, A.S. (1977). Helv. chim. acta **60**:673-683. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. The Biochemistry of Plants **7**:557-575.

HESS, A.F. y MYERS, V.C. (1919). Carotinemia. A new clinical picture. J.A.M.A. **73**:1743. Citado por ZINDLER, A. (1950). Anthocyaninuria and beet allergy. Annals of Allergy, **8**:603617.

HORHAMMER, L.; WAGNER, H. y FRITZSCHE, W. (1964). Zur Biosynthese der Betacyane I. Biochem. Z. **339**:398-400. Citado por NILSSON, T. (1970). Lantbrukshögskolans annaler, **36**:179- 219.

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.

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

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

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

KOHLER, K. (1970). Phytochemistry 11:127-131. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. The Biochemistry of Plants 7:557-575.

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.

LEE, C.Y. y SMITH, N.L. (1978). Polyphenol oxidase activity in table beets. Presented at the 38th Annual Meeting of Institute of Food Technologists, Dallas. Citado por SAGUY, I. (1979). Thermostability of red beet pigments (betanine and vulgaxanthine-I): influence of pH and temperature. *Journal of Food Science* 44:1554-1555.

LEMPKA, A. y KRAUZE, A. (1970). Separation of pigments of the red beet on polyamide columns. *Chem. Abstr. Biochemical Methods*, 75:126379.

LEWIS Y ELVIN LEWIS, (1977). *Medical Botany*. Pags.184, 285, 399

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 of canning beets. *Univ. Wis. Res. Bull*, 218:1-16.

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.

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. (1966). The betacyanins and betaxanthins. En: *Comparative Phytochemistry*. Ed. Swain, Academic Press, 14:231-243.

MABRY, T.J. y DREIDING, A.S. (1968) The betalains. *Recent Advances in Phytochemistry*, 1:145-160. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants*, 7:557-575.

MABRY, T.J. (1970). En: *Chemistry of the Alkaloids*. Ed. T. Swain, pág. 231. Academic Press, N.Y. 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.

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.

MARIN, A.; ESEVERRI, J.L. y BOTEY, J. (1985). Conservantes en patología alérgica. En: Aditivos y patología alérgica. Jornada Internacional de clausura curso 1984-85 de la Sociedad Catalana de Alergia e Inmunología Clínica. Edit. J. Botey y J.M^a Calzada, Barcelona, 9:121.

MATHESON, A. (1936). Anthocyaninuria. *American Journal of diseases of children*, 51:226.

MAZIN, V.; SHASHKOVA, L.S. y ANDREEV, L.N. (1976). Dokl. Akad. Nauk SSSR 231:506-509. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-575

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.

MUSSO, H. (1973). *Chimia* 27:659. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-574.

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.

NICOLA, G. (1975). Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-575.

NILSSON, T. (1970). Studies into the pigments in beetroot (Beta vulgaris L. ssp. vulgaris var. rubra L.). *Lantbrukshogskolans Annaler*, 36:179-219.

NOZAKI, M.; NAKAZAWA, T. y FUJASAWA, H. (1968). *Advan. Chem. Ser.* 77:242. 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.

OOTANI, S. y HAGIWARA, T. (1969). *Jpn. J. Genet.* 44:65-79. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-575.

PASCH, J.H., von ELBE, J.H. (1975). Betanine degradation as 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 ARBELAEZ, E. (1982). *Plantas útiles de Colombia*. Ed. Imprenta Nacional, Santa Fé de 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.

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*, 429-441.

PHARMACIA FINE CHEMICALS (1979). *Gel filtration: theory and practice*.

PIATTELLI, M. y MINALE, L. (1964). Pigments of Centrospermae-II. Distribution of betacyanins. *Phytochemistry*, 3:547- 557.

PIATTELLI, M., MINALE, L. y PROTA, G. (1964). Isolation, structure and absolute configuration of indicaxanthin. *Tetrahedron*, 20:2325-2329.

PIATTELLI, M. y MINALE, L. (1964). Pigments of Centrospermae-I. Betacyanins from *Phyllocactus Hkybridus Hort.* and *Opuntia ficus indica Mill.*. *Phytochemistry*, 3:307-311.

PIATTELLI, M., MINALE, L. y PROTA, G. (1965). Pigments of

Centrospermae-III. Betaxanthins from Beta vulgaris L. *Phytochemistry*, 4:121-125.

PIATTELLI, M., MINALE, L. y NICOLAUS, R.A. (1965). Pigments of Centrospermae-V. Betaxanthins from Mirabilis jalapa L. *Phytochemistry*, 4:817-823.

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. (1981). The betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants*, 7:557- 575.

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.

REUTER, H., SCHOLZ, H. (1977). *Journal of Physiology*, 264:49-62. Citado por KOHLHARDT, M. (1979) en *Drug Research*, 29(1):218-221.

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 Consti-*

tuentis. En: *Plant Phenolics*, 1:1-22. Edit. V. H. Heywood. Oliver y Boyd (Edinburg).

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 (Edimburg).

ROSLER, H., ROSLER, U., MABRY, T.J. y KAGAN, J. (1966). The flavonoid pigments of *Opuntia lindheimeri*. *Phytochemistry*, 5:189-192.

ROY, C. (1984). Interpretación de un antibiograma. *Enfermedades infecciosas*. 1:29-36

RUH, H. y GARVIN, J. Citado por FORRAY, GY. (1968). Betaninuria in childhood. *Acta Paediatrica Academiae Scientiarum Hung.* 9(1):43-51.

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.

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). Computer- aided prediction of beet pigment (betanin and vulgaxanthin I) retention during air-drying. *Journal. Computer-aided prediction of beet pigment (betanin and vulgaxanthin I) retention during air-drying. Journal of Food Science*, 45:230-235.

SAINT BLANQUAT, S. (1988). Colores alimentarios. En: *Aditivos y auxiliares de fabricación en las Industrias Agroalimentarias*. Edit. Acribia, Zaragoza, pág. 275-297.

SAITO, K. y KOMAMINE, A. (1976). *Eur. J. Biochem.* 68:237- 243. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-575.

SALDANHA, P.H., MAGALHAES, L.E. y HORTA, W.A. (1960). Race differences in the ability to excrete beetroot pigment (betanin). *Nature*, **187**:806.

SALDANHA, P.H., FORTA-PESSOA, O. y PEIXOTO, L. (1962). On the genetics of betanin excretion. *The Journal of heredity*, **53**:296-298.

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.

SCHMIDT, O.T. y SCHONLEBEN, W. (1957). *Z. Naturforsch., Teil B* **12**:262-263. Citado por PIATTELLI, M. The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants*, **7**:557-574.

SCHOENKNECHT, F.D., SABATH, L.D., THORNSBERRY, C. (1985). Susceptibility Tests : Special Tests. En "Manual of Clinical Microbiology". Lennette, E., Balows, A., Hausler, W., Shadomy, H. (Eds.) Amer. Soc. Microb. (Washington D.C.) pp 1000-1008

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. 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., 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. (1983). Identification of betanin degradation products. *Z. Lebensm Unters Forsch*, **176**:448-453.

SCHWARTZ, S.J. y Von ELBE, J.H. (1983). Inability 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.

SCIUTO, S.; ORIENTE, G.; PIATTELLI, M. y IMPELLIZZERI, G. (1974). *Phytochemistry* **13**:947-951. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants*, **7**:557-575.

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.

SOBOLEVA, G.A.; UL'YANOVA, M.S. y ZAKHAROVA, N.S. (1976). Betacyanine-decolorizing enzyme. *Biokhimiya* 41:968. Citado por **SAGUY, I. (1979).** Thermostability of red pigments (betanine and vulgaxanthin-I): influence of pH and temperature. *Journal of Food Science* 44:1554-1555.

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.

STOBART, A.K. y KINSMAN, L.T. (1977). *Phytochemistry* 16:1137-1142. Citado por **PIATTELLI, M. (1981).** The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-575.

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.

TIMBERLAKE, C.F. y BRIDLE, P. (1975). The anthocyanins. En: *The flavonoids*, 5:230. Ed. J.B. Harborne. Chapman and Hall (Londres).

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.

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., 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. y MAING, I.Y. (1973). Betalains as possible food colorants of meat substitutes. *Cereal Science Today*, **18** (9):263-317.

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., 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.

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. (1977). The betalaines. En: *Current aspects of Food Colorants*, pág. 29-39. Ed. T. E. Furia, CRC Press Inc., Cleveland.

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). Loss and regeneration of betacyanin pigments during processing of red beets. *Journal of Food Science*, **46** (6):1713- 1715.

WALKERS et al. (1987). *Proceeding of the Natural Academy of Science*. **84**: 8120.

WATSON, W. C., LUKE, R. G. e INALL, J. A. (1963). Beeturia: its incidence and a clue to its mechanism. *British Medical Journal*, **2**:971-973.

WATSON, W. C. (1964). The metabolism of betanin. *Biochemical Journal*, **90**:3.

WILCOX, M. E. , WYLER, H. y DREIDING, A. S. (1965). Stereochemie von betanidin und isobetanidin. *Helvetica Chimica Acta*, **45**(5):1134-1147.

Citado por NILSSON, T. (1970). Studies into the pigments in beetroot. *Annaler Lantbrukshögskolans*, 36:179-219.

WILKOWSKE, C. J., HERMANS, P. E. (1983). General principles of antimicrobial Therapy. *Mayo Clin. Proc.* 58:6-13.

WILLIAMS, K. W. (1972). Solute interactions in gel filtration. *Laboratory Practice*, 21:667-670.

WOHLPART, A. y BLACK, S.M. (1973). *Phytochemistry* 12:1325- 1329. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-575.

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. y DREIDING, A.S. (1961). Über betacyane, die stickstoffhaltigen Farbstoffe der Centrospermen. Vorläufige Mitteilung. *Experientia* 17:23-25. Citado por NILSSON, T. (1970). Studies into the pigments in beetroot. *Lantbrukshögskolans annaler* 36:179-219.

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.

WYLER, H.; ROSLER, H.; MERCIER, M. y DREIDING, A.S. (1967). *Helv. chim. acta*. 50:545-561. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Biochemistry of Plants* 7:557-575.

WYLER, H. y MEUER, V. (1979). On the biogenesis of betacyanins. Experiments with [2-14C] dopaxanthine. *Helvetica Chimica Acta*, 62(4): 1330-1339.

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.

YASUI, K. (1920). *Bot. Mag.* 34:55-65. Citado por PIATTELLI, M. (1981). The Betalains: structure, biosynthesis and chemical taxonomy. *The Bioche-*

mistry of Plants 77:557-575.

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.