
Universidad Central de Las Villas

Facultad Química y Farmacia

Departamento de Ciencias Farmacéuticas

***Estudio del extracto obtenido de tubérculos de *Dahlia*
“Elga” tipo *semicactus* familia *Asteráceae*, para su uso
como prebiótico***

**Tesis para optar por el título de máster en
Desarrollo de Medicamentos de Origen Natural**

Autora: Lic. María Magdalena Rodríguez Martínez

Tutores: Dr. José Orestes Guerra de León

Dra. Dulce María González Mosquera

2013

Bienaventurado el hombre que halla Sabiduría y el que obtiene entendimiento; porque su provecho es mayor que el de la plata, y su resultado es mejor que el oro fino.

Prov. 3: 13-14

AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi fortaleza y luz, Señor y Salvador de mi vida, por permitir que, en su tiempo, este trabajo llegara al día de ser presentado a quienes puedan sentir interés por él.

A muchos de mis compañeros de trabajo que me impulsaron cuando pensé no seguir. En especial a Aliuska, Daniellys, Yolandita por todo su apoyo. A Jeanette por dedicarme horas de su tiempo; a Jorge de la Torre por hacerme reír y enseñarme; a mi profesor de Orgánica Elio Soto por revisar tantas veces este estudio y darme buenos consejos. A mi buen amigo Omar Prieto quien también puso sus conocimientos en esta labor. A quienes contribuyeron en mi formación profesional; al colectivo de profesores de la maestría “Desarrollo de Medicamentos de Origen Natural”; a mis tutores por las indicaciones dadas. A mi vecina Liliana por facilitar la realización de los ensayos bilógicos.

A Dulce por su interés, sus recomendaciones, su inmensa ayuda, por ser paciente en todo momento y exigirme mucho más de lo que pensé.

A mi querida Irene porque nunca me ha defraudado y siempre me ha dado su apoyo incondicional.

A mis padres y demás familiares por ayudarme a alcanzar mis sueños; a mi eterna pequeña Ivis y sus dos tesoros, y a Isa por estar constantemente pendiente de todas mis cosas. A mi amiga Elizabeth por no dejar que la distancia empañe nuestra amistad y prestarme su valiosa ayuda en todo momento.

A mis hermanos en Cristo por ser perseverantes en sus oraciones para la presentación de este trabajo, en especial a Félix, Dayamí y Tatica por ocupar mi lugar cuando lo necesité, por escucharme y poner sus recursos a mi disposición.

A Beatriz por ser una de las hijas que no tuve y a Amalia, porque en medio de su gravedad entendí lo importante que son los alimentos prebióticos para la salud humana, sobre todo, la infantil.

DEDICATORIA

A todos los niños, en especial a Anthony y Aaron, mis dos luceros. A Iselys y Adriana y a Amalia, mi primavera.

RESUMEN

La inulina es un fructooligosacárido con propiedades que permiten su uso como prebiótico. Se encuentra como sustancia de reserva en raíces, tubérculos y rizomas de ciertas plantas fanerógamas. Una de las especies que presenta concentraciones considerables de inulina es la *Dahlia*. En esta investigación se aisló y caracterizó el extracto rico en inulina obtenido de tubérculos de *Dahlia "Elga" tipo semicactus*, familia *Asteráceae*, empleando métodos espectroscópicos y cromatográficos. Se realizó la evaluación inhibidora de bacterias que afectan el intestino de cerdos pequeños y niños menores de 5 años, que causan enfermedades diarreicas. La evaluación cualitativa realizada permitió la detección de inulina en el extracto, presentando D-fructosa y D-glucosa en su composición y se comprobó que ejerce efecto inhibitor al desarrollo de enterobacterias patógenas al intestino de cerdos (*E. coli fimbriae 1*) e inhibe el crecimiento de *Salmonella D*, *Shigella D* y *Yersinia enterocolítica*, en cepas de control y cepas salvajes.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	8
I.- LA INULINA Y SUS PROPIEDADES	14
1.1.- Alimentos funcionales. Importancia.....	15
1.2.- Enterobacterias:.....	21
II.- ESTUDIO DEL EXTRACTO AISLADO DE TUBÉRCULOS DE <i>DAHLIA</i> “ <i>ELGA</i> ” TIPO <i>SEMICACTUS</i> , <i>ASTERÁCEAE</i>	29
2.1- Obtención de extracto.....	31
2.2.- Ensayos de identificación.....	32
2.3.- Hidrólisis de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de <i>Dahlia</i>	33
2.4.- Evaluación cromatográfica (CLAE y GC)	35
2.5.- Análisis espectroscópico (H ¹ RMN).....	35
2.6.- Ensayos biológicos con inulina patrón y extracto orgánico	35
III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
3.1. – Obtención de extracto.....	39
3.2.- Ensayos de identificación.....	39
3.3.- Hidrólisis de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de <i>Dahlia</i>	42
3.4.- Evaluación cromatográfica (CLAE y GC)	47
3.5.- Análisis espectroscópico (H ¹ RMN).....	51
3.6.- Ensayos biológicos con inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de <i>Dahlia</i>	52
CONCLUSIONES	54

RECOMENDACIONES	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS.....	66

INTRODUCCIÓN

Entre los intereses fundamentales de Cuba está mejorar la alimentación de la población y mantener la salud humana. Con vistas a lograrlo, se han creado criaderos de animales para consumo humano, entre ellos cerdos; y se realiza un trabajo preventivo encaminado a la desaparición de enfermedades diarreicas en humanos que se producen, sobre todo, en los meses de lluvia y excesivo calor.

Muchas veces, cuando los cerdos son separados de las madres a los pocos días de nacidos, sufren de algunas afecciones causadas por enterobacterias que provocan desnutrición, desorientación y diarrea severa que pueden causarles la muerte^{43, 49}. No llegan entonces a ser adultos y aprovechados en la alimentación humana, ni pueden ser sustitutos de los ejemplares que se usan para la reproducción. Esto constituye en Villa Clara y otras regiones de Cuba un problema que afecta, sobre todo, a la población que por tales razones no cuenta, frecuentemente, con productos cárnicos de este tipo para su alimentación.

Por otra parte, en los meses de lluvia, las enfermedades diarreicas en humanos tienen un ascenso notable debido a la contaminación de las aguas, mala manipulación de alimentos y el excesivo calor que permiten la proliferación de bacterias. La población infantil menor de 5 años es la más sensible a esta afección^{14, 26}. Aunque se reportan ascensos de enfermedades diarreicas en los infantes en los meses de verano, no es menos cierto que durante todo el año, a la sala de Gastroenterología del Hospital Infantil “José Luis Miranda” de Santa Clara-Villa Clara, llegan pacientes de pocos meses de vida aquejados por infecciones provocadas por bacterias patógenas al organismo. Estos niños pequeños no cuentan con un sistema gastrointestinal resistente al ataque de enterobacterias por no haberse producido en ellos el desarrollo de bacterias benéficas a la salud; algunos no han sido amamantados por sus madres durante los primeros cuatro meses de vida, otros recibieron la leche materna solo unos días después de su nacimiento.

A nivel mundial muchos son los países que se enfrentan a esta situación, encontrándose en estudios clínicos que estos desórdenes digestivos son provocados, habitualmente, por bacterias enteropatógenas que atacan el tracto digestivo y se transmiten fácilmente de persona a persona^{1,26}. Entre los tipos de bacterias que causan enfermedades por diarrea en humanos se encuentran Salmonella, Shigella, Yersinia, Escherichia coli entre otras^{52,54,58}. Los cerdos neonatos se ven afectados, fundamentalmente, por *E. coli fimbriaes* y toxinas, siendo el primer tipo causante de la diarrea que puede provocar la muerte en estos animales⁴³.

La existencia de los agentes patógenos ha llevado a realizar estudios que permiten encontrar vías para prevenir la colonización de las bacterias patógenas al organismo e incrementar el crecimiento de aquellas que benefician la flora intestinal. De este modo se ha llegado a establecer la necesidad de emplear alimentos funcionales^{3, 16, 20, 27}. Dentro del término alimentos funcionales encontramos los probióticos que son alimentos comunes que contienen microorganismos vivos que, ingeridos, proporcionan efectos beneficiosos a nuestro organismo^{3, 21,50}. Los más comunes y conocidos son los que se incluyen en los productos lácteos, donde se añaden bacterias como los lactobacilos (*lactobacillus*), las bífidobacterias (*bifidobacterium*). Entre los más usados se encuentra el yogur²¹. También los alimentos funcionales incluyen a los prebióticos. Éstos son ingredientes que no se transforman en el proceso de digestión y afectan beneficiosamente al organismo mediante la estimulación del crecimiento y/o actividad de una o varias cepas de bacterias en el colon, mejorando la salud. Estructuralmente, los prebióticos son oligosacáridos entre los que se encuentran los galactooligosacáridos, xilooligosacáridos y fructooligosacáridos (FOS)^{21,40,46}. Entre los prebióticos de amplio uso se encuentran galactosacáridos, lactulosa, lactilol, inulina y FOS. La inulina y los FOS obtenidos de su hidrólisis son los más usados en Europa, por encontrarse en un amplio grupo de vegetales y frutas como raíz de espárrago, de yacón, bulbo de puerro, banano, entre otros^{15, 45, 61}. Se estima que la ingestión diaria de FOS a partir de alimentos es muy baja (806 miligramos al día). Considerando que la cantidad de bífidobacterias benéficas puede incrementarse desde 20 a 71%, con una

cantidad de 5 a 8 gramos por día de inulina, por un período de 2 semanas^{40, 48}, se ha recomendado aumentar su consumo introduciéndolos en los alimentos como ingredientes añadidos.

La Inulina, al igual que el resto de los oligosacáridos, es resistente a la hidrólisis de los enzimas digestivos, llegando intacta al colon, donde es fermentada por la microbiota intestinal, sobre todo bífidobacterias, estimulando el crecimiento de las mismas, conociéndose este proceso como efecto prebiótico. Las fibras de inulina, al ser fermentadas por las bífidobacterias, aumentan la concentración de las mismas y disminuyen o inhiben la colonización de las enterobacterias a nivel de la flora intestinal^{15,16, 20, 24, 40}.

Entre las principales fuentes de inulina se encuentran el Topinambu (*Helianthus tuberosus*), la Achicoria (*Cichorium intybus*), Cebolla (*Allium cepa* L) y la raíz de *Dahlia* (*Dahlia spp.*)^{4, 29, 38}.

La *Dahlia* es una especie originaria de los bosques templados del Sur y Centro de México, es la flor nacional de México y se reproduce por bulbos, fue llevada por los españoles a España y de allí a otros países del mundo. Las mayores concentraciones de inulina se encuentran en los tubérculos de esta planta, semejantes a las papas, pero con aspecto áspero al tacto⁴. En Cuba no existen especies puras de *Dahlia*s, sino híbridos que crecen en jardines, fundamentalmente destinados a la comercialización de las flores en el mercado regional.

Se han reportado trabajos donde se refiere el empleo de inulina obtenida de achicoria, yacón y especies puras de *Dahlia*s, pero no de *Dahlia*s híbridas, para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas al intestino humano y de cerdos que causan diarrea, observándose además, el mejor desarrollo de bífidobacterias^{2, 4, 29, 38}.

Hasta el momento no se han realizado estudios de obtención de este producto en especies híbridas de *Dahlia*s para valorar su posible acción sobre enterobacterias que provocan desórdenes digestivos, tanto en animales como en humanos. Por tal motivo

se realiza el siguiente trabajo de investigación, con el fin de estudiar extractos obtenidos de *Dahlia* "Elga" tipo *semicactus* familia *Asteráceae*.

Problema Científico:

✚ ¿Cómo comprobar la presencia de Inulina con actividad prebiótica, mediante caracterización químico-física y biológica, en tubérculos de *Dahlia* que crece en la región central de Cuba?

Hipótesis:

✚ Se puede demostrar la existencia de inulina con actividad prebiótica, en tubérculos de *Dahlia* híbrido que crece en la región central de Cuba, con el empleo de métodos espectroscópicos, cromatográficos y ensayos bacteriológicos.

Para dar respuesta al problema planteado, se proponen los siguientes objetivos:

Objetivo General:

✚ Estudiar el producto obtenido de tubérculos de *Dahlia "Elga"* tipo *semicactus* familia *Asteráceae* que crece en la región central de Cuba, para su empleo como prebiótico.

Objetivos específicos:

✚ Caracterizar el producto obtenido de los tubérculos de *Dahlia "Elga"* tipo *semicactus* por métodos químico-físicos.

✚ Sintetizar los derivados de los monómeros que forman la inulina presente en el extracto de tubérculos *Dahlia "Elga"* tipo *semicactus*.

✚ Caracterizar, por métodos químico-físicos, los derivados de los monómeros que componen la inulina.

✚ Evaluar la acción inhibidora del extracto rico en inulina, mediante ensayos con cepas de control y cepas salvajes de enterobacterias, para comprobar sus potencialidades como prebiótico.

I.- LA INULINA Y SUS PROPIEDADES

1.1.- Alimentos funcionales. Importancia.

Los alimentos funcionales son ingredientes que se añaden a diferentes preparados alimenticios y comidas. Éstos favorecen la nutrición básica a los organismos animales y humanos y son, además, promotores de la salud mediante mecanismos no previstos a través de la nutrición convencional. El efecto de los mismos se reduce entonces, precisamente, a mantener una buena salud y no a curar dolencias.

Los alimentos funcionales se dividen en dos grupos: probióticos y prebióticos. En la actualidad se define internacionalmente como probióticos a microorganismos o bacterias no patógenas que tienen la propiedad de regular el funcionamiento intestinal, combatir algunos tipos de alergia, prevenir la gripe y reforzar el sistema inmunológico de personas que se encuentran expuestas a altos consumos de calorías^{3,21,27,37,46,50}. Este tipo de alimento estimula la multiplicación de bacterias que no provocan daños al organismo y, simultáneamente, permite que no proliferen las que son potencialmente perjudiciales, asegurando el reforzamiento de mecanismos de defensa naturales de los hospederos.

Los prebióticos son también de suma importancia al ser alimentos no digeribles que estimulan, selectivamente, el desarrollo de las bifidobacterias no patógenas al organismo e impiden el desarrollo de enterobacterias, garantizando de este modo beneficios adicionales a la salud^{3,9,27,40}. Entre los prebióticos se incluyen ampliamente algunos oligosacáridos, especialmente fructooligosacáridos (FOS), entre ellos la Inulina. Los FOS son estructuras poliméricas de mediana masa molecular (5000 D) formados, principalmente, por unidades de D-fructosa; están presentes en muchos alimentos vegetales como el puerro, la cebolla, el espárrago, el ajo, tomates etc.^{5, 24, 36}.

Los FOS no son absorbidos en el tracto intestinal superior, pudiendo penetrar en el intestino grueso sin haber sufrido apenas transformaciones, siendo fermentados por bacterias anaerobias del colon. La fermentación a este nivel les permite, entre otros efectos, elevar la producción de ácido láctico, ácidos grasos de cadenas cortas y

gases, lo que provoca una disminución del pH del medio y estimula el desarrollo de células del epitelio del colon que inhiben el crecimiento de enterobacterias como *Escherichi coli*, *Shigella* y *Salmonella*²⁴.

Se han reportado estudios que demuestran el efecto prebiótico de la inulina por mejorar el balance de la microbiota, incrementando las bifidobacterias. Éstas ejercen un efecto muy positivo en la salud ya que mejoran la absorción del calcio, magnesio y fósforo, y colaborar activamente en la síntesis de vitaminas del complejo B y de la vitamina K^{24, 36, 48}. También impiden el crecimiento de bacterias dañinas, estimulando el desarrollo del intestino delgado y reduciendo el olor de las heces. Además, se ha comprobado que reduce la concentración de lípidos en sangre, tiene propiedades antitumorales, de regulación hormonal y estimulación inmunológica^{16,33}. Al fermentarse la inulina en el colon se incrementa la producción de ácidos grasos y lactatos, disminuyendo significativamente el pH del contenido del colon, lo que permite prevenir la carcinogénesis^{20, 24, 48}.

❖ Propiedades de la Inulina:

La Inulina y sus derivados se emplean, en gran variedad, en la industria alimenticia como espesantes, emulsificantes, gelificantes, sustitutos de azúcares y de grasas, humectantes y depresores del punto de congelación^{16,17, 23, 45}. Los principales efectos de las fibras de inulina sobre el sistema digestivo son:

- regulación de la duración del tránsito intestinal
- disminución de la tasa de glucemia
- disminución del contenido de lípidos en la sangre
- disminución del fenómeno de estreñimiento.

La inulina tiene, además, efectos beneficiosos sobre el metabolismo de los lípidos y efectos profilácticos y terapéuticos, como por ejemplo sobre la génesis y desarrollo del

cáncer de mama; se usa como materia prima en la fabricación de derivados químicos y para medir el índice de filtración glomerular (GFR) ^{2, 24, 33}. También, entre otros beneficios de la inulina se encuentran la prevención y tratamiento de enfermedades tales como:

- Diarrea. Por inhibir el crecimiento de diversos microorganismos patógenos o dañinos.
- Estreñimiento y exceso de gases. Por favorecer el equilibrio de la flora intestinal, mejorar el tránsito digestivo y la distensión asociada a exceso de gases.
- Riesgo cardiovascular y diabetes. Regula el tránsito digestivo por lo que contribuye a reducir los niveles de colesterol y triglicéridos, y mejorar el control de la glucemia.
- Estabiliza y mejora enfermedades que afectan al intestino como colitis ulcerosa - en particular por el consumo excesivo de probióticos ^{24, 33}.

Aunque el consumo de inulina en la dieta no trae consigo alteraciones toxicológicas, dosis masivas de la misma pueden provocar episodios de diarrea⁵⁰.

La inulina es la reserva energética en más de 36 000 especies de plantas, fue aislada por primera vez de la especie *Inula helenium*, en 1804 por un científico alemán de apellido Rose. En 1818 el científico británico Thompson le da su actual nombre. Es un polvo blanco mate parecido al almidón, posee un sabor neutral suave, es moderadamente soluble en agua en la que forma un gel cremoso, tiene gran capacidad para reemplazar las grasas. En su forma natural está formada por unidades de fructosa enlazadas entre sí por uniones β (2→1), y una glucosa terminal, en muchos casos. Su peso molecular es del orden de 5.000 Dalton y éste depende de la longitud de la cadena, que es del orden de 37 unidades de D-fructosa con una D-glucosa terminal en caso de que la presente ^{44,45}.

En la hidrólisis total de este fructooligosacárido se forman entre 87 y 94% de fructosa y 3 y 6% de glucosa. La inulina es utilizada en la obtención de fructosa y en la síntesis

de la sacarosa por vía química^{45, 48}. Se emplea, además, en la obtención de etanol, acetona, butanol y otros disolventes.

Tiene propiedades como agente quelante y anti incrustante por lo que se emplea en la industria química y de procesamiento para evitar costras en tuberías, contenedores, cámaras de reacción y separación y otros equipos^{34,45, 48}. Muchos autores coinciden también en las propiedades prebióticas de la misma, al no ser fermentada por los enzimas digestivos durante el proceso de digestión de humanos y animales; llega apreciablemente intacta al colon, permitiendo la fermentación selectiva por bífidobacterias que se desarrollan a expensas de este proceso fermentativo^{44,45,48}. El hecho de que sea fermentada en el intestino grueso permite su uso en la alimentación de animales domésticos al disminuir el olor de las heces fecales.

❖ Métodos de extracción de inulina:

Existen diferentes métodos de extracción de inulina que se basan en procesos de difusión, en los que las ralladuras de los tubérculos o raíces de la planta, ya sea de achicoria, topinambo o especies puras de *Dahlia*s, se someten a un proceso de decocción entre 60-75°C por varios minutos, con agitación mecánica y control del pH entre 6 y 7. Posteriormente se procede a la clarificación y concentración del licor hasta estado sólido.

Otros métodos de extracción incluyen la siembra de cristales de inulina enfriando a temperaturas de hasta 1°C por más de 10 horas, para obtener inulina cristalina^{4, 38}.

Son empleados, también, procesos en que se separa la inulina de glucosa, fructosa y sacarosa presentes en algunos extractos, por técnicas de cromatografía de columna de intercambio iónico, que contienen un catión con una solución estable de inulina y se eluye con agua a 65-75°C, obteniéndose, por este método una inulina con grado de polimerización (GP) alrededor de 10^{17, 19,29}.

Otra vía utilizada consiste en la precipitación fraccionada de inulina desde una disolución acuosa por disminución gradual de su solubilidad en la disolución, mediante la adición de un alcohol¹⁷.

Para la preparación de inulina con un elevado GP se emplean técnicas de cristalización fraccionada clásicas. Una solución de inulina polidispersa acuosa se enfría gradualmente de 40 a 10 °C. Este no es un método económicamente atractivo por lo laborioso y difícil¹⁷.

Desde el punto de vista industrial el método de difusión empleado se realiza a 72-76°C, con pH 5,4-5,8. La clarificación se realiza con carbón activado, se filtra y evapora secándose por pulverización el sirope resultante, obteniéndose un 85% de rendimiento de inulina de calidad estándar³⁸.

Las técnicas para el aislamiento de inulina a partir de raíces de achicoria comprenden la trituración o molienda de las mismas, o extracción de la inulina de las raíces cortadas en láminas o desmenuzadas recientemente, con agua caliente.^{17,38}

Existe un método económicamente favorable para la producción de inulina a escala industrial, con elevado GP. Este proceso comprende una cristalización dirigida de inulina, a partir de una solución acuosa meta estable de una inulina de partida, polidispersa, produciendo una suspensión de partículas de inulina cristalizadas que son aisladas por centrifugación o filtración. Los cristales se lavan con agua desmineralizada para separar las impurezas y se secan. Se obtiene así una inulina con GP de alrededor de 10 hasta alrededor de 70 con un rendimiento medio alrededor de 30 a 35%¹⁷.

De los métodos de obtención del FOS en estudio resulta mucho más sencillo y práctico el de difusión, a partir de ralladuras de las raíces de las especies empleadas, o de estas raíces trituradas finamente, controlando el pH de trabajo. El resto de los métodos descritos pueden resultar poco efectivos por incurrir en gastos que, lejos de

resolver un problema práctico, pudieran encarecer las posibilidades de mejorar la salud humana y animal empleando inulina como prebiótico.

❖ Caracterización de azúcares:

Para reconocer los grupos funcionales de los productos bajo estudio, es muy empleada la espectroscopía infrarroja, empleando pastillas de KBr para registrar los espectros. La comparación con patrones o con sustancias de estructuras semejantes, posibilita el análisis espectroscópico de estas sustancias.

Actualmente, los métodos cromatográficos son una herramienta imprescindible para la determinación rápida y específica de azúcares^{13,25,31,42}. Cuando se somete un oligosacárido a análisis, según sus características estructurales, se procede a la hidrólisis y posterior derivatización de sus productos o a la derivatización y posterior hidrólisis del oligosacárido derivatizado, en función del objetivo del análisis.

Es ampliamente empleada la cromatografía líquida de alta resolución (CLAE) con fase reversa (RP-18). Los detectores pueden ser varios, desde espectrómetro de masas hasta los ya menos empleados, UV-VIS. En caso de emplear el CLAE con fase reversa (RP-18) y detector UV-VIS, es necesario realizar una previa derivatización de los azúcares por reacción primaria. Se requiere de la presencia de grupos poco polares y que confieran color para lograr un aumento en la selectividad y sensibilidad del método. En el caso del análisis de monosacáridos, son fácilmente obtenibles e intensamente coloreados, derivados como las osazonas y fenilhidrazonas^{11, 13, 42}.

Otra importante herramienta para la determinación de estas sustancias orgánicas es la cromatografía gaseosa con detectores diferentes. El análisis de carbohidratos por cromatografía gaseosa tiene el inconveniente de que los mismos no son volátiles, haciéndose necesario obtener un derivado que reúna las características requeridas por el método cromatográfico^{28,31}. Las osazonas y fenilhidrazonas, que pueden emplearse en análisis por CLAE, al no ser volátiles dejan de ser efectivas en el desarrollo de esta técnica. Pueden, entonces, obtenerse otros derivados de

monosacáridos que reúnan los requisitos que exige la cromatografía gaseosa, entre los cuales se reportan los metil y acetyl derivados, las benzilidinas, etc. que resultan, según la literatura, de fácil obtención ^{25,28}.

También es empleada para la caracterización de las sustancias orgánicas, entre ellas los FOS, la espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-H') que fue desarrollada a finales de los años cuarenta para estudiar los núcleos atómicos. En 1951 los químicos descubrieron que este método podía ser utilizado para determinar las estructuras de los compuestos orgánicos. Cuando una muestra de un compuesto orgánico es irradiada, brevemente, por un pulso intenso de radiación, los núcleos son promovidos del estado de espín α al estado de espín β , al regresar a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias-intensidad, que es el llamado espectro de RMN. Las variaciones en las frecuencias de absorción de resonancia magnética nuclear, reciben el nombre de desplazamientos químicos (unidades δ ó ppm).

Como el desplazamiento químico de un protón está determinado por su entorno se han construido tablas con valores representativos que permiten asignar las señales protónicas a los compuestos orgánicos en estudio.

1.2- Enterobacterias:

El intestino humano y de cerdos, es constantemente afectado por microorganismos que habitan en el medio que nos rodea, evitando su función metabólica. Estos microorganismos provocan trastornos gastrointestinales, variación del pH, carcinogénesis, disminución de la capacidad de absorción del intestino y de proliferación de la flora intestinal benéfica^{1,26}. Dentro de la población, el sector más sensible a estas afecciones es el infantil menor a 5 años, por no contar con una flora intestinal y anticuerpos capaces de resistir y rechazar el ataque de estos microorganismos, entre los que se encuentran *Shigellas*; *Salmonellas*; *Escherichia coli*

hemorrágica y *Yersinia enterocolítica*^{52,54.,58}. Estas son bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, formadas por bacilos Gramnegativos no esporulados capaces de fermentar y provocar la oxidación de la glucosa. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, teniendo muchas de estas especies como hábitat el intestino humano y de los animales, otras son capaces de hospedarse en plantas o tener vida saprofítica. Las mismas pueden o no ser móviles mediante flagelos peritricos y son causantes de enfermedades relacionadas con infecciones entéricas o infecciones fuera del tracto intestinal.

Las *Escherichias coli*, entre ellas la *fimbriae 1*, son bacterias patógenas que se adhieren a los villus del intestino de los cerdos pequeños para colonizarse. Esto provoca trastornos en la absorción de alimentos nutritivos necesarios para un desarrollo y metabolismo sanos en los cerdos. La multiplicación de la *E. coli fimbriae 1*, provoca trastornos gastrointestinales que afectan la salud del animal ocasionando diarrea, pérdida de la estabilidad y el apetito, llegando a causar la muerte de algunos⁴³.

Una de las enterobacterias que más daño causa a la salud del hombre es la *Salmonella*. Estos microorganismos comenzaron a estudiarse desde 1880, siendo descritos diferentes serotipos dentro de este género. En la actualidad se plantea que el género *Salmonella* (figura 1) está integrado por una sola especie, *Salmonella entérica*, dentro de la que se encuentran diversos serotipos. La mayoría de las cepas de *Salmonella* que afectan al hombre pertenecen a la subespecie I que se divide en cinco serogrupos: A, B, C, D y E⁵².

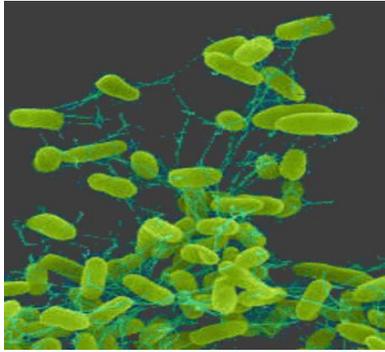


Fig.1. *Salmonella*

La *Salmonella* puede transmitirse por contacto directo o contaminación cruzada durante el proceso de manipulación y/o procesamiento de alimentos o en el hogar y también por vía sexual ⁵². Su nombre se debe al patólogo veterinario estadounidense Daniel Elmer Salmon, quien la descubriera en 1885, aislándola de cerdos con cólera; la misma habita, normalmente, en la superficie de los huevos, la piel de tomates y de frutos y en verduras que tienen contacto con la tierra ⁵³.

La *salmonellosis*, o infección por *Salmonella*, es una enfermedad que se trasmite por alimentos, especialmente los de origen animal. En escuelas, círculos infantiles o guarderías, restaurantes y residencias de ancianos se pueden presentar brotes de *salmonellosis*. El período de incubación es de entre 5 horas y 5 días, apareciendo diarreas y dolor abdominal. Un número elevado de esta bacteria es eliminado por las heces de la persona infestada; se observa fiebre entérica, con un período de incubación de 7 a 28 días, dolor de cabeza, dolor abdominal y diarrea, erupción máculo-papulosa en pecho y espalda. Los enfermos presentan un período de convalecencia entre 1 y 8 semanas ^{52,53}.

Otra enfermedad que puede ocasionar la *Salmonella* es la fiebre tifoidea ^{6,52}, habitualmente provocada por cepas de *Salmonella typhi*. La fiebre tifoidea se trasmite de persona a persona, por ser el hombre el único reservorio de esta bacteria ^{52,53}. También puede adquirirse, por infección con la bacteria, la fiebre paratifoidea que, aunque presenta ciertas similitudes con la fiebre tifoidea, tiene un curso más benigno.

Esta enfermedad es muy común en África; en Europa se presenta como una gastroenteritis severa y en el Extremo Oriente como una septicemia ⁵³.

Se calcula que en los Estados Unidos se presentan unos cinco millones de infecciones por este agente cada año, mientras en Europa se han notificado varias epidemias en los últimos años. En Cuba la *Salmonella* se notifica entre los dos agentes que con mayor frecuencia se encuentra en los estudios de brotes de diarrea, fundamentalmente en niños ⁵².

Shigella ssp. (figura 2) es el agente que provoca la disentería bacilar o *shigelosis*, una de las más frecuentes causas de diarrea. La bacteria fue analizada por primera vez en 1888 al ser estudiadas las heces fecales, el intestino grueso y los ganglios mesentéricos de un soldado que murió a causa de la *shigelosis*. El nombre de la misma se debe al científico japonés llamado Kijoshi Shega ^{57,58}.



Fig.2. *Shigella*

La infección por *Shigella* o *shigelosis* es causada por consumir alimentos o agua contaminada con la bacteria. La infestación puede producirse también de persona a persona por la ruta fecal-oral, cuando alguien infestado manipula los alimentos sin lavarse antes las manos, llevando restos de sus heces a ser ingeridas por otra persona ^{55,56,59,60}.

La infección por *Shigella* puede producir fiebre alta, pérdida de apetito, náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea que puede o no contener sangre o mucosidades,

pujos^{56,59}. La complicación que más se manifiesta es la deshidratación. Además se reportan algunos casos en que la *shigellosis* afecta el aparato digestivo provocando artritis, erupciones cutáneas, insuficiencia renal, convulsiones, rigidez de cuello, dolor de cabeza, letargo, confusión y alucinaciones^{55,56,59}. Los síntomas de infección pueden aparecer entre 1 y 7 días después de la exposición, pero suelen ocurrir durante los 2 o 3 días posteriores a la misma^{55,56}.

La *shigellosis* es una afección que aparece en todos los países del mundo, siendo más frecuente en aquellos donde las condiciones higiénicas no son buenas. El reservorio y hospedero natural de esta bacteria es el hombre.

Yersinia es un género de bacterias patógeno de animales (figura 3), que contaminan al ser humano ocasionando la aparición de enfermedades. El género *Yersinia* incluye tres especies: *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolítica* y *Yersinia pseudotuberculosis*⁵⁴.

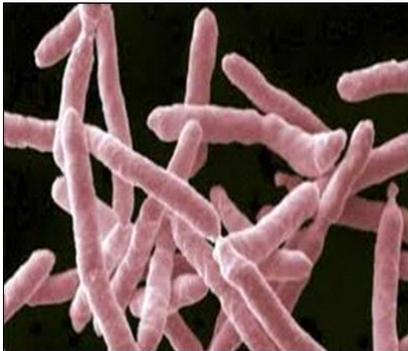


Fig.3. *Yersinia*

La *Yersinia enterocolítica* es una de las tres especies de este género, identificada como patógena para el hombre, que le causa, principalmente, una gastroenteritis. La *Yersinia pestis* es la responsable de la peste bubónica que mató, aproximadamente, a un 25% de la población europea en el siglo XIV. El nombre de esta bacteria es en memoria del bacteriólogo francés Alexandre Yersin quien, en 1894, describió por primera vez el organismo responsable de la peste bubónica⁵⁴.

La *Yersinia enterocolítica* es un representante de las *Enterobacteriaceae*. Se caracteriza por ser un bacilo asporógeno, corto, Gram-negativo, anaerobio facultativo, capaz de crecer dentro de una amplia escala de temperaturas, desde -1°C hasta +40°C; inmóvil a 37°C pero móvil por medio de flagelos peritricos a temperaturas inferiores a 30°C ⁵⁴.

El principal reservorio natural de las *Yersinias pestis* y *enterocolítica* son los roedores. Se puede encontrar también en animales domésticos y silvestres de sangre caliente, y en ocasiones en reptiles y peces. Los cerdos son importantes reservorios de los serotipos patógenos para el hombre ⁵⁴.

La *yersiniosis* es la enfermedad infecciosa causada por la *Yersinia enterocolítica*. Es una infección frecuente en niños y rara vez causa síntomas en adultos. En los niños puede causar fiebre, dolor abdominal y diarrea, a veces hemorrágica. Los primeros síntomas aparecen, generalmente, de 4 a 7 días después del contacto con la bacteria y pueden durar entre 1 y 3 semanas o más. En los adolescentes y los adultos pueden aparecer síntomas dolorosos que se asemejan a una apendicitis. Hay grupos minoritarios en los que pueden aparecer complicaciones como salpullidos, dolor en las articulaciones y, si llega a la sangre, puede ocasionar una bacteriemia ⁵⁴.

Las bacterias pueden ingerirse con alimentos contaminados, se instalan en el intestino delgado, particularmente en el íleon, provocando úlceras. También invaden los ganglios linfáticos del mesenterio produciendo un aumento exagerado del volumen lo que puede llevar a problemas de diagnóstico diferencial con cuadros de tumoración abdominal. No parece posible la transmisión de persona a persona de forma directa, pero sí indirectamente. La contaminación oral- fecal parece ser el mecanismo de infestación principal en ambas especies ⁵⁴.

Entre las cepas patógenas de *Escherichia coli* se destacan dos grandes grupos: las *fimbriaes* y las *toxinas*. Las primeras están asociadas a la colonización intestinal y extra intestinal, las segundas son las causantes de la hipersecreción electrolítica ⁴³.

Las cepas *E. coli* con *fimbriaes* son la mayor causa de diarrea neonatal, que pueden provocar, incluso, la muerte de cerditos, ya que estas estructuras son factores de colonización específicos, evento fundamental para que las cepas enteropatógenas (EPEC) y enterotóxicas (ETEC) de *E. coli*, causen este tipo de afección en cerdos neonatos. Esto es posible porque se adhieren a las células de la mucosa, permitiendo la colonización en el intestino delgado del huésped, con la posterior elaboración de enterotoxinas que estimulan la secreción de fluidos, con la producción de diarrea^{43, 51}.

Escherichia coli produce varias adhesinas fímbricas, entre las que se encuentran las fimbrias de tipo 1, que provocan el desequilibrio de los cerdos pequeños y son causa de desorientaciones neurológicas, pérdida de apetito y muertes por diarrea en estos animales⁴³.

De la revisión realizada se pudo constatar que el empleo de sustancias con potencialidades como prebióticos puede disminuir las afecciones diarreicas causadas por bacterias patógenas al intestino humano y/o porcino. Por tanto, aplicar algún método de extracción de inulina, de los reportados en la literatura, a híbridos de *Dahlia* que crecen en nuestros jardines puede resultar interesante, considerando además, que la única utilidad que se le da a las *Dahlías* es ornamental; sus tubérculos se desechan una vez envejecidos. El hecho de que quede demostrado que esta inulina presenta propiedades prebióticas como la de otras fuentes vegetales de las que se extrae a nivel mundial, puede constituir un resultado relevante, al tener medios para sustituir importaciones de alto beneficio para la salud humana y animal. Por último, consideramos que emplear métodos de caracterización de este FOS puede ser novedoso si se pudieran aplicar a otros oligosacáridos con los que se trabaja en el grupo de investigación de productos naturales.

De los procesos que se reportan en la literatura para extraer inulina de especies vegetales, el que menos inconvenientes prácticos trae, con el fin de aislar este producto, es el método de difusión. Éste se fundamenta en la decocción en agua de las especies vegetales secas y frescas, que permiten el paso del FOS al agua, para

ser tratado hasta llevarlo al estado sólido, en forma de polvo de color mate. Si bien otros métodos de extracción llevan a la obtención de una inulina mucho más pura y cristalina, el proceso suele encarecerse demasiado, lo que no es conveniente, desde el punto de vista económico, para el estudio que se intenta realizar con este trabajo^{4,17,38}.

**II.- ESTUDIO DEL EXTRACTO AISLADO DE
TUBÉRCULOS DE *DAHLIA* “*ELGA*” TIPO
*SEMICACTUS, ASTERÁCEAE***

Para determinar la existencia de inulina en los tubérculos de *Dahlia "Elga"* tipo *semicactus* familia *Asteráceae*, se seleccionó el método de difusión descrito en el capítulo anterior, realizando algunas modificaciones al mismo. Según el trabajo "*Inulin from tubers of Dahlia Imperialis Roets*", los tubérculos de *Dahlia* se lavan con agua y desinfectan con hipoclorito de sodio, el material crudo se reduce mezclándolo con el agua en una exprimidera de jugo mecánica. Se realiza una decocción a 65-70 °C durante 15-20 minutos. Se separa el sólido tosco filtrando. El licor obtenido del último paso se clarifica con la tierra de diatomeas. Para cristalizar la inulina, se agrega, el etanol de 96% despacio, al líquido clarificado. La inulina cristalizada se recupera por la filtración al vacío y se seca por liofilización.

La obtención y caracterización del producto aislado se realizó empleando los siguientes materiales, reactivos y equipos:

Reactivos:

Todos los disolventes y reactivos utilizados proceden de las firmas MERCK y BDH. La Inulina patrón fue Inulina patrón analítico (98%) Fluka.

Los disolventes de calidad técnica se destilaron y secaron antes de ser utilizados.

Equipamiento:

RMN Varian INOVA-600 equipado con una sonda z-gradiente de detección indirecta a campos altos

Espectrofotómetro "Rayleigh FTIR" WQF-510

Microplatina "Electro thermal Engineering LTD"

Espectrofotómetro "Spekoll 11"

Espectrofotómetro "GENESIS" V10

GC/MS GP5000 “Shymaksu”, columna DB-5 ms de 30m de largo y 0.25mm de diámetro interior.

Balanza Analítica “Sartorius BS124S”

Estufa “J.P.Selecta”

Rota Evaporador IKA-Werke” RV 05 Basic

Agitador mecánico IKA-Werke EURO-ST P CV S1

HPLC “CXTH” con detector UV-VIS, columna de octadecilsilano ODS 2 DAISO GEL ODS 2, a 25°C (20 cm x 0,46 mm de d.i y 18 -10 µm de diámetro de las partículas del relleno)

HPLC Pharmacia LKB con detector UV-VIS, columna Econocil C-18, a 25 °C (tamaño de partícula 5µ de diámetro, ID 4,6mm, largo 250mm)

Las Cepas de Control procedieron del Centro de Higiene y Epidemiología de Villa Clara.

Las Cepas Salvajes de enterobacterias se aislaron de patógenos intestinales de niños menores de cinco años, ingresados en el Hospital Pediátrico “José Luis Miranda”, de Santa Clara-Villa Clara-Cuba.

Los tubérculos de *Dahlia* “Elga” tipo *semicactus* familia *Asteráceae* se recolectaron en el Jardín de Flora y Fauna, de Villa Clara-Cuba.

2.1- Obtención de extracto

Los tubérculos frescos de *Dahlia* se lavaron y esterilizaron con hipoclorito de sodio y se rallaron. Una vez secos, se tomaron 39,4 gramos del material vegetal y se sometieron a un proceso de decocción con agua, durante 20 minutos, a una temperatura entre 65 y 70°C, agitando a 150 rpm. Se controló el pH entre 6-7. El licor

obtenido se filtró, clarificó con carbón activado y concentró. El sólido se recristalizó en etanol.

2.2.- Ensayos de identificación

- Ensayos de solubilidad de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia*

Se realizaron los ensayos de solubilidad al polvo obtenido, de forma comparativa con la inulina patrón, empleando los disolventes de clasificación establecidos para estos fines^{28,39}.

- Ensayos químicos a inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia*

I. Ensayo de Fehling

Se disolvieron en agua 0.05 gramos del extracto, se mezcló con 2 mL del reactivo de Fehling y se calentó por 5 minutos, en baño de agua. Se procedió de igual modo con inulina patrón. El ensayo es positivo si aparece coloración rojo ladrillo^{28, 39}.

II. Ensayo de formación de osazonas de inulina patrón y extracto

Se mezclaron 0,2 gramos de extracto con 0,2 gramos de clorhidrato de fenilhidracina, 0,3 gramos de acetato de sodio y 2 mL de agua destilada en un tubo de ensayos. Se tapó el tubo con tapón con agujeros y se colocó en baño de agua hirviendo por 30 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente luego de este tiempo. Se realizó igual procedimiento a la inulina patrón. El ensayo se considera positivo si aparece, al cabo de algunos minutos, un sólido de color amarillo-naranja^{7, 28, 39}.

- Preparación y análisis de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia* por espectroscopía infrarroja

Se mezcló 1 mg de extracto seco con KBr, a razón 1:100 (sustrato: KBr), se homogeneizó la mezcla y se preparó el comprimido. De igual modo se preparó la

muestra con Inulina patrón y se registró el espectro infrarrojo de ambas. La temperatura y la humedad en el local de trabajo se mantuvieron a 20°C y 30%, respectivamente.

2.3.- Hidrólisis de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia*

Se mezclaron 5.0 gramos de extracto e inulina patrón, respectivamente, con 75 mL de Etanol y 75 mL de HCl (2 M), se reflujo durante 3 horas.

- Preparación de derivados de los productos de hidrólisis de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia*

I. Formación de Osazonas

Se obtuvo la osazona de la D-fructosa (patrón), procediéndose de igual modo con los productos de hidrólisis de inulina patrón y del extracto, según el método empleado en el ensayo 2 (II). Se filtraron y lavaron los sólidos con agua y luego con etanol, se secaron y se les determinó la temperatura de fusión. Se realizó una evaluación cromatográfica por capa delgada (CCD) empleando placas de gel de sílice. La fase móvil fue una mezcla de tolueno: 1-butanol (50:50) y como disolvente del producto acetonitrilo: agua (60:40). El revelado de las placas se realizó con solución acuosa de ácido sulfúrico 10%. Se registró, además, el espectro IR de los sólidos.

II. Formación de 2,4-dinitrofenilhidrazonas

Se procedió a la obtención de 2,4-dinitrofenilhidrazonas a partir de patrones de D-glucosa y D-fructosa, y posteriormente a la obtención de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas de los productos de hidrólisis de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia* utilizando 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNFH).

Se sometió a reacción 1,2 gramos de hidrocloreto de 2,4-Dinitrofenilhidracina con 50 mL de ácido perclórico para obtener la 2,4-dinitrofenilhidracina. Se disolvieron 3 mL de 2, 4-DNFH en 6mL de agua destilada y se agitó con 1mL de solución etanólica 10-20%

del compuesto carbonílico. La 2,4-dinitrofenilhidrazona obtenida se filtró y recrystalizó en etanol. Para comprobar la formación del producto se siguió la reacción por CCD, empleando placas de gel de sílice. Las 2,4-dinitrofenilhidrazonas se disolvieron en una mezcla de acetonitrilo: agua a razón 60:40, como fase móvil se empleó una mezcla de n-butanol: tolueno, a razón 50:50. Se realizó el revelado de la placa de H₂SO₄ (10% en etanol)²⁸.

III. Formación de derivados acetilados (Procedimiento A)

- Se sometieron al proceso de acetilación la D-glucosa y D-fructosa patrones y posteriormente los productos de hidrólisis de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia*.

10 gramos del compuesto carbonílico se mezclaron con 6 gramos de acetato de sodio, ambos anhidros, se maceró y homogeneizó la mezcla y se añadió a 50 mL de anhídrido acético. La mezcla reaccionante se reflujo por espacio de una hora, en baño de agua, agitando cada cierto tiempo. La mezcla de reacción se vertió caliente sobre 400 mL de agua-hielo, agitándola y dejándolos en contacto durante 40 minutos, en este tiempo se formó un producto sólido. Éste se filtró a vacío, se lavó con pequeñas cantidades de agua fría, alcohol y éter dietílico y, 1 gramo del mismo se recrystalizó en agua caliente^{7,39}.

IV. Formación de derivados acetilados (Procedimiento B)

- Se procedió a obtener los derivados de la D-glucosa y D-fructosa patrones, posteriormente y de igual modo se procedió con los productos de hidrólisis de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia*.

Se disolvieron 100 mg de la muestra en 3 mL de piridina y 1,5 mL de anhídrido acético. Se calentó sobre plancha de calentamiento, a reflujo, durante 60 minutos. Se rotoevaporó la solución hasta obtenerse el producto en estado sólido^{7,39}.

2.4.- Evaluación cromatográfica (CLAE y GC)

Para el análisis de los productos de hidrólisis de inulina patrón y del extracto, se emplearon las osazonas y las 2,4-dinitrofenilhidrazonas como derivados. Se realizó el análisis con derivados de D-fructosa y D-glucosa patrones, determinándose la longitud de onda de trabajo¹¹.

Como fase móvil se empleó una mezcla de acetonitrilo: agua a razón 60:40, la velocidad de flujo fue de 1 mL/ min¹¹ en equipo HPLC.

El análisis de los productos de hidrólisis del sustrato o extracto e inulina patrón por cromatografía gaseosa, se realizó empleando los derivados acetilados obtenidos por las técnicas descritas (III y IV). Se empleó como disolvente el dimetilsulfóxido; se inyectó la muestra a 280°C, con una temperatura del horno de 290°C, para una velocidad de flujo de 1.5 mL/min. Como gas portador se usó He.

2.5.- Análisis espectroscópico (H'RMN)

Se registró el espectro H'RMN del extracto aislado de tubérculos de *Dahlia*, para lo cual se utilizó agua deuterada como disolvente.

2.6.- Ensayos biológicos con inulina patrón y extracto orgánico

Se disolvió la inulina patrón y el extracto orgánico en agua estéril y se inoculó, separadamente, en placas petri con agar nutriente, como medio de cultivo, y en tubos en forma vertical, con agar nutriente y agar papa. Se incubó a 37⁰C, observándose por el microscopio durante 24, 48 y 72 horas.

Se empleó inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia*, por separado, para los ensayos biológicos realizados:

✚ Ensayo de acción inhibidora a la adhesión de la *Escherichia coli fimbriae* 1, en los *villus* del yeyuno de cerdo

-
- El experimento se realizó en el laboratorio de microbiología del Instituto de Biotecnología de las Plantas, de Villa Clara. Se mezcló y dejó en contacto, por 30 minutos, 50 µL del cultivo de *villus* del yeyuno de cerdo con igual cantidad de cultivo de *Escherichia coli fimbriae* 1 y solución, al 50% en masa, de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia*^{30, 49,51}.

✚ Ensayo de acción inhibidora del crecimiento y desarrollo de bacterias enteropatógenas que afectan el intestino humano

Los ensayos se realizaron en el laboratorio de Microbiología de la ciudad de Santa Clara-Villa Clara-Cuba. Durante el mes de junio y primera mitad del de julio de 2010, de un total de 79 muestras de heces analizadas para determinar la causa de diarrea en niños ingresados, el 27.8% presentaba infestación por *Salmonellas*; 63.3% por *Shigellas*; el 2.5% estaban infestadas por *Yersinia enterocolítica* y el 1.3% por *Escherichia coli enterohemorrágica*. De un total de 179 muestras analizadas con el mismo fin, pero en los meses de enero, febrero y marzo de 2011, un 23.1% se encontraban infestadas por *Salmonellas*; 62.4% por *Shigellas*; 5.2% por *Yersinia enterocolítica* y 3.5% por *Escherichia coli enterohemorrágica*.

Se procedió a realizar el ensayo para la determinación de acción inhibidora de la inulina patrón y del extracto aislado de tubérculos de *Dahlia* a diferentes niveles de concentración [0; 5; 10; 15; 20; 25; 50; 100 y 150g/L] con cepas de control de *Salmonella C*, *Salmonella C₁*, *Salmonella D*; *Shigella A*, *Shigella C*, *Shigella D*; *Yersinia enterocolítica* y *Escherichia coli enterohemorrágica*.

Se realizó el proceso de incubación en solución salina (0.9%), a 37⁰ C durante 24 horas, añadiendo al medio fracciones de inulina patrón y extracto. Se llevó a cabo un pase para medios selectivos (*agar SS*) y medios diferenciales (*agar MacConkey*)⁵⁷. Los resultados se observaron en microscopio a las 48 horas.

Se llevó a cabo la evaluación de la acción inhibidora de la inulina patrón y extracto en cepas salvajes para las enterobacterias inhibidas en cepas de control. El análisis se

hizo por el método de coprocultivo incubándose, inicialmente, en solución salina a 37°C por 24 horas, y se añadió fracciones de inulina patrón y extracto a los niveles de concentración antes referidos.

Se realizó un pase (siembra en estrías) para medios selectivos -*agar SS*- y medios diferenciales -*agar MacConkey*- incubándose, una vez más, por 24 horas a 37°C.

El estudio se repitió hasta obtener resultados concluyentes en relación con la acción inhibidora del extracto en el metabolismo y desarrollo de estas bacterias.

III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez concluidos los procesos de caracterización del producto aislado de tubérculos de *Dahlia "Elga"* tipo *semicactus* familia Asteráceae, se procede a la discusión de los resultados de la investigación.

3.1. – Obtención de extracto

Como resultado del procesos extractivo se obtuvo un licor oscuro que después del tratamiento con carbón activado y concentrado por rotoevaporación, se convirtió en un polvo de color mate, después de recristalizado en etanol. El rendimiento resultó 10.52% (4,15 gramos), en relación a la masa seca de los tubérculos triturados. Este resultado lo consideramos aceptable en comparación con datos que aparecen reportados en la literatura. En estudios de extracción de inulina de otras especies vegetales como *Dahlia Imperialis Roets*⁴ y ajo¹², los rendimientos informados son de 13.75 y 5 % respectivamente, en relación a la masa seca del material vegetal. La cantidad de inulina en los vegetales, como pudo observarse en estos trabajos, es baja lo que hace que su precio aumente en el mercado mundial. Por ejemplo, como suplemento alimentario se comercializa en forma de cápsulas, en frascos de 60 cápsulas de 280mg, a un precio de 4190 USD. El kilogramo de inulina en polvo, extraída de achicoria, se comercializa a precios que oscilan entre 30 y 60 USD.

3.2.- Ensayos de identificación

- Ensayos de solubilidad de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia*

Se realizaron ensayos de solubilidad que se muestran en la tabla 1. Ambos no manifestaron cambios frente a Hidrógeno carbonato de sodio, corroborándose la no existencia de compuestos carboxílicos. En ácido sulfúrico concentrado se observó el comportamiento característico de los azúcares, oscurecimiento del contenido de los tubos de ensayos, debido a la deshidratación que sufren los mismos en este medio. La inulina patrón y el extracto orgánico resultaron poco solubles en disolventes apolares y

solubles en agua, en esta última, al aumentar la cantidad de sólido en la misma se formó una suspensión en ambos casos, propio de sustancias con grupos polares pero con masa molecular considerable. No se disolvieron en alcohol a temperatura ambiente y sí en caliente, siendo este el disolvente en que se recristalizó el extracto orgánico.

Tabla 1. Resultados de la solubilidad de inulina patrón y extracto en algunos disolventes

Disolvente	Inulina patrón	Extracto aislado de tubérculos de <i>Dahlia</i>
H ₂ SO ₄ (C)	+	+
NaHCO ₃ 10%	-	-
Éter	-	-
Etanol 70% (Δ)	+	+
Agua	+	+

- Ensayos químicos a inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia*

I. Ensayo de Fehling

El ensayo de Fehling resultó negativo para inulina patrón y extracto, al no formarse el precipitado rojo de óxido de cobre (I). Esto indica que no existen azúcares reductores libres en el extracto o, de existir, se encuentran en muy bajas concentraciones no siendo detectados por este ensayo.

II. Ensayo de formación de osazonas de inulina patrón y extracto

No se observó la formación de un sólido coloreado amarillo-naranja, característico de las osazonas de los carbohidratos. Este hecho reafirma lo concluido en el ensayo anterior, la ausencia o presencia en pequeñas concentraciones de azúcares reductores libres en el extracto que se estudia.

- Análisis de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia* por espectroscopía infrarroja

Se observó similitud entre los espectros infrarrojos de inulina patrón y extracto aislado.

En los mismos aparecen entre 3600 y 3000 cm^{-1} las bandas de vibración de valencia de grupos O-H presentes en la estructura de los componentes del fructooligosacárido (FOS). Se observaron las señales correspondientes a las vibraciones de valencia $C_{sp^3}\text{-H}$ a 2929 cm^{-1} y las señales de vibraciones de valencia C-C a 1032 cm^{-1} que se asocian a las conformaciones del anillo hemiacetálico. Se apreciaron, además, las señales de vibraciones de valencia C-O-C a 1150 cm^{-1} que se asignaron a los enlaces anoméricos; vibraciones de deformación C-H a 938 cm^{-1} asignadas a enlaces glicosídicos para anómeros β de las unidades del oligosacárido (Anexo 1). En el caso del extracto aislado, las señales son más anchas por tratarse del extracto de tubérculos brutos de *Dahlia*. Estos resultados se corresponden con otros trabajos que aparecen en la literatura. En el trabajo "*Inulin from tubers of Dahlia Imperialis Roets*"⁴, se reportan las señales de vibraciones de valencia de los OH en 3395 cm^{-1} , vibraciones de valencia $C_{sp^3}\text{-H}$ a 2925.33 cm^{-1} , vibraciones de valencia C-O-C a 1130 cm^{-1} y las vibraciones de deformación C-H a 934 cm^{-1} . También en el artículo: "*Extração e caracterização de carboidratos presentes no alho (Allium sativum L.): proposta de metodologia alternative.*"¹², se muestra el espectro IR de inulinas patrón y obtenida a partir del ajo, donde se observan las señales correspondientes a vibraciones de valencia de los grupos OH en 3600 y 3000 cm^{-1} , vibraciones de valencia C-O-C entre 1200 y 900 cm^{-1} , característica de carbohidratos, en 2950 a 2900 cm^{-1} la de $C_{sp^3}\text{-H}$, a 1639 cm^{-1} la C-O (Anexo 2). Como se aprecia, existen coincidencias significativas entre los espectros IR del extracto obtenido en esta

investigación y los obtenidos a partir de otras especies vegetales. Esto es indicativo de que el extracto en estudio presenta sustancias con los mismos grupos funcionales a las inulinas obtenidas a partir de *ajo (Allium sativum L.)* y de *Dahlia Imperialis Roets*

3.3.- Hidrólisis de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de Dahlia

Teniendo en cuenta lo reportado en la literatura^{7, 28} y para conocer los monómeros que conforman el extracto obtenido, se realizó la hidrólisis ácida del mismo, comparativamente con la hidrólisis de la inulina patrón. Una vez efectuada la hidrólisis se realizó el ensayo de Fehling que resultó esta vez positivo, al aparecer en el tubo de ensayos el precipitado de óxido de cobre (I). El ensayo confirma que las condiciones empleadas para el proceso de hidrólisis permitieron la ruptura de la unión glucosídica de los monómeros que se encontraban enlazados en el FOS. La presencia de azúcares reductores en el medio, permitieron la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} .

- Derivados de los productos de hidrólisis de inulina patrón y extracto orgánico

I. Formación de Osazonas

Se compararon las osazonas obtenidas de los productos de hidrólisis de inulina patrón y extracto obtenido, con la obtenida de D-fructosa patrón. Se trabajó solamente con la D-fructosa patrón por ser ésta epímero de la D-glucosa y formar, por tanto, la misma osazona (Figura 4).

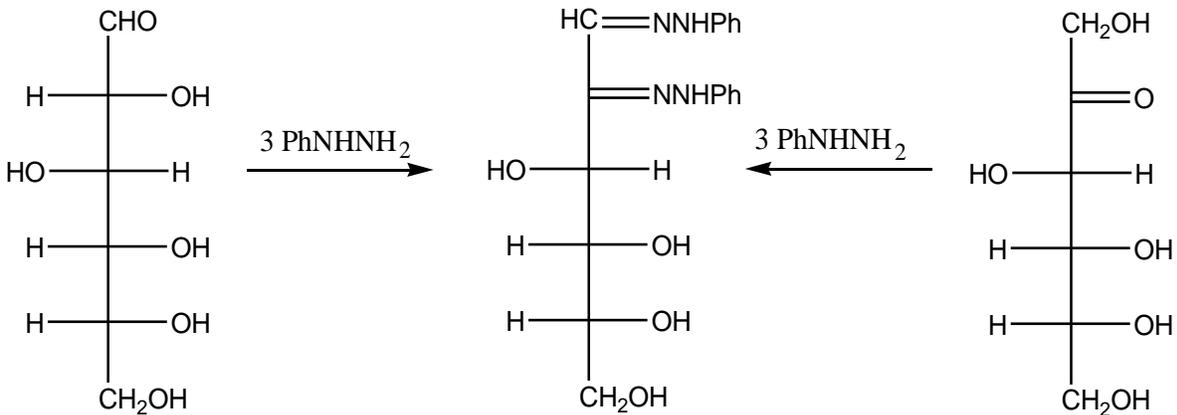


Figura 4. Estructura de los epímeros D-glucosa y D-fructosa y su fenilosazona

La temperatura de fusión de la osazona de los productos de hidrólisis de inulina patrón y extracto se compararon con la reportada en la literatura para la osazona de D-fructosa y D-glucosa (205⁰C). Se observaron valores similares entre ellas, 206⁰C para la osazona del producto de hidrólisis de inulina patrón y 206.5⁰C para la del producto de hidrólisis del extracto aislado. Se comparó el valor de los factores de retardo (Rf) de estos derivados en CCD, presentando la osazona de la D-fructosa Rf= 0.56, al igual que la del producto de hidrólisis de la inulina patrón. La osazona del producto de hidrólisis del extracto mostró Rf= 0.56, no existiendo diferencias en estos resultados (Tabla 2). La forma y color de las manchas en los tres casos es similar.

Tabla 2. Valores de Rf de las osazonas de los productos de hidrólisis y patrón

Osazona:	Rf
D-Fructosa patrón	0.56
Producto de hidrólisis de Inulina patrón	0.56
Producto de Hidrólisis de Extracto aislado de tubérculos de <i>Dahlia</i>	0.56

En los espectros infrarrojo registrados a las osazonas de los patrones y a las de los productos de hidrólisis de inulina patrón y extracto, aparecen señales asignadas a las vibraciones de valencia N-H a 3545 cm^{-1} ; la señal a 3464 cm^{-1} corresponde a vibraciones de valencia Ar-N. La señal registrada a 3307 cm^{-1} se asigna a los grupos OH. (Anexo 3)

También aparecen las señales correspondientes a las vibraciones de valencia $C_{sp^3}\text{-H}$ en 2904 cm^{-1} ; en 1601 cm^{-1} la asignada a C=C. La señal de vibraciones de deformación CH_2 se encuentra a 1495 cm^{-1} y en 746.3 y 687.4 cm^{-1} la señal correspondiente al anillo aromático monosustituído.

Se determinó, por espectrofotometría UV-VIS, la longitud de onda (λ) a que absorbe la osazona obtenida a partir del patrón de D-fructosa, para realizar el análisis por CLAE con detector UV. La máxima absorción se observa a una λ de 390nm (Anexo 4).

II. Formación de 2,4-dinitrofenilhidrazonas

Se obtuvieron las 2,4-dinitrofenilhidrazonas de D- glucosa y D-fructosa patrones y de los productos de hidrólisis de inulina patrón y extracto obtenido de tubérculos de *Dahlia*, a las que se le determinó la temperatura de fusión (Tabla 3).

Tabla 3. Temperaturas de fusión experimentales de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas

2,4-dinitrofenilhidrazona de	Tf (°C)
D-glucosa	186-187
D-fructosa	158-159
Producto hidrólisis Inulina patrón	170-172
Producto hidrólisis Extracto aislado de tubérculos de <i>Dahlia</i>	168-171

Como se observa en la tabla 3, existen diferencias entre las temperaturas a las que funden estos derivados de la D-glucosa y D-fructosa debido a la diferencia en la estructura de las mismas, (Figura 5). Las temperaturas de fusión de los productos de hidrólisis de inulina patrón y extracto tienen valores intermedios entre las de los patrones empleados, y la fusión ocurre en un intervalo de temperatura debido, seguramente, a la existencia de los derivados de ambos monosacáridos presentes en estos productos derivatizados y a otros productos de la hidrólisis, en menor proporción.

Se determinó, por espectrofotometría UV-VIS, la longitud de onda a que absorben las 2,4-dinitrofenilhidrazonas obtenidas a partir de los patrones de D-glucosa y D-fructosa, para realizar el análisis por CLAE con detector UV, empleándose para el análisis una longitud de onda de 390 nm. (Anexo-6)

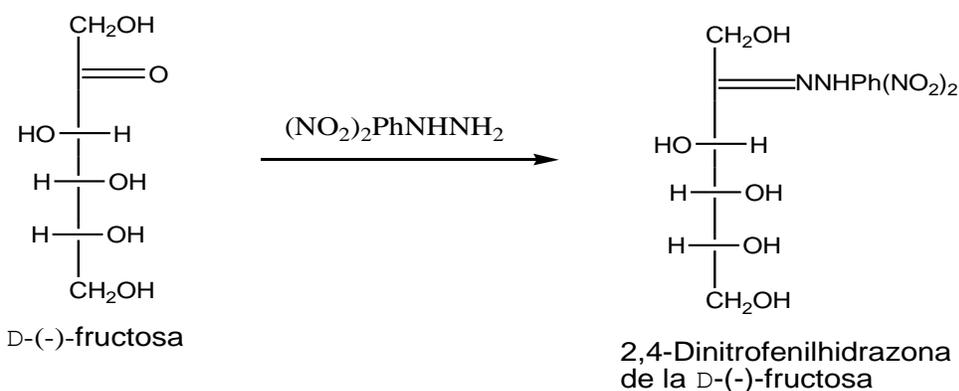
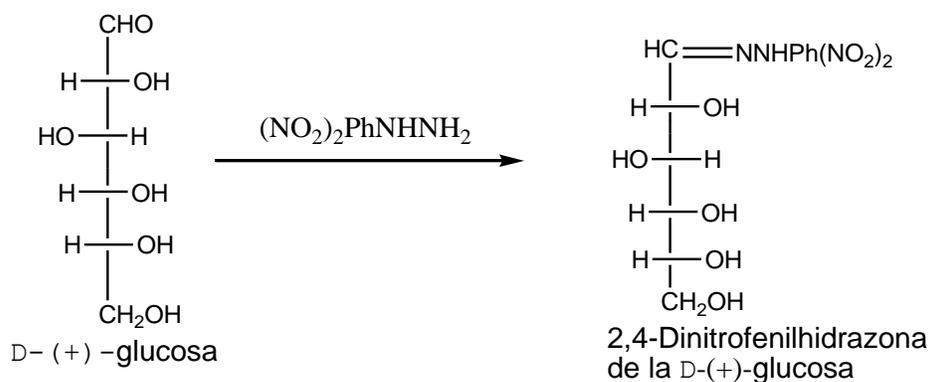


Figura 5. Estructuras de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas de la D-glucosa y de la D-fructosa

III. Formación de derivados acetilados (Procedimiento A)

Se obtuvieron los derivados acetilados de D-glucosa y D-fructosa patrones y, en iguales condiciones, los derivados acetilados de los productos de hidrólisis de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia*, empleando anhídrido acético y acetato de sodio anhidros, para la acetilación. Los sólidos obtenidos se recrystalizaron en agua.

IV. Formación de derivados acetilados (Procedimiento B)

La acetilación, empleando anhídrido acético y acetato de sodio anhidros, no arrojó resultados satisfactorios por lo que se obtuvo este tipo de compuesto empleando piridina y anhídrido acético. Los sólidos obtenidos se recrystalizaron en agua.

3.4.- Evaluación cromatográfica (CLAE y GC)

- Osazonas

Como se observa en el Anexo-5, en los cromatogramas se registran señales a tiempos de retención 3.865 minutos para la osazona de D-fructosa patrón, de 3.859 minutos para el derivado del producto de hidrólisis de inulina patrón y 3.863 minutos para la osazona del producto de hidrólisis del extracto que se estudia. No aparecen señales a otros tiempos de retención, lo que sugiere que en los productos de hidrólisis empleados para obtener este derivado, solo existe D-fructosa o D-fructosa y D-glucosa, que por ser epímeros forman la misma osazona. De existir ambos monosacáridos, el método no resulta selectivo para la diferenciación de los mismos, aunque pudiera emplearse para diferenciarlos de otros monosacáridos no epímeros, que no se encuentran en este extracto orgánico.

- 2,4-dinitrofenilhidrazonas

El análisis por CLAE con detector UV-VIS de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas obtenidas como derivados de D-fructosa y D-glucosa patrones y de los productos de hidrólisis de inulina patrón y extracto, muestra que los valores de los tiempos de retención (t_R) son cercanos. Como se observa en el Anexo 7, el tiempo de retención de la 2,4-dinitrofenilhidrazona de la D-fructosa patrón fue de 10.61 minutos, mientras que la 2,4-dinitrofenilhidrazona de la D-glucosa patrón tuvo un t_R de 10.633 minutos. La cercanía de estos tiempos de retención puede deberse a la escasa diferencia que existe entre las estructuras de ambos derivados, como se muestra en la figura 5.

Se realizó el análisis a una mezcla de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas de la D-glucosa y D-fructosa patrones. En el cromatograma se observó una señal ancha, con t_R de

10.627 minutos, valor intermedio en relación con los t_R de los derivados de los patrones por separado. En las condiciones en que se registró el cromatograma, no se logró diferenciar la señal del derivado de un monosacárido con respecto al otro.

Las señales de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas de los productos de hidrólisis de inulina patrón y extracto obtenido aparecieron como señales asimétricas con tiempos de retención de 10.643 y 10.667 minutos, respectivamente (Anexo-8). En el cromatograma de la 2,4-dinitrofenilhidrazona del producto de hidrólisis de la inulina patrón se observó una forma de la señal similar al observado en el caso de la D-fructosa. En el cromatograma de la 2,4-dinitrofenilhidrazona del producto de hidrólisis del extracto, la señal es más ancha, lo que puede deberse al hecho de que se trata de un extracto de un material vegetal en el que pueden existir impurezas o productos de descomposición que co-eluyan con los derivados empleados en el análisis, y/o productos que se obtuvieron durante el proceso de hidrólisis, en menor proporción. La no presencia de señales significativas a otros tiempos de retención, en el intervalo a que aparecen las muestras analizadas, correspondientes a 2,4-dinitrofenilhidrazonas de otros monosacáridos, nos indica la ausencia de los mismos en el extracto aislado de los tubérculos de *Dahlia*.

La derivatización de un azúcar conlleva a complicar el análisis en el sentido de que se puede degradar el producto obtenido o pueden aparecer sustancias colaterales que interfieran en las separaciones cromatográficas. Esta técnica no resultó favorable para determinar la composición real del FOS presente en el extracto, al menos en las condiciones seleccionadas para el trabajo, porque los derivados que se emplearon para el análisis no presentan diferencias significativas en sus estructuras, lo que implica que el detector UV no sea específico para su diferenciación. Es posible que esta técnica pueda ser empleada para diferenciar hexosas de pentosas u otros tipos de azúcares que presenten estructuras menos coincidentes.

- Derivados acetilados (Procedimiento A)

Al realizar el análisis de los productos por cromatografía gaseosa con espectrómetro de masas, se observó que el cromatograma del producto acetilado de la D-fructosa registra picos no definidos en su totalidad, lo cual pudiera deberse a que se ha degradado la fructosa en el proceso de derivatización; el tiempo de retención del pico mayor es de 6.85 minutos. Sin embargo el cromatograma gaseoso del producto acetilado de la D-glucosa muestra un pico más definido, con un tiempo de retención de 7.25 minutos (Anexo-9). El cromatograma del derivado acetilado del producto de hidrólisis del extracto aislado de tubérculos de *Dahlia* presenta más picos, por lo que suponemos que se encuentran eluyendo sustancias que pueden ser productos de degradación de alguno de los monosacáridos que componen el extracto. Los dos picos mayores aparecen a tiempos de retención de 7.15 y 6.7 minutos.

Los espectros de masas de los acetilderivados reflejaron la formación del pentaacetato de α -D-(+)-glucopiranososa (Anexo 10).

Los iones fragmentos, según la relación masa/carga (m/z), observados son 99 $C_6H_{11}O^+$, 44 CH_2CHO+H , CO_2 . Los fragmentos perdidos más comunes (M^+) son 18, de H_2O ; 31 de OCH_3 y/o CH_2OH y 43 de CH_3CO

No se observó la formación del derivado acetilado de la D-fructosa, sino la formación de 5-Acetoximetil-2-furaldehído (Anexo 10). Los iones fragmentos, según m/z se corresponden con CH_3CO^+ con m/z 43; C_6H_5+2H con m/z 79; 2-furaldehído con m/z 95, pero no aparecen los picos de m/z 29 del CHO^+ y 31, del $^+CH_2OH$, $^+OCH_3$. Los fragmentos perdidos son H_2O (18); CH_2O (30), pero no aparecen CHO (29), CH_3CO (43) y CH_3CH_2O (45). Este método de derivatización del patrón de D-fructosa y del producto de hidrólisis del extracto aislado de tubérculos de *Dahlia*, no resultó eficaz porque el espectro de masas obtenido del análisis por CROM-MASS, indica que la fructosa sufrió, en el proceso químico, una transformación al no obtenerse el derivado esperado.

- Derivados acetilados (Procedimiento B)

Al realizar el análisis de los productos acetilados se obtuvieron cromatogramas de mayor calidad, con picos más resueltos (Anexo 11). Los tiempos de retención a que aparece el derivado de la D-glucosa es de 7.25 minutos; de la D-fructosa de 7.0 minutos y el derivado del producto de hidrólisis del extracto aislado de tubérculos de *Dahlia* registra dos picos con tiempos de retención de 7.15 y 6.9 minutos.

Los espectros de masas de los derivados analizados mostraron iones fragmentos y fragmentos perdidos que coinciden totalmente con las estructuras propuestas para los pentaacetatos obtenidos (Anexo 12). En el caso del derivado de la D-glucosa, el pentaacetato de α -D- (+)-glucopiranososa, los iones fragmentos, según relación m/z son 99 ($C_6H_{11}O^+$); 44 (CH_2CHO+H , CO_2). Los fragmentos perdidos H_2O (18), CH_2O (30), CH_3CO (43).

Para el pentaacetato de β -D-(-)-fructopiranososa, derivado de la D-fructosa, los iones, según relación m/z: CHO^+ (29); $CH_2CO.OCH_3$ (73). Los fragmentos perdidos M^+ : H_2O (18), CO_2 (44), CH_3CH_2O (45).

El espectro de masas de los derivados acetilados del extracto aislado de tubérculos de *Dahlia* mostró similitud con el de los derivados de las sustancias patrones (Anexo 12).

El método de acetilación, con empleo de piridina como catalizador básico mejoró notablemente los resultados en el análisis, al obtenerse el cromatograma gaseoso del producto acetilado de la D-fructosa con más calidad. En el espectro de masas se confirmó la existencia de este monosacárido en el extracto obtenido de los tubérculos de la *Dahlia*, por lo que se recomienda esta técnica de derivatización para otros tipos de estudio en que se desee identificar azúcares.

3.5.- Análisis espectroscópico (H'RMN)

El espectro RMN protónico del extracto presentó un patrón característico de un fructooligosacárido y es, en gran medida, superponible con espectros reportados en la literatura (Anexo 13). Un análisis más profundo indica que la señal más desapantallada tiene apariencia de un singlete y aparece a δ 5,4 ppm, región característica de los protones anoméricos de los monosacáridos. La presencia de la misma es típica de una unidad de glucosa, específicamente el anómero α , pues de ser β la señal aparecería en forma de doblete con constante de acoplamiento entre 7 y 8 Hz, ya que en este caso el ángulo diedro entre H1 y H2 es de 180° , siendo J máxima. Esta señal confirma los resultados que se obtuvieron en el análisis por CROM-MASS en el que se concluye que en el extracto obtenido a partir de la especie de *Dahlia* en estudio, existe α -D-glucosa como monómero que forma parte del FOS presente en el mismo.

No aparecieron señales en la región de los Csp₂ por lo que descartamos la presencia de ácidos aldónicos u otra estructura de azúcares modificados.

En el espectro no se asignan señales a carbonos anoméricos de la fructosa por no existir en la estructura de la misma.

Entre 4,3 y 3,6 ppm apareció un grupo de señales que se asignan al resto de los protones del anillo de la fructosa, teniendo en cuenta la posición en que se encuentran y por el análisis comparativo con los espectros RMN-H' de los artículos "*Inulin Determination for Food Labeling*"³⁴ y "*Evaluación del efecto prebióticos del Aguamiel de Maguey (Agave salmiana) en Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*"³² (Anexo 14).

Entre 4,17 y 3,45 ppm se observó un grupo de señales que se asignan a los protones del anillo de la glucosa, considerando la posición en que aparecen y realizando el análisis comparativo con datos de la literatura^{32,34}.

3.6.- Ensayos biológicos con inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de Dahlia

Antes de realizar ensayos biológicos con estas muestras, se comprobó que las mismas no se encontraban contaminadas con microorganismos que falsearan los resultados. Se realizaron observaciones por el microscopio a los cultivos incubados a 37° C a las 24, 48 y 72 horas. No se observó la existencia de microorganismos por lo que se concluyó que la inulina patrón y el extracto que se obtuvo de tubérculos de *Dahlia*, se encontraban sin contaminantes que pudieran repercutir en el resultado de los estudios biológicos.

En todos los ensayos se empleó blancos de bacterias, inulina patrón y extracto para comprobar el efecto ejercido por las sustancias añadidas a los medios de crecimiento de los microorganismos y comparar, además, la acción del patrón empleado con la del extracto obtenido de los bulbos de la *Dahlia* usada como material vegetal.

✚ Acción inhibitoria a la adhesión de *E. coli fimbriae 1* a los *villus* del yeyuno de cerdos

La inulina patrón y el extracto resultaron positivos al ensayo. Se observó al microscopio que la bacteria no colonizó en las vellosidades del intestino de los cerdos, confiriéndosele al extracto la acción inhibitoria a la adhesión de la *E. coli fimbriae 1* los *villus* del yeyuno de cerdos.

✚ Acción inhibitoria en el crecimiento y desarrollo de bacterias enteropatógenas que afectan el intestino humano

A las cepas de control se les realizó el control de calidad incubándose en solución de NaCl (0.9%), a 37°C durante 24 horas. Esto se realizó para corroborar si las mismas estaban aptas para el estudio biológico. En el tiempo en que se mantuvieron incubadas, crecieron y se desarrollaron los microorganismos a los que posteriormente, y en otro ensayo, se adicionó niveles diferentes de concentración de inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia*, para valorar la acción inhibitoria de estas

sustancias en el crecimiento de enterobacterias que afectan el intestino de los humanos, especialmente de los niños. Los resultados se muestran en el Anexo 15. Resultaron inhibidas las cepas de control de *Salmonella D* y *Shigella D* para una concentración de 100g/L de inulina patrón y 150g/L de extracto, cada una; *Yersinia enterocolítica*, para una concentración de 50g/L de inulina patrón y 100g/L de extracto.

La evaluación de la acción inhibidora de la Inulina Patrón y el Extracto obtenido se realizó empleando cepas salvajes de aquellas enterobacterias que mostraron inhibición en el ensayo con cepas de control (Anexo 16). Las cepas salvajes de *Salmonella D* y *Shigella D* fueron inhibidas a concentraciones de 100g/L de inulina patrón y 150g/L de extracto, cada una. La inhibición de las cepas salvajes de *Yersinia enterocolítica* ocurrió con 50g/L de inulina patrón y 100g/L de extracto.

Se pudo comprobar que el sólido extraído inhibe el desarrollo o metabolismo de estas enterobacterias. Es sumamente importante este estudio en patógenos intestinales de niños pequeños que reciben lactancia materna artificial, ya que la mala manipulación de los alimentos es la causa fundamental de la infestación por las mismas, problema que podrá ser resuelto al emplear, en la alimentación, estas sustancias conocidas como alimentos añadidos.

CONCLUSIONES

-
- 1.- Se demostraron las semejanzas entre inulina patrón y extracto aislado de tubérculos de *Dahlia* mediante el empleo de espectrometría infrarroja y de técnicas cromatográficas de CLAE con detector UV y cromatografía gaseosa con detector de Espectrometría de Masa.
 - 2.- El análisis por CLAE con detector UV-VIS no resulta eficaz para la caracterización del extracto obtenido, por ser los derivados empleados muy semejantes estructuralmente, pero pudiera ser utilizado para la caracterización de otros azúcares.
 - 3.- Los mejores resultados en el análisis con el empleo de la cromatografía gaseosa con detector de masas, se obtuvieron utilizando piridina como catalizador básico, en la obtención de pentaacetato de D-fructosa, al no observarse transformaciones en el anillo del monómero.
 - 4.- El extracto aislado de tubérculos de *Dahlia* "Elga" tipo *semicactus* familia *Asteráceae* inhibe la adhesión de *E. coli fimbriae 1* en las vellosidades del yeyuno de cerdos.
 - 5.- El extracto aislado de tubérculos de *Dahlia* "Elga" tipo *semicactus* familia *Asteráceae* impide el crecimiento a cultivos con cepas de control de enterobacterias *Salmonella D*, *Shigella D* y *Yersinia enterocolítica*, no así el de *Salmonellas C* y *C₁*, *Shigellas A* y *C* y *E. Coli enterohemorrágica*.
 - 6.- El extracto aislado de tubérculos de *Dahlia* "Elga" tipo *semicactus* familia *Asteráceae* limita el desarrollo de enterobacterias *Salmonella D*, *Shigella D* y *Yersinia enterocolítica* en cepas salvajes.

RECOMENDACIONES

-
- 1.-Cambiar las condiciones cromatográficas en el análisis del extracto obtenido de la *Dahlia "Elga"* tipo *semicactus* familia *Asteráceae* por el método CLAE.
 - 2.-Determinar la concentración óptima de extracto obtenido a que se manifiesta el efecto inhibidor de desarrollo de las bacterias que afectan al sistema gastrointestinal.
 - 3.-Evaluar otras potencialidades biológicas del extracto aislado de tubérculos de *Dahlia "Elga"* tipo *semicactus* familia *Asteráceae*.
 - 4.-Seleccionar el mejor método para el análisis biológico (difusión o agar)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
1. Apao Díaz J., y col., Introducción a la Salud Pública. La Habana. Editorial Ciencias Médicas. Cuba, 2004
 2. Arango Bedoya O. y col., “Extracción, cristalización y caracterización de Inulina a partir de yacón (*Smallantus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) para su utilización en la Industria Alimentaria y Farmacéutica” Facultad de Ciencias Agropecuarias. 6 (2): 15-20, 2008
 3. Benedes S.V., Curso de Naturopatía Capítulo 10: “Alimentos especiales, prebióticos, probióticos y antioxidantes” 2004 www.mailxmail.com consultado en noviembre, 2008
 4. Bernal B. y col., “Inulin from tubers of *Dahlia Imperialis* Roets” Rev. Col. Cienc. Quim. Farm. 34 (2): 122-125, 2005
 5. Biedrzycka E., y col., “Prebiotic effectiveness of fructans of different degrees of polymerization” Trends in Food Science and Technology. 15: 170-175, 2004
 6. Bravo Pérez R., y col., “Presentación de un caso atípico de fiebre tifoidea”. Rev. Cub. Med. Mil. 54-57 ene.-mar., 2002
 7. Breswter R. Curso Práctico de Química Orgánica, Editorial Pueblo y Educación, Cuba, 1986
 8. Burdock G, Carabin I, Giffiths J, “The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries”. Journal of Toxicology. 221: 17-27, 2006
 9. Cabré Gelada E., “Probióticos y prebióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal”. Nutrición Clínica y Medicina. III (1) : 31-39, 2009

-
10. Caballero Repullo J. L., Moyano Cañete E., "Cromatografía de filtración en gel". Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus universitario de rabanales. 13 :1-7 2009 www.uco.es consultado en marzo, 2009
 11. Casas Cardoso L., Fajardo García R., "Determinación de azúcares reductores en miel final por Cromatografía Líquida de Alta Resolución". Revista Centro Azúcar. p-6, 2001
 12. Dalonso N. y col., "Extraction and characterization of carbohydrates present in the garlic (*Allium sativum* L.): proposal of alternative methods". Ciencia y Tecnología de Alimentos. 29 (4): 793-797, 2009
 13. Díaz H. F., "Determinación de sacarosa, glucosa y fructosa en jugo de caña de azúcar por HPLC". Revista Industrial y Agrícola de Tucumán. 69 (1-2): 87-92, 1992
 14. Doyle M., Ruoff K., Weinberg W., "Reducción de la transmisión de agentes infecciosos en el hogar". Lácteos, Alimentos y Saneamiento Ambiental. 20 : 330-337, 2000
 15. Flickinger E., Van Loo J., Fahey G., "Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diet of domesticated animals". Foods Science and Nutrition. 43: 19-60, 2003
 16. Gibson G., "Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and Inulin". Journal of Nutrition. 126: 1438S-1440S, 1999
 17. Gómez- Ayala R. y col., "Extracción de la Inulina y azúcares del Agave con métodos químicos". RESPYN Revista de Salud Pública y Nutrición. Edición Especial (1), 2004

-
18. Gómez- Ayala R. y col., "Aprovechamiento integral del *Agave americana* L. México". RESPYN Revista de Salud Pública y Nutrición. 3 (2), 2008
 19. González-González L.R., García Martínez I., Pérez Bedolla R., Cruz K., "Obtención de azúcares fermentables a partir de inulinas inmovilizadas por el método de sol-gel. Revista Ciencia y Tecnología. 6: 4-6, 2007
 20. Guarner F., "Studies with Inulin-Type Fructans on Intestinal infections, Permeability, and Inflammation" Journal of Nutrition. 137: 2568S-2571S, 2007
 21. Isay Saad S.M., "Probióticos e prebióticos: o estado da arte". Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 42 (1) Jan./mar., 2006
 22. Johansen F.R. "Toxicological profile of carboxymethyl inulin. Food and Chemical Toxicology. 41 (1): 49-50, 2003
 23. Kip P., Meyer D., Jellema R., "Inulin improve sensoric and textural properties of low-fat yogurts. International Dairy Bull Federation. 16:1098-1103, 2005
 24. Kolida S., Gibson G., "Prebiotic Capacity of Inulin-type Fructans". Journal of Nutrition. 137: 2503S-2506S, 2007
 25. Lamari Fotini N.R., Karamanosak Nikos K., "Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis". Journal of Chromatography B 793: 15–36, 2003
 26. Llop Hernández A. y col., Microbiología y Parasitología Médicas, Tomo I. La Habana. Editorial Ciencias Médicas. Cuba, 2001

-
27. Molina Montes M.E., Martin Islán A., “La fibra dietética procesada como alimento funcional”. *Ámbito Farmacéutico. Nutrición.* 26 (1): 70-77, 2007
 28. Pasto Daniel J., Johnson Carl R., “Determinación de estructuras Orgánicas” Editorial-país, 1986
 29. Paucar M.V., “Obtención de inulina por hidrólisis del zumo de *smallanthus sonchifolius* yacón) para la prevención de diabetes”. Universidad Nacional del Centro del Perú Facultad de Ingeniería Química, 2008
 30. Pietro A., Luceri C., y col., “Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethaneinduced colon carcinogenesis in rats”. *Carcinogenesis.* 23: 1953-1960, 2002
 31. Prosky L., Hoebregs H., “Methods to determinate food inulin and oligofructose”. *Journal of Nutrition.* 129 : 1418-1423, 1999
 32. Ramírez Higuera A., “Evaluación del efecto prebióticos del Aguamiel de Maguey (*Agave salmiana*) en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*”. Tesis de Maestría. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del IPN, México, 2009
 33. Rao A.V., “Dose-response effects of inulin and oligofructose on intestinal bifidogenesis effects”. *Journal of Nutrition.* 126: 1443S-1445S, 1999
 34. Ravenscroft N. y col., “Inulin Determination for Food Labeling”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 57: 3995-4003, 2009
 35. Roberfroid M., “Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients”. *Journal of Nutrition.* 137: 2493S-2502S, 2007

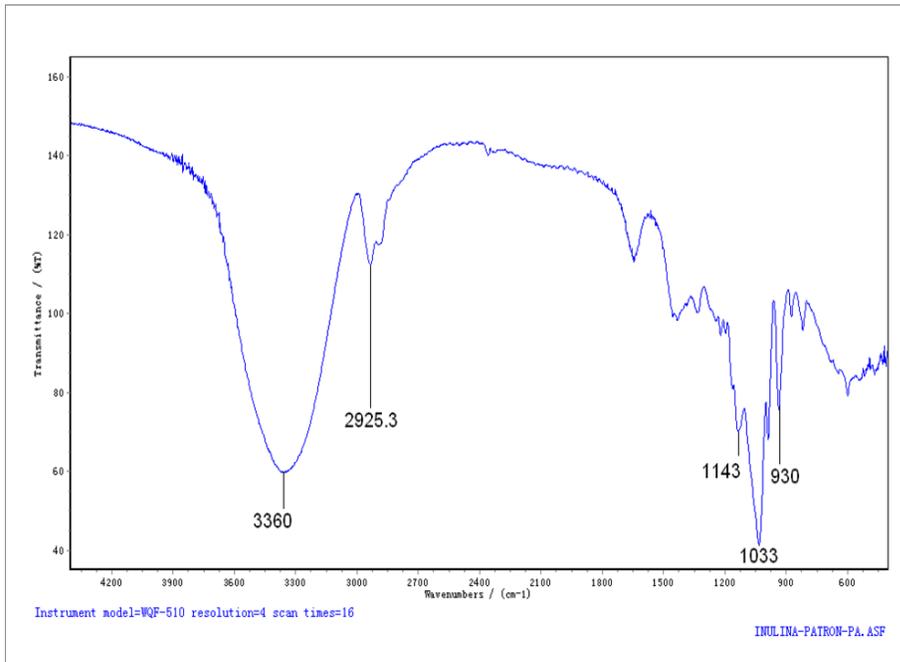
-
36. Sangronis E.y Madrigal L., “La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales”. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 57 (4): 12 , 2007
37. Silveira M., Monereo S., Molina B., “Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos? Revista Española Salud Pública. 77: 317-331, 2006
38. Smits G., Leen D.L., “Proceso para la fabricación de inulina de achicoria. OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS. 23, 2004
39. Suárez J.Q., “ Métodos de Análisis en la Química Orgánica” Universidad Central de Las Villas Cuba, 1986
40. Van Loo JA. “Prebiotics Promote Good Health: The basis, the Potential, and the Emerging Evidence”. Journal of Clinical Gastroenterology. 38: 70-75, 2004.
41. Villalobos A.C.,”Perspectivas Agroindustriales actuales de los Oligofructosacáridos (FOS)”. Agronomía Mesoamericana. 17 (002): 265-286, 2006
42. Youlva X.Y., y col., “Separation and quantification of component monosaccharides of the tea polysaccharides from Gynostemma pentaphyllum by HPLC with indirect UV detection”. Food Chemistry. 112 : 742–746, 2009
43. Zamora J. y col., “Cepas de Escherichia coli enteroadhesivas aisladas de cerdos. Propiedades hemolíticas y determinación serológica de fímbricas”. Archivos de Medicina Veterinaria, XXVIII (2) 1996 Instituto de microbiología. Facultad de ciencias. Universidad Austral de Chile, casilla 567. Valdivia. Chile
44. <http://www.wikipedia.com> Inulina consultado en enero 2009
45. <http://www.elrincondelvago.com> Inulina y propiedades enero 2009

-
46. <http://revista.consumer.es/web/es/alimentacion/aprenderacomerbien/enfermedad/2009/07/03/34960.p> ¿Qué son y qué propiedades tienen los alimentos prebióticos y probióticos?
 47. <http://revista.consumer.es/web/es/20060701/alimentacion> Alimentos prebióticos y probióticos: ¿Realmente son necesarios?
 48. <http://inulinadeagave.blogspot.com/2008/08/blog-post.html> Inulina de Agave, fibra soluble prebiótica
 49. Handbook of microbiology 2007 Isolation and store of the *villus*.
 50. <http://www.drrondonpediatra.com/probioticos.htm/2009/07/03.p> Los prebióticos, probióticos y el sistema inmune
 51. <http://www.monografias.com/E.coli/adhesion/2010/12/15>. S.A. Opciones para el bloqueo de la adhesión fimbrial de *Escherichia coli*: empleo de extractos de plantas
 52. <http://www.WhoNamedIt.com/Salmonella/2010/12/18>
 53. <http://www.google.es/#q=salmonella+A+&hl=es&biw=1362&bih=581&sa=2&fp=7926544d0fcfd6a6>
 54. <http://es.wikipedia.org/wiki/Yersinia>. *Yersinia* consultado en noviembre 2010
 55. <http://www.medterms.com/script/main/art.asp?articlekey=6322> ¿Qué es la shigellosis? consultado en diciembre 2010
 56. http://kidshealth.org/parent/en_espanol/infecciones/shigella_esp.html *Shigellosis* consultado en diciembre 2010

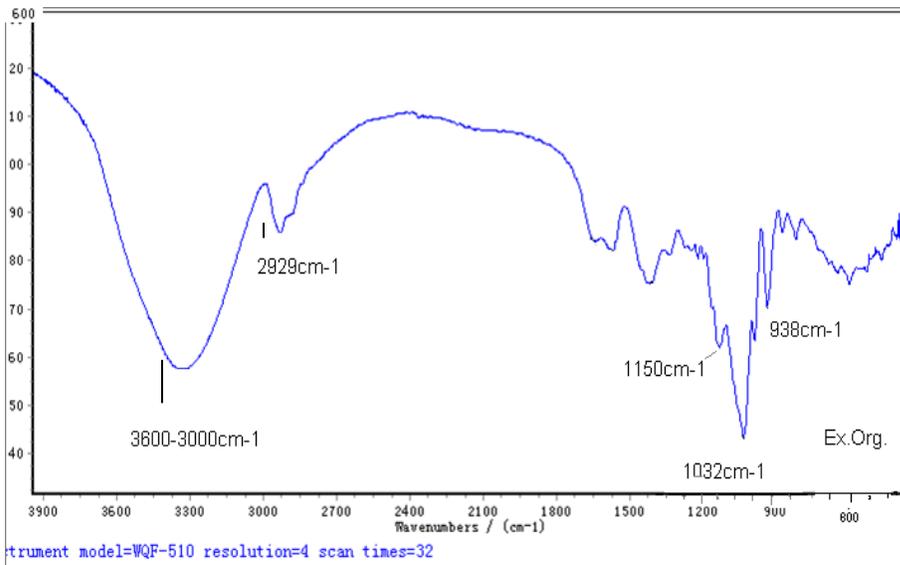
-
57. <http://universitas.usal.es/web/fundacion/universitas/es/sistemas/microacua/demo1/shigella.html> Aislamiento e identificación de *Shigella* consultado en diciembre 2010
 58. <http://www.mayoclinic.com/health/shigella/DS00719> *Shigella* consultado en diciembre 2010
 59. http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/shigellosis_t.htm Hoja de Datos Técnicos de los Centros para el Control de Enfermedades *Shigella* (2006) consultado en diciembre 2010
 60. <http://www.pritzkerlaw.com/shigella/> ¿Qué es la shigellosis? Consultado en diciembre de 2010
 61. http://www.tuotromedico.com/temas/alimentos_prebioticos.htm/2010

ANEXOS

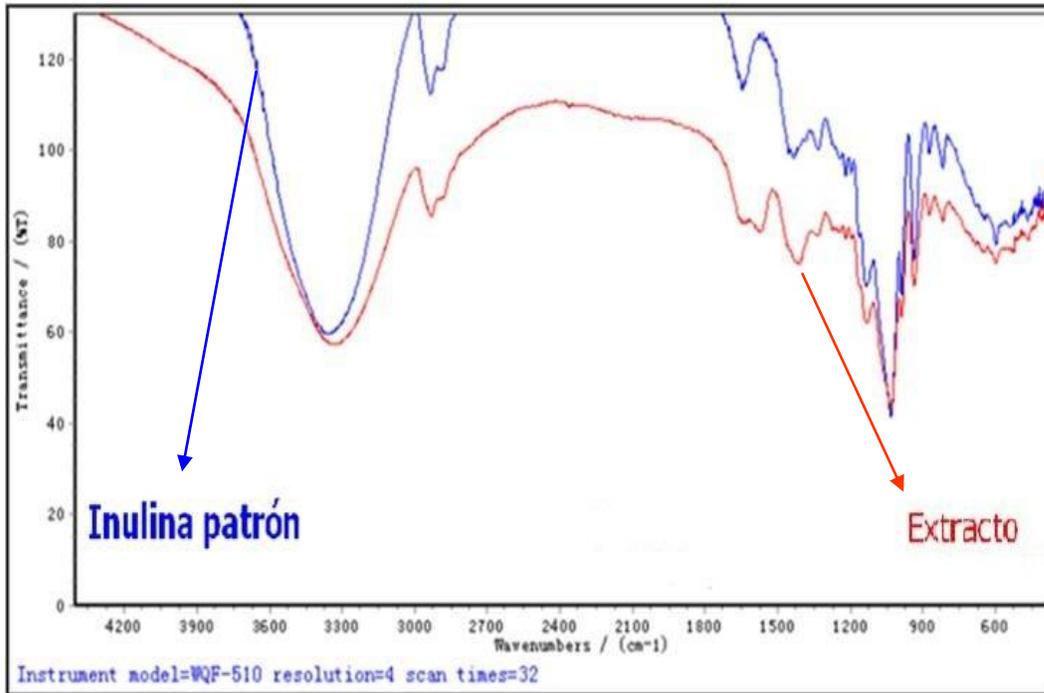
Anexo 1- Espectros IR de Inulina Patrón y Extracto Aislado



Inulina Patrón



Extracto Aislado



Anexo 2 -Comparación de los espectros IR de inulina extraída de ajo con inulina patrón⁽¹²⁾

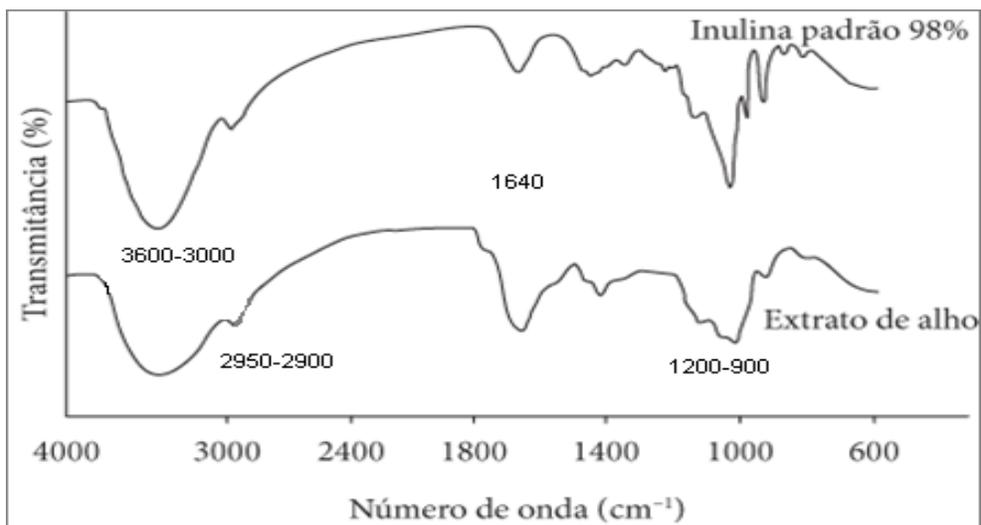
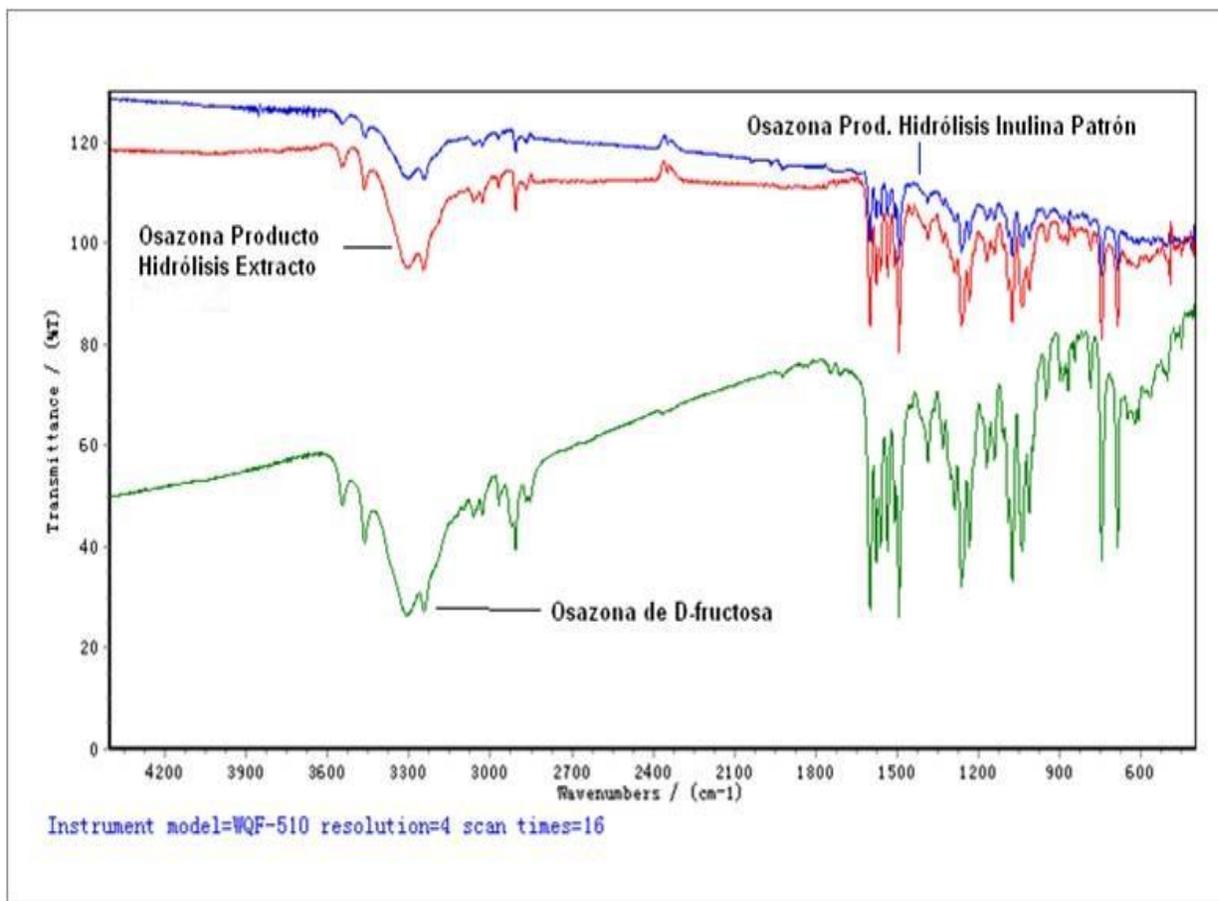
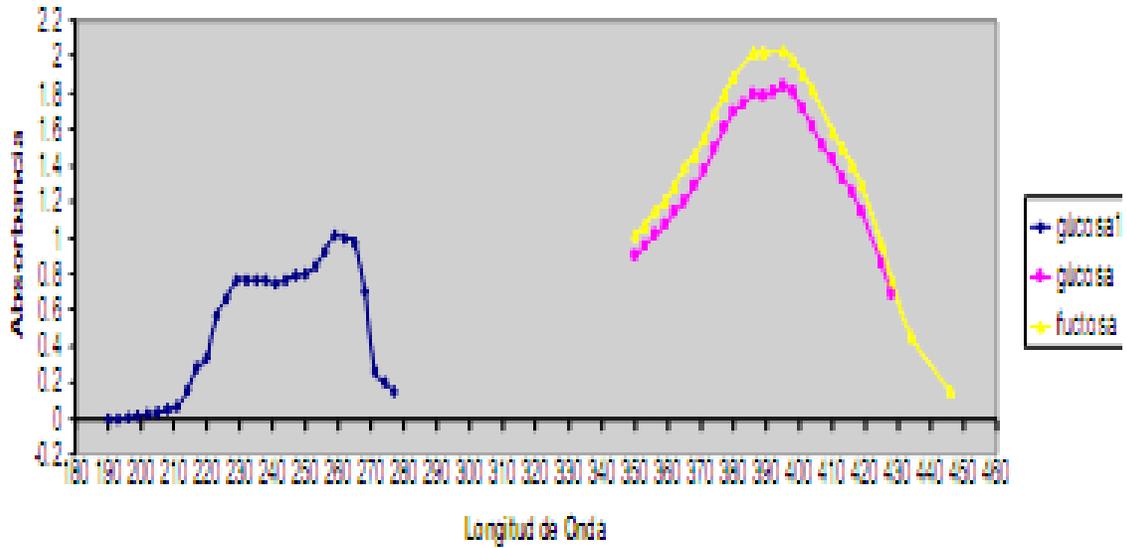


Figura 1. Espectro de infravermelho, modo transmitância, para o extrato isolado.

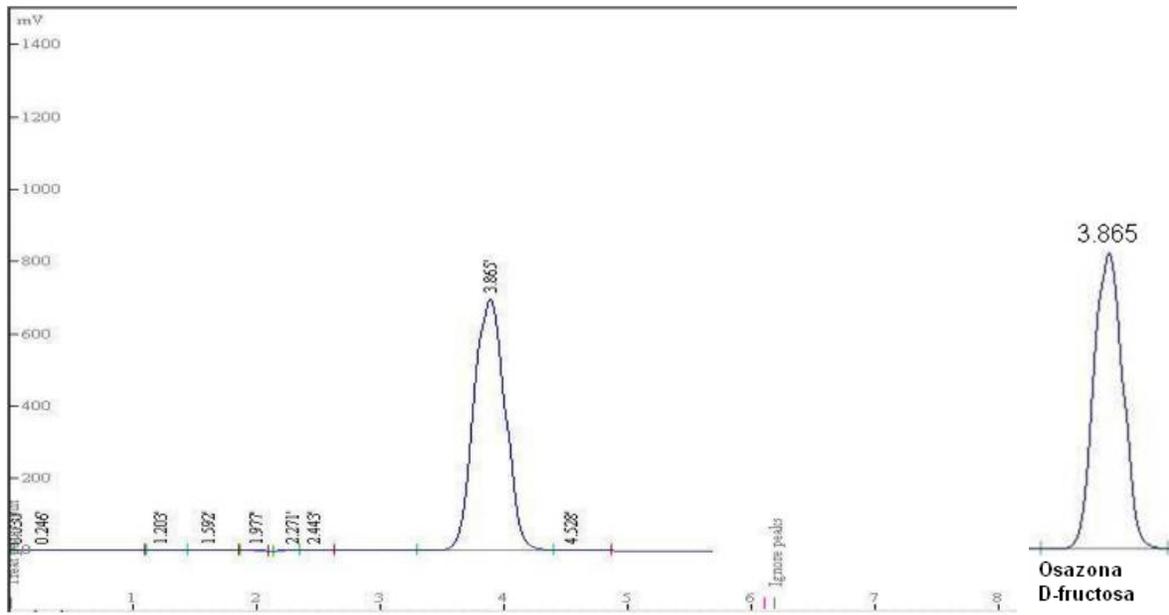
Anexo 3-Espectros IR de osazonas de D-fructosa; osazona de producto de hidrólisis de inulina patrón y osazona de producto de hidrólisis de extracto aislado



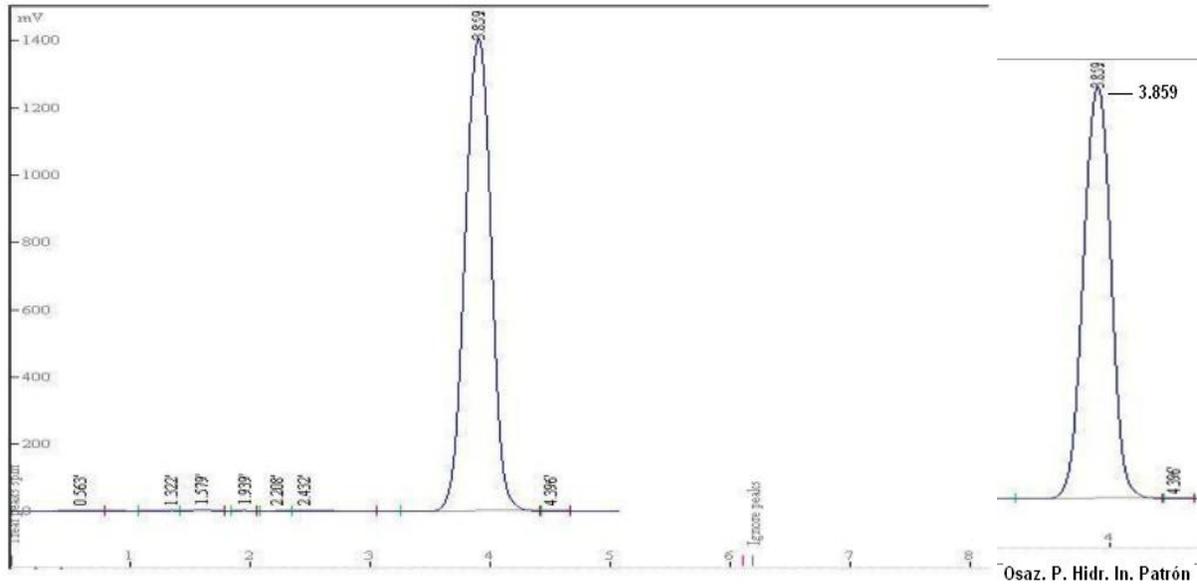
Anexo 4-Absorbancia vs Longitud de onda de osazonas de D-glucosa y D-fructosa patrones



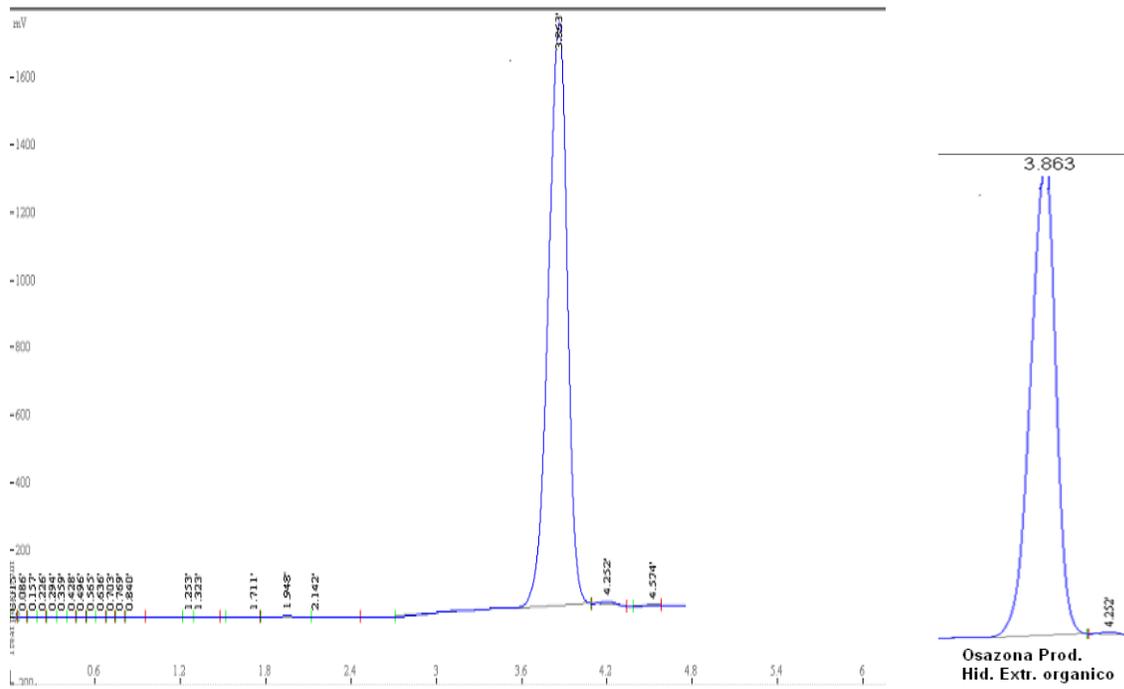
Anexo 5-Cromatogramas de las osazonas analizadas por CLAE con detector UV-VIS



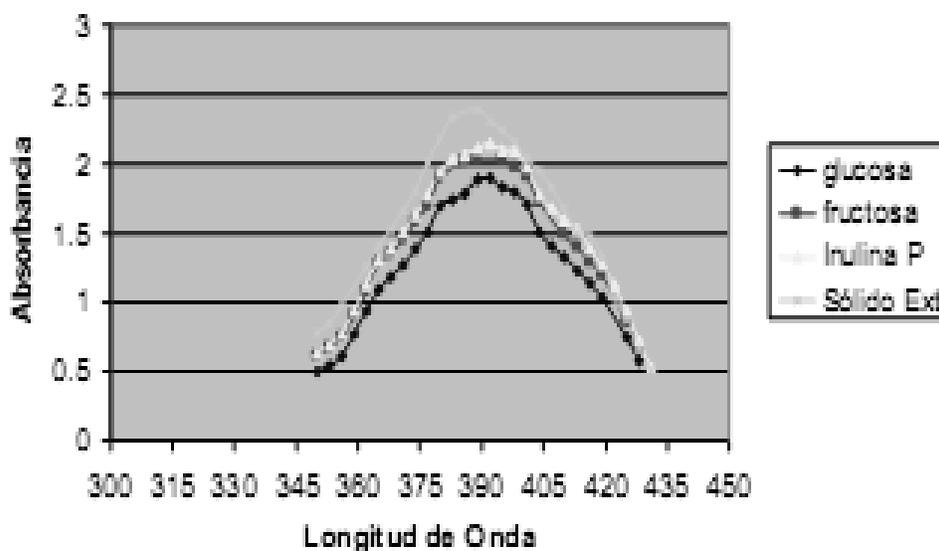
D-fructosa patrón



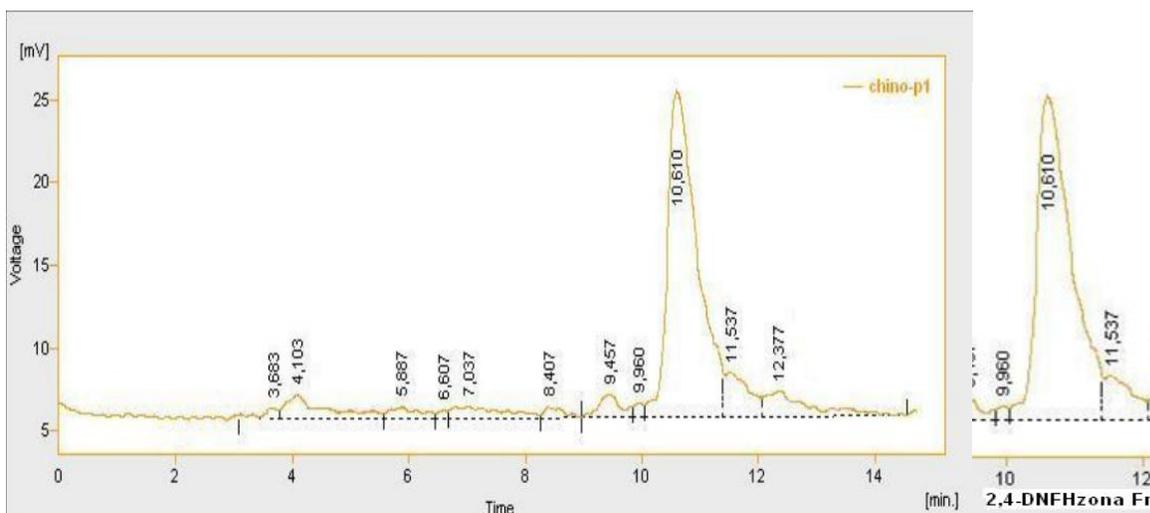
Producto de hidrólisis de inulina patrón



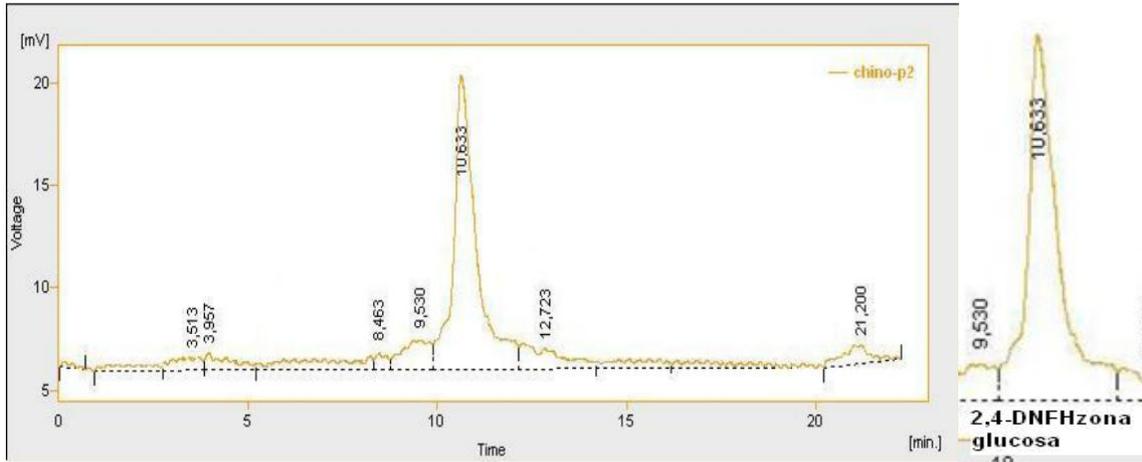
Anexo 6- Absorbancia vs Longitud de onda de 2,4-dinitrofenilhidrazonas de D-glucosa, D-fructosa y productos de hidrólisis de inulina y extracto



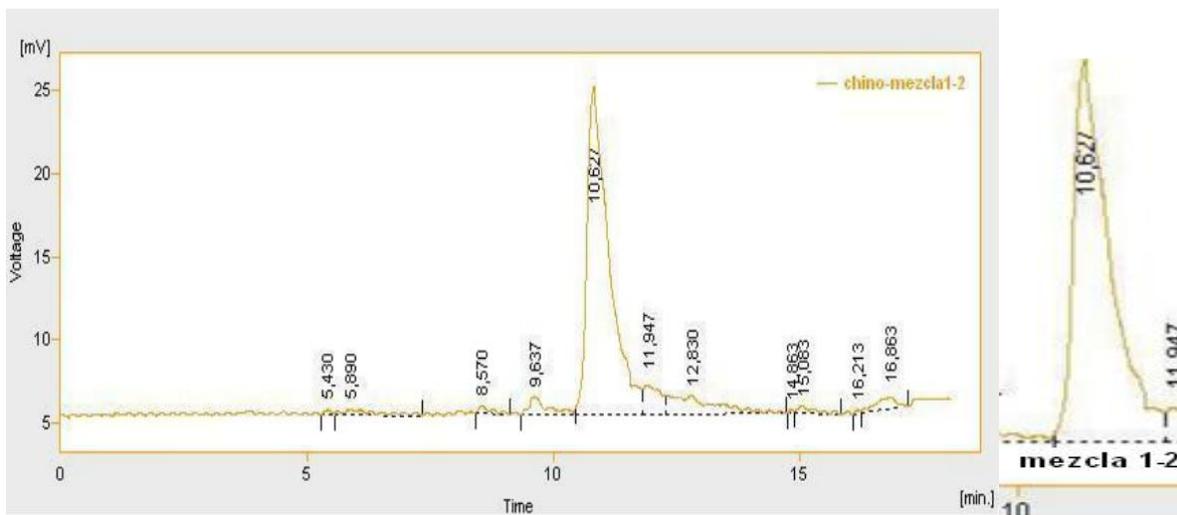
Anexo 7- Cromatogramas de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas de D-Fructosa y D-glucosa patrones analizadas por CLAE con detector UV-VIS



2,4-dinitrofenilhidrazona de la D-fructosa patrón

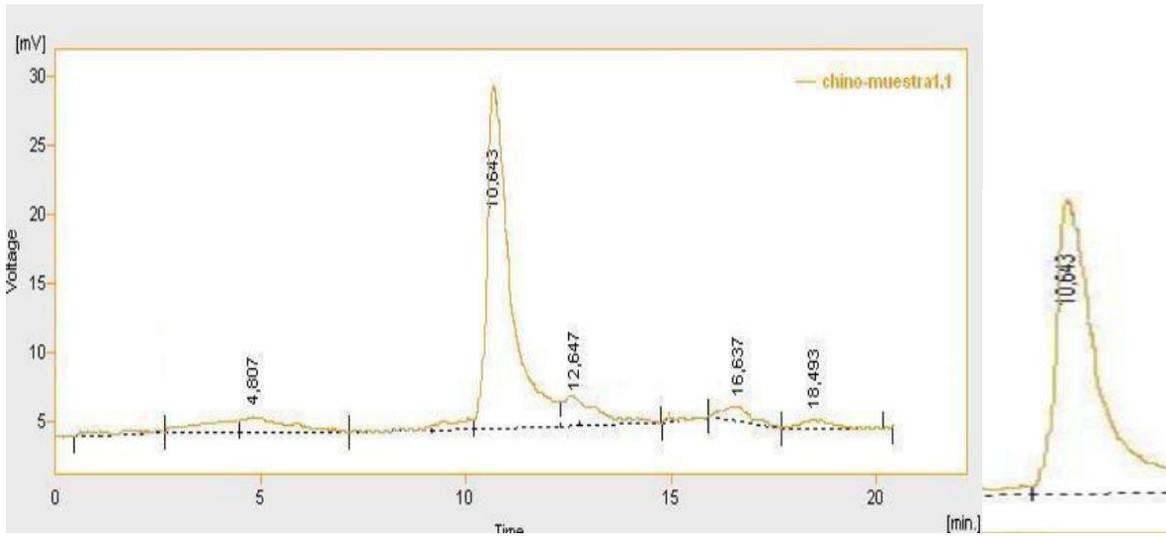


2,4-dinitrofenilhidrazona de la D-glucosa patrón

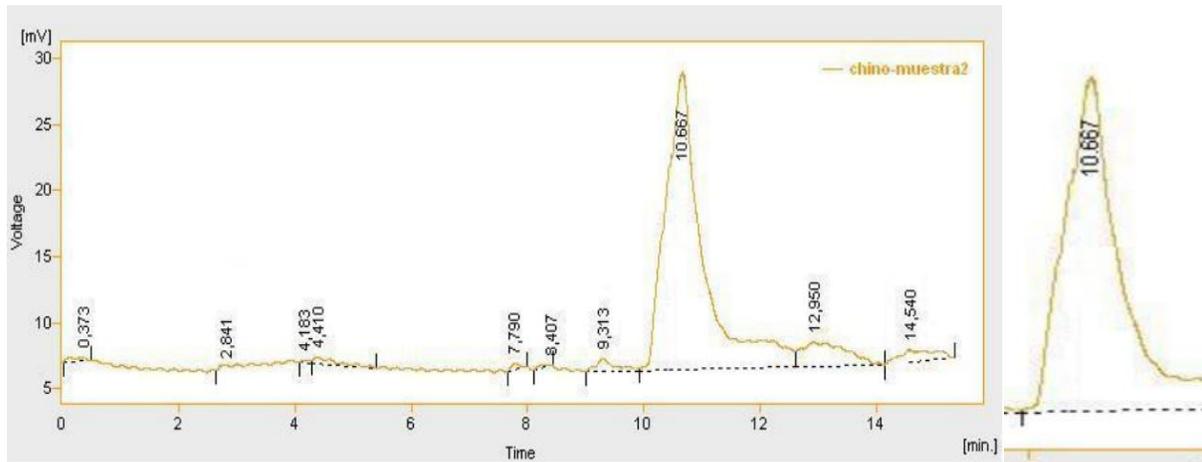


Mezcla de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas de la D-fructosa y D-glucosa patrones

Anexo 8- Cromatogramas de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas de inulina patrón y extracto analizadas por CLAE con detector UV-VIS

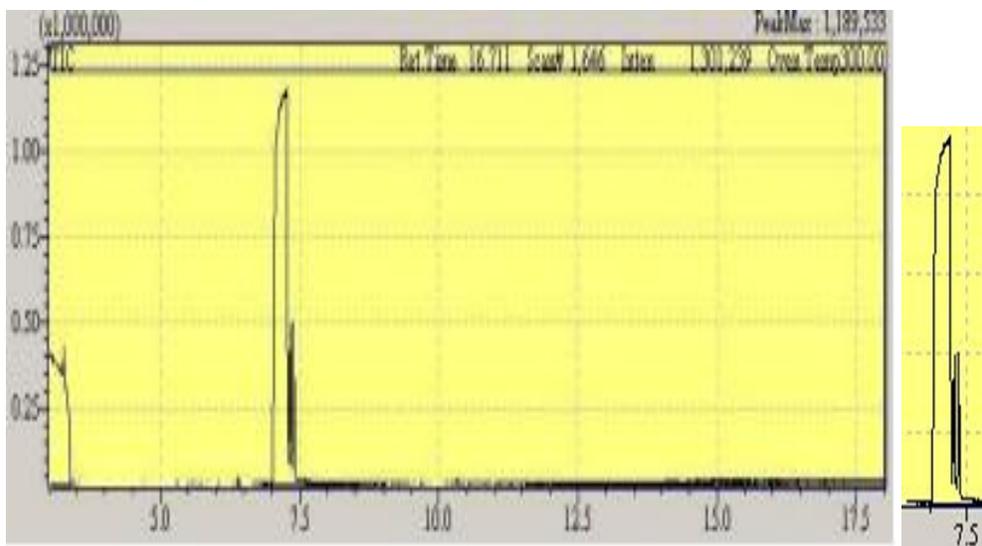


2,4-dinitrofenilhidrazona del producto de hidrólisis de inulina patrón



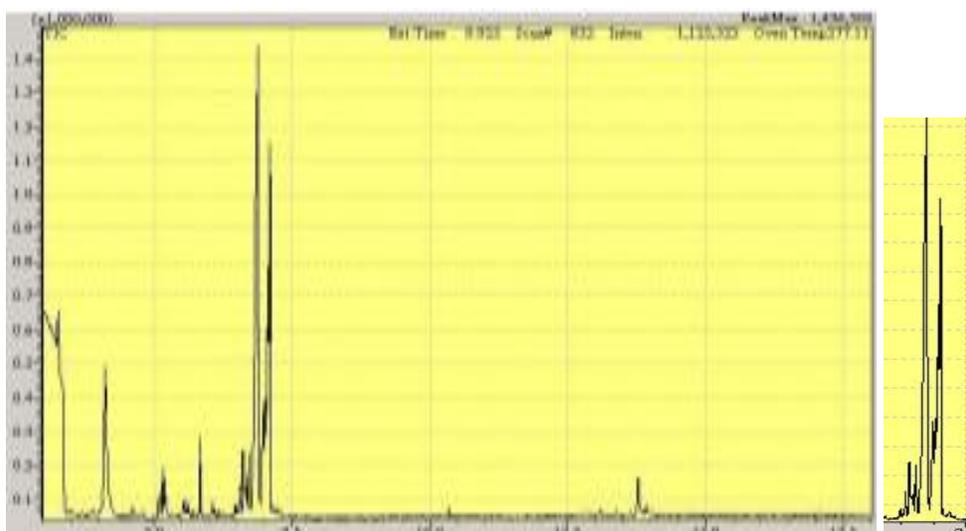
2,4-dinitrofenilhidrazona del producto de hidrólisis del extracto

Anexo 9- Cromatogramas de gases de los derivados acetilados de D-glucosa patrón, D-fructosa patrón y producto de hidrólisis del extracto aislado de tubérculos de *Dahlia "Elga"* tipo *semicactus* familia *Asteráceae* (Procedimiento A de derivatización)



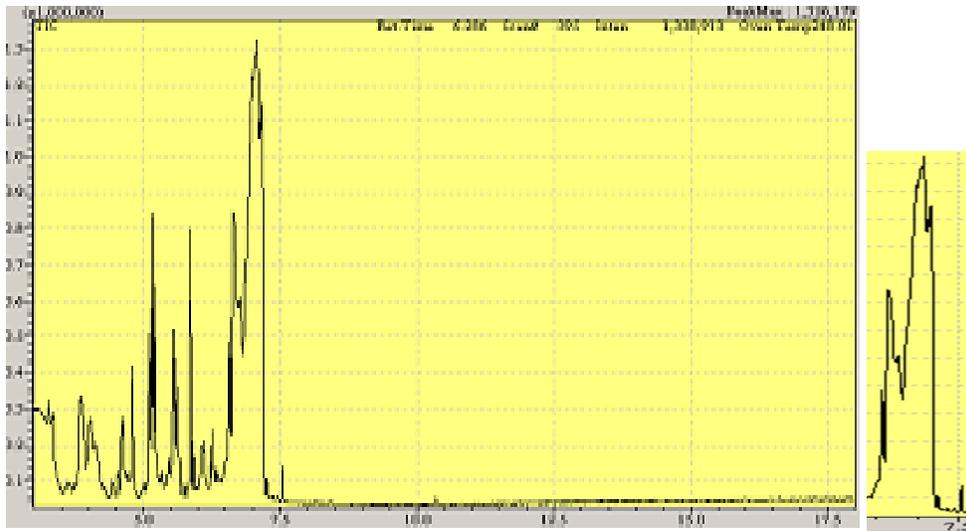
Derivado de la D-glucosa patrón

$t_R = 7.25 \text{ min.}$



Derivado de la D-fructosa patrón.

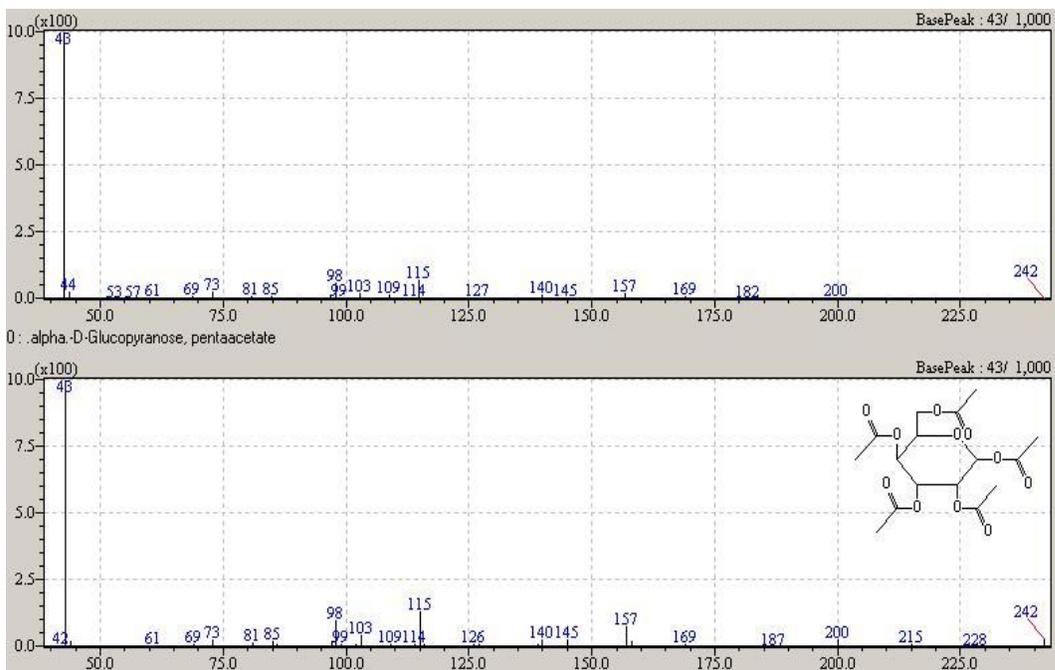
$t_R = 6.85 \text{ min.}$



Derivado del producto de hidrólisis del extracto

$t_R=7.15\text{min}$ $t_R= 6.7\text{min}$.

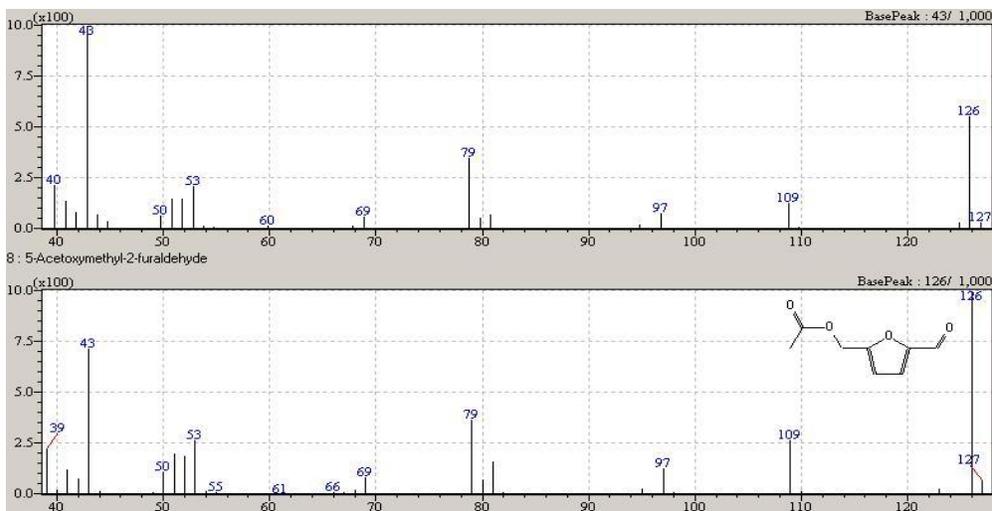
Anexo 10-Espectros de masas de los acetyl derivados de la D-glucosa y de la D-fructosa patrones



Acetilderivado de la D-glucosa patrón (92% pentaacetato α -D-(+)-glucopiranos)

Relación m/e	iones
99	$C_6H_{11}O^+$
44	CH_2CHO+H, CO_2

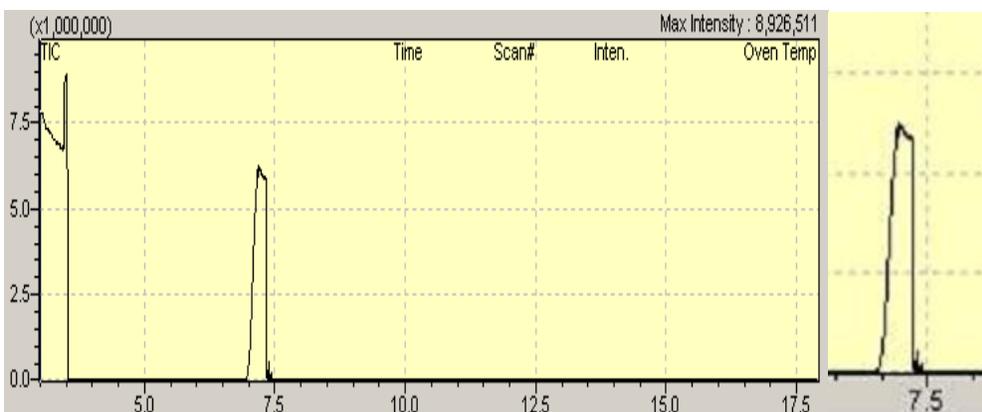
$M^+ -$	Fragmento perdido
18	H_2O
31	$OCH_3; CH_2OH$
43	CH_3CO



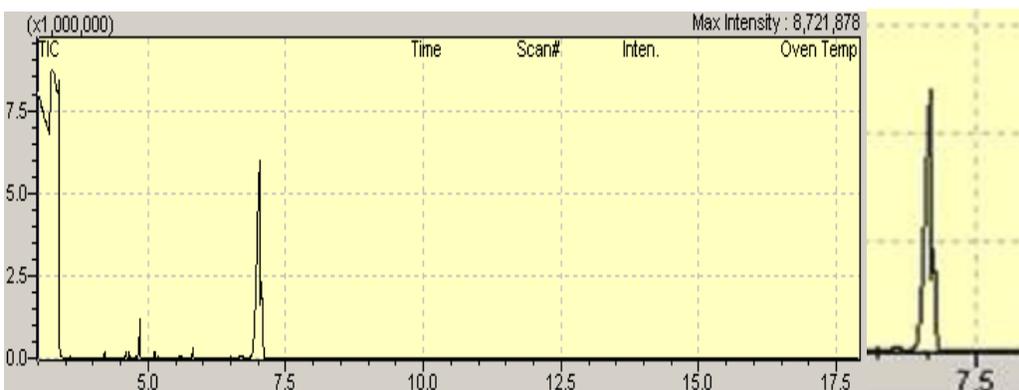
“Derivado acetilado” de la D-fructosa patrón (88% 5-Acetoxyetil-2-furaldehído)

Relación m/e	iones	M ⁺ -	Fragmento perdido
43	CH ₃ CO ⁺	18	H ₂ O
79	C ₆ H ₅ +2H	30	CH ₂ O
95	2-FURALDEHÍDO	DEBEN APARECER ADEMÁS	
DEBEN APARECER		29	CHO
29	CHO ⁺	43	CH ₃ CO
31	⁺ CH ₂ OH, ⁺ OCH ₃	45	CH ₃ -CH ₂ O

Anexo 11- Cromatogramas de gases de los derivados pentaacetilados de D-glucosa patrón, D-fructosa patrón y producto de hidrólisis del extracto aislado de tubérculos de *Dahlia "Elga"* tipo *semicactus* familia *Asteráceae* (Procedimiento B de derivatización)



Derivado de la D-glucosa patrón

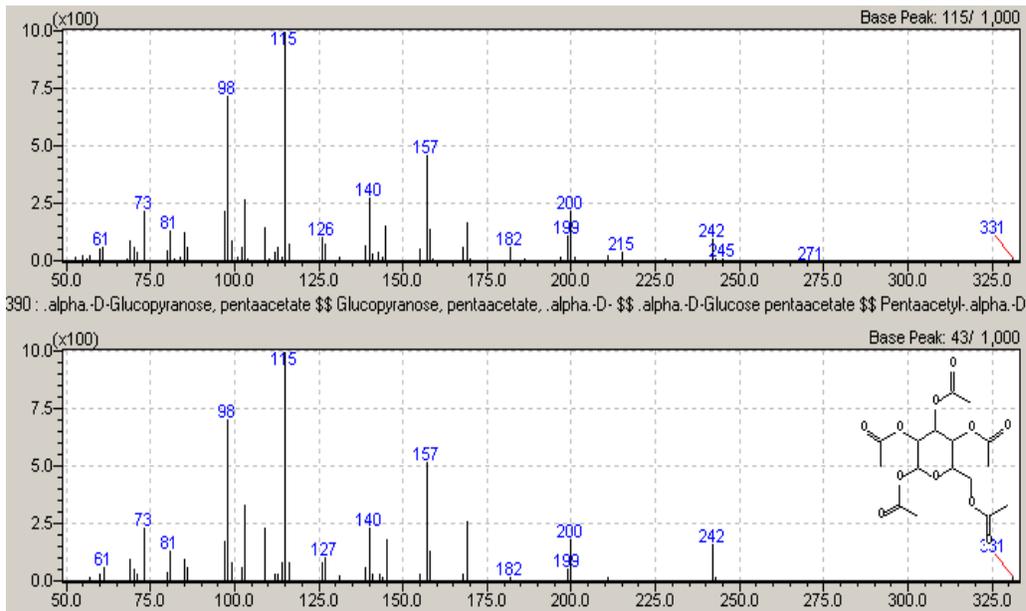


Derivado de la D-fructosa patrón



Derivado del producto de hidrólisis del extracto

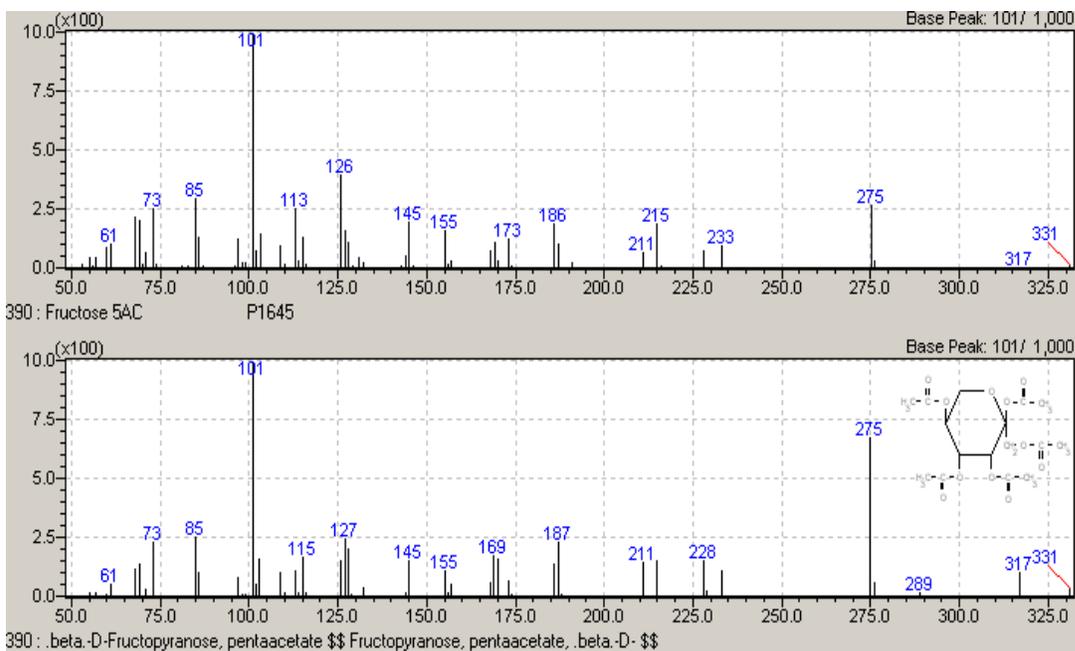
Anexo12-Espectros de masas de derivados pentaacetilados de D-glucosa patrón, D-fructosa patrón y producto de hidrólisis del extracto



Derivado acetilado de la D-glucosa patrón (94% pentaacetato de α -D- (+)-glucopiranososa)

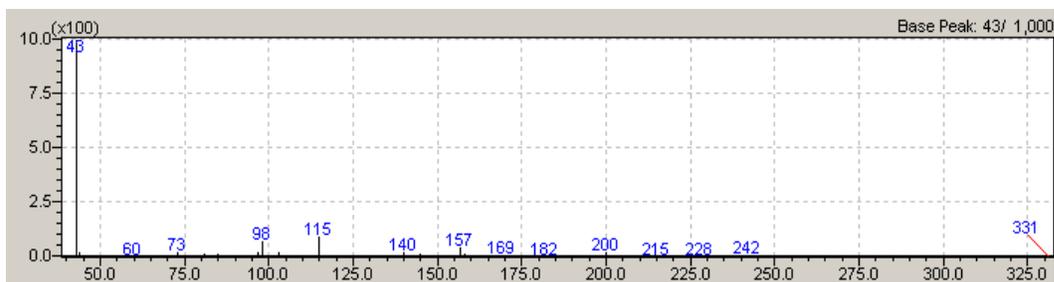
Relación m/e	iones
99	$C_6H_{11}O^+$
44	CH_2CHO+H, CO_2

$M^+ -$	Fragmento perdido
18	H_2O
30	CH_2O
43	CH_3CO

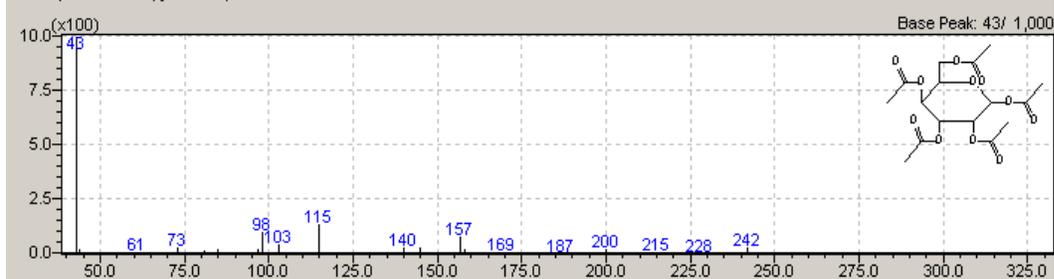


Derivado acetilado de la D-fructosa patrón (87% pentaacetato de β -D-(-)- fructopiranososa)

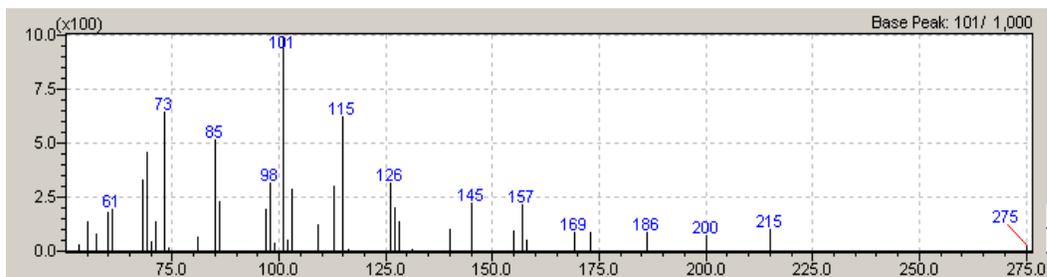
Relación m/e	iones	M ⁺ -	Fragmento perdido
29	CHO ⁺	18	H ₂ O
73	CH ₂ CO.OCH ₃	44	CO ₂
		45	CH ₃ -CH ₂ O



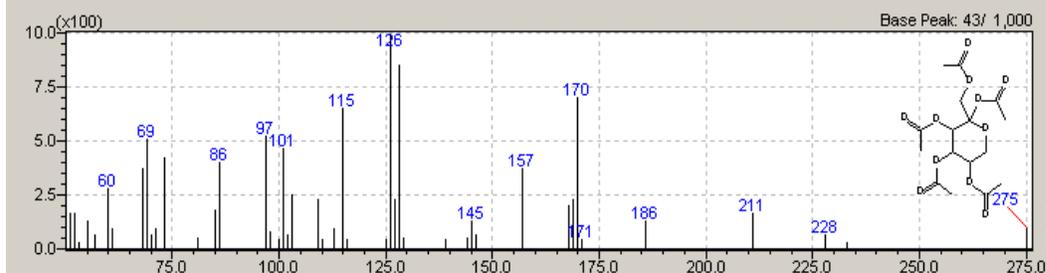
390 : α -D-Glucopyranose, pentaacetate



94% pentaacetato de α -D-glucopiranososa en derivado acetilado del producto de hidrólisis del extracto

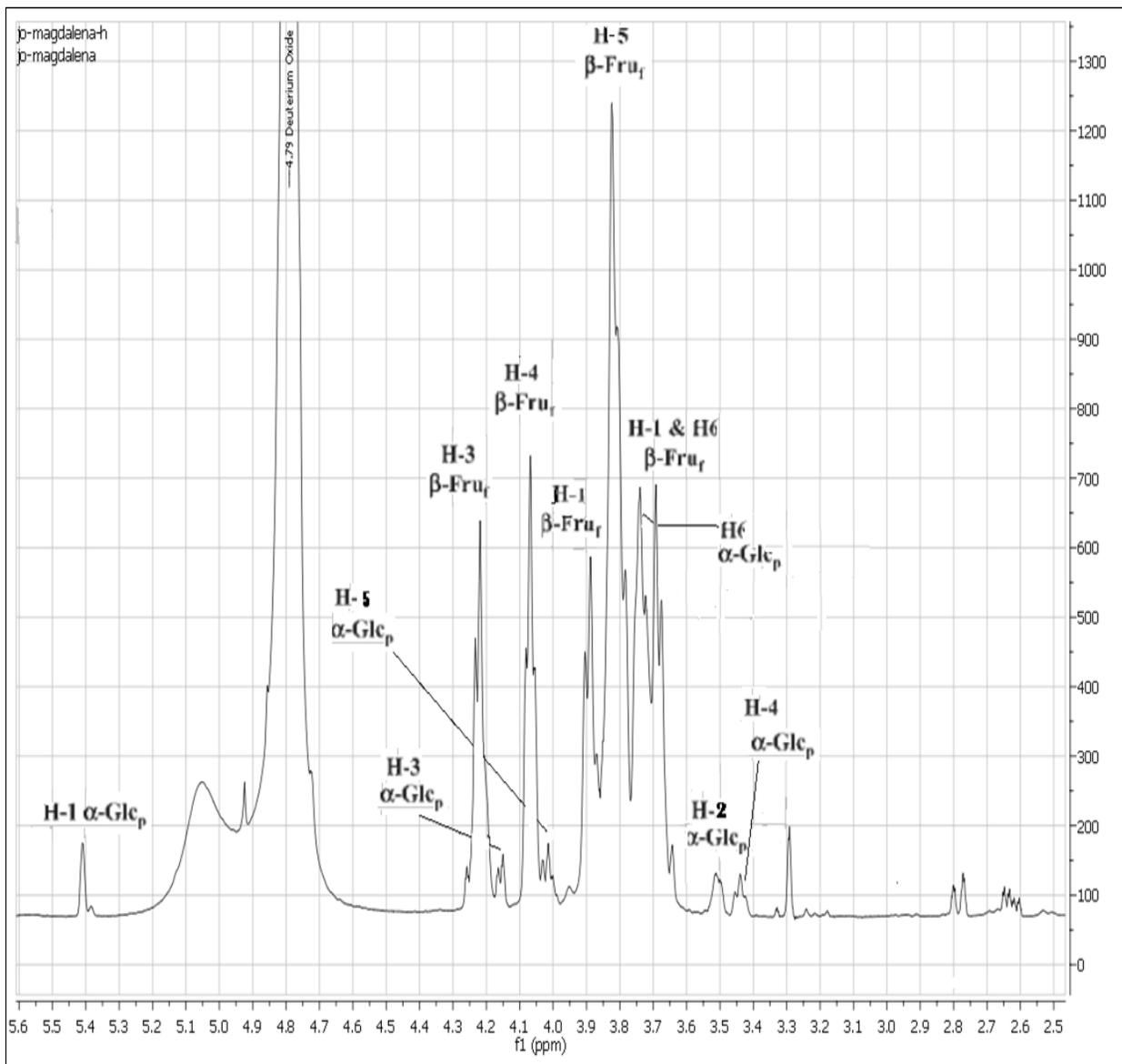


390 : β -D-Fructopyranose, pentaacetate \$\$ Fructopyranose, pentaacetate, β -D- \$\$



78% pentaacetato de β -D- fructopiranososa en derivado acetilado del producto de hidrólisis del extracto

Anexo 13- Análisis, por resonancia magnética nuclear, del extracto orgánico de tubérculos de *Dahlia* "Elga", tipo *semicactus* familia *Asteráceae*

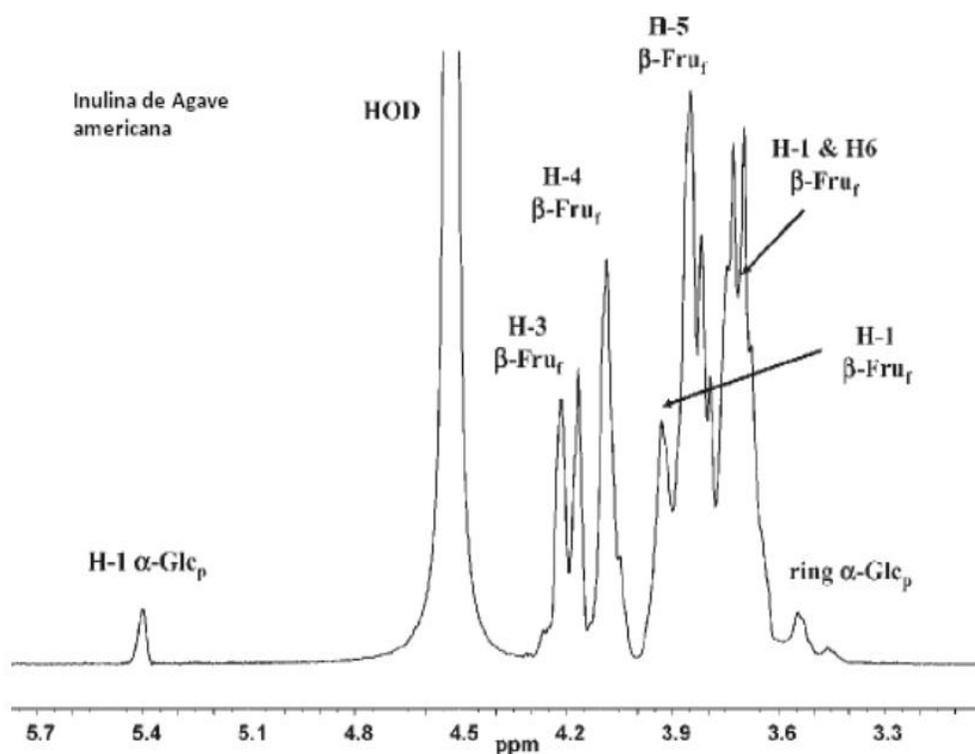


Espectro RMN protónico del extracto obtenido de tubérculos de *Dahlia* "Elga", tipo *semicactus* familia *Asteráceae*

Señales asignadas al espectro RMN-H' del extracto obtenido de tubérculos de *Dahlia "Elga" tipo semicactus familia Asteráceae*

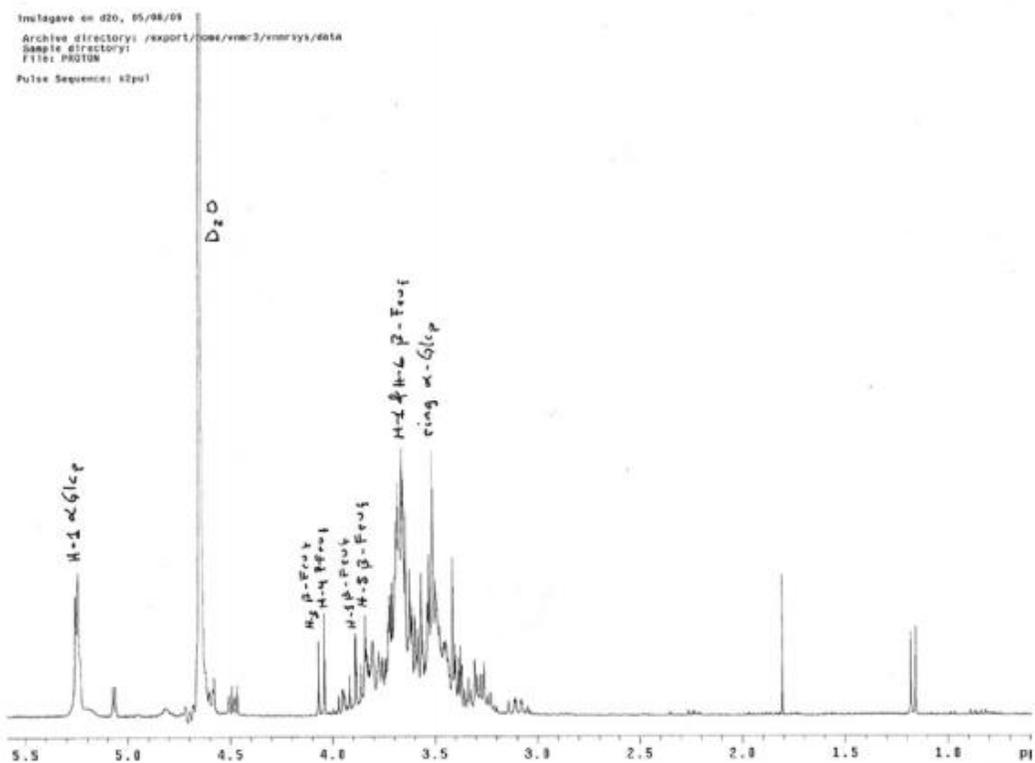
Protones	Corrimiento químico (ppm)	Protones	Corrimiento químico (ppm)
H-1 α -Glc	5.4	H-3 β -Fruf	4.23
H-3 α -Glc	4.17	H-4 β -Fruf	4.05
H-5 α -Glc	4.0	H-1 β -Fruf	3.89
H-6 α -Glc	3.74	H-5 β -Fruf	3.81
H-2 α -Glc	3.6	H-1 y H-6 β -Fruf	3.68
H-4 α -Glc	3.45		

Anexo 14- Espectros RMN-H' reportados en "Inulin Determination for Food Labeling"³⁴ y "Evaluación del efecto prebióticos del Aguamiel de Maguey (Agave salmiana) en *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*"³²



Espectro de RMN¹ para la inulina extraída de *Agave americana* (Ravenscroft et al., 2009)

Espectro RMN-H' de inulina obtenida de *Agave americana*³⁴



Espectro de RMN-H' de la inulina del agua miel de Agave salmiana

Espectro RMN-H' de inulina obtenida de agua miel de *Agave Salmiana*³²

Anexo 15-Valoración de la acción inhibidora de inulina patrón y extracto orgánico en el crecimiento de enterobacterias en cepas de control.

Concentración ↓ Enterobacterias	0.0 g/L		5.0 g/L		10.0 g/L		15.0 g/L		20.0 g/L		25.0 g/L		50.0 g/L		100.0 g/L		150.0 g/L		
	I.P*	E.O**	I.P	E.O	I.P	E.O	I.P	E.O	I.P	E.O	I.P	E.O	I.P	E.O	I.P	E.O	I.P	E.O	
	<i>Salmonella C</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella C₁</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella D</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>Shigella A</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella C</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella D</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>Yersinia Enterocolítica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>E. coli entero-hemorrágica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*I.P= Inulina Patrón **E.O= Extracto Obtenido No Inhibidas = (-) Inhibidas = (+)

Anexo 16- Valoración de la acción inhibitora de Inulina patrón y Extracto Orgánico en el crecimiento de enterobacterias en cepas salvajes.

Concentración	0.0 g/L		5.0 g/L		10.0 g/L		15.0 g/L		20.0 g/L		25.0 g/L		50.0 g/L		100.0 g/L		150.0 g/L			
	Enterobacterias																			
	I.P*	E.O**	I.P	E.O	I.P	E.O	I.P	E.O	I.P	E.O	I.P	E.O	I.P	E.O	I.P	E.O	I.P	E.O	I.P	E.O
<i>Salmonella D</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
<i>Shigella D</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	
<i>Yersinia Enterocolítica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	

*I.P= Inulina Patrón **E.O= Extracto Orgánico No Inhibidas = (-) Inhibidas = (+)

