ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	3
CAPÍTULO 2	17
CAPÍTULO 3	30
CAPÍTULO 4	43
COROLARIO	52
BIBLIOGRAFÍA	53

Excelentísimo Sr. Presidente de la Academia de Ciencias de la Región de Murcia.

Excelentísimas e Ilustrísimas Autoridades.

Ilustrísimas compañeras y compañeros de la Academia.

Señoras y Señores.

Amigas y Amigos.

Es para mí un verdadero honor a la vez que una inmensa responsabilidad dictar esta lección inagural del curso 2016 de la Academia de Ciencias de la Región de Murcia.

Al recibir este encargo medité sobre qué tema tratar y me di cuenta que el encargo coincidía con el hecho personal de cumplirse este mismo mes mis cuarenta años dedicados a la investigación científica en el ámbito de la Bioquímica. Esto me llevo a la conclusión de que este solemne acto podía ser el marco idóneo para hacer un reconocimiento público de agradecimiento a todas las personas que me han alentado en mis 40 años de afición por la investigación científica en el campo de la Bioquímica. En primer lugar, a mi familia que siempre me ha apoyado y que sin críticas, me ha permitido que les quitara mucho del tiempo que les correspondía para dedicarlo a la investigación; en segundo lugar, a todos los que en algún momento me han permitido aprender nuevas ideas, planteamientos o enfoques y de una manera singular a los miembros de mi grupo de investigación por su generosidad y apoyo en todo momento, en algunos casos llevo más de 35 años a su lado.

Qué modo mejor de agradecimiento y homenaje que esta lección verse sobre una de las líneas de investigación que forma parte del acervo común del grupo, pues en la actualidad en el campo de la investigación experimental no cabe el científico solitario sino el del grupo cohesionado para poder obtener resultados mínimamente significativos.

Así pues la lección lleva por título “Betalaínas 2005-2015: Una historia con futuro” y la he estructurado en:

Introducción.

Cuatro capítulos.

y un corolario.

INTRODUCCIÓN

Las betalaínas son pigmentos presentes en plantas que contienen nitrógeno en su estructura y son solubles en agua, encontrándose presentes en la mayoría de las plantas del orden de las Caryophyllales (Figura 1) tanto en elementos comestibles como frutos y tubérculos o en elementos no comestibles como flores, tallos, hojas o raíces, además se encuentran en semillas, (Figura 2) como las de quinóa que tienen una amplia gama de colores y también ha sido descrita su presencia en algunos hongos como en *Amanita muscaria.*

Figura 1

Chenopodium quinoa

Amanita muscaria

Figura 2

En la mayoría de plantas y flores los pigmentos son antocianos y de hecho hasta 1957 las betalaínas se consideraron que eran antocianos que

contenían nitrógeno, lo realmente curioso es que son dos tipos de pigmentos que se autoexcluyen, así las plantas que tienen betalaínas no producen antocianos y las que tienen antocianos no producen betalaínas, esta segregación no tiene, a día de hoy, una clara explicación evolutiva. Las betalaínas (Figura 3) se establecieron como grupo independiente que contenían en su estructura un sistema 1,7-diazaheptametilen puesto que todas contienen una molécula de ácido betalámico condensada con un grupo amino formando una base de Schiff. Esta independencia en el año 1957 marca que la investigación sobre betalaína comenzara ese año.

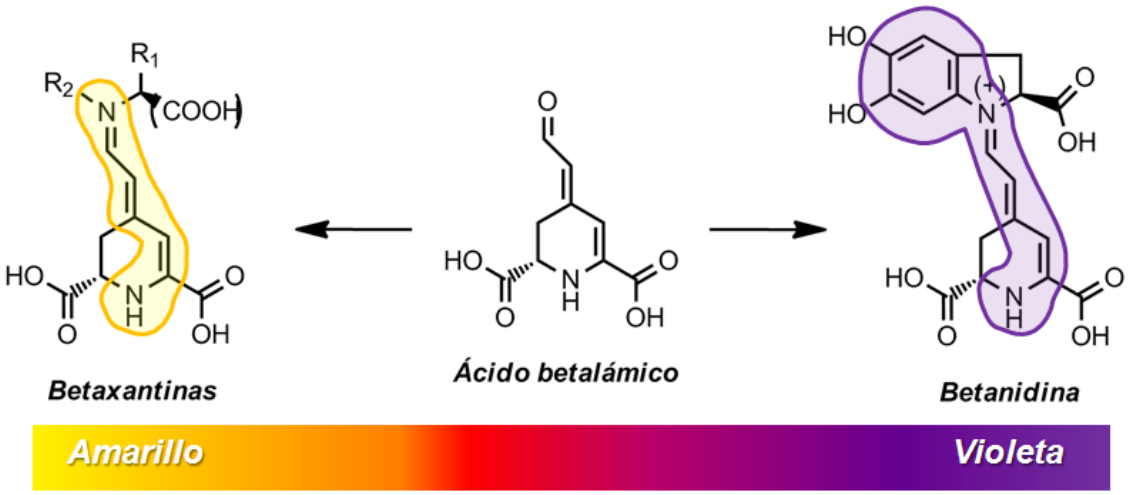


Figura 3

Las betalaínas se subdividen en dos grupos: Betacianias de color rojo-violeta y betaxantinas de color amarrillo. Así las betacianinas presentan un espectro en el visible con un máximo a 536 nm y presentan en su estructura glicosilaciones o acilglicosilaciones unidos a uno o dos de los grupos hidroxilos que tienen dando una gran complejidad estructural, y por su parte las betaxantinas que tienen un espectro de absorción en el visible con un máximo a 480 nm y no poseen glicosilaciones en su estructura.

En las betacianinas el ácido betalámico está condensado con una molécula de ciclo-DOPA (ciclo-3,4-dihidroxifenilalanina) extendiendo la resonancia electrónica al anillo arómatico difenólico, esta extraconjugación desplaza el máximo de absorbancia hasta los 540 nm. En el caso de las betaxantinas el ácido betalámico está conjugado con un grupo amino de un aminoácido o de una amina primaria o secundaria.

La presencia de betalaínas en flores es particularmente interesante por la importancia del color para atraer a los animales para su polinización, la coloración de las flores que poseen betalaínas se extiende desde el rojo-violeta hasta el amarillo y va a depender de la presencia de betacianinas o betaxantinas o de la proporción en que se encuentren unas y otras.

CAPÍTULO 1

SÍNTESIS BIOLÓGICA Y ABIÓTICA DE BETALAÍNAS

SÍNTESIS BIOLÓGICA DE BETALAÍNAS

La ruta de biosíntesis de betalaínas se empezó a conocer en 1972 (Fischer y Dreiding) mediante un experimento con marcaje radiactivo de los llamados de “pulso y caza”. En este experimento (Figura 4) se proporcionó a plantulas productoras de betalaínas el aminoácido L-Tirosina marcada con tritio radiactivo en sus posiciones 3’ y 5’ y al cabo de un tiempo se analizó si el tritio radiactivo se había incorporado en la estructura de la betanidina, la unidad estructural de los pigmentos violeta. El resultado del experimento fue que tritio efectivamente se encontraba en betanidina, es decir, existía una ruta de biosíntesis de betanidina desde L-Tirosina.

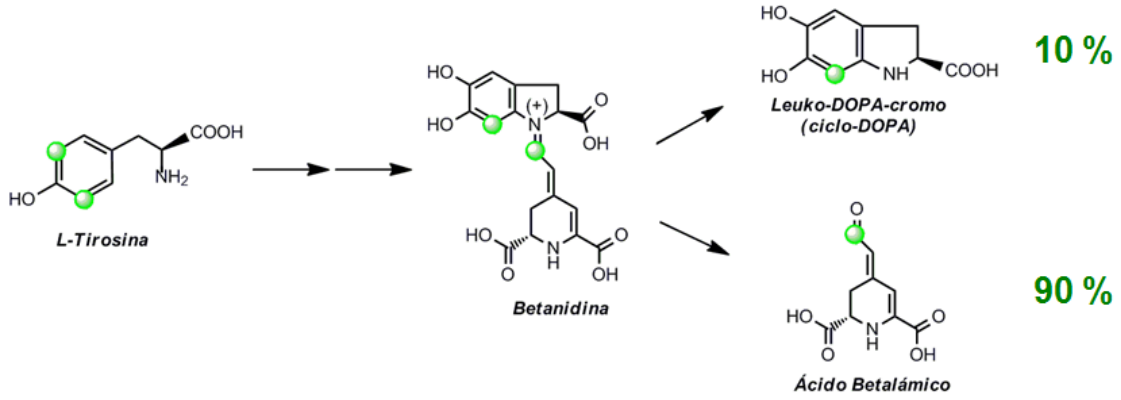


Figura 4

Cuando se analizó dónde estaba la radiactividad en la betanidina se encontró en las dos sub-estructuras básicas que la constituyen, el ciclo-DOPA con un 10% de la radiactividad incorporada y el ácido betatalámico con el 90% de la radiactividad incorporada.

Estos datos son compatibles, en el caso del ciclo-DOPA, (Figura 5) con la ruta de pardeamiento enzimático en vegetales. Esta ruta se inicia con la trasformación de una moléculas de L-Tirosina a L- DOPA por la actividad hidroxilasa de la enzima Tirosinasa utilizando oxígeno molecular (Etapa 1) y siguiendo la ruta del pardeamiento enzimático en vegetales, la molécula de L-DOPA es transformada en o-DOPA-quinona (Etapa 2). Esta etapa está catalizada por la actividad oxidasa de Tirosinasa también a expensas de oxígeno molecular. La enzima Tirosinasa se encuentra distribuida ampliamente en el mundo vegetal por lo que podemos suponer que se encuentra disponible para realizar ambas etapas.

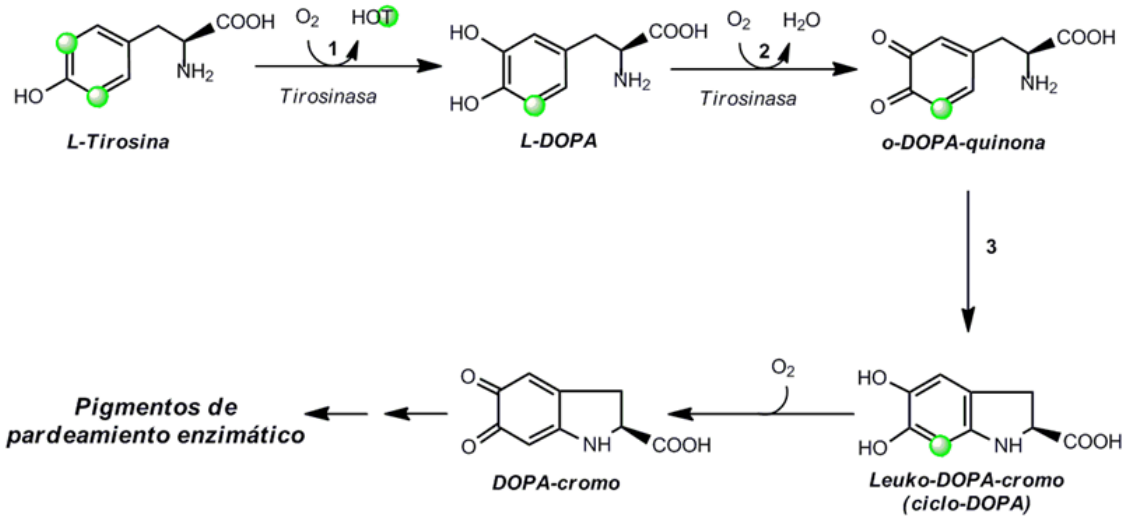


Figura 5

La ruta de pardeo enzimático se consideraba, en esos años, que continuaba con la ciclación espontánea de la o-DOPA-quinona mediante un ataque nucleofílico del grupo amino al anillo aromático, rindiendo el ciclo-DOPA (Etapa 3). La ruta progresa en otra etapa espontánea de oxidación del cicloDOPA con oxígeno molecular para rendir DOPA-cromo, que lentamente evoluciona para dar los pigmentos pardos.

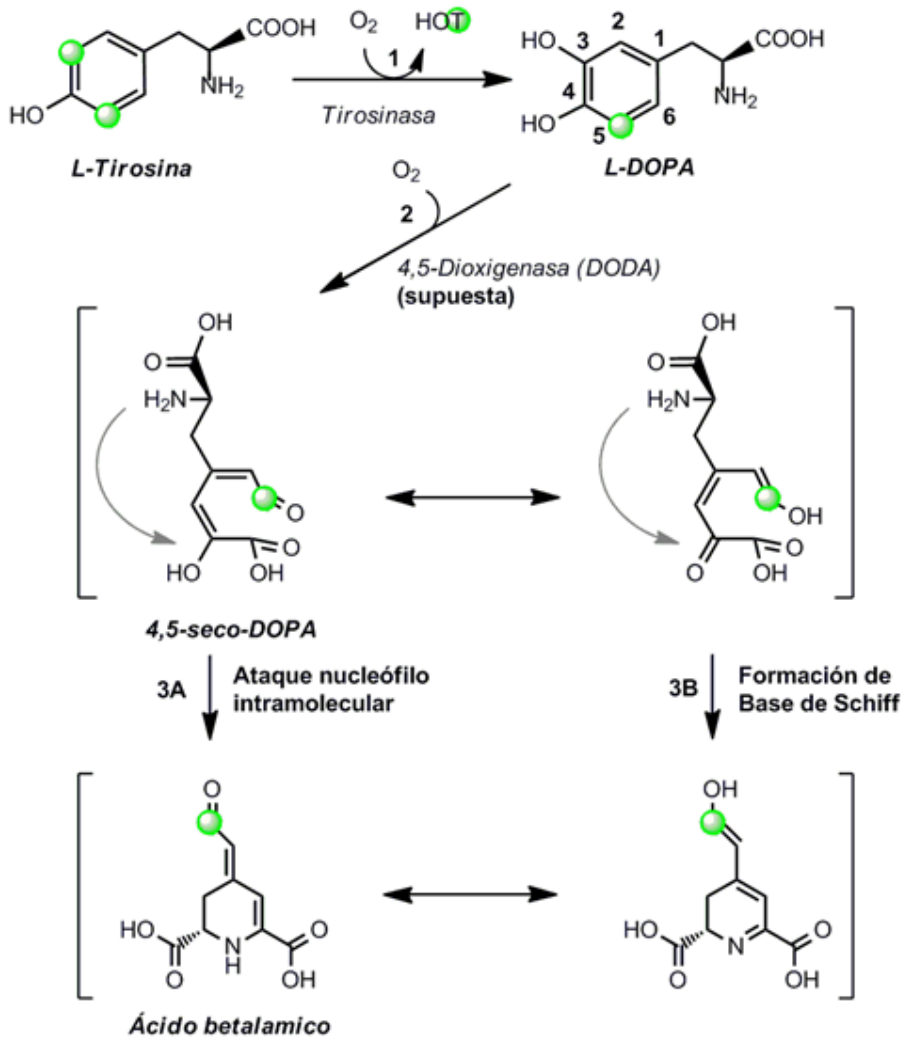


Figura 6

La obtención del ácido betalámico (Figura 6) se podía explicar si una segunda molécula de L-Tirosina se transformara en L-DOPA siguiendo la misma etapa 1 y a continuación se rompiera de forma específica el anillo difenólico entre las posiciones 4,5 para dar una estructura abierta (el 4,5-seco-DOPA) con una 4-5 dioxigenasa (DODA) imaginaria (Etapa 2). El 4,5-secoDOPA experimentaría una posterior ciclación de forma espontánea para rendir el ácido betalámico (Etapa 3) mediante una condensación intramolecular entre el grupo amino procedente del L-DOPA con el aldehído producido enzimáticamente. Esta etapa podría seguir dos posibles mecanismos, por un lado un ataque nucleofílico del grupo amino sobre el carbono que soporta el hidroxilo con salida del mismo (Etapa 3A), por otro, podría estabilizarse el seco-DOPA mediante una tautomería ceto-enol para producir una estructura α-cetoácido y de esta forma posibilitar una ciclación por medio de una base de Schiff que se estabilizaría dando otra tautomería ceto-enol (Etapas 3B).

El esquema de la biosíntesis de betacianinas puede verse en la Figura 7 (Strack et al., 2003), donde se integran las rutas de obtención de seco-DOPA y

de ácido betalámico a partir de dos moléculas de L-Tirosina. Se completa la ruta con la unión espontánea de ciclo-DOPA con ácido betalámico por medio de una base de Schiff para sintetizar betanidina. Betanidina puede transformarse en betanina, etapa que necesita una enzima glucosil-trasferasa específica para realizar esa glucosilación.

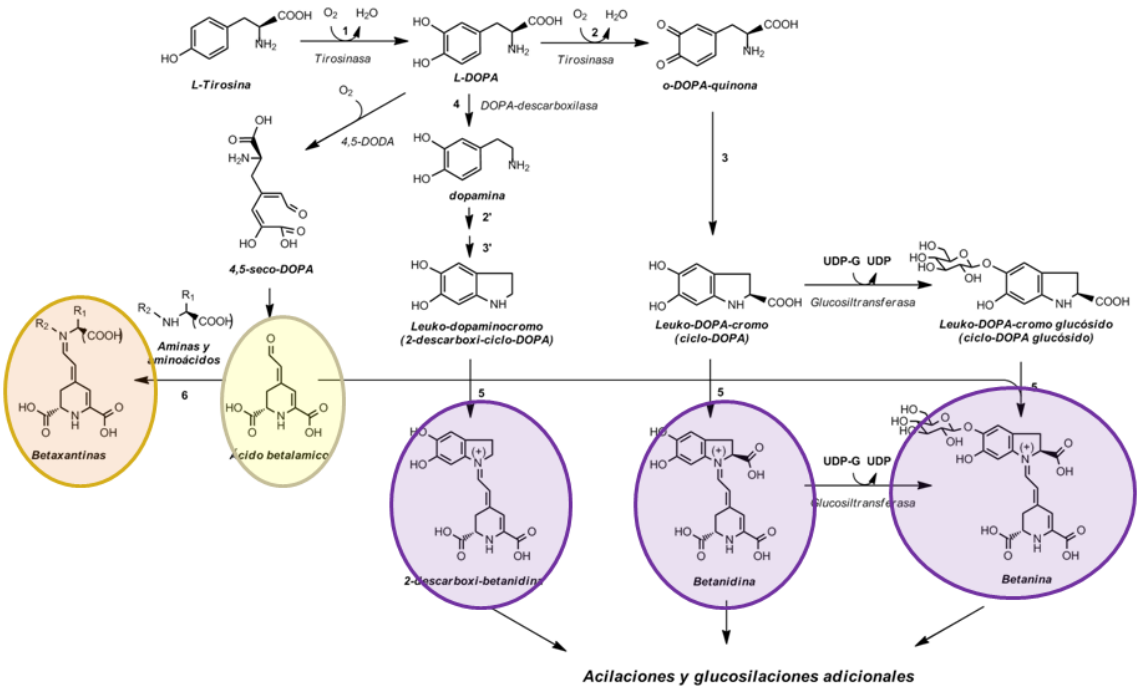


Figura 7

También se han encontrados glucosil-transferasas específicas para glucosilar al ciclo-DOPA a cicloDOPA 5-O-glucósido, lo que permite obtener betanidina por unión de esta molécula con ácido betalámico.

En el esquema se presenta la etapa de descarboxilación de DOPA a Dopamina por la enzima DOPA descarboxilasa que puede rendir 2-descarboxi-ciclo-DOPA siguiendo etapas paralelas a la ruta del pardeamiento enzimático. Esto permite obtener una familia de descarboxi-betacianinas por medio de la 2-descarboxi-betanidina.

Además se han descrito otras enzimas específicas que pueden hacer glicosilaciones y acil-glicosilaciones que decoran a uno o a los dos hidroxilos de betanidina o de descarboxi-betanidina generándose múltiples moléculas de betacianinas. Así, hoy se conocen más de 54 estructuras de betacianinas en plantas.

Por otro lado, la obtención de betaxantinas solo requiere la unión de cualquier aminoácido o amina primaria o secundaria al ácido betalámico formando una base de Schiff, reacción que se produce de forma espontanea a

pH y temperatura fisiológica. Hoy se conocen 35 betaxantinas presentes en plantas.

Los conocimientos sobre la ruta de biosíntesis de betalaínas antes de 2005, se completaron en 2004 con la primera clonación de una 4,5-DODA vegetal procedente de *Portulaca grandiflora* que con oxígeno molecular rompe el L-DOPA para rendir 4,5-seco-DOPA (Christinet et al., 2004). Con anterioridad en 1991 (Girod y Zryd, 1991), se había purificado y parcialmente caracterizado una DODA de *Amanita muscaria* responsable de la síntesis de betalaínas en hongos. Sin embargo, esta enzima no era específica (Figura 8) pues rompía el L-DOPA por el enlace 2,3 además de por el enlace 4,5 por lo que daba lugar la Muscaflavina además del ácido betalámico. Hoy en día, sabemos que esta DODA no tiene similitud de secuencia con las DODAs vegetales, por lo que se considera que ha llegado a catalizar la misma reacción por evolución convergente.

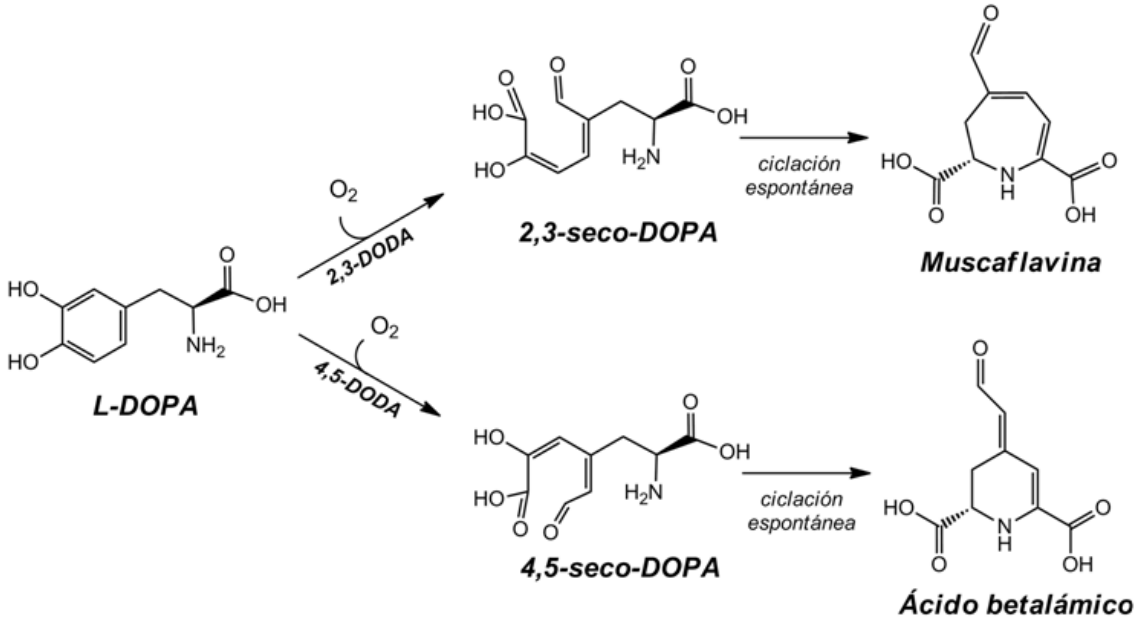


Figura 8

Hasta 2005, no se discutió el esquema de biosíntesis de betacianinas con los avances de la ruta de pardeamiento enzimático, donde nuestro grupo aportó evidencias, desde 1982 (García-Carmona et al.,1982) (Figura 9) de que la etapa de oxidación de ciclo-DOPA no se producía por oxígeno molecular cuando en el medio de reacción estaba presente o-DOPA-quinona, situación que se produce cuando la ruta se inicia desde L-DOPA actuando Tirosinasa. Bajo estas condiciones se da una etapa espontánea de oxidación del ciclo-DOPA por la o-DOPA-quinona para obtener una nueva molécula de L-DOPA y un compuesto coloreado conocido como DOPA-cromo, etapa muy desplazada hacia los productos a pH fisiológico. Esto hace que el esquema de biosíntesis

de betacianinas tuviera una inconsistencia: En presencia de o-quinona no puede acumularse ciclo-DOPA.

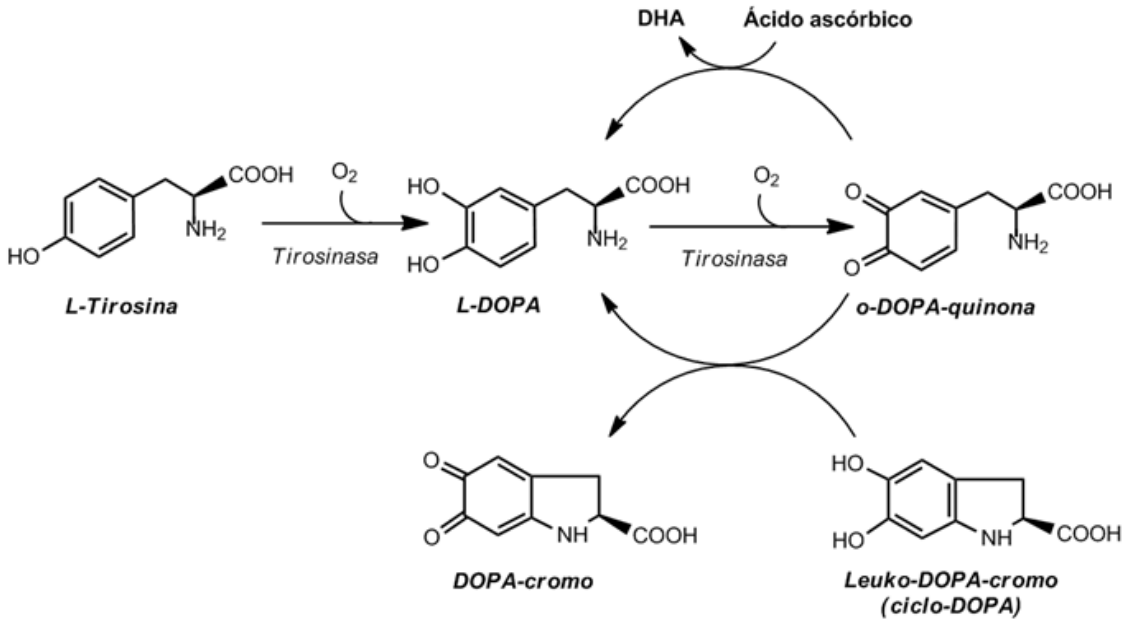


Figura 9

Además, actuando Tirosinasa desde L-Tirosina no se acumulan niveles significativos de L-DOPA (no más de 30 μM) como pusimos de manifiesto en un análisis cinético del mecanismo de la enzima en 1987 (Cabanes et al., 1987) y este L-DOPA es absolutamente necesario para la obtención del ácido betalámico. La acumulación de L-DOPA solo puede hacerse si un reductor, por ejemplo ácido ascórbico, está presente en el medio de reacción de Tirosinasa ya que es capaz de reducir la o-DOPA-quinona a L-DOPA con altísima eficacia, lo que, por otro lado, impide completamente la aparición de ciclo-DOPA, necesario para la obtención de betacianinas.

La inconsistencia de cómo aparece y se acumula ciclo-DOPA a nivel biológico fue resuelta en 2012 (Hatlestad et al., 2012) (Figura 10) cuando se descubrió en *Beta vulgaris* una enzima la CYP76AD1, un nuevo tipo de citocromo P450, capaz de producir ciclo-DOPA a partir de L-DOPA en presencia de ácido ascórbico. La enzima no ha sido purificada y por tanto su mecanismo de reacción no está establecido todavía, pero este no puede pasar por la obtención libre de o-DOPA-quinona ya que la presencia de acido ascórbico impediría la evolución de ésta hasta ciclo-DOPA. Además, la presencia de este citocromo P450 deja a Tirosinasa solo como responsable de acumular L-DOPA en presencia de ácido ascórbico y por tanto desde L-DOPA no se sigue la ruta de pardeamiento enzimático.

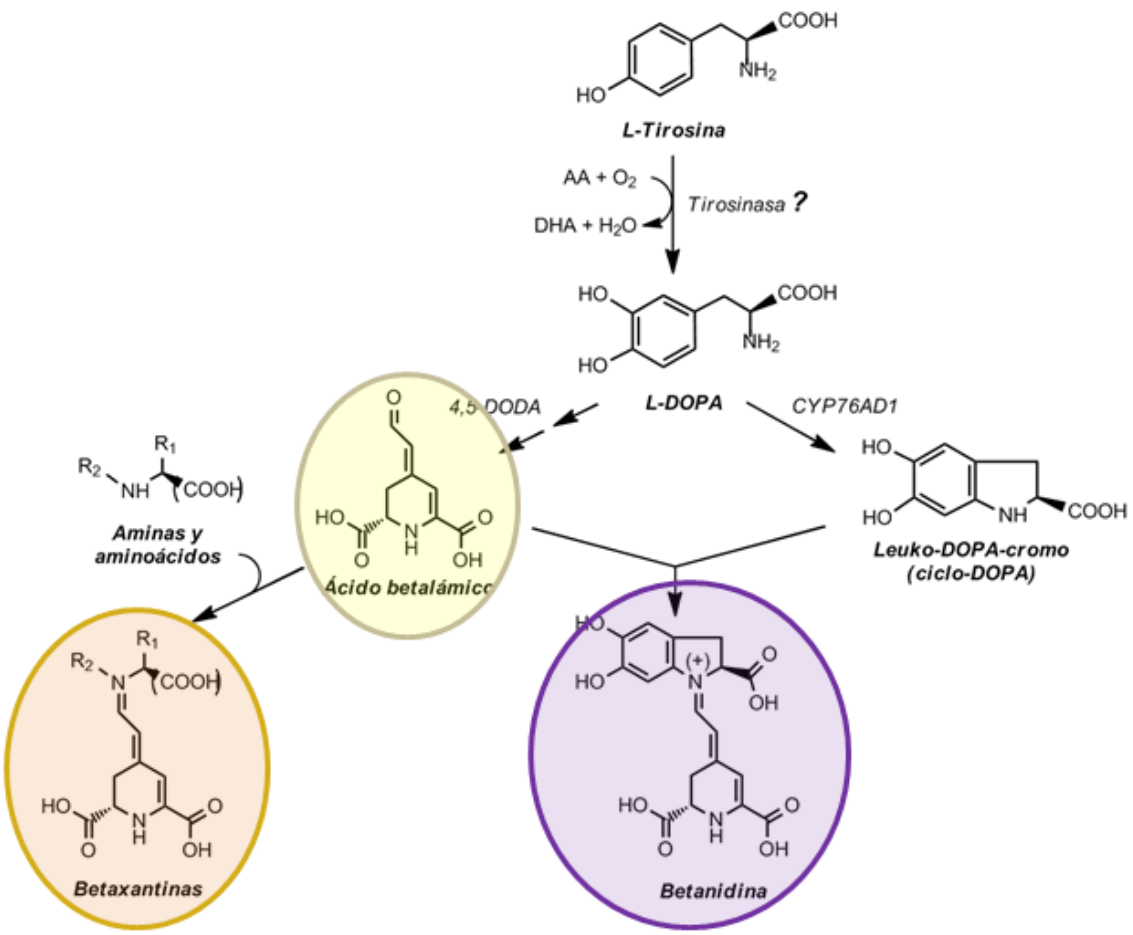


Figura 10

Con respecto a la otra enzima clave de la síntesis de betalaínas en 2009 (Figura 11) se detecta actividad 4,5-DODA en un extracto de *Escherichia coli* donde se había clonado el gen DOD de *Mirabilis jalapa* (Sasaki et al., 2009) y se caracteriza parcialmente la enzima. En 2012 nuestro grupo de investigación purifica y caracteriza la 4,5-DODA de *Beta vulgaris* con una secuencia génica que se había mejorado para su expresión en *E. coli* mediante la sustitución de 151 nucleótidos lo que supuso la modificación de 142 codones (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2012a).La purificación fue hasta pureza electroforética, obteniendo una proteína monomérica de 32 KD que producía ácido betalámico puro desde L-DOPA.

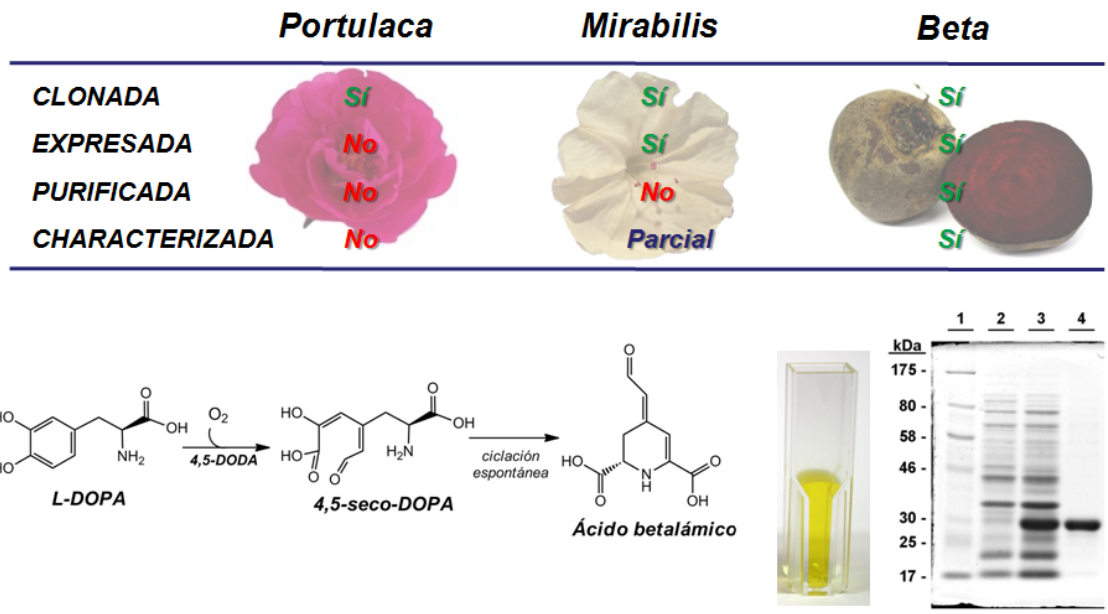


Figura 11

En una búsqueda de proteínas de microorganismos análogas a DODAs vegetales (Figura 12) encontramos en 2013 (Gandía-Herrero y García-Carmona, 2013) una proteína de *E. coli* que tenía un grado de identidad del 36.7% y un 52.9% de similitud con la enzima de *Portulaca grandinflora* y un grado de identidad del 30.2% y de similitud del 48.9% con DODA de *M. jalapa*. Además su estructura cristalina estaba depositada en la base de datos cristalográficos PDB bajo el registro 2PW6, por un consorcio americano dedicado a establecer estructura de proteínas (PSI), sin haber asignado ninguna actividad biológica a esta proteína.

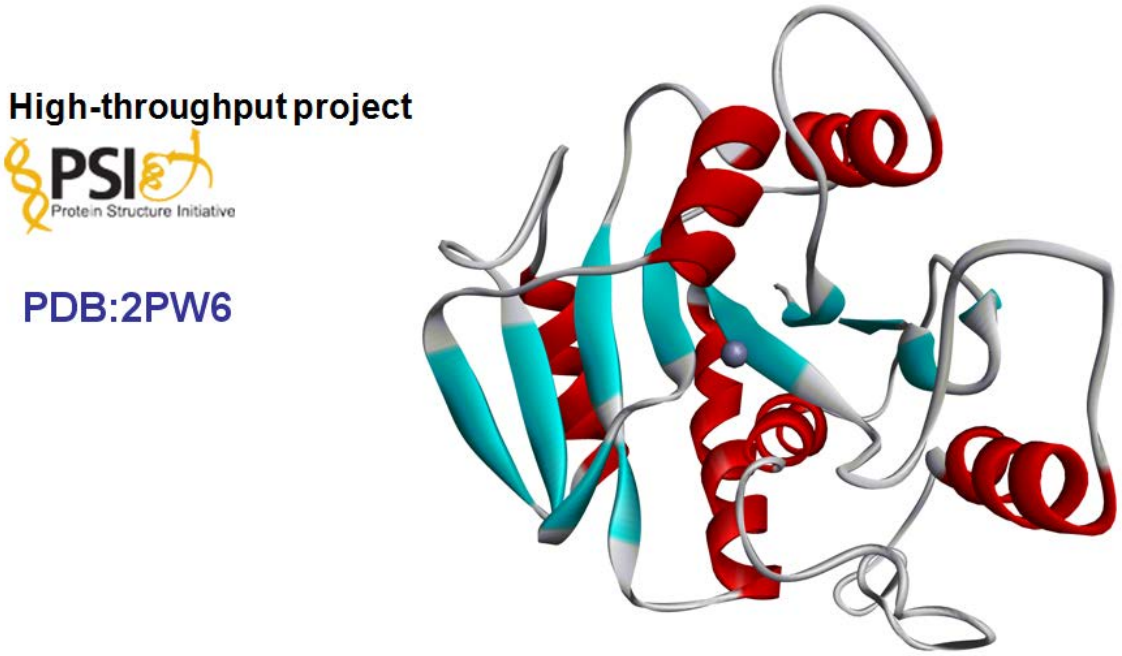


Figura 12

Un análisis del posible centro activo (Figura 13) permitía visualizar los residuos de las tres histidinas características de las DODAs de origen vegetal, como son las histidina 22, 57 y 234 con una interacción directa con el hierro del centro catalítico.

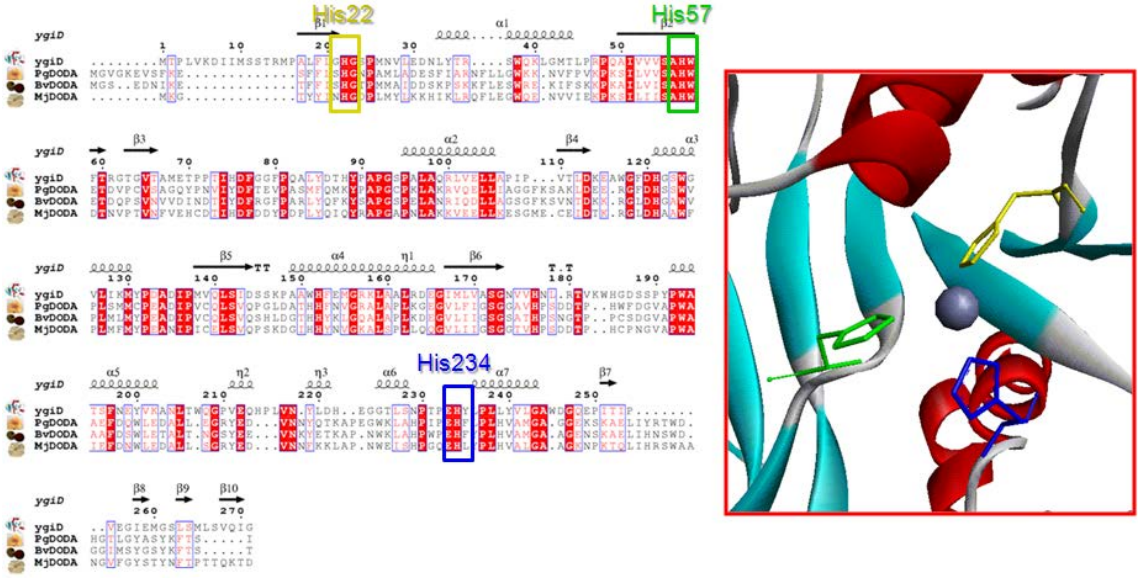


Figura 13

Esta proteína fue clonada y sobre-expresada en *E. coli*, purificada a homogeneidad electroforética dando un monómero de peso molecular de 32 kD. La expresión de su actividad (Figura 14) resultó ser de una DODA que además de romper por el enlace 4,5 también rompe el anillo de L-DOPA por el enlace 2,3 rindiendo por tanto ácido betalámico y muscaflavina, como se pudo identificar con HPLC y espectrometría de masas, y por tanto tiene una especificidad igual que la DODA de *Amanita*.

Así, la DODA de *E. coli* tiene una similitud de secuencia con las DODAs vegetales lo que indica que deben proceder de un tronco de evolución común y a nivel funcional se comporta como la DODA de *Amanita*, pero en todo caso, esta DODA abre la posibilidad de la presencia, al menos, de betaxantinas en procariotas .

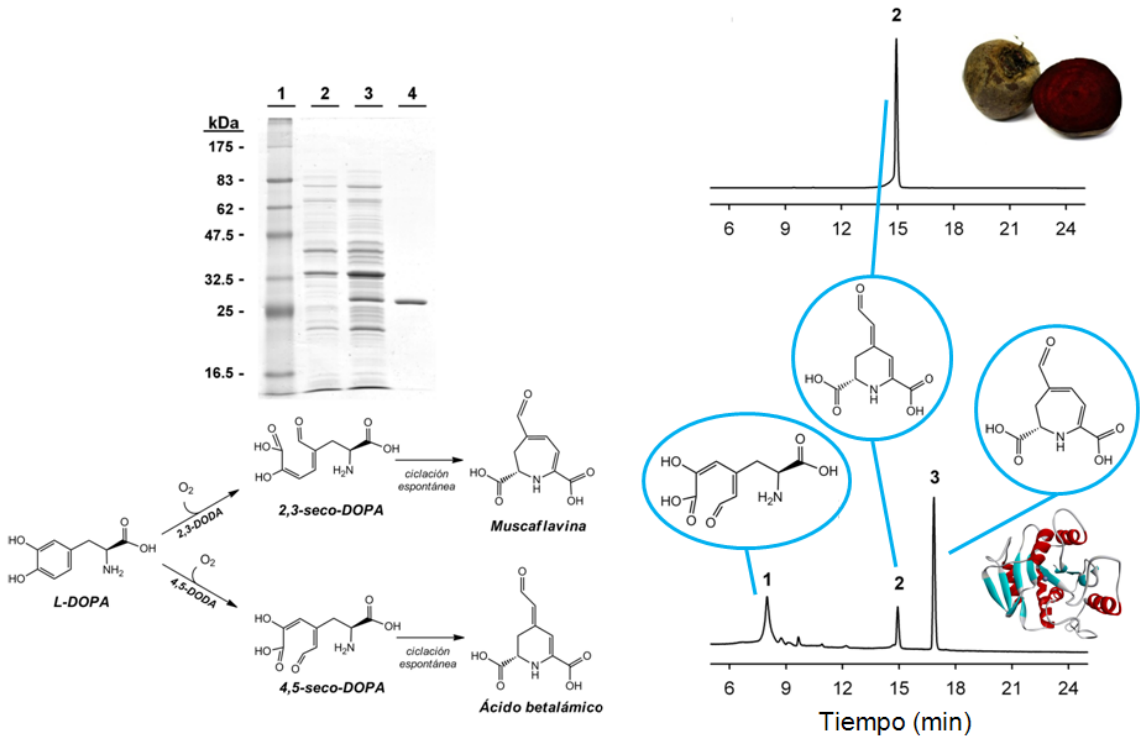


Figura 14

SÍNTESIS ABIÓTICA DE BETALAÍNAS

El interés por poder sintetizar betalaínas, fuera del sistema biológico, deriva de tres limitaciones de los extractos de origen vegetal:

a) Son, en general, mezclas complejas de diferentes betalaínas que hacen difícil obtener compuestos puros. Ello hace imposible establecer correlaciones de estructura-función cuando se trabaja con estas mezclas.
b) Tienen poca concentración de cada una de las betalaínas en los extractos.
c) Se tiene una dependencia del ciclo de crecimiento de la planta completa y de la floración.

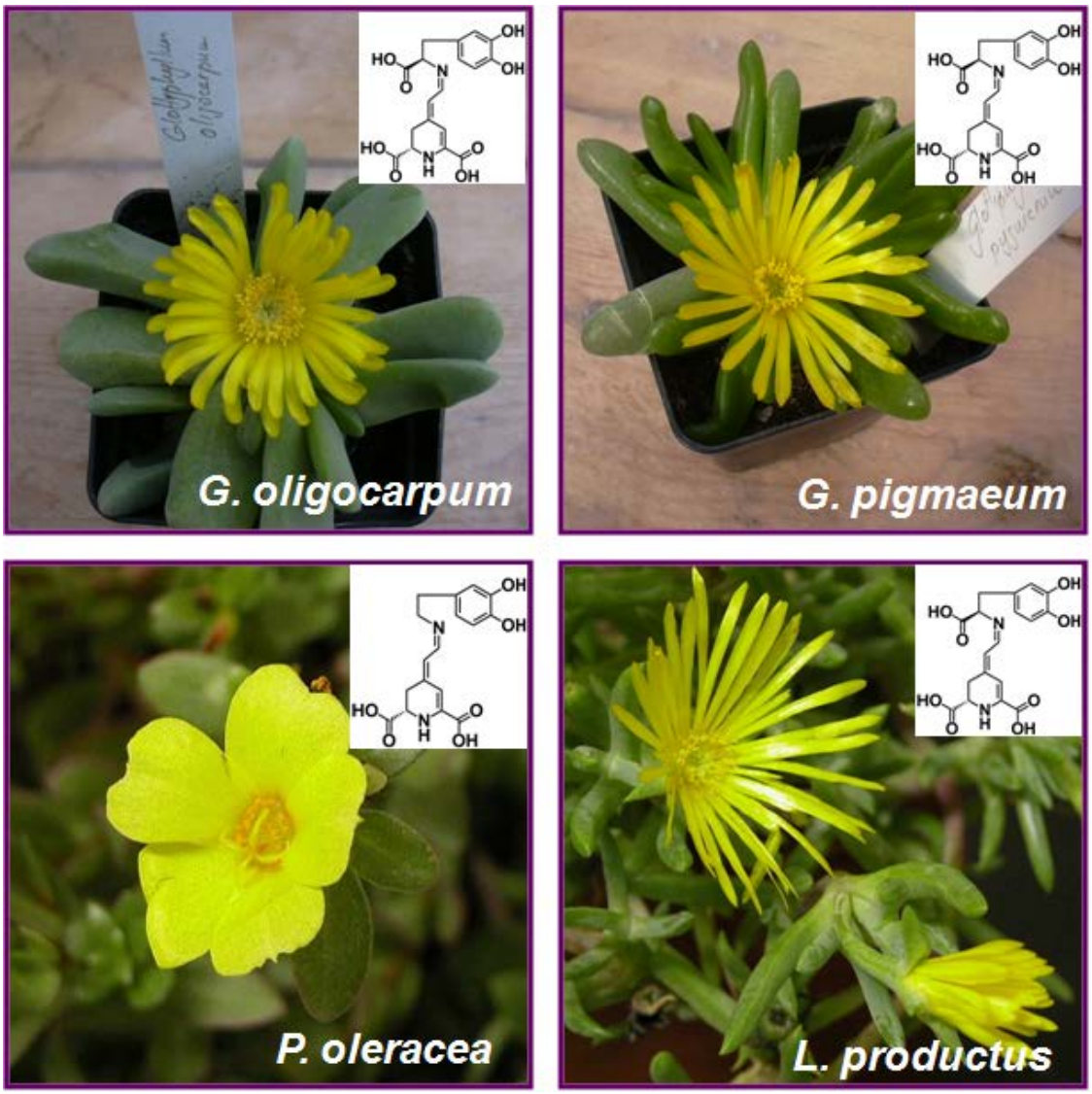


Figura 15

Hasta ahora solo se han encontrado dos betaxantinas puras en extractos de fuentes naturales. La dopaxantina en *Glottiphyllum oligocarpum*, *Glottiphyllum pigmaeum* y en *Lampratum productus* y la dopaminaxantina en *Portulaca oleracea*. En cualquier caso, la dependencia del desarrollo de plantas completas y de su floración hace difícil su aplicación preparativa (Figura15).

La síntesis química del ácido betalámico es muy complicada y con muy bajo rendimiento, por lo que se ha optado por un proceso de semisíntesis (Figura 16) donde se aprovecha la fuente de ácido betalámico que la naturaleza nos proporciona en forma de betanina en el tubérculo de remolacha roja (*Beta vulgaris)* 300-600 mg/Kg. Para ello se somete betanina a pH fuertemente básico con lo que se revierte la base de Schiff liberándose el ácido betalámico y ciclo-DOPA-5-O-glucósido. Si a esta mezcla añadimos en exceso el aminoácido, la amina o el anillo indólico de la betalaína que queremos sintetizar y bajamos el pH a 5-6, se obtiene en una reacción de competencia la

betanina original y la de nuestro interés. Este procedimiento ha permitido desde 1965 (Wyler et el., 1965) obtener patrones cromatográficos de algunas betalaínas, pero quedaban mezclados con betanina, el ciclo-DOPA-5-O-glucósido y el exceso de amina adicionada.

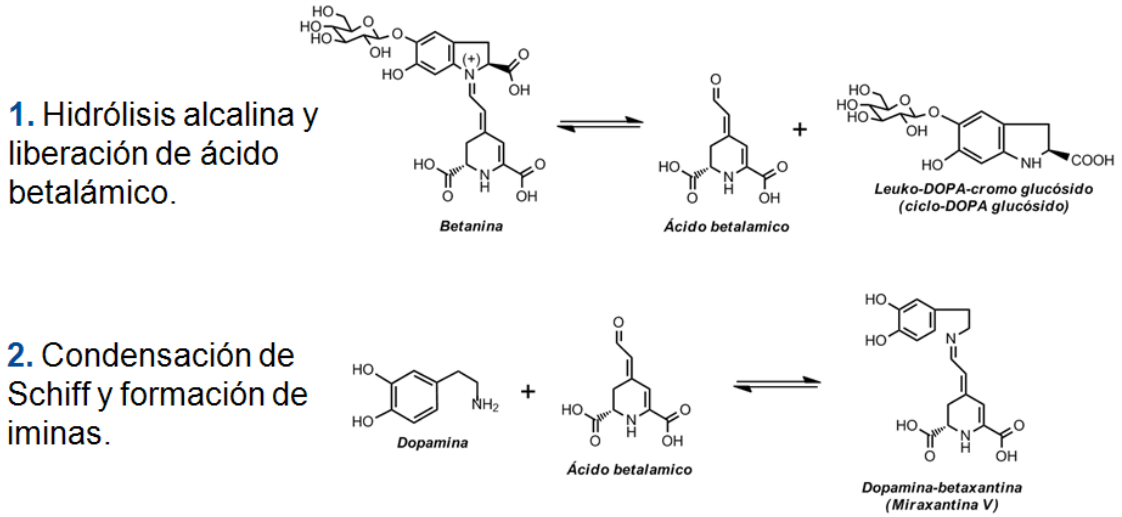


Figura 16

En el año 2006 (Gandía-Herrero et al., 2006) nuestro grupo establece un protocolo para la síntesis a nivel preparativo, en base al anterior procedimiento, combinado con un proceso para la purificación de la betalaína sintetizada.

El protocolo se inicia con la obtención de un extracto crudo de remolacha roja que se somete a ultra-centrifugación y ultrafiltración para eliminar componentes de alto peso molecular y a un proceso cromatográfico para obtener betanina pura con un rendimiento del 75%. Esta betanina se someta en ausencia de oxígeno a un pH de 11.4 para romper la base de Schiff, provocando un cambio de un color violeta de la disolución a amarrillo pálido, A continuación se añade un exceso de la amina o aminoácido, por ejemplo dopamina sin oxígeno, correspondiente a la betaxantina a sintetizar y se baja el pH a 5 con ácido acético. Cuando el color cambia de amarillo pálido a amarillo brillante se pasa a purificar la betaxantina sintetizada mediante una cromatografía preparativa, este procedimiento nos ha permitido sintetizar y purificar más de 30 betaxantinas, algunas descritas en la naturaleza y otras no encontradas hasta ahora.

En 2014, nuestro grupo (Cabanes et al., 2014) ha desarrollado un procedimiento de síntesis de betalaínas en soporte sólido (Figura17). Este procedimiento básicamente consiste en añadir a una disolución de zumo de remolacha roja a pH 11.4 una resina sintética con grupos aminos primarios libres (Lewatit VP OC 1065), esta resina porosa presenta un área de superficie de 50 m^2/gr., se deja 30 minutos de reacción y se baja el pH a 5. Una vez fijado el ácido betalámico se lavan las perlas con tampón acetato de pH 5

obteniéndose un nuevo material derivatizado. Las perlas de resina se pueden introducir en una disolución del aminoácido, amina o indol que queramos unir al ácido betalámico y por desplazamiento obtener la betalaína de interés. Por este procedimiento se han sintetizado tiramina, dopamina y pirrolidina-betaxantinas y la betacianina derivada de indolina.

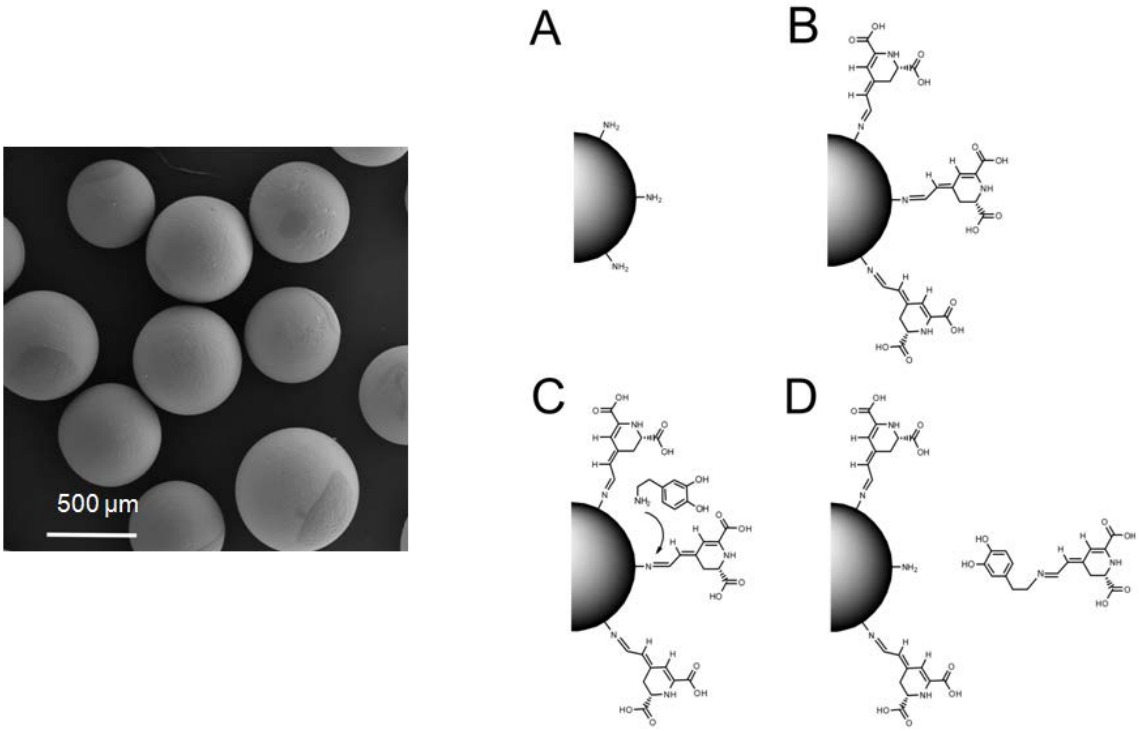


Figura 17

En la Figura 18 se puede ver el proceso de síntesis en columna donde se empaqueta el polímero derivatizado con ácido betalámico y se adiciona la disolución del correspondiente grupo amino, recogiéndose por gravedad el pigmento resultante.

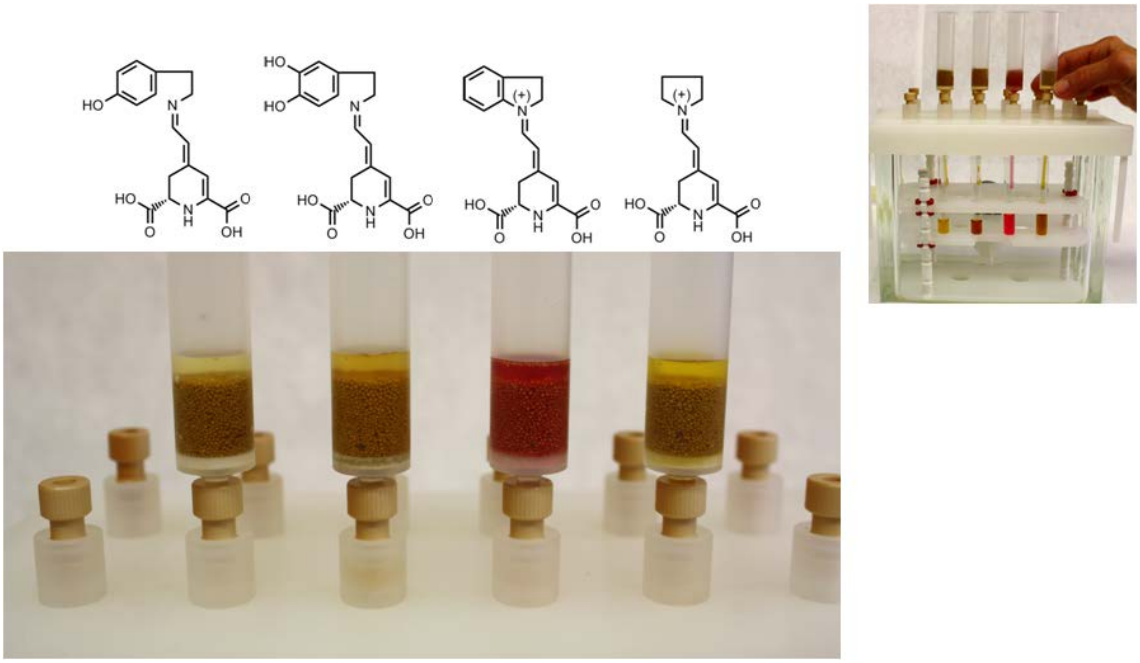


Figura 18

Estas metodologías nos han permitido disponer de betalaínas puras, bien naturales o análogas sintéticas no encontradas en la naturaleza, en cantidad y calidad suficiente para realizar trabajos sistemáticos de establecimiento de relaciones estructura-función.

CAPÍTULO 2

COLOR Y FLUORESCENCIA DE BETALAÍNAS

COLOR EN BETALAÍNAS

El color de las betalaínas es el parámetro que llama más rápidamente la atención y en la décadas 70 y 80 del siglo pasado acaparó la mayoría de los trabajos realizados sobre estos pigmentos. De una manera particular se centraron en la estabilidad de estos pigmentos frente a los parámetros del medio como: temperatura, luz, pH, actividad del agua o naturaleza del disolvente, ya que se consideraron pigmentos de interés para la industria de los alimentos. De hecho el extracto de remolacha roja (Figura19) rico en betanina (la forma 5-glucosilada de betanidina) está autorizado como aditivo alimentario con el nombre "rojo remolacha" en EEUU y en Europa por su fuerte color rojo-violeta. En Europa bajo el código E-162, se comercializa como zumo concentrado y pasteurizado (producido por concentración a vacio de zumo de remolacha hasta alcanzar un 60-65% de sólidos totales) o polvo (producido por liofilización o secado en spray) conteniendo del 0.3 a 1% de pigmento. Se está proponiendo también el uso de pigmentos de diferente origen y de una manera singular de higo chumbo (Sáez et al., 2009) ya que se evitaría la presencia de nitratos y el alcohol biciclico geosmina que están presentes en los extractos de remolacha dándole un desagradable aroma a tierra.

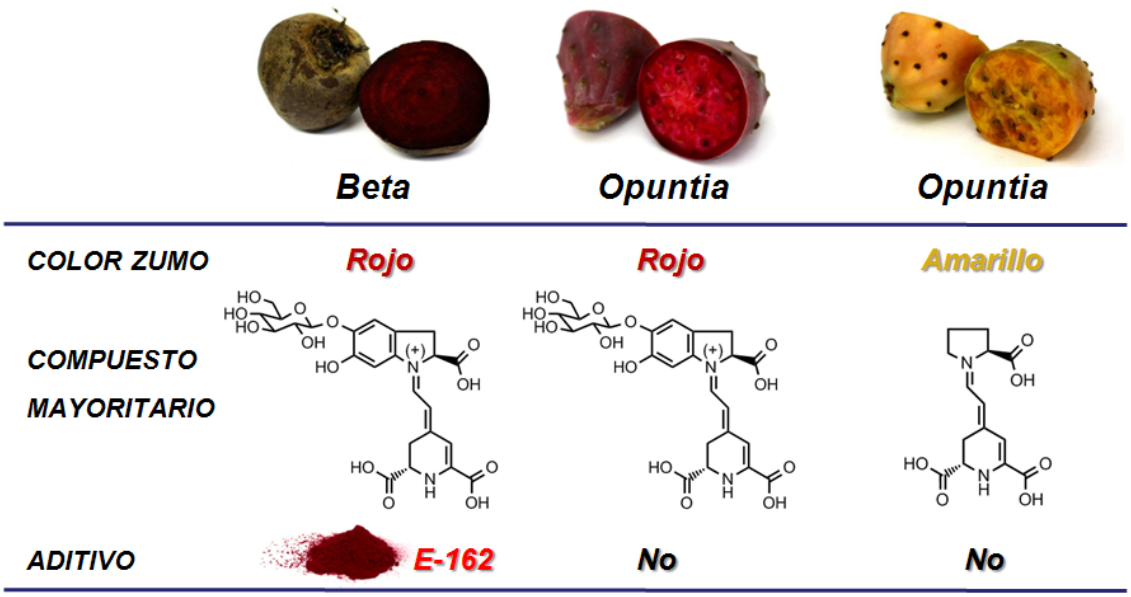


Figura 19

Este aditivo (E-162) suele usarse para colorear en helados, yogurt, queso fresco, embutidos, etc. Además, se está usando en productos de cosmética y de farmacia.

El problema general que presenta su uso es su labilidad frente a parámetros del medio, por ello se sigue haciendo investigación sobre cómo encapsular betalaínas en diferentes matrices. En 2010 (Gandía-Herrero et al., 2010a) decidimos estudiar la estabilización del pigmento mayoritario (casi único) en higo chumbo amarillo, que como se puede ver en la Figura 19, es la indicaxantina que se obtiene de la unión del aminoácido prolina con el ácido betalámico. La estabilización (Figura 20) se realizó mediante la encapsulación del pigmento en maltodextrinas usando un sistema de secado por spray, como resultado se obtiene un polvo amarillo de tamaño grano de aproximadamente 10 μm.

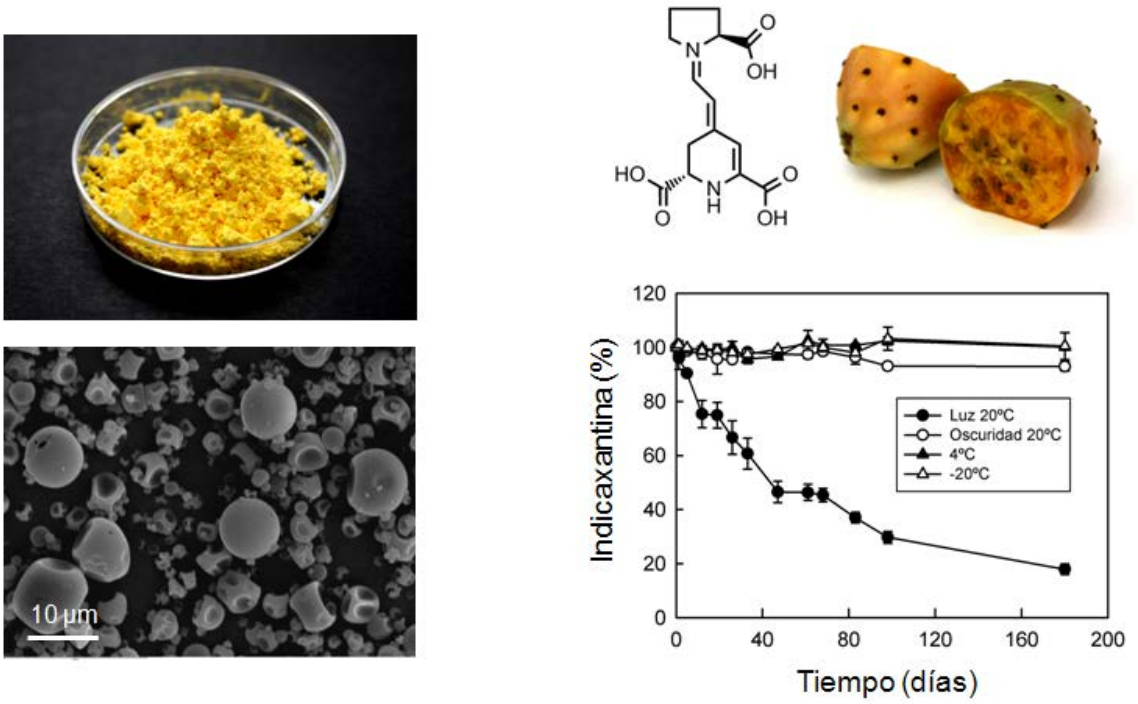
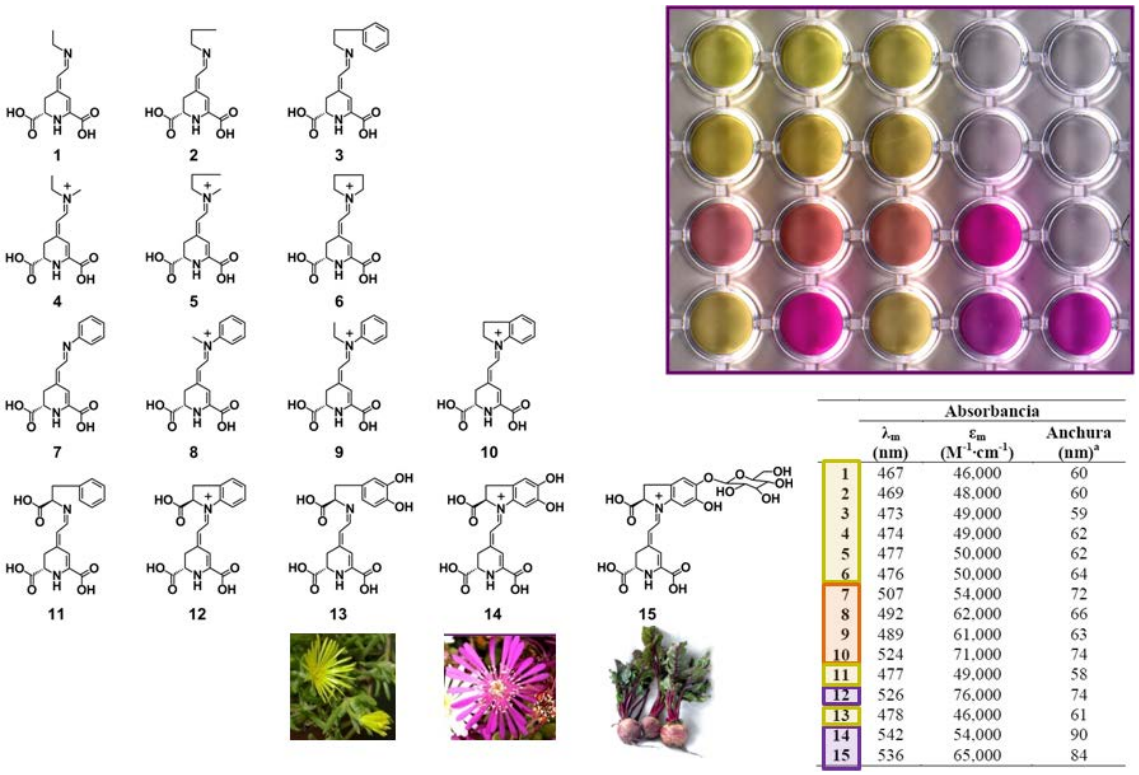


Figura 20

Las pruebas de estabilidad a la luz y a la temperatura demostraron que esta encapsulación mantenía durante meses el pigmento estable entre -20 y +20ºC en obscuridad.

Una cuestión importante cuando se trabaja con pigmentos es entender la relación entre las estructuras y sus diferentes colores. Con esta finalidad creamos en 2010 una librería con las quince betalaínas que se ven en la Figura 21(Gandía-Herrero et al., 2010b).



	Absorbancia		
	λ_m (nm)	ε_m ($M^{-1}\cdot cm^{-1}$)	Anchura (nm)[a]
1	467	46,000	60
2	469	48,000	60
3	473	49,000	59
4	474	49,000	62
5	477	50,000	62
6	476	50,000	64
7	507	54,000	72
8	492	62,000	66
9	489	61,000	63
10	524	71,000	74
11	477	49,000	58
12	526	76,000	74
13	478	46,000	61
14	542	54,000	90
15	536	65,000	84

Figura 21

La dopaxantina (11), betanidina (14) y betanina (15) se extrajeron de flores amarillas de *lampranthus productus,* de flores violetas de *lampranthus* y de remolacha roja (*Beta vulgaris)* respectivamente. El resto de las estructuras se obtuvieron mediante semisístesis, usando las aminas correspondientes.

El color que presentan las betalaínas está relacionado con el sistema resonante de electrones entre los dos átomos de nitrógeno de su molécula. Para las betalaínas con una estructura más simple alrededor del nitrógeno (estructuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, y13), las longitudes de onda de sus máximos de absorción se limita desde 467 a 478 nm, por lo que son de color amarillo. Para las moléculas con resonancia extendida al anillo aromático (estructuras 7,8 y 9) sus máximos se extienden desde 489 a 507 nm, y presentan color naranja. Por último, los compuestos con un sistema aromático análogo, pero estructuralmente obstaculizado por un ciclo intramolecular adicional (estructuras 10, 12,14 y 15) tienen máximos que van de 524 a 542 nm, y presentan color violeta. En la Tabla se enumeran las propiedades espectroscópicas determinadas para todos los pigmentos, incluyendo anchura del espectro a un valor de absorbancia mitad del correspondiente máximo, así como los correspondientes coeficientes de absorción molar calculados que varían desde 46.000, a 76.000 M^{-1} cm^{-1}.

En la figura 22 se muestran espectros característicos de cada grupo y una representación de los valores de los coeficiente de absorción molar frente a las correspondientes longitudes de onda máximas apareciendo una

correlación entre ellos. Puede hacerse una clasificación de las betalaínas en tres grupos que se distinguen de acuerdo a sus propiedades espectroscópicas: Betaxantinas, con valores más bajos para las variables representadas. Betacianinas con los valores más altos de absorbancia y longitudes de onda. Los compuestos 7, 8 y 9, con valores intermedios.

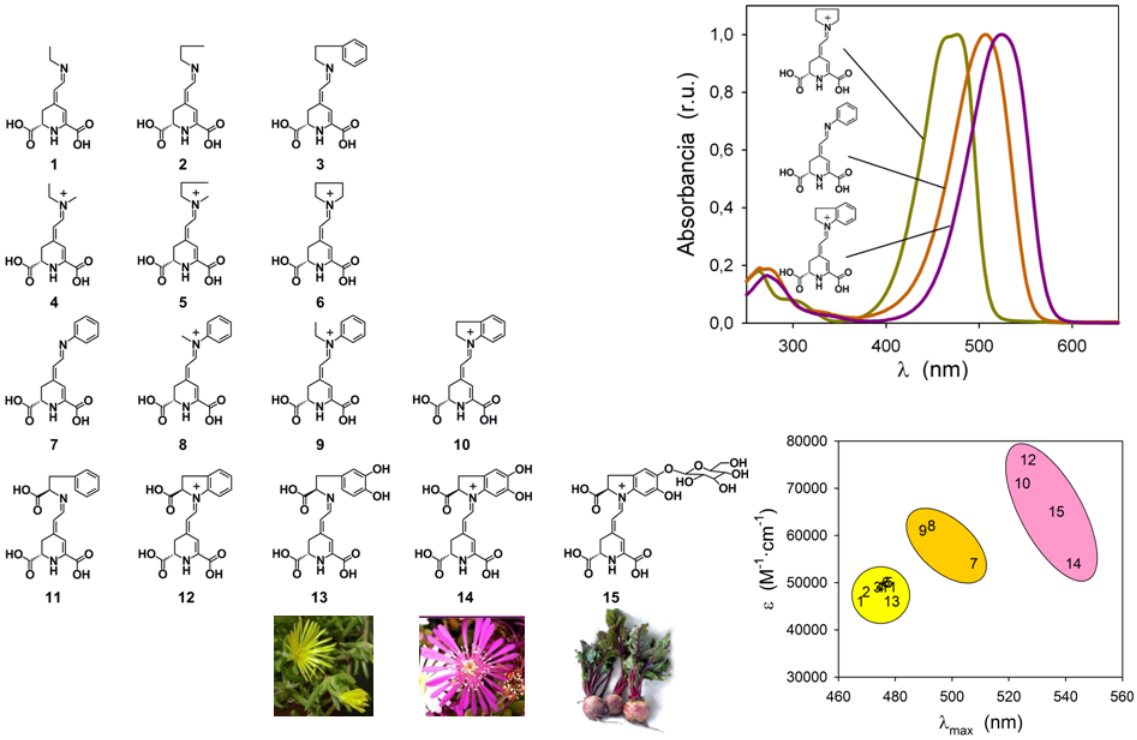


Figura 22

La inclusión en el grupo amarillo de betaxantinas es independiente de la naturaleza de la amina condensada con el resto de ácido betalámico, en la medida en que no haya aromaticidad en resonancia con los átomos de nitrógeno. Por lo tanto, la condensación se puede realizar con aminas primarias y secundarias o con aminoácidos. Como resultado, hay compuestos con propiedades betaxantina que implican ciclos (6), aromaticidad (3, 11, 13), y con una carga positiva en el nitrógeno (4, 5, 6).

Por otro lado, las moléculas con propiedades de betacianina contienen un sistema aromático en resonancia con el ácido betalámico, además de un segundo ciclo fusionado dando una indolina. El compuesto 10 puede ser considerado el más simple de las betacianina. Es probable que el anillo indolina distorsione la planaridad estructural en el sistema de resonancia aromática y ello puede ser responsable de las características de los pigmentos derivados (compuestos 10, 12, 14, y 15).

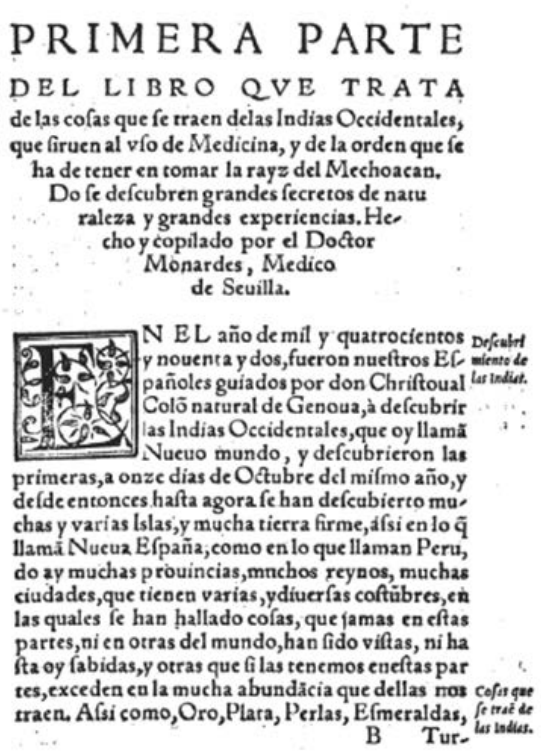
Esto es más evidente cuando se consideran las propiedades del compuesto 7. En este caso, el sistema de resonancia no está restringido, y es probable que la estructura resonante sea completamente plana. Incluso en la

ausencia de un segundo ciclo, la introducción de un grupo metilo o un resto etilo a nivel de nitrógeno puede causar una distorsión menor y esto puede estar detrás de las diferentes propiedades de los compuestos 8, y 9, con respecto al compuesto 7.

FLUORESCENCIA EN BETALAÍNAS

Algunas moléculas sintetizadas en la Biosfera tienen capacidad fluorescente, es decir, son cromoforos capaces de absorber energía en forma de luz de una determinada longitud de onda y emitir parte de esa energía en forma de luz de mayor longitud; este fenómeno puede llegar a detectarse por simple observación cuando la luz que emite esta dentro del espectro de la luz visible (400-750 nm).

La primera observación, de la que se tiene constancia escrita, de un fenómeno de fluorescencia de una molécula biológica, se admite que es la referencia realizada por el médico y botánico español Nicolás Monardes en el año 1565 (Figura 23). Cuando en su libro titulado "*Historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales que sirven en Medicina"* pone de manifiesto que las infusiones (*Lignum nephriticum)* obtenidas de una particular tipo de madera traída de México y conocida como "palo dulce", tenían un peculiar color azul que describe de la siguiente manera "*Toman el palo y hacen unas tajaditas muy delgadas y no muy grandes y echarlas en agua…dentro de media hora se comienza el agua a poner con un color azul muy claro y cuánto más va más azul se torna"*.



PRIMERA PARTE

DEL LIBRO QVE TRATA de las cosas que se traen delas Indias Occidentales, que siruen al vso de Medicina, y de la orden que se ha de tener en tomar la rayz del Mechoacan. Do se descubren grandes secretos de naturaleza y grandes experiencias. Hecho y copilado por el Doctor Monardes, Medico de Seuilla.

EN EL año de mil y quatrocientos y nouenta y dos, fueron nuestros Españoles guiados por don Christoual Colõ natural de Genoua, à descubrir las Indias Occidentales, que oy llamã Nueuo mundo, y descubrieron las primeras, a onze dias de Octubre del mismo año, y desde entonces hasta agora se han descubierto muchas y varias Islas, y mucha tierra firme, assi en lo q̃ llamã Nueua España, como en lo que llaman Peru, do ay muchas prouincias, muchos reynos, muchas ciudades, que tienen varias, y diuersas costũbres, en las quales se han hallado cosas, que jamas en estas partes, ni en otras del mundo, han sido vistas, ni hasta oy sabidas, y otras que si las tenemos enestas partes, exceden en la mucha abundãcia que dellas nos traen. Assi como, Oro, Plata, Perlas, Esmeraldas,

Descubrimiento de las Indias.

Cosas que se traẽ de las Indias.

B Tur-

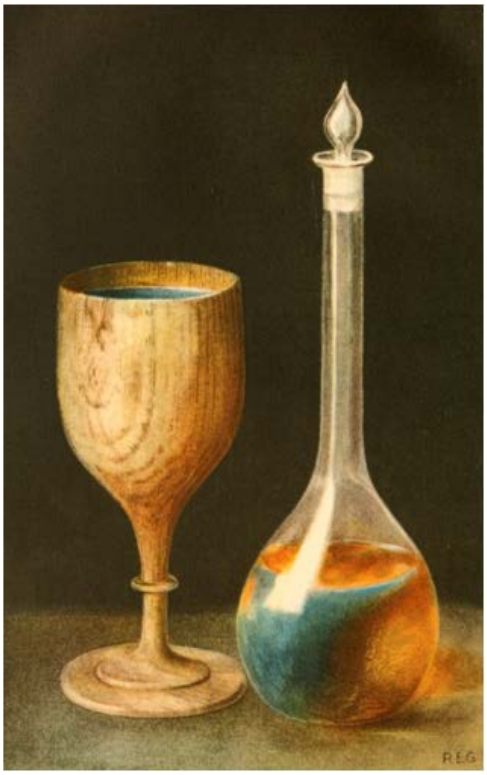


Figura 23

Este fenómeno intrigó a grandes científicos como Robert Boyle que en 1664 describió que el peculiar color azul se manifestaba de forma dependiente del pH, o a Isaac Newton que en 1672 incluye la observación de este fenómeno en sus esfuerzos para formular una teoría de la luz y el color.

El compuesto fluorescente recibió el nombre matlalina (de Matlali, palabra azteca que significa azul) pero su estructura química y origen no se aclaró hasta el año 2009 (Acuña etal., 2009) (Figura 24) cuando se realiza un extracto del palo dulce y se encuentra que se obtienen de forma muy abundante unas raras y no fluorescentes glicosil-hidroxidihidrochalconas denominadas coatlina A y coatlina B e inesperadamente, se observó que a temperatura ambiente en una solución acuosa ligeramente alcalina (pH=7.5) coatlina B evolucionaba hacia un solo producto, emisor de luz azul, la matlalina.

El proceso era espontáneo y suponía dos pasos de oxidación con oxígeno molecular de dos estructuras de chalconas orto-difenolicas que se estabilizaban mediarte ataque intramoleculares y alguna adición de agua.

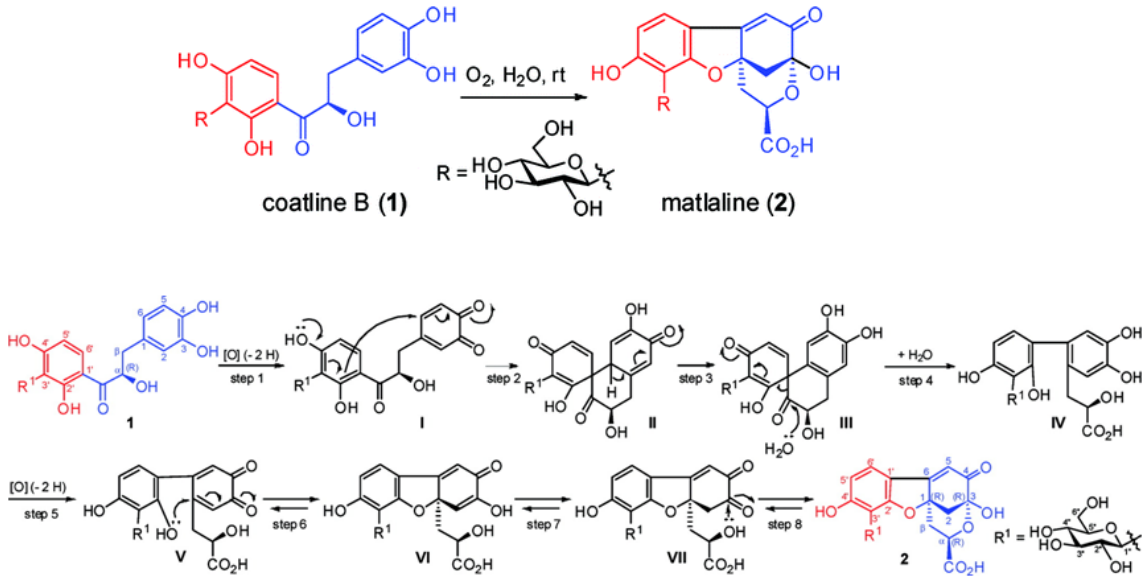


Figura 24

Existen referencias de fluorescencia en el espectro visible detectadas en el mundo animal, la fluorescencia que presentan algunos periquitos o camarones (Figura 25) es de reciente descubrimiento (Arnold et al., 2002; Mazel et al., 2004) y tienen relevancia a nivel fisiológico como señales que incluso sirven en la elección de pareja.

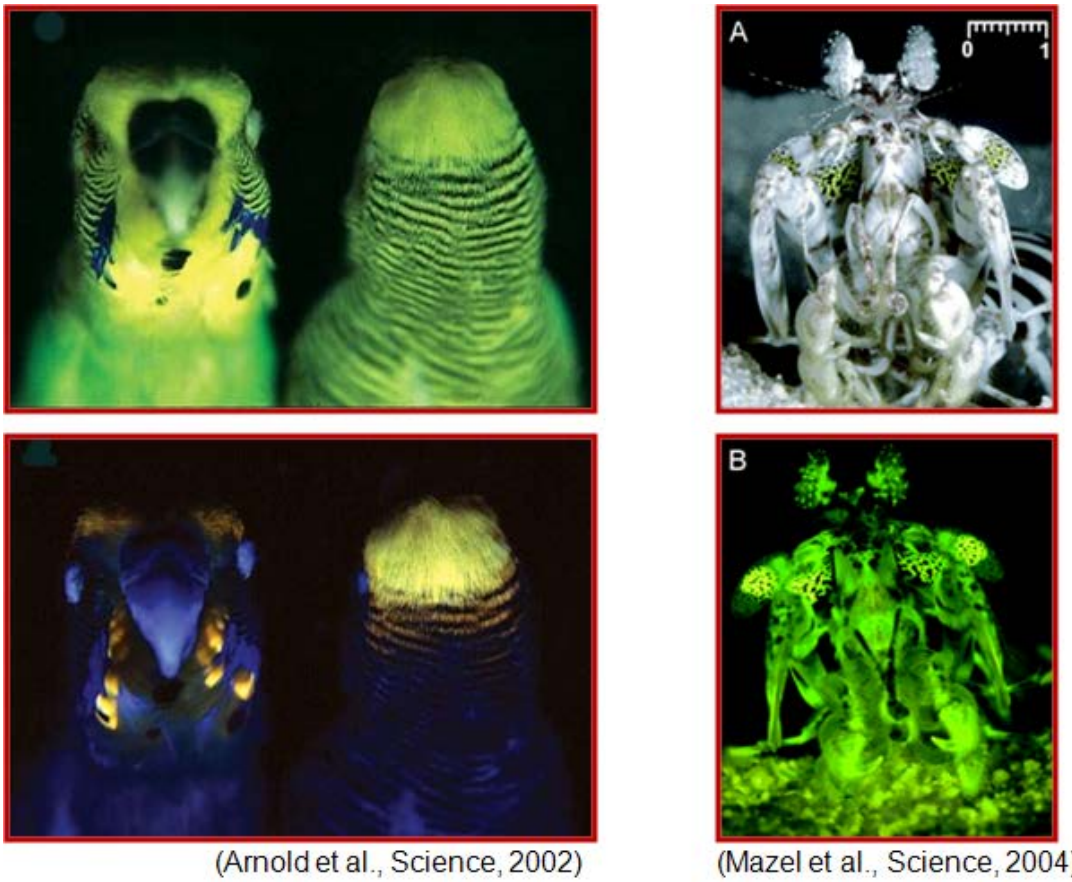


Figura 25

Hasta 2005 en el reino vegetal se habían detectado fluorescencia en el visible de la quinina, de la clorofila y de beta-caroteno (Lagorio et al. 2015). En el año 2005 nuestro grupo de investigación publica el original descubrimiento de que las betaxantinas presentan fluorescencia en el rango visible, este descubrimiento se produce durante la elaboración de la tesis doctoral de Fernando Gandía (Figura 26). Cuando Fernando estaba realizando extractos de los pétalos de diferentes flores y los conservaba en el congelador a -80ºC, al sacar un extracto congelado de *Lampranthus* amarillo observó que presentaba un color amarillo brillante. Tras unos minutos de trabajo en el fluorímetro quedó confirmado: este extracto presentaba una fuerte fluorescencia. Se comprobó que todos los extracto amarillos de diferentes flores tenían fluorescencia mientras que los extractos de flores rojas no la presentaban. Es decir, las betaxantinas tienen fluorescencia en el visible y las betacianinas no (Gandía-Herrero et al 2005a).

Este conocimiento llevó de inmediato a una pregunta ¿Esta fluorescencia se presenta en la naturaleza? ¿Podemos fotografiar esa fluorescencia?

Para poder realizar fotografías fluorescentes se debe trabajar en cámara obscura y de acuerdo con los típicos espectros de excitación y emisión de las betaxantinas (ver figura 26) se colocaron un filtro en el flash que solo dejaba pasar la luz de 360 a 480 nm y sobre el objetivo un filtro que solo dejaba pasar la luz de más de 490 nm.

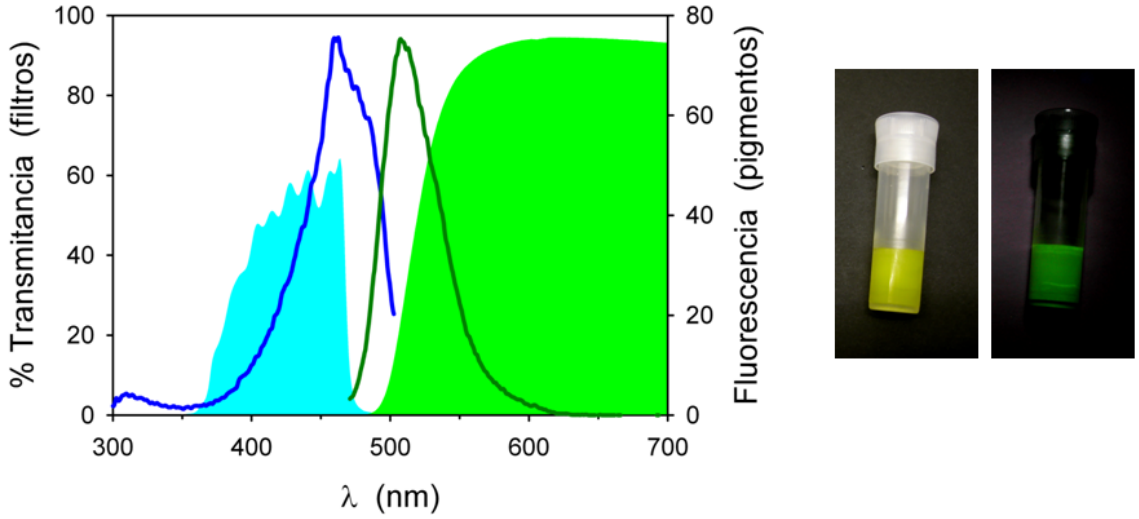


Figura 26

De las flores que estábamos estudiando nos pareció que *Portulaca grandiflora* podía ser un modelo ideal ya que disponíamos de flores amarillas y flores blancas sin ningún pigmento betalámico.

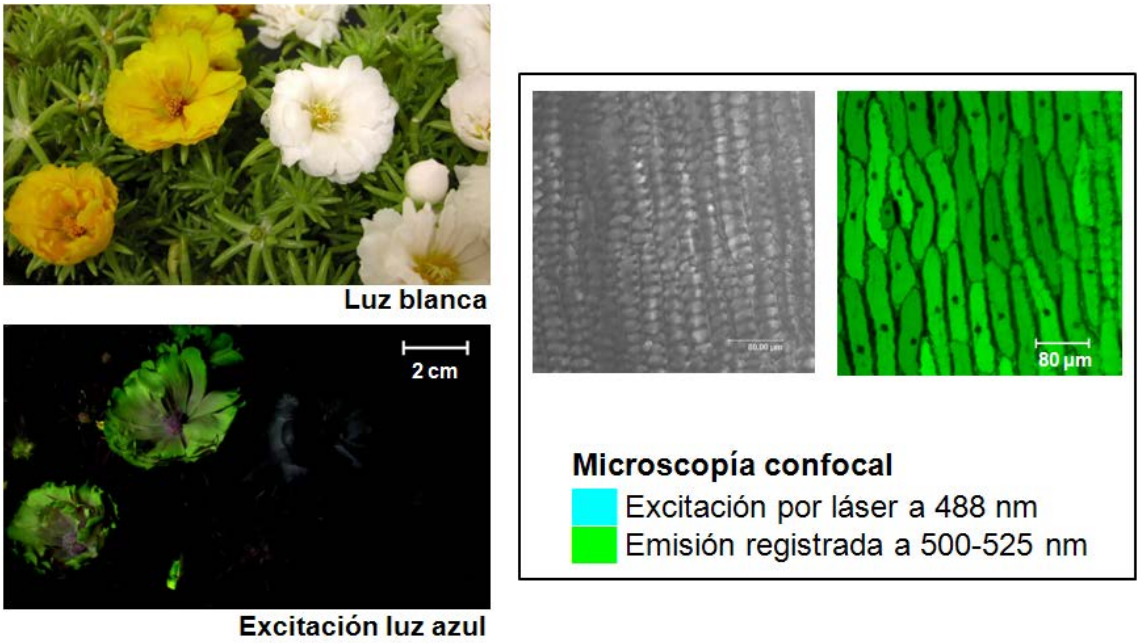


Figura 27

En la fotografía (Figura 27) se puede ver como con luz controlada por los filtros, las flores amarillas dan fluorescencia y con un microscopio confocal puede observarse la vacuola fluorescente donde se almacenan las betaxantinas, que ocupa prácticamente toda la célula. Similares fotografías se pueden hacer con *Lampranthus* amarillo donde los pétalos que solo contienen dopaxantina dan una intensa fluorescencia (Figura 28).

Figura 28

El siguiente objetivo fue fotografiar flores de *Mirabilis jalapa* conocida como Dondiego de noche. Esto representa entrar en un tema altamente complejo, ya que como puede verse en la figura 29, Dondiego de noche es capaz de ofrecer en el mismo tronco una amplia policromía, dando flores rojas,

amarillas, rosas, blancas o mezcla de estos colores en la misma flor, hecho que no se puede explicar con las leyes de Mendel y por ello han sido objeto de múltiples investigaciones.

Figura 29

Hemos tenido que esperar al año 2014 (Suzuki et al., 2014) para encontrar una explicación a esta policromía. Para ello se secuenciaron en flores de diferentes colores los ARN mensajeros responsables de la expresión en *Mirabilis* de la enzima *CYP76AD3*, enzima encargada de catalizar la etapa de L-DOPA a ciclo-DOPA. En esas secuencias se encontró que tenían un intrón y dos exones y en las flores variegadas la secuencia del intrón estaba interumpida por un elemento de transposición, dTmj1. Así pues, un transposón móvil es el responsable de la variedad de colores en *Mirabilis jalapa*.

En la figura 30 se muestran las de una flor de *Mirabilis jalapa* dividida en dos claros sectores rojo y amarillo como puede observarse bajo luz blanca. Cuando se fotografía bajo condiciones de obtener fluorescencia se puede ver que la parte amarilla fluorece y la parte roja no. La composición de las zonas amarillas era básicamente dopamina-betaxantina y el de las zonas rojas era dopamina-betaxantinas mas betanina, lo que significaba que en presencia de betanina la dopamina-betaxantina aparentemente no tenia fluorescencia.

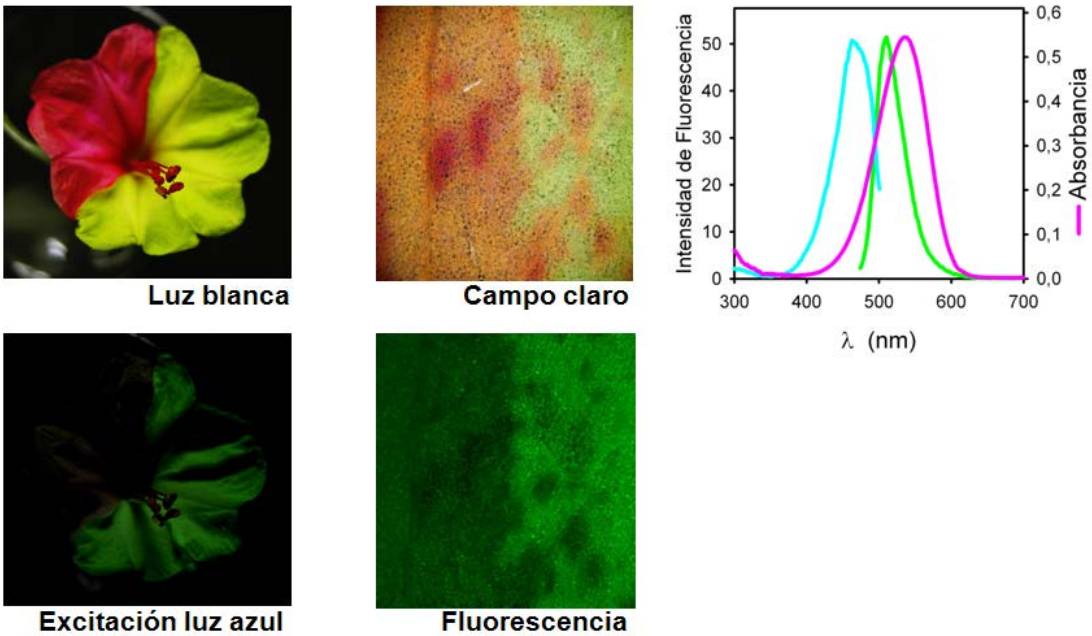


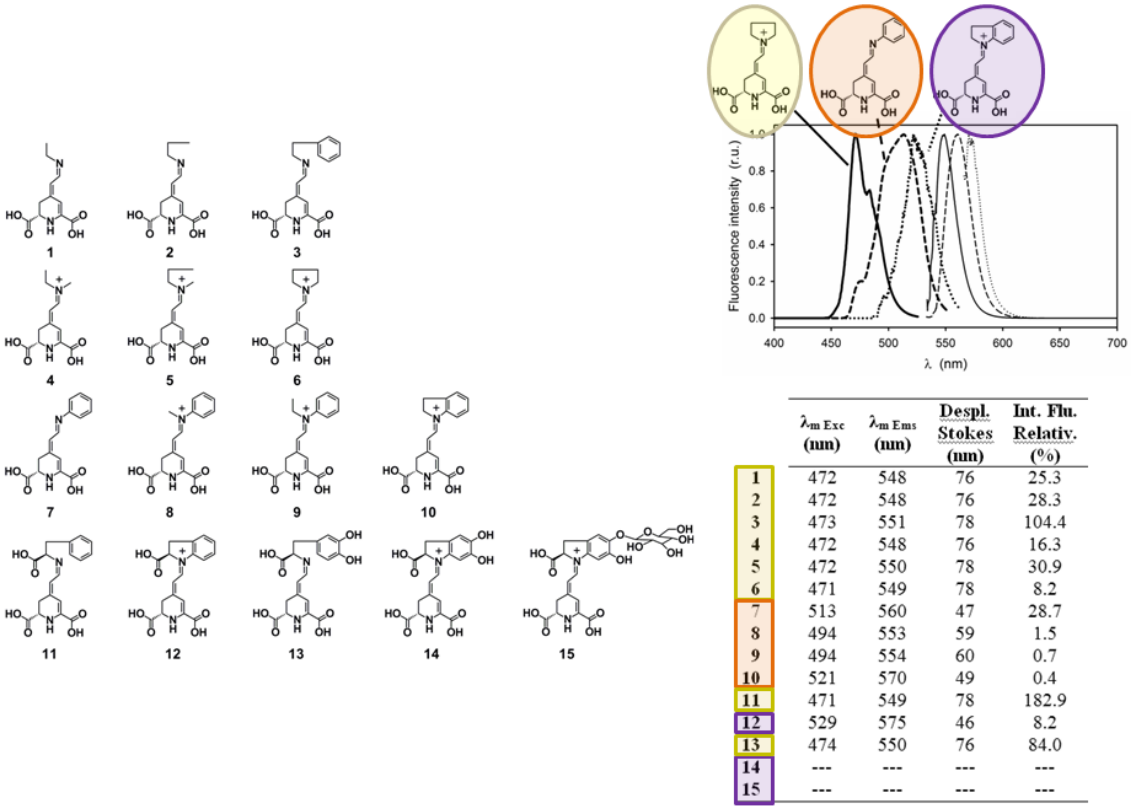
Figura 30

Esto pudo explicarse cuando se vieron los espectros de excitación y emisión de dopamina-betaxantina y el de absorbancia de betanina ya que esta absorbe en las mismas longitudes que emite domina-betaxantina actuando de filtro interno (Gandía-Herrero et al. 2005b).

Estos efectos fluorescentes en las flores pueden desempeñar una función fisiológica notable ya que los agentes polinizadores presentan sensibilidades distintas y perciben los colores de diferente forma (Figura 31). Se ha encontrado que las abejas que polinizan numerosas plantas tienen un receptor verde y que son capaces de percibir con mayor eficacia los objetos brillantes. Así mismo existen murciélagos polinizadores de cactus que poseen un único receptor visual cuyo máximo coincide con la luz de fluorescencia de las betaxantinas.

Figura 31

Para establecer la relación entre la estructura de betalaínas y sus características de fluorescencia se examino la biblioteca de 15 compuestos para esta propiedad (Gandía-Herrero el al., 2010b). En la Figura 32 se recogen los máximos de excitación, de emisión, la diferencia entre ambos máximos (desplazamiento de Stokes) y la intensidad de fluorescencia relativa.



	$\lambda_{m\ Exc}$ (nm)	$\lambda_{m\ Ems}$ (nm)	Despl. Stokes (nm)	Int. Flu. Relativ. (%)
1	472	548	76	25.3
2	472	548	76	28.3
3	473	551	78	104.4
4	472	548	76	16.3
5	472	550	78	30.9
6	471	549	78	8.2
7	513	560	47	28.7
8	494	553	59	1.5
9	494	554	60	0.7
10	521	570	49	0.4
11	471	549	78	182.9
12	529	575	46	8.2
13	474	550	76	84.0
14	---	---	---	---
15	---	---	---	---

Figura 32

Como puede verse, se distinguen los mismos tres grupos que para el color, así betaxantinas presentan máximos de longitudes de onda de excitación entre 471 y 474 nm, mientras que los máximos de emisión se encuentran en el rango de 548 a 551 nm. Para aquellas betacianinas donde se pudo detectar fluorescencia, los compuestos 10 y 12, las longitudes de onda de excitación máxima fueron 521 y 529 nm, y máximos de emisión a 570 y 575 nm, respectivamente. Los compuestos 7, 8 y 9 presentan características intermedias de fluorescencia con longitudes de onda máximas de excitación entre 494 y 513 nm, y longitudes de onda máximas de emisión entre 553 y 560 nm.

Por otro lado, se observa que la presencia de algunos grupos en la estructura afecta al nivel de fluorescencia. Por ejemplo, la presencia de un grupo carboxilo en posición α respecto del nitrógeno produce un aumento de fluorescencia, ver pigmentos 11 y 12 respecto de sus descarboxilados 3 y 10, o por otro lado, la presencia de grupos hidroxilo produce una disminución de fluorescencia, ver las moléculas 13 y 14 con respecto de las 11 y 12.

Con el fin de cubrir toda la gama de posibles longitudes de onda tanto para excitación como emisión, se registraron espectros de fluorescencia en tres dimensiones para todas las moléculas (Figura 33). La matriz de excitación-emisión derivada de los datos de la espectroscopia de fluorescencia se muestra gráficamente. Los resultados proporcionan una caracterización completa de las propiedades fluorescentes de las betalaínas, mostrando picos de fluorescencia centrados en las correspondientes longitudes de onda máximas de excitación y emisión.

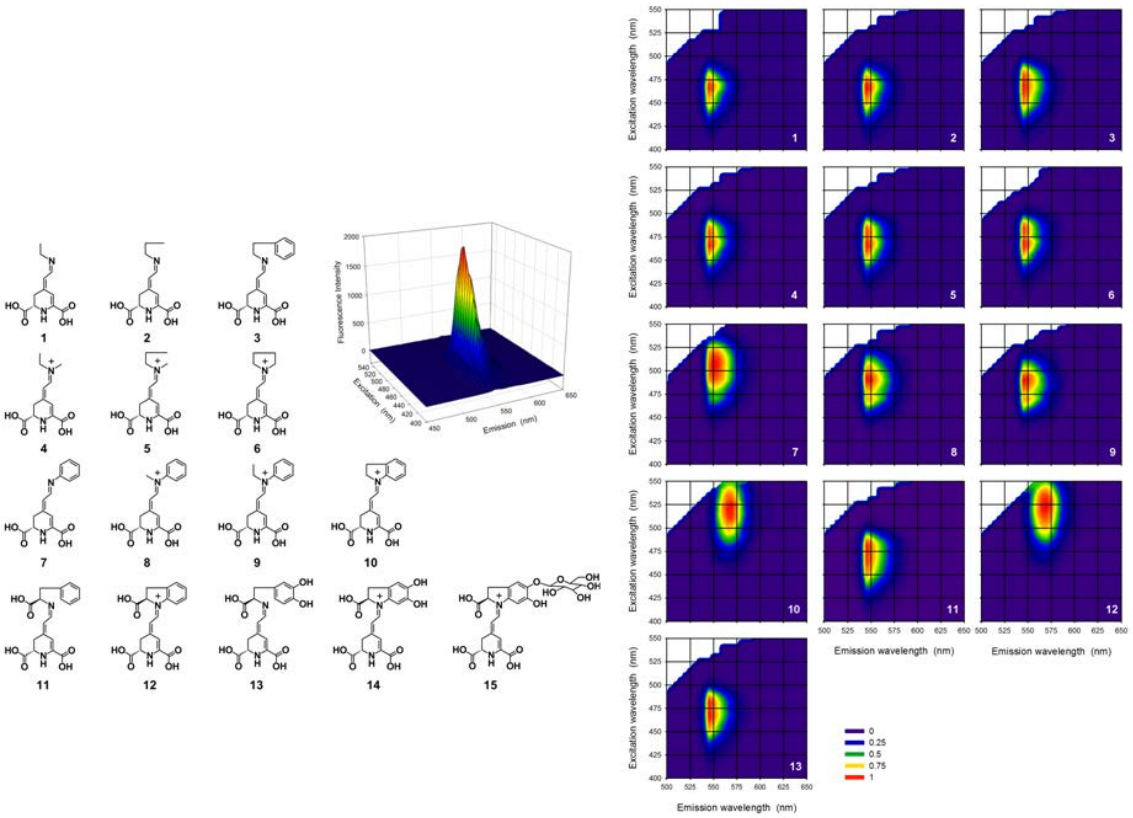


Figura 33

El mismo comportamiento se observa para las moléculas 1, 2, 3,4, 5, 6, 11, y 13 (betaxantinas), y la forma del pico y la posición son casi iguales para las moléculas 10 y 12 (betacianinas). Aunque las moléculas 7, 8, y 9 presentan propiedades intermedias, el compuesto 9 está más cerca de betacianinas en su forma espectral y en su posición. Además, los compuestos 8 y 9 presentan picos secundarios de fluorescencia que se centran en las longitudes de onda excitación-emisión de 470-545 nm y 470-550 nm, respectivamente.

CAPÍTULO 3

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BETALAÍNAS

ACTIVIDAD BIOLÓGICA EXPRESADA IN VITRO

En los últimos años las betalaínas han mostrado un alto potencial bioactivo lo que ha hecho crecer enormemente el interés por estos pigmentos.

Como preámbulo al tema debemos advertir que con frecuencia los conceptos antioxidante y antirradical no se diferencian en la literatura. Ello puede deberse a que la medida de la capacidad antioxidante de las moléculas se puede hacer de forma experimental como la eliminación de un radical libre. En esta sección se utilizará el término antirradical cuando la actividad se ha evaluado a través de un ensayo basado en radical (ABTS, DPPH u ORAC) independientemente de los términos originales utilizados por los autores. El término antioxidante se limitará a medidas experimentales donde no estén implicados radicales libres.

La actividad antirradical y antioxidante es una medida de la capacidad de retrasar o prevenir la oxidación de proteínas, lípidos, carbohidratos, y el daño causado al ADN por especies reactivas de óxigeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Halliwell et al., 1995). Los antioxidantes son considerados como los responsables de asegurar, en buena parte, la salud debido a su capacidad de eliminar las especies reactivas y los radicales libres (Khan y Giridhar, 2011).

En un trabajo pionero del año 1998 realizado por nuestro grupo en colaboración con el grupo de Fisiología Vegetal encabezado por el profesor Romualdo Muñoz (Figura 34), se midió la capacidad antirradical de las betacianinas y betaxantinas, previamente separadas de un extracto de remolacha roja. Para este fin se utilizó el método del ABTS, método que consiste en medir la eliminación del radical libre y estable ABTS a 414 nm cuando se adicionan las betalaínas. Los resultados demuestran que las betacianinas tienen el doble de capacidad antiradical que las betaxantinas (Escribano et al., 1998).

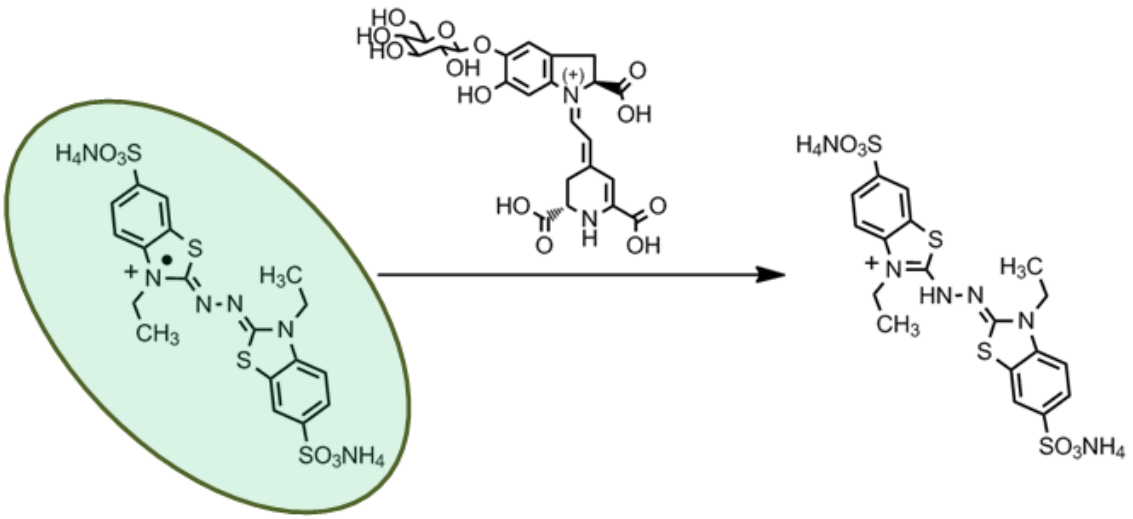


Figura 34

Posteriormente, otros autores demostraron también esta actividad de las betalaínas procedentes de otras fuentes como de *Opuntia ficus-indica* (Butera et al., 2002) o de plantas *Amaranthaceae* (Cai et al., 2003). En todos los casos esas capacidades eran superiores a la de los conocidos compuestos secuestradores de radicales libres como son: acido ascórbico, catequina o Trolox, este ultimo un análogo sintético de la vitamina E.

En el caso de las betacianinas, la capacidad antirradical quedaba mermada con la glucosilacion de uno de sus grupos hidroxilos. Sin embargo, la presencia de estos grupos no es necesaria para expresar actividad. Esto contracta con los resultados obtenidos para los flavonoides, donde la ausencia de actividad ha sido descrita en los compuestos deshidroxilados como flavonas, isoflavonas y flavononas (Cai et al., 2006).

También se observó que betanidina es más potente contra los radicales peroxilo y de óxido nítrico que betanina lo que indica que la glucosilación reduce la capacidad antirradical de las betacianinas (Taira et al., 2015).

Para cuantificar la importancia de los grupos hidroxilos de las betalaínas en su capacidad antirradical-antioxidante, en 2009 (Gandía-Herrero et al.,2009) nuestro grupo sintetizó una librería de compuestos betalámicos (Figura 35) que poseían dos hidroxilos fenólicos o solo uno en diferente posición o ningún grupo con una estructura aromática o con una cadena lineal. La capacidad antirradical de los miembros de la librería se evaluó, a pH 7, en unidades TEAC (capacidad equivalente a Trolox) y los resultados pueden verse en la figura. Todas las betalaínas estudiadas presentan actividad, lo que indica que existe una “actividad intrínseca” no ligada a la presencia de grupos hidroxilos o a la aromaticidad en la estructura del pigmento. Esta capacidad intrínseca mejora con la presencia de grupos hidroxilos con un aumento desde 2.5 a 4 unidades TEAC con un grupo hidroxilo y hasta 5,8 unidades con dos grupos hidroxilos.

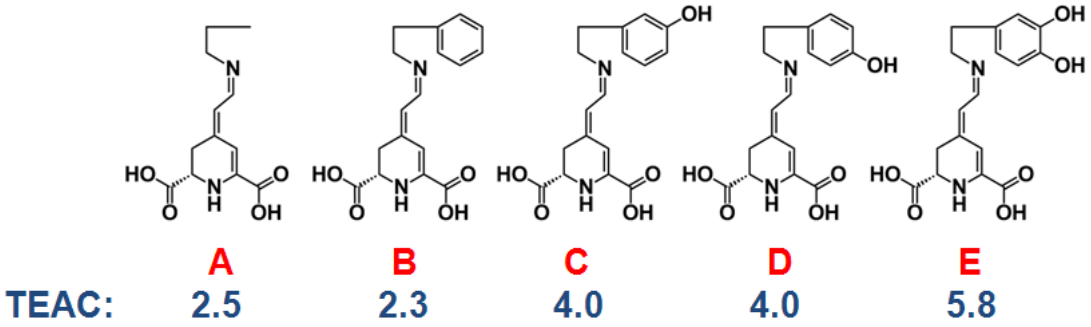


Figura 35

La capacidad antioxidante de los compuestos de la librería se evaluó mediante el ensayo del FRAP donde se mide la capacidad de reducir Fe^{+3} a Fe^{+2} en disolución a pH 3.6. Los resultados mostraron que los compuestos 1,2,3,4 tenían una equivalencia molecular con trolox de 1.1 mientras que el compuesto 5 tenía una equivalencia de 3.3.

El concepto de “actividad intrínseca” fue evaluado en un posterior trabajo al poner de manifiesto que el ácido betalámico puro poseía actividad antirradical y antioxidante por sí mismo, con un valor de TEAC de 2.7 (Gandía-Herrero et al., 2012b).

Para evaluar la relación estructura-actividad de las betalaínas se midió la capacidad antirradical con la librería de 15 betalaínas (Figura 36). La actividad de 2.4 unidades TEAC de las estructuras más simples 1,2,3 y 11 se ve disminuida con las aminas secundarias de las estructuras 4 a 6 y se ve reforzada por la ampliación del sistema resonante con un anillo aromático en 0.4 unidades TEAC. Este incremento es mayor si es una estructura tipo indolina (10). Igualmente se puede observar el efecto de la estructura tipo indolina al comparar las estructuras 3 y 11 con las 10 y 12, en este caso implicando un aumento de 1.6 unidades. Por otro lado, las estructuras 13 a 15 manifiestan el efecto potenciador de los grupos hidroxilos (Gandía-Herrero et al., 2010b). La presencia de dos grupos hidroxilo en la molécula aumenta la capacidad antioxidante y antirradical de las betalaínas tanto con estructura de betaxantina como de betacianina. El valor TEAC de 6.8 que presentan es superior al encontrado para otros antioxidantes bien conocidos como el galato de epigalocatequina (EGCG) del té verde.

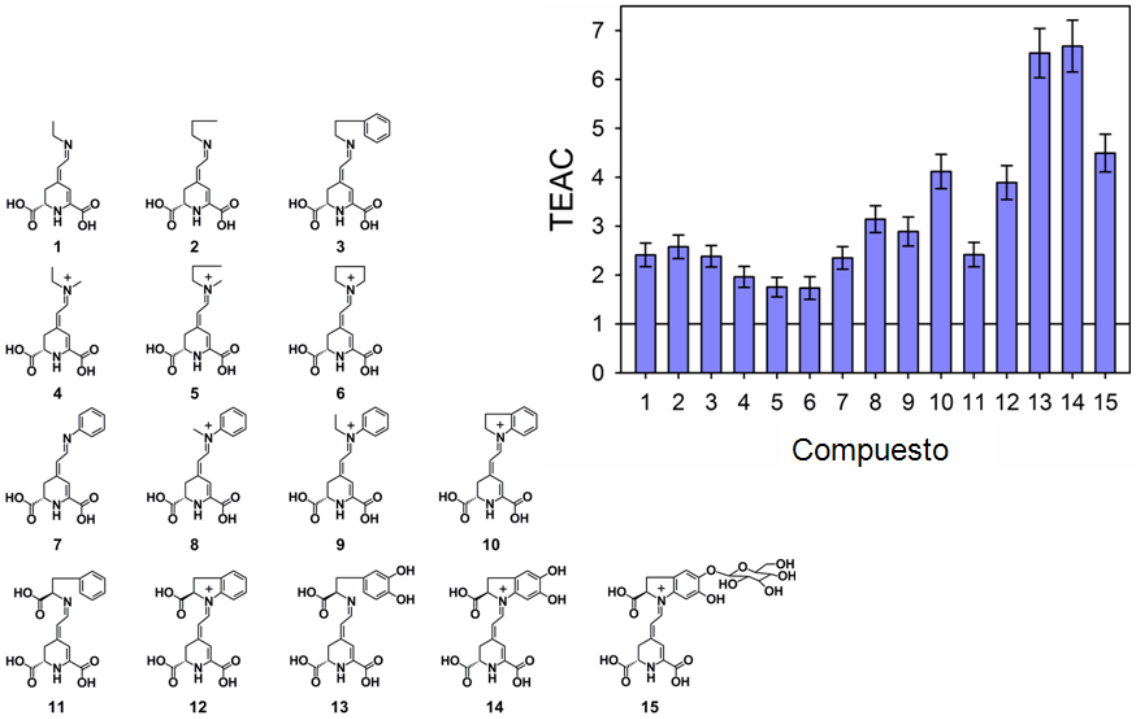


Figura 36

A pesar de su capacidad como colorante y superior actividad antirradical, las betalaínas dihidroxiladas no se han considerado por la industria alimentaria como aditivos potenciales. Esto es en parte debido a su inestabilidad, lo que impide el almacenamiento a largo plazo (Figura 37). Para intentar estabilizar estos potentes antioxidantes encapsulamos la dopamina-betaxantina y la betanidina con maltodextrina y con chitosan mediante la técnica de obtener polvo por secado en spray (Gandía-Herrero et al., 2013b). Los mejores resultados se alcanzaron con maltodextrina y condiciones de almacenamiento sin luz. Así las pérdidas de pigmento eran insignificantes después de 6 meses.

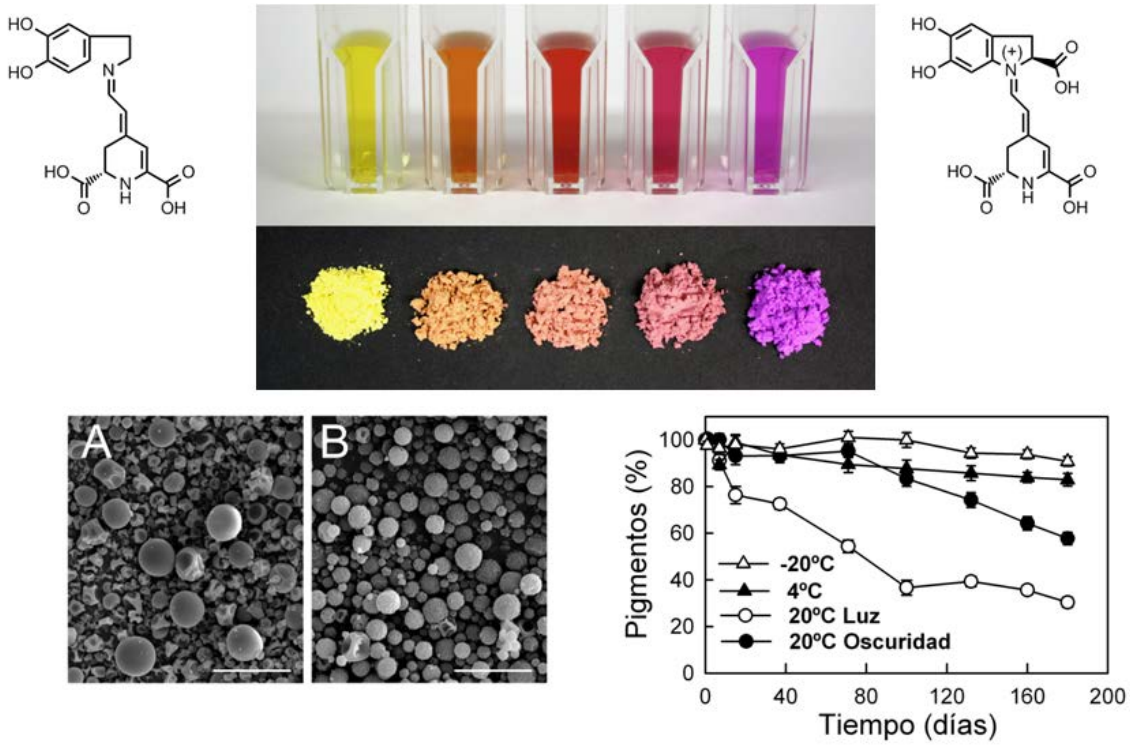


Figura 37

Al tener una betaxantina y una betacianina preparamos encapsulaciones de mezclas en diferentes proporciones y conseguimos una paleta de colores que puede ser de interés como colorantes alimentarios.

Por otro lado, un gran número de trabajos se han realizado desde el año 2005 evaluando la capacidad antirradical de extractos crudos de betalaínas procedentes de partes vegetales comestibles. El hecho de ser extractos crudos hace difícil evaluar la naturaleza de la estructura química es responsable de la actividad antioxidante, siendo los extractos de frutos de diferentes *Opuntia* comestibles unos de los más estudiados. En 2005 se usaron extractos de de múltiples cultivares de *Opuntia* encontrándose unos valores de TEAC para estos zumos similar al del vino tinto o a infusiones de té verde (Stintzing et al., 2005).

Los extractos de *Opuntia* muestran altas actividades antirradicales y antioxidantes y un perfil complejo de sustancias bioactivas, incluyendo betalaínas. Cuando fueron obtenidas fracciones purificadas, la fracción que contenia betalaínas tenía mayor actividad que las fracciones de flavonoides y de fenoles, obtenidas a partir de los mismos frutos (Osorio-Esquivel et al., 2011).

Otras formas de poner de manifiesto estas capacidades de las betacianinas ha sido la eliminación del ácido hipocloroso por betalaínas purificadas. El ácido hipocloroso es el oxidante más potente producido por neutrófilos humanos en los procesos inflamatorios, y este efecto parece estar

relacionado con la inhibición de la actividad mieloperoxidasa enzima responsable de su formación (Allegra et al., 2005).

Además, las especies pertenecientes a la orden Caryophyllales se han utilizado tradicionalmente para mejorar los síntomas de los procesos inflamatorios (Ibrahim et al., 2012; Neto et al., 2005) y en los últimos años, la actividad anti-inflamatoria de extractos de *Gomphrena globosa* (Silva et al., 2012) que continen betalaínas ha sido caracterizada.

A pesar de todas estas evidencias no hay estudios a nivel bioquímico que establezcan si el efecto es simplemente por sus capacidades antioxidantes o existen moléculas diana para ellas, lo que daría lugar a efectos específicos.

A nivel bioquímico, (Figura 38) existen dos caminos que nacen del ácido araquidónico y que están implicados en la respuesta inflamatoria. Por un lado la ruta que se inicia con su transformación en prostanglandina H_2 catalizada por ciclooxigenasa-2 (COX-2) y por otro la ruta que se inicia con su transformación en leucotrieno A_4 catalizada por lipooxigenasa-5 (LOX-5). Por la importancia de estas dos enzimas en el proceso inflamatorio decidimos estudiar si las betalaínas las tenían como dianas moleculares. Para ello usamos una serie de 10 estructuras de betalaínas entre las que había naturales y análogos sintéticos (Vidal et al., 2014).

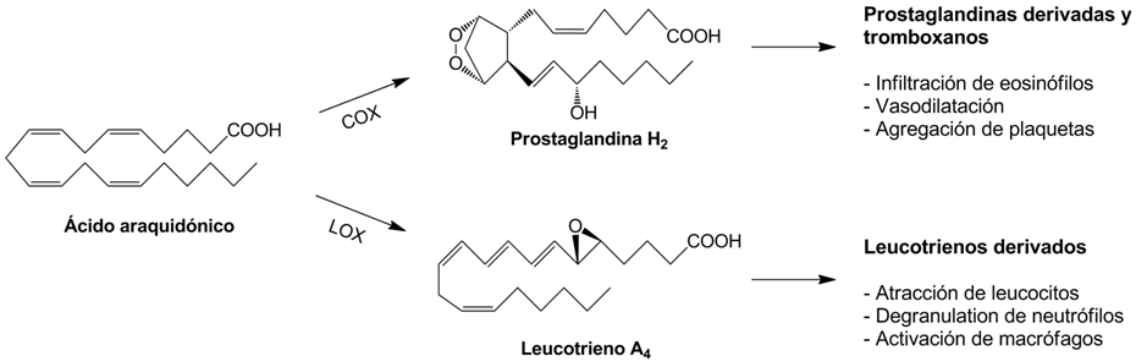


Figura 38

Los resultados obtenidos (Figura 39) ponen de manifiesto que LOX se inactiva en presencia de betanidina (2) y de los análogos de betalaínas 8 y 10, esta inactivación es dosis dependiente, presentando valores de IC_{50} de 41 μM para betanidina, 40 μM para el análogo 8 y 47 μM para el análogo 10.

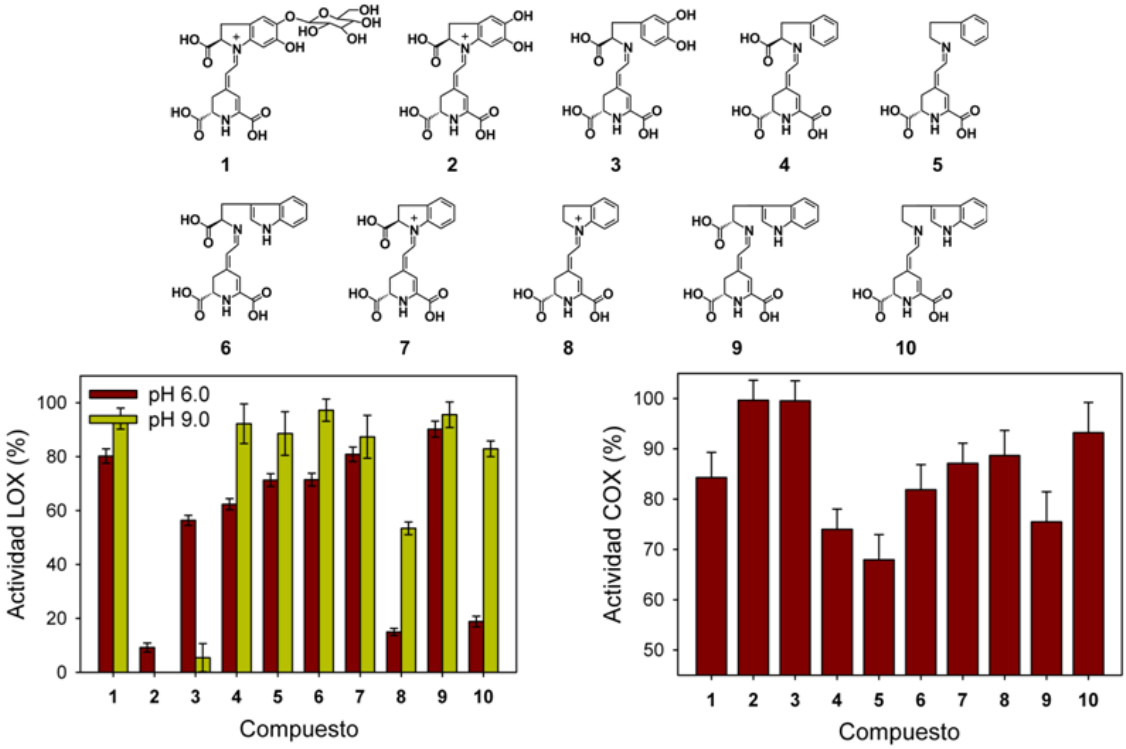


Figura 39

Los resultados con COX daban inactivación máxima con feniletilamina-betaxantina (5), teniendo una pérdida de actividad de hasta el 68% con respecto al control.

Mediante programas informáticos se realizaron simulaciones para ver el acoplamiento molecular de los mayores inactivadores para LOX y COX, los resultados los podemos ver en la Figura 40.

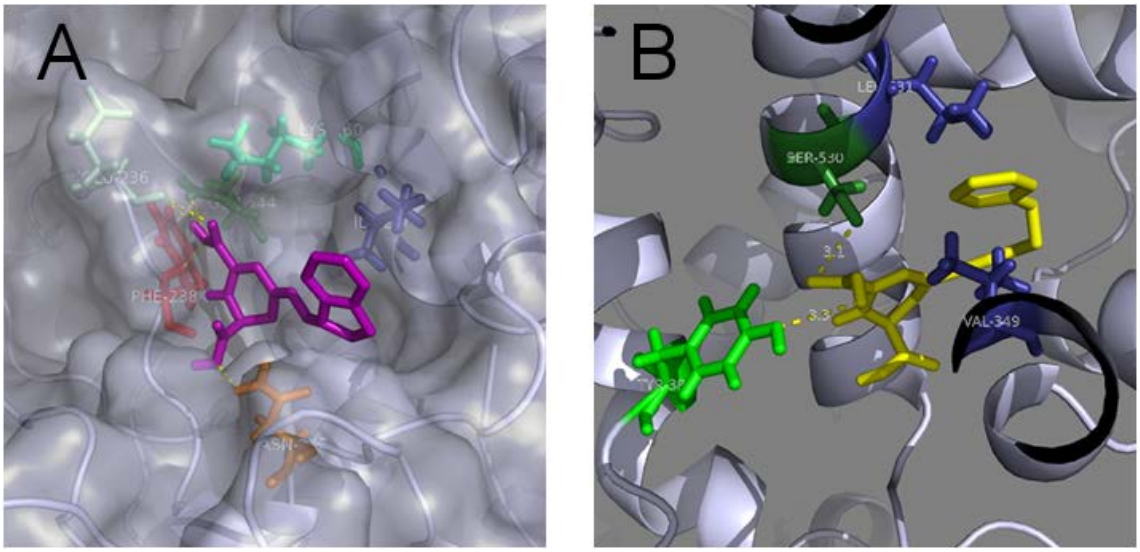


Figura 40

En la estructura 3D de LOX interactuando con el derivado de indolina-betacianina (8) (Figura 40A) se observa que la indolina-betacianina queda unida en la zona de interacción del sustrato evitando por tanto la adecuada unión de éste. Esto podría explicar la disminución de la actividad en la enzima incubada con la indolina-betacianina.

En el caso de la COX-2, el análisis de acoplamiento molecular revela la interacción de uno de los grupos carboxílicos presentes en el resto de ácido betalámico de la feniletilamina-betaxantina (5) con las cadenas laterales de los residuos de la enzima Tyr-385 y Ser-530 (Figura 40B) ocupando el centro activo. Esta situación es análoga a la obtenida con inactivadores bien conocidos de la COX, tales como el diclofenaco y la indometacina (Rowlinson et al., 2003).

Así pues, betalaínas naturales y análogos semisintéticos producen, mediante interacción específica, la inactivación de las enzimas LOX y COX, que están involucrados en la respuesta inflamatoria.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA EXPRESADA IN VIVO

Estudios recientes, con diferentes líneas celulares de cáncer, han demostrado un alto potencial quimiopreventivo de los extractos con Betalaínas (Tabla 1). El uso de pigmentos purificados en algunos de los estudios los hacen especialmente interesantes ya que permiten establecer una clara relación entre actividad evaluada y la betalaína concreta, lo que refuerza el potencial biológico de cada una de ellas. Así en 2006 (Wu et al.) se ensayó betanina pura sobre células de melanoma, revelando una fuerte inhibición de la proliferación de estas células. Igualmente en 2007 (Sreekanth et al.), se utiliza betanina pura con una línea de células de leucemia humana provocando la inhibición del crecimiento celular de una manera dosis dependiente con un IC_{50} de 40 μM, después de 24 h de incubación. Betanina entra en las células y altera la integridad de la membrana mitocondrial. Y en última instancia, conduce a la activación de caspasas y a la desintegración del núcleo. Las alteraciones bioquímicas se reflejaron en cambios morfológicos de las células, que fueron seguidos por microscopía electrónica de transmisión y citometría de flujo. Las células entraron en apoptosis, en una clara demostración *in vitro* del potencial anti-cancerígeno de las betalaínas.

Tabla 1

Línea celular	Fuente de betalaínas	Efecto	Pureza del pigmento	Referencia
Raji (linfoma humano)	*Beta vulgaris*	Reduce viabilidad celular	No	Kapadia et al., 1996
Varios cánceres humanos	*Opuntia ficus-indica*	Inhiben crecimiento, apostosis	No	Zou el al., 2005
B16F10 (melanoma, ratón)	Hylocereus polyrhizus	Inhiben crecimiento	No	Wu et al., 2006
B16F10 (melanoma, ratón)	comercial	Inhiben crecimiento	Betanina purificada	Wu et al., 2006
K562 (Leucemia humana)	*Opuntia ficus-indica*	Inhiben crecimiento, apostosis	Betanina purificada	Sreekanth et al., 2007
PC-3 (Cáncer próstata, humano)	*Beta vulgaris*	Inhiben crecimiento	No	Kapadia et al., 2011
MCF-7 (cáncer mama, humano)	*Beta vulgaris*	Inhiben crecimiento	No	Kapadia et al., 2011
HepG2 (cáncer hígado, humano)	*Rivinahumilis*	Inhiben crecimiento	Parcial	Khan et al., 2012
A549 y H1299 (cáncer de pulmón, humano)	*Beta vulgaris*	inducción de apoptosis	Betanina purificada	Zhang et al., 2013
Caco-2 (Colon humano)	*Opuntia ficus-indica*	apoptosis	Indicaxantina purificada	Nasell et al., 2014
MCF-7 (Adenocarcinoma humano)	*Beta vulgaris*	inducción de apoptosis	Betanina purificada	Nowacki et al., 2015

En 2013 se utilizó betanina purificada (Zhang et al., 2013) con dos líneas de células de cáncer de pulmón A549 y H1299 encontrándose una activación de la cascada de caspasas, en la inducción de apoptosis.

En 2014 (Naselli et al., 2014), usando indicaxantina purificada de *Opuntia ficus-indica* sobre la proliferación de células de cáncer Caco-2 de colon humano, se causó apoptosis, dependiente de la dosis, de las células en proliferación. Se usaron cantidades que pueden tener relevancia nutricional, con IC_{50} de 115 μM, concluyendo que el uso de higos chumbos o el aporte de indicaxantina en la dieta pueden tener potencial quimiopreventivo en las células intestinales.

En 2015 usando betanina purificad de remolacha roja (Nowacki L et al., 2015) se ha estudiado su citotóxicidad sobre células de líneas de cáncer y lineas células normales, destacándose las múltiples vías de señalización implicadas. Betanina disminuyó significativamente la proliferación de células cancerosas y su viabilidad. Particularmente en el tratamiento con células de adenocarcinoma humano MCF-7, la expresión de las proteínas relacionadas

con la apoptosis aumentaron de forma muy significativa (Bad, TRAILR4, FAS, p53) y el potencial de membrana mitocondrial se alteró, lo que demuestra la implicación de las vías apoptóticas intrínseca y extrínseca. Los autores destacan que betanina no tuvo ningún efecto evidente hacia las líneas de células normales, y apostillan que sus resultados traen una nueva perspectiva para considerar a betanina como compuesto terapéutico contra el cáncer, solo o en combinación con fármacos quimioterapéuticos clásicos.

ESTUDIOS CON ANIMALES

La actividad antitumoral de extractos de *Beta vulgaris* ha sido demostrada *In vivo* con tumores formados en la piel de ratones. Los extractos se administraban por vía oral a los animales con el agua, después de haberles inducido tumores tópicos (Kapadia et al., 1996). Los resultados mostraron una disminución significativa en la incidencia y en el número de papilomas de la piel de los ratones. En el mismo estudio, fueron inducidos tumores en el pulmón de los ratones detectándose una disminución con la administración oral de extractos de *Beta vulgaris*. Se llegó a una reducción del 60% de los ratones que presentaban adenomas y aquellos que los presentaban, el número de adenomas se reducía un 30%.

Análogamente, la formación de tumores de piel inducidos químicamente o promovidos por luz UV-B también fue inhibida después de la administración oral de extractos de *B. vulgaris* en ratones (Kapadia et al., 2003). En el caso de tumores inducidos en el hígado, los extractos de remolacha por administración oral provocaron un reducción de la incidencia del tumor en un 40%, mostrando una potente actividad quimiopreventiva del cáncer.

Aunque el efecto de betalaínas no puede ser identificado, extractos acuosos de *Opuntia ficus-indica* fueron capaces de inhibir el crecimiento del tumor en un modelo de cáncer de ovario en ratón cuando se comparó con los animales no tratados (Zou et al., 2005). El extracto se administó por inyección y se comparó con el agente quimiopreventivo N- (4-hidroxifernil) retinamida (4-HPR), utilizado en ensayos clínicos sobre el cáncer de ovario. Tanto los extractos de higo chumbo como el agente quimiopreventivo fueron capaces de reducir el tamaño del tumor de una manera comparable. Extractos de frutos de *Opuntia* también han demostrado su potencial en la protección o recuperación del hígado después de que se les provoque daño. La hepatotoxicidad por tetracloruro de carbono (CCl_4) en ratas fue limitado en los animales alimentados con extractos que contenían betalaínas tanto antes como después del tratamiento perjudicial (Galati et al., 2005). La administración por vía oral del extracto promovió la recuperación del hígado a niveles histoquímico y bioquímico.El mismo efecto se ha descrito para los extractos que contienen betalaínas obtenidos de plantas enteras de *Amaranthus spinosus*, y se ha

propuesto que el mecanismo de hepatoprotección era debido a su actividad antioxidante (Zeashan et al, 2008;. 2009).

Por otro lado, la quimioprevención contra la carcinogénesis esofágica inducida fue también demostrada en ratas con la administración por vía oral de extractos de *B. vulgaris* (Lechner et al., 2010). Los resultados mostraron una reducción del 45% en el número de tumores, limitando la proliferación celular, la angiogénesis, y la inflamación. Se planteó la hipótesis de que la actividad antioxidante de betalaínas provocara una reducción en el nivel de especies reactivas de oxígeno hasta unas concentraciones que serían demasiado bajas para estimular la proliferación anómala.

En un estudio de 2013, la actividad quimiopreventiva de betanina purificada se estudió en dos modelos de tumor de pulmón inducidos en ratón (Zhang et al., 2013). Tras el tratamiento por vía oral con betanina en el agua administrada betanina disminuyó significativamente el número de tumores y la carga tumoral inducida en un 46% y un 65%. El mecanismo molecular de la actividad de betanina contra el cáncer implico una reducción en la expresión de CD31 y de microvasos endoteliales y aumentó la expresión de la caspasa-3, lo que sugiere que los efectos inhibidores de tumor de pulmón fueron a través de la inducción de la apoptosis y la inhibición de la angiogénesis.

Por otro lado, extractos de *Amaranthus spinosus* y de *Boerhaavia erecta* que contienen betalaínas han demostrado actividad anti-malaria *in vivo* en un ensayo modelo en ratones (Hilou et al., 2006). Los extractos acuosos fueron capaces de inhibir el crecimiento de los parásitos inoculados, de una manera que era dependiente de la dosis. Estas plantas se utilizan en la medicina tradicional para tratar infecciones por *Plasmodium falciparum* en los seres humanos (la malaria). Los autores han señalado a las betacianinas, betanina y amarantina como posibles moléculas responsables de la actividad evaluada, al mismo tiempo que reconocieron la necesidad de realizar experimentos con compuestos purificados.

Además, se ha encontrado protección dosis dependiente de los extractos de *Beta vulgaris* sobre los efectos adversos de la irradiación de rayos γ en ratones, este efecto se ha atribuido a las betalaínas (Lu et al., 2009). Así, extractos administrados por vía oral restauraron parcialmente los niveles normales de los parámetros bioquímicos alterados por causa de la irradiación, incluyendo las actividades catalasa, superóxido dismutasa y de la oxidación de lípidos en el hígado, el bazo y el riñón.

Curiosamente, otras actividades también se han descrito para betalaínas. Pigmentos purificados extraídos de *Portulaca oleracea* han demostrado su capacidad para revertir los problemas de aprendizaje y de memoria producidos por D-galactosa en ratones (Wang y Yang, 2010). En comparación con el ácido ascórbico, betalaínas administrada por vía oral

mostraron un efecto más pronunciado en la mejora de los déficits cognitivos en ratones y restauraron los niveles bioquímicos normales de enzimas relevantes. Ello lleva a proponer que se está produciendo un efecto neuroprotector por parte de betalaínas.

Extractos de *Opuntia ficus-indica* y su pigmento principal purificado, indicaxantina, eran capaces de reducir la contractilidad del músculo liso longitudinal ileal obtenido de ratones (Baldassano et al, 2010; 2011). Los autores proponen la utilidad del hallazgo en la regulación de la motilidad intestinal en los trastornos relacionados con ella y describen el mecanismo de acción. Éste implica la inhibición de las enzimas fosfodiesterasas y el aumento de los niveles de cAMP, lo que conduce a una disminución en la concentración intracelular de Ca^{2+}, que en última instancia promueve el relajación del músculo liso.

Los estudios de biodisponibilidad de betalaínas en humanos indican que después de la administración oral de las betalaìnas modelo, betanina y indicaxantina, éstas permanecen en el cuerpo y son capaces de jugar una función en la promoción de la salud , mediante la mejora del estado redox del cuerpo (Tesoriere et al, 2004; Frank et al, 2,005). Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan 3 horas después del consumo, con un descenso correspondiente a una cinética de primer orden. Después de este tiempo, las betalaínas se pueden incorporar en los globulos rojos *in vivo* (Tesoriere et al., 2005). Su eliminación completa se produce a las 12 h después de la ingesta, con un la excreción urinaria de 76% en el caso de la betaxantina, pero muy limitado en el caso de betanina. Esto indica la metabolización del pigmento y su transformación en otros compuestos, incluyendo ácido betalámico, como se ha demostrado en estudios de digestión simulada (Pavlov et al., 2005; Tesoriere et al., 2008).

CONCLUSIÓN

Como conclusión de este capítulo, podemos señalar que la descripción de la actividad de captación de radicales libres por betalaínas implicó el renacimiento del interés de la comunidad científica por estas moléculas. Desde entonces, múltiples artículos con respecto a la actividad biológica de betalaínas se han publicados, incluyendo estudios sobre la quimioprevención de la formación de tumores. Teniendo en cuenta la seguridad demostrado en su consumo (Khan et al., 2011), la reciente bibliografía indica el potencial de las betalaínas en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

Resultados prometedores se han obtenido para la prevención de tumores *in vivo* y el posible papel desempeñado por betalaínas en la dieta. Sin embargo, el uso de extractos limita las conclusiones extraídas, las hipótesis sobre los mecanismos implicados y el potencial terapéutico de los ensayos.

Actualmente, los estudios con pigmentos purificados son escasos pero proporcionan conclusiones interesantes. El aumento de estos estudios, ayudarían a establecer el papel real que desempeñan las betalaínas solas o en cooperación con otros compuestos. Sin duda, hay que tener mucha cautela con respecto a la posible aplicación de las actividades biológicas descritas en moléculas naturales, pero los resultados para las betalaínas son prometedores en términos de su potencial de promoción de la salud.

CAPÍTULO 4

APLICACIONES DE LAS BETALAÍNAS

Además del uso de las betalaínas como moléculas bioactivas, que hemos visto en el anterior capítulo, en este apartado vamos a tratar aplicaciones singulares que se han desarrollado en base a las propiedades químico-fisicas que presentan estos pigmentos.

1ª-Aplicación de la fluorescencia de betaxantinas para el desarrollo de un método de alta sensibilidad en HPLC para su detección y cuantificación en extractos naturales o matrices complejas.

La fluorescencia es un parámetro más sensible y específico que la absorbancia, por ello se desarrollan métodos fluorimétricos para la determinación de cantidades traza para diferentes compuestos en el campo de las biociencias, como pueden ser aminoácidos (Kultlán y Molnár-Perl, 2003., Gatti et al., 2004), vitaminas (Viñas et al., 2004), o drogas (Chem et al., 2004). Estos sistemas requieren en general la derivatización previa de los compuestos a separar o la derivatización postcolumna ya que en general las moléculas no presentan fluorescencia.

El hecho de que las betaxantinas presenten fluorescencia intrínseca y que todas tengan una fuerte absorción de luz a 460 nm y una fuerte emisión a 510 nm nos ha permitido (Gandía-Herrero et al., 2005c) establecer un método fluorimétrico para su detección y cuantificación (Figura 41), así se pueden detectar betaxantinas que habían pasado desaparcibidas en algunos extractos naturales.

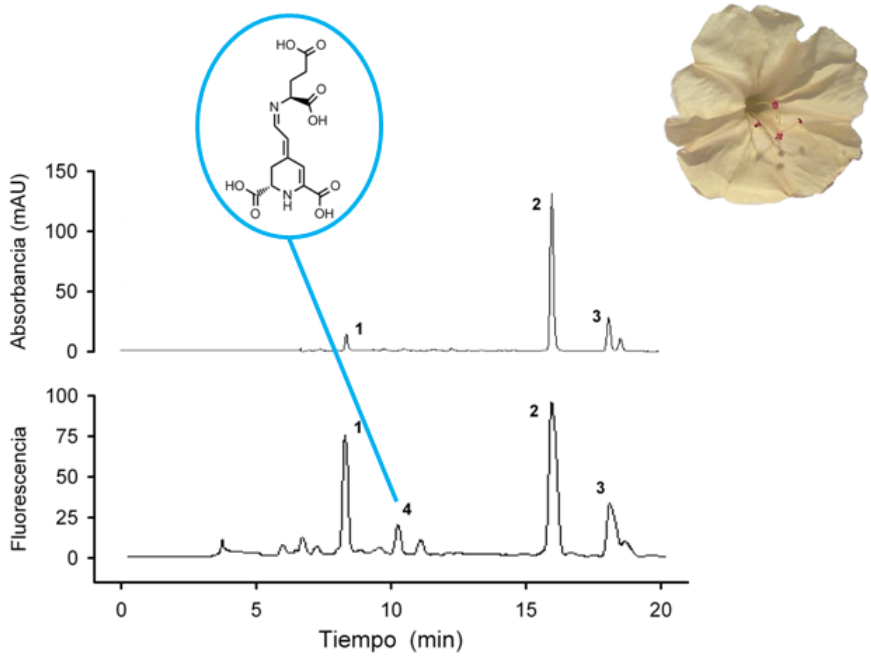


Figura 41

En la figura se presentan los perfiles de un extracto de flores amarrillas de *M. jalapa,* donde se compara los registros del método espectofotométrico y del método fluorimétrico. En el primer caso se detectan tres picos; pico 1 metionina sulfosido-betaxantina, pico 2 dopamina-betaxantina, pico 3 tiramina-betaxantina y en el registro de fluorescencia se detecta un pico adicional 4. Este pico 4 ha sido identificado como la betaxantina derivada del ácido glutámico.

Para poner a punto el método cuantitativo (Gandía-Herrero et al., 2005d) se sintetizaron patrones de 14 betaxantinas naturales y se realizaron sus correspondientes rectas de calibraje. En la Figura 42 se presenta el perfil comatográfico de un extracto de *Carpobrotus acinaciformis* donde se han cuantificado: glutamina-betaxantina 28 $\mu g\ g^{-1}$, glutamico-betaxantina 5.5 $\mu g\ g^{-1}$ y tiramina-betaxantina 11 $\mu g\ g^{-1}$.

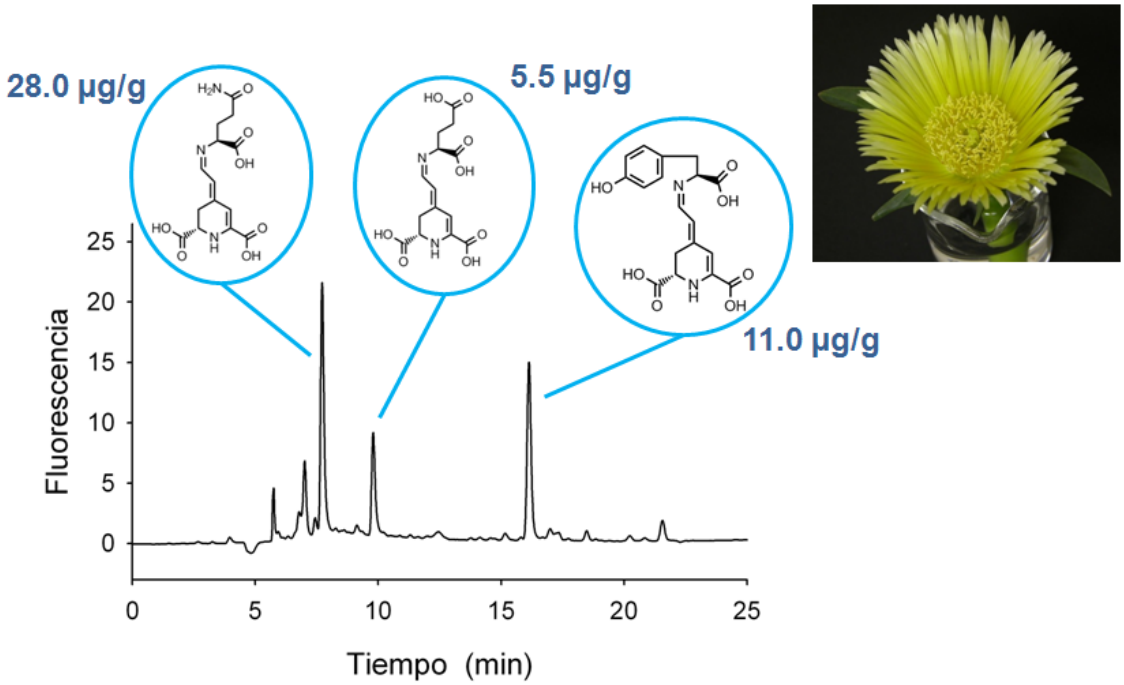


Figura 42

2ª-Uso de betanina para determinación de esporas de Bacillus anthracis.

En 2013 la colaboración de un grupo de investigación brasileños y otro estadounidense dio lugar a la publicación sobre el uso directo del complejo de betanina con europio (un elemento que pertenece al grupo de los lantánidos) para la cuantificación de dipiconilato de calcio que se encuentra en gran cantidad en esporas de bacterias del genero *Bacillus*, incluido el *Bacillus anthracis* (responsable del ántrax) (Gonçalves et al. 2013a).

En presencia de iones europio (III), betanina forma con él un complejo 1:1 de color naranja soluble en agua, (Figura 43) lo que provoca un cambio muy significativo en el espectro de la disolución a pH 7.5, Este cambio se

observa como una bajada en el máximo de betanina de 536 nm y un coeficente de extrincion de 65.000 M^{-1} cm^{-1} y la generación de un máximo a 474 nm, que corresponde al complejo formado con un coeficiente de extinción de 40.000 M^{-1} cm^{-1}.

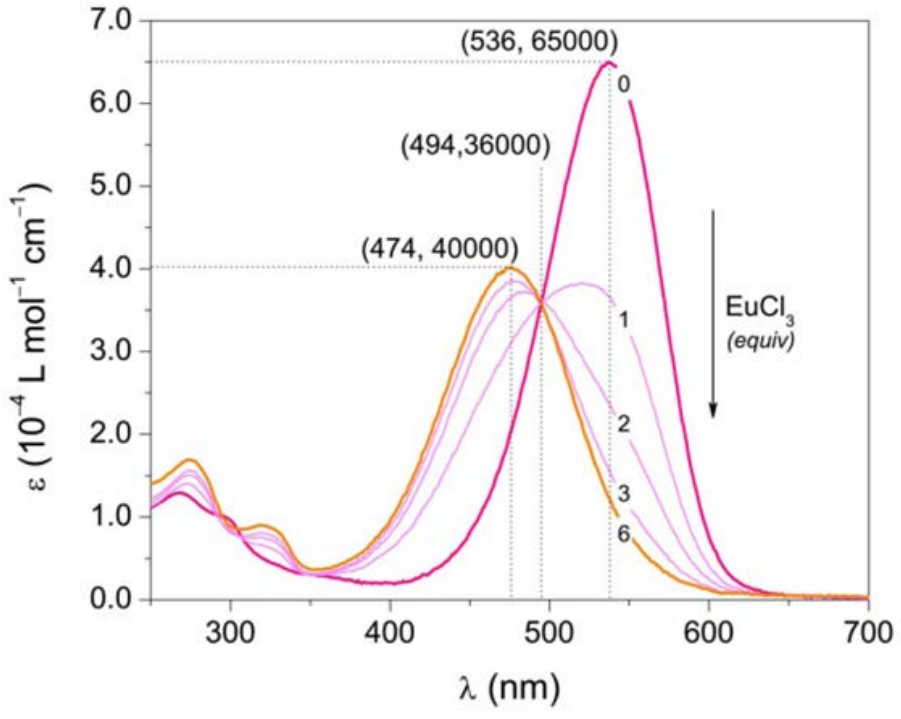


Figura 43

La adición posterior de dipiconilato de calcio, cambia el color de la solución acuosa de complejo de naranja a magenta (Figura 44), cambio que es dependiente de la concentración de dipiconilato o de las esporas de *Bacillus* si se usa una muestra donde estén presentes.

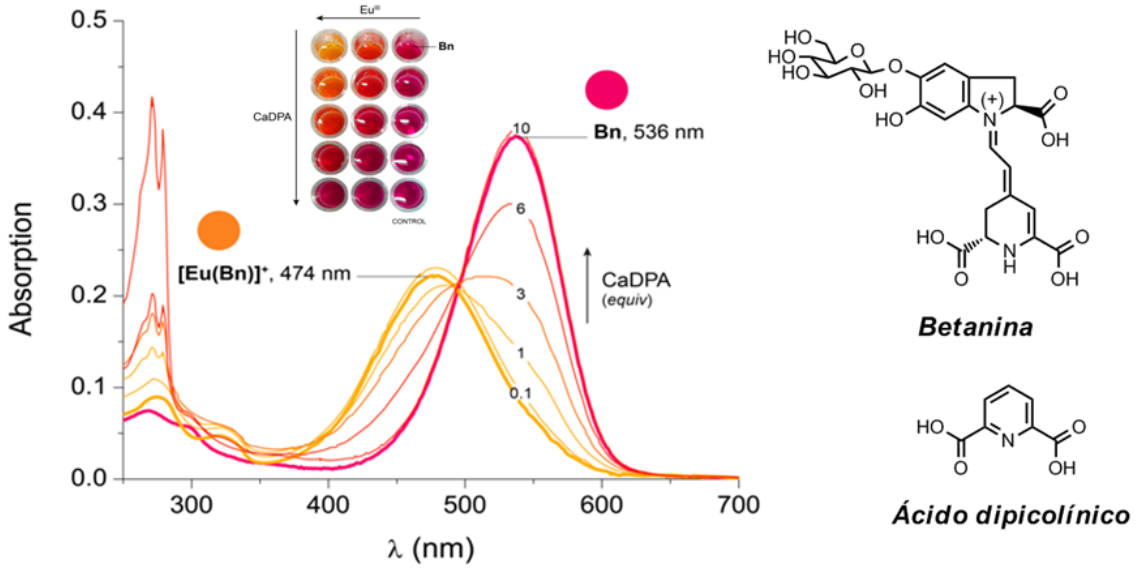
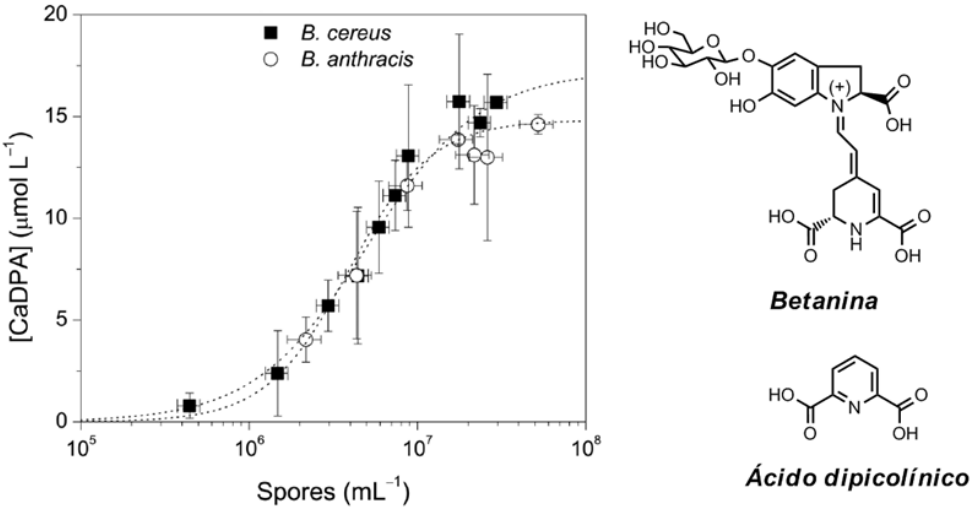


Figura 44

El análisis (Figura 45) del incremento de absorbancia a 536 nm con respecto al número de esporas, establece un límite de detección para la determinación de esporas de *B. cereus* y *B. anthracis* de $1.1x10^6$ esporas mL^{-1}. Este método colorimétrico es selectivo para dipiconilato de calcio en comparación con varios compuestos análogos, siendo un ensayo simple, rápido y de bajo coste para detectar con alta sensibilidad la no presencia de *B. anthracis*. Además, este trabajo demuestra la posibilidad de usar betalaínas como sensores colorimétricos para aplicaciones biológicas.



Figuras 45

3ª-Determinación de infección de malaria mediante imagen fluorescente de eritrocitos infectados, usando una betaxantina semisintética.

La colaboración de los mismos grupos brasileño y estadounidense dio como resultado una publicación en 2013 (Gonçalves et al. 2013b) donde sintetizan lo que denominan como "Una sonda betalaínica inspirada en la naturaleza" (Figura 46). La síntesis se hace por el procedimiento se semisíntesis usando como amina la 7-amino-4-metilcumarina, resultando un producto fluorescente (BtC) con un máximo de excitación a 485 nm y un máximo de emisión a 520 nm.

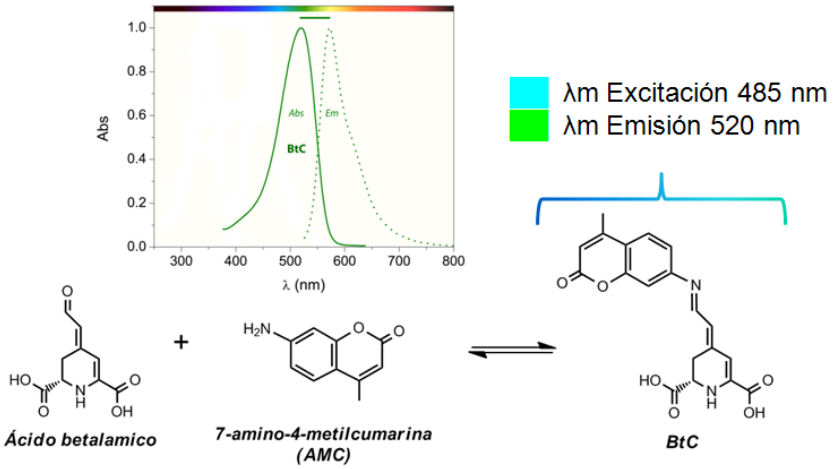


Figura 46

Esta sonda ha sido diseñada para que sea capaz de penetrar solo en los eritrocitos infectados por *Plasmodium falciparum,* donde se va a producir su diferenciación y multiplicación. La infección por *Plasmodium* conlleva la modificación de la de la membrana plasmática del eritrocito y sus componentes proteicos para generar el llamado nuevo camino de penetración (NPP).

Este camino permite un mayor flujo de nutrientes, siendo el responsable del aumento de la permeabilidad de solutos de bajo peso molecular, tanto cargados como sin carga, pero con una fuerte preferencia por los aniones. Este nuevo camino de penetración que solo está presente en los eritrocitos infectados, es la vía por donde penetra la sonda sintetizada que es fuertemente aniónica a pH fisiológico puesto que se encontran desprotonados los dos grupos carboxilo del ácido betalámico.

Cuando se incuba unos minutos los eritrocitos de ratón infectados con *Plasmodium* con la sonda BtC y se observan en un microscopio de epifluorescencia (Figura 47) con luz de trasmisión para obtener contraste de interferencia diferencial (DIC) o con la fluorescencia usando un filtro de excitación a 470 nm y de emisión a 525 nm se obtienen las imágenes de la primera y segunda columnas para tres experimentos separados. En la tercera columna se muestra la superposición de esas imágenes donde podemos ver como la fluorescencia de la sonda solo penetra en los eritrocitos infectados y se sitúa alrededor del parásito.

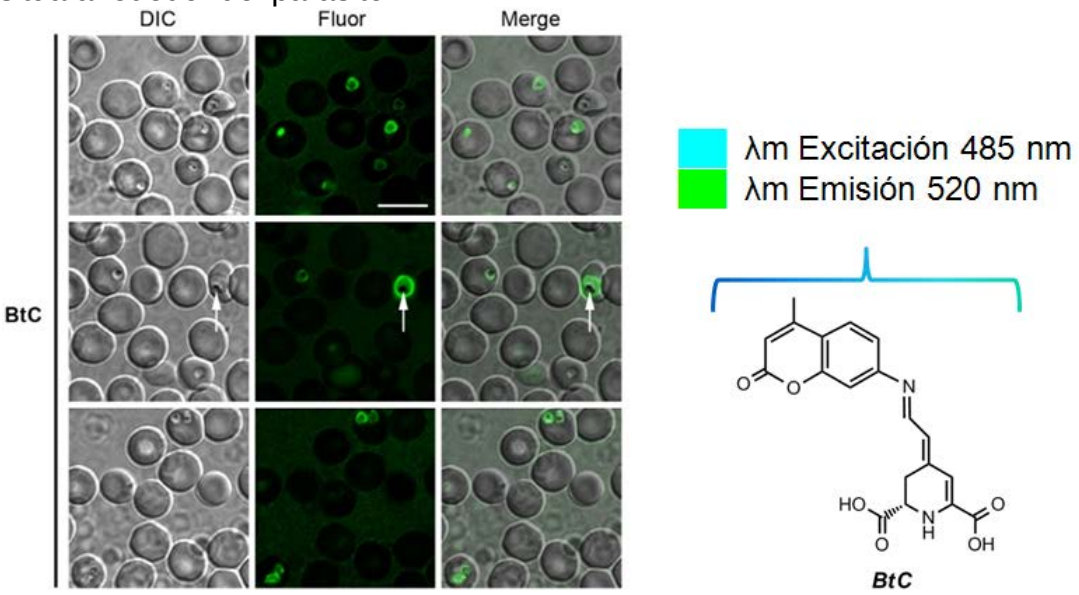


Figura 47

4ª-Uso de betalaínas en células solares sensibilizadas por pigmentos (DSSC).

Las células fotovoltaicas sensibilizadas por colorante están en la actualidad atrayendo un gran interés desde el punto de vista científico y

tecnológico por su alta eficiencia, bajo coste, y por ser la alternativa más viable a las células solares inorgánicas.

Las células solares sensibilizadas con pigmentos se inspiran en la forma como la naturaleza capta la energía y la transforma en electrones en el proceso de la fotosíntesis.

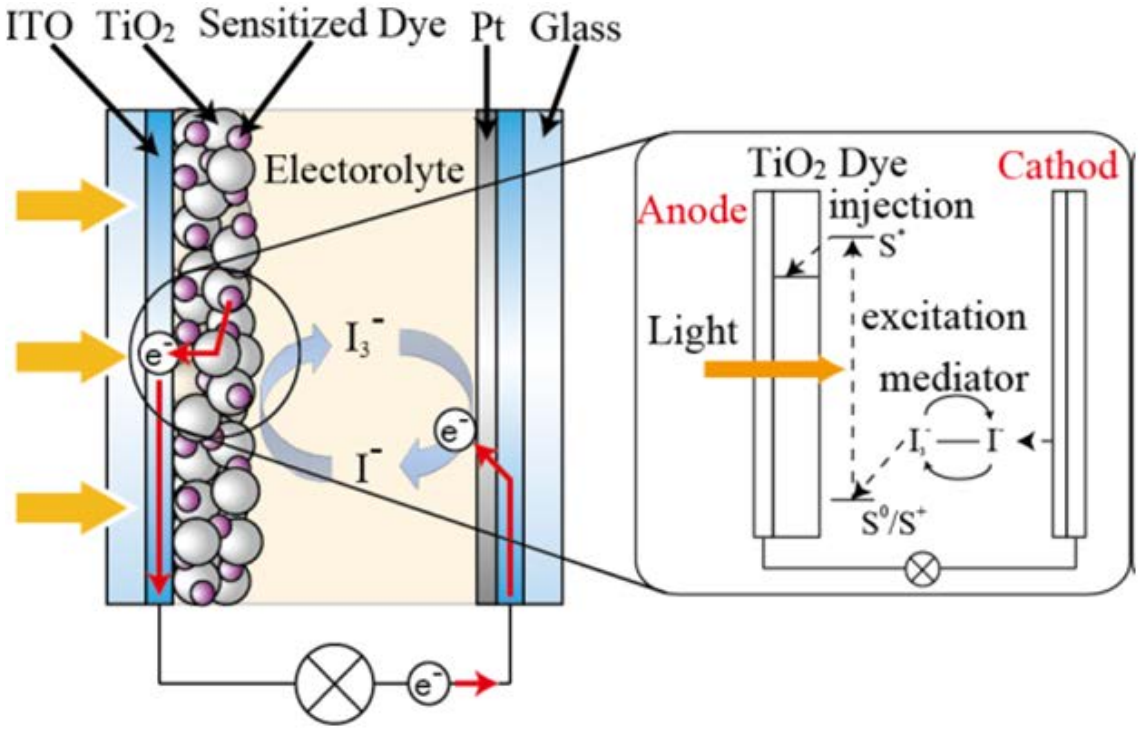


Figura 48

La Figura 48 muestra un esquema ilustrativo del principio de la estructura y del funcionamiento de un dispositivo fotovoltaico sensibilizado por colorante. La célula consiste en dos electrodos y un líquido electrolítico encapsulado que contiene iones yoduro y triyoduro.

El cátodo son nanopartículas de óxido de titanio (TiO_2) altamente porosas en cuya superficie se adsorbe el pigmento. Las partículas están depositadas sobre un vidrio eléctricamente conductor y transparente. El TiO_2 sólo absorbe luz ultravioleta, por lo tanto, el uso de pigmento permite utilizar la luz con una gama más amplia de longitud de onda. El contra-electrodo (ánodo) es un vidrio eléctricamente conductor y transparente con un electrodo de platino.

El dispositivo es transparente y está coloreado de acuerdo con el colorante empleado. Cuando la luz pasa a través del electrodo de vidrio transparente las moléculas de colorante se excitan y transfieren un electrón a la capa del semiconductor TiO_2. El electrón es transportado luego a través de la capa de TiO_2 y recogido por la capa de vidrio conductora. Los electrones cedidos por las moléculas de colorante a la capa de TiO_2 se sustituyen por los electrones de los iones yoduro y triyoduro del electrolito, que a su vez obtiene

electrones en el contraelectrodo. Todos estos acontecimientos culminan con un flujo de corriente a través del circuito eléctrico externo.

Este es básicamente el mecanismo para la conversión de energía de la luz recibida por la célula solar en energía eléctrica. El rendimiento de la célula viene en gran medida determinado por las características del pigmento que se utilice. Desde 2006 se empiezan a utilizar los diferentes pigmentos naturales de las plantas, como son: carotenoides, clorofilas, flavonoides y betalaínas, para sustiruir a colorantes sintéticos basados en rutenio que tienen una gran estabilidad, pero son muy caros ya que el rutenio es un metal raro. Pronto destaca el uso de un extracto de *Beta vulgaris rubra* con alta concentración de betacianina con el que se consigue una eficacia de conversión de fotones a corriente del 65% a 470 nm, y con una eficacia global del 1.7%, lo que es comparable a la eficacia de la fotosíntesis natural, y de otro extracto de *Opuntia* rico en indacaxantina (prolina-betaxantina) con el que se obtienen valores de eficacia global del 1.19%.

Estos resultados los convierten en los pigmentos más prometedores para la conversión de energía solar debido a su reducido coste de producción y bajo impacto ambiental (Narayan, 2012). En 2011 se utilizó betanina purificada obteniéndose un valor de eficacia de conversión de 2.7%, siendo hasta ahora el mayor valor obtenido con un pigmento natural (Sandquist y McHale, 2011).

5ª-Uso del ácido betalámico y del zumo de remolacha roja en el marcaje y revelado de proteínas.

La purificación de ácido betalámico a partir de betanina obtenida de zumo de remolacha roja puede hacerse por una modificación de la reacción de semisíntesis de betaxantina, siguiendo una hidrolisis básica de betanina para liberar el ácido betalámico que se fija por interacción durante 15 minutos con una resina de intercambio anionico (IRA400), se elimina el sobrenadante, se lava con agua y se libera el ácido betalámico con ClNa 5 M. Una vez desalada la disolución el ácido batalámico está preparado para su uso.

Para la síntesis de proteína-betaxantina (Figura 49) se usa ácido betalámico purificado que se mezcla con una disolución de proteínas a pH=11.4, (como albúmina) que poseen grupos aminos primarios libres, véanse amino terminal y aminos de los restos de lisina que formen parte de la proteína. A continuación se baja el pH a 5 y se deja que progrese la reacción pasando de un amarillo palido λ_{max} de 424 nm a λ_{max} de 476nm, amarillo brillante propio de la proteina-betaxantina sintetizada. Mediante este procedimiento se han obtenidos derivado de proteína de peso molecular entre 6.000 y 200.000 dalton (Cabanes et al., 2016). Las proteínas obtenidas son fluorescentes con una longitud máxima de excitación y de emisión de 475 y 551nm respectivamente.

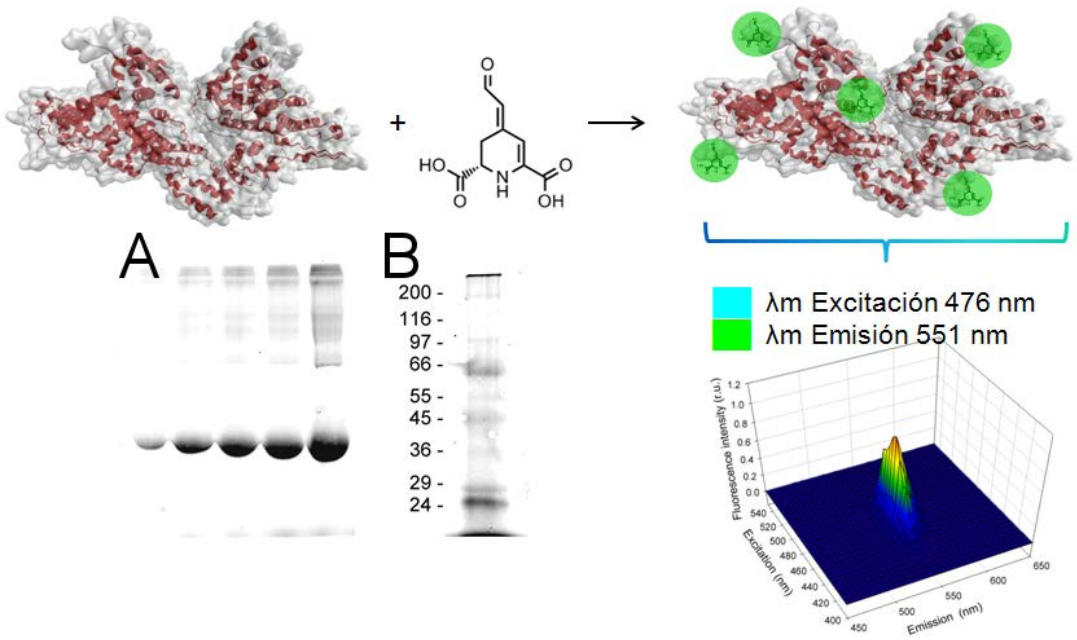


Figura 49

Esas proteínas se pueden separar en una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y visualizarse con un scanner de fluorescencia. En la imagen A se ven calles con cantidades crecientes de albúmina y en B marcadores de peso molecular de proteínas (mezcla de proteínas de peso molecular conocido) derivatizadas con ácido betalámico y visualizados por fluorescencia.

Una vez realizada la prueba de concepto: Se pueden sintetizar proteínas-betaxantinas sin que ello modifique sustancialmente la respuesta de las proteínas en electroforesis en SDS y mantenerse fluorescentes, nos propusimos usar esta posibilidad para revelar las proteínas previamente separadas en una electroforesis.

Procedimos a hacer una electroforesis de albúmina y marcadores sin derivatizar, y una vez realizada la electroforesis derivatizamos las proteínas presentes en el gel (Figura 50) con ácido betalámico puro. En la Figura 50A podemos ver el resultado de incubar el gel a pH=11.4 con ácido betalámico durante 15 min y luego bajar el pH a 5 con acético y mantenerlo otros 15 minutos.

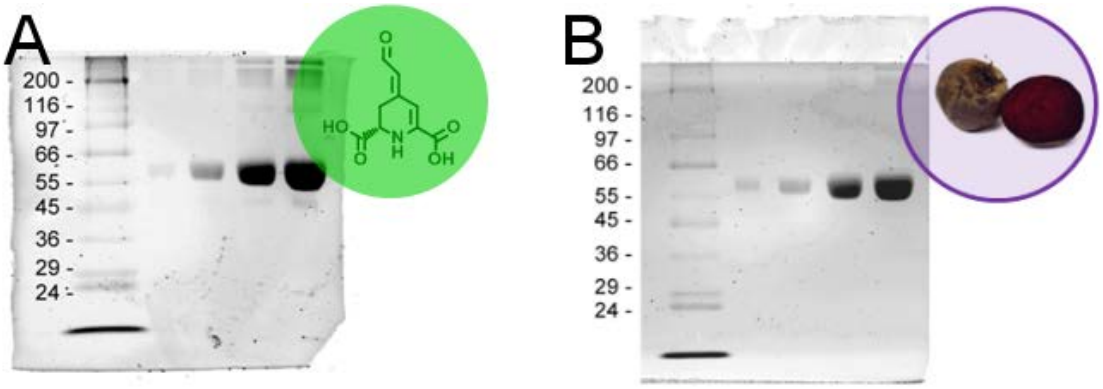


Figura 50

El mayor inconveniente de la técnica de revelado es disponer de ácido betalámico puro, por lo que decidimos hacer un gel y revelarlo usando zumo de remolacha roja filtrado por un ultrafiltro de 10 kd. Siguiendo la misma metodología el resultado puede verse en la Figura 50B. Así pues, es posible revelar por fluorescencia una electroforesis-SDS de proteínas con zumo de remolacha.

COROLARIO

A lo largo de la lección hemos repasado el más que significativo desarrollo de los conocimientos sobre betalaínas en los últimos años, tanto desde un punto de vista de conocimientos básicos como biosíntesis, síntesis abiótica o propiedades de color y fluorescentes como desde el punto de vista aplicado, actividad biológica y aplicaciones singulares, cumpliendo con esa frase que algunos atribuyen a Pasteur “Ni ciencia básica ni aplicada, solo ciencia y sus aplicaciones”.

El desarrollo científico de las betalaínas ha sido grande pero cada vez se abren más caminos. Así pues creo que esta es una historia con futuro.

Muchas gracias por su atención.

BIBLIOGRAFíA

Acuña A.U., Amat-Guerri F., Morcillo P., Liras M., Rodríguez B. (2009) Structure and formation of the fluorescent compound of *Lignum nephriticum*. *Organic Lettres,* 11, 3020-3023.

Allegra M., Furtmüller P.G., Jantschko W., Zederbauer M., Tesoriere L., Livrea M.A., Obinger C. (2005) Mechanism of interaction of betanin and indicaxanthin with human myeloperoxidase and hypochlorous acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 332, 837-844.

Arnold K.E., Owens I.P.F., Marshall N.J. (2002) Fluorescent signaling in Parrots. *Science*, 295, 92-92.

Baldassano S., Tesoriere L., Rotondo A., Serio R., Livrea M.A., Mulè F. (2010) Inhibition of the mechanical activity of mouse ileum by cactus pear (*Opuntia ficus indica*, L, Mill.) fruit extract and its pigment indicaxanthin*. J. Agric. Food Chem*., 58, 7565-7571.

Baldassano S., Rotondo A., Serio R., Livrea M.A., Tesoriere L., Mulè F. (2011) Inhibitory effects of indicaxanthin on mouse ileal contractility: Analysis of the mechanism of action. *European Journal of Pharmacology*, 658, 200-205.

Butera D., Tesoriere L., Di Gaudio F., Bongiorno A., Allegra M., Pintaudi A.M., Kohen R., Livrea M.A. (2002).Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: Betanin and indicaxanthin. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6895-6901.

Cabanes J., García-Cánovas F., Lozano J.L., García-Carmona, F. (1987) A kinetic study of melanization pathway between L-Tyrosine and Dopacrome. *Biochim. Biophys. Acta*, 923, 187-195.

Cabanes J., Gandía-Herrero F., Escribano J., García-Carmona F., Jiménez-Atiénzar M. (2014) One-Step Synthesis of Betalains Using a Novel Betalamic Acid Derivatized Support *J. Agric. Food Chem*., 62, 3776−3782

Cabanes J, Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F, Jiménez-Atiénzar J (2016) Derivatization and Characterization of Novel Protein-Betaxanthins. Fluorescent Protein Labeling with Betalamic Acid. *Bioconjugate Chem.* (enviado)

Chen J, Jiang X.G., Jiang W.M., Mei N., Gao X.L., Zhang Q.Z. (2004) High-performance liquid chromatographic analysis of zolmitriptan in human plasma using fluorescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, 639-645.

Christinet L., Burdet F.X., Zaiko M., Hinz U., Zrÿd, J.-P. (2004) Characterization and functional identification of a novel plant 4,5-extradiol dioxygenase involved in betalain pigment biosynthesis in *Portulaca grandiflora*. *Plant Physiol.*, 134, 265-274.

Cai Y., Sun M., Corke H. (2003) Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 2288-2294.

Cai Y.-Z., Sun M., Xing J., Luo Q., Corke H. (2006) Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sciences*, *78*, 2872-2888.

Escribano J., Pedreño M.A., García-Carmona F., Muñoz R. (1998). Characterization of the antiradical activity of betalains from *Beta vulgaris* L. roots. *Phytochem. Anal.*, 9, 124-127.

Fischer N., Dreiding A.S. (1972). Biosynthesis of betalaines. On the cleavage of the aromatic ring during the enzymatic transformation of dopa into betalamic acid. *Helv. Chim. Acta*, 55, 649-658.

Frank T, Stintzing FC, Carle R, Bitsch I, Quaas D, Strass G., Bitsch R, Netzel, M. (2005). Urinary pharmacokinetics of betalains following consumption of red beet juice in healthy humans. *Pharmacol Res.* 52: 290–297.

Galati E.M., Mondello M.R., Lauriano E.R., Taviano M.F., Galluzzo M., Miceli N. (2005) *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. fruit juice protects liver from carbon tetrachloride induced injury. *Phytother. Res.* 19, 796-800.

Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F (2005a) Betaxanthins as pigments responsible for visible fluorescence in flowers. *Planta* 222, 586-593.

Gandía-Herrero F, García-Carmona F. Escribano J. (2005b) Floral fluorescence effect. *Nature,* 437, 334-334.

Gandía-Herrero F, García-Carmona F, Escribano J. (2005c) Fluorescent pigments: New perspectives in betalain research and applications. *Food Research International* 38, 879–884.

Gandía-Herrero F., García-Carmona F., Escribano J. (2005d) A novel method using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of betaxanthins. *J. Chromatogr. A,* 1078, 83-89.

Gandía-Herrero F., García-Carmona F., Escribano J. (2006) Development of a protocol for the semi-synthesis and purification of betaxanthins. *Phytochem. Anal.*, 17, 262-269.

Gandía-Herrero F, Escribano J, García-Carmona F. (2009) The role of phenolic hydroxy groups in the free radical scavenging activity of betalains. *J Nat Prod.* 72, 1142-1146.

Gandía-Herrero F., Jiménez-Atiénzar M., Cabanes J., García-Carmona F., Escribano J. (2010a) Stabilization of the bioactive pigment of *Opuntia* fruits through maltodextrin encapsulation. *J. Agric. Food Chem*., 58, 10646-10652.

Gandía-Herrero F., Escribano J., García-Carmona F. (2010b) Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. *Planta*, 232, 449-460.

Gandía-Herrero F., García-Carmona F. (2012a) Characterization of recombinant *Beta vulgaris* 4,5-DOPA-extradiol-dioxygenase active in the biosynthesis of betalains. *Planta*, 236,91-100.

Gandía-Herrero F., Escribano J., García-Carmona F. (2012b) Purification and antiradical properties of the structural unit of betalains. *J. Nat. Prod*., 75, 1030-1036.

Gandía-Herrero F, Cabanes J, Escribano J, García-Carmona F, Jimenez-Atiénzar M. (2013) Encapsulation of the most potent antioxidant betalains in edible matrixes as powders of different colors. *J Agric Food Chem*. 61, 4294–302.

García-Carmona F., García-Cánovas F., Iborra J.L., Lozano J.A. (1982) Kinetic study of the pathway of melanization between L-Dopa and Dopacrome. *Biochim. Biophys. Acta*, 717, 124-131.

Gatti R., Gioia M.G., Andreatta P., Pentassuglia G. (2004) HPLC-fluorescence determination of amino acids in pharmaceuticals after pre-column derivatization with phanquinone *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, 339-348

Girod P.A., Zrÿd J.-P. (1991) Biogenesis of betalains: purification and partial characterization of DOPA 4,5-dioxygenase from *Amanita muscaria*. *Phytochemistry*, 30, 169-174.

Gonçalves LCP, Da Silva SM, DeRose PC, Ando RA, Bastos EL (2013a) Beetroot-Pigment-Derived Colorimetric Sensor for Detection of Calcium Dipicolinate in Bacterial Spores. *PLoS ONE*. 8(9): e73701. doi:10.1371/journal.pone.0073701

Gonçalves LCP, Tonelli RR, Bagnaresi P, Mortara RA, Ferreira AG, et al. (2013b) A Nature-Inspired Betalainic Probe for Live-Cell Imaging of Plasmodium-Infected Erythrocytes. *PLoS ONE*. 8(1): e53874. doi:10.1371/journal.pone.0053874

Hilou, A., Nacoulma, O.G., Guiguemde, T.R. (2006) In vivo antimalarial activities of extracts from Amaranthus spinosus L. and *Boerhaavia erecta* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 103, 236-240.

Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI. (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol*, 33, 601–617.

Hatlestad GJ, Sunnadeniya RM, Akhavan NA, Gonzalez A, Goldman IL, McGrath JM, Lloyd AM. (2012). The beet R locus encodes a new cytochrome P450 required for red betalain production. *Nat Genet.* 44:816–820.

Ibrahim, B., Sowemimo, A., van Rooyen, A., & van de Venter, M. (2012). Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathula prostrate*(Linn.) Blume (Amaranthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 141, 282–289.

Kapadia G.J., Tokuda H., Kinoshima T., Nishino H. (1996) Chemoprevention of lung and skin cancer by *Beta vulgaris* (Beet) root extract. *Cancer Lett.,* 100, 211-214.

Kapadia G.J., Azuine M.A., Sridhar R., Okuda Y., Tsuruta A., Ichiishi E., Mukainake T., Takasaki M., Konoshima T., Nishino H., Tokuda H. (2003). Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. *Pharmacol. Res.*, 47, 141-148.

Khan M.I., Giridhar P. (2011). Dietary antioxidants: the insurer of health. *Everymans Sci,* XLVI, 214–218.

Khan M.I., Joseph K.M.D., Muralidhara, Ramesh H.P., Giridhar P., Ravishankar G.A. (2011) Acute, subacute and subchronic safety assessment of betalains rich *Rivina humilis* L. berry juice in rats*. Food and Chemical Toxicology,* 49, 3154-3157.

Kutlán D., Molnár-Perl I. (2003) New aspects of the simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthaldialdehyde derivatives by high-performance liquid chromatography Analysis of wine, beer and vinegar, *J. Chromatogr. A* 987, 311-322.

Lechner J.F., Wang L.S., Rocha C.M., Larue B., Henry C., McIntyre C.M., Riedl K.M., Schwartz S.J., Stoner G.D. (2010) Drinking water with red beetroot food color antagonizes esophageal carcinogenesis in N-nitrosomethylbenzylamine-treated rats. *J. Med. Food.,* 13, 733-739.

Logorio M.G., Cordon G.B., Iriel A. (2015) Reviewing the relevance of fluorescence in biological systems. *Photochem. Photobiol. Sci.* 14, 1538-1559.

Lu X., Wang Y., Zhang Z. (2009) Radioprotective activity of betalains from red beets in mice exposed to gamma irradiation. *Eur. J. Pharmacol.,* 615, 223-227.

Mazel C.H., Cronin T.W., Caidwell R.L., Marshall N.J. (2004) Fluerescent enhancement of signaling in a Martis Shrimp. *Science*. 303, 51-51.

Monardes N. (1565) *Historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales que sirven en Medicina*.

Narayan, M.R. (2012) Dye sensitized solar cells based on natural photosensitizers *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16 (2012) 208-215.

Naselli F, Tesoriere L, Caradonna F, Bellavia D, Attanzio A, Gentile C, Livrea MA. (2014) Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of whole extract and isolated indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* associated with re-activation of the onco-suppressor p16INK4a gene in human colorectal carcinoma (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun,* 450, 652-658.

Nowacki L, Vigneron P, Rotellini L, Cazzola H, Merlier F, Prost E, Ralanairina R, Gadonna J-P, Rossi C, Vayssade M. 2015. Betanin-enriched red beetroot (*Beta vulgaris* L.) extract induces apoptosis and autophagic cell death in MCF-7 cells. *Phytother Res.* 29, 1964-1973.

Osorio-Esquivel O., Ortiz-Moreno A., Álvarez V.B., Dorantes-Álvarez L., Giusti M.M. (2011) Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Research International,* 44, 2160-2168.

Pavlov A., Kovatcheva P., Tuneva D., Ilieva M., Bley T. (2005) Radical scavenging activity and stability of betalains from *Beta vulgaris* hairy root culture in simulated conditions of human gastrointestinal tract. *Plant Foods for Human Nutrition,* 60, 43-47.

Rowlinson S. W., Kiefer J. R., Prusakiewicz J. J., Pawlitz J. L., Kozak K. R., Kalgutkar A. S., et al. (2003) A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. *Journal of Biological Chemistry,* 278, 45763–45769

Saénz C., Tapia S., Chávez J., Robert P. (2009) Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica). Food Chem.* 114, 616-622.

Sandquist C., McHale J.L. (2011). Improved efficiency of betanin-based dye-sensitized solar cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 221, 90-97.

Sasaki N., Abe Y., Goda Y., Adachi T., Kasahara K., Ozeki Y. (2009) Detection of DOPA 4,5-dioxygenase (DOD) activity using recombinant protein prepared from *Escherichia coli* cells harboring cDNA encoding DOD from *Mirabilis jalapa. Plant Cell Physiol.,* 50, 1012-1016.

Silva, L. R., Valentao, P., Faria, J., Ferreres, F., Sousa, C., Gil-Izquierdo, A., et al. (2012) Phytochemical investigations and biological potential screening with cellular and non-cellular models of globe amaranth (Gomphrena globosa L.) inflorescences. *Food Chemistry,* 135, 756–763.

Sreekanth D., Arunasree M.K., Roy K.R., Reddy T.C., Reddy G.V., Reddanna P. (2007) Betanin, a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Phytomedicine,* 4, 739-746.

Stintzing F.C., Herbach K.M., Mosshammer M.R., Carle R., Yi W., Sellappan S., Akoh C.C., Bunch R., Felker P. (2005) Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *J. Agric. Food Chem.,* 53, 442-451.

Strack D., Vogt T., Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62, 247-269.

Suzuki M, Miyahara T, Tokumoto H, Hakamatsuka T, Goda Y, Ozeki Y, Sasaki N. (2014) Transposon-mediated mutation of CYP76AD3 affects betalain synthesis and produces variegated flowers in four o'clock (*Mirabilis jalapa*). *J Plant Physiol.* 171, 1586-1590.

Taira J, Tsuchida E, Katoh MC, Uehara M, Ogi T. (201 Antioxidant capacity of betacyanins as radical scavengers for peroxyl radical and nitric oxide. *Food Chem*. 166:531–536.

Tesoriere L., Butera D., Pintaudi M., Allegra M., Livrea M.A. (2004) Supplementation with cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit decreases oxidative stress in healthy humans: a comparative study with Vit C. *Am. J. Clin. Nutr.,* 80, 391-395.

Tesoriere L., Butera D., Allegra M., Fazzari M., Livrea M.A. (2005). Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1266-1270.

Tesoriere L., Fazzari M., Angileri F., Gentile C., Livrea M.A. (2008) In vitro digestion of betalainic foods. stability and bioaccessibility of betaxanthins and betacyanins and antioxidative potential of food digesta. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 10487-10492.

Vidal PJ, López-Nicolás JM, Gandía-Herrero F, García-Carmona F. (2014) Inactivation of lipoxygenase and cyclooxygenase by natural betalains and semi-synthetic analogues. *Food Chem*. 154:246–54.

Viñas P, Balsalobre N, López-Erroz C, Hernández-Córdoba M, (2004) Liquid Chromatographic Analysis of Riboflavin Vitamers in Foods Using Fluorescence Detection *J. Agric. Food Chem.* 52, 1789-1794.

Wang CQ, Yang GQ. 2010. Betacyanins from *Portulaca oleracea* L. ameliorate cognition deficits and attenuate oxidative damage induced by D-galactose in the brains of senescent mice. *Phytomedicine* 17:527–532.

Wu L.-C., Hsu H.-W., Chen Y.-C., Chiu C.-C., Lin Y.-I., Ho J.-A.A. (2006) Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. *Food Chemistry*, 95, 319-327.

Wyler H., Wilcox M.E., Dreiding, A.S. (1965). Umwandlung eines Betacyans in ein Betaxanthin. Synthese von Indicaxanthin aus Betanin. *Helv. Chim. Acta*, 48, 361-366.

Zeashan, H., Amresh, G., Singh, S., Rao, C.V. (2008) Hepatoprotective activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3417-3421.

Zeashan H., Amresh G., Singh S., Rao C.V. (2009) Hepatoprotective and antioxidant activity of *Amaranthus spinosus* against CCl_4 induced toxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 125, 364-366.

Zhang Q, Pan J, Wang Y, Lubet R, You M. (2013) Beetroot red (betanin) inhibits vinyl carbamate- and benzo(a)pyrene-induced lung tumorigenesis through apoptosis. *Mol Carcinog*. 52: 686–691.

Zou D.M., Brewer M., Garcia F., Feugang J.M., Wang J., Zang R., Liu H., Zou C. (2005) Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition Journal*, 4, 25.