

# ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CUANTIFICACIÓN DE CATECOLAMINAS PRECURSORES DE NEUROTRANSMISORES EN CÁSCARA DE *Musa paradisiaca*

Daissy J. Cardona., José H. Isaza, Ana J. Colmenares

Grupo de Investigación de Productos Naturales, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad del Valle. Calle 13 No. 100-000. Cali, Colombia.

KEYWORDS: Actividad antioxidante, catecolaminas, fenoles totales, neurotransmisores, medicina tradicional y *Musa paradisiaca*.

**ABSTRACT:** La cáscara de *Musa paradisiaca* tiene diversas aplicaciones en la medicina tradicional debido a su contenido de flavonoides, terpenos, fenoles, y catecolaminas. La investigación permitió la realización de extracciones usando agua, metanol, cloroformo y acetato de etilo; encontrando que en los extractos polares existe la presencia de compuestos de tipo fenil propanoides identificados por UV. Para el extracto clorofórmico se aisló un compuesto triterpénico cíclico del tipo Cicloabissinona o Cicloeuca-lenona. Se realizó la cuantificación de Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Serotonina en extractos en medio ácido, básico y neutro para los estados de maduración verde, pintón y maduro por fluorescencia y HPLC; obteniéndose que el contenido de catecolaminas aumenta según lo hace el estado de maduración de la cáscara; el medio ácido arrojó mejores resultados. Los extractos con mayor actividad antioxidante según el estado de maduración y el medio de extracción corresponden a *MppA* con  $4,54 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g/mL}$ , *MpvA* 1,89  $\mu\text{g/mL}$  y *MpmA* 5,12  $\mu\text{g/mL}$ . Los extractos con mayor contenido de fenoles por Folin-Ciocalteu según el estado de maduración y medio de extracción corresponden a *MpmA* 1403,3  $\mu\text{Eq AG/gEH}$ , *MppA* 169  $\mu\text{Eq AG/gEH}$  y *MpvA* 92,7  $\mu\text{Eq AG/gEH}$ .

## 1. INTRODUCCIÓN.

El plátano conocido como *Musa paradisiaca* es considerado uno de los alimentos con mayor valor nutricional y uno de los cultivos más comunes en todos los países con clima tropical<sup>1</sup>; de todo el fruto lo único que es consumido por el ser humano es la pulpa por lo que se generan grandes cantidades de desperdicios con el material restante, este generalmente es colocado en basureros lo que contribuye a la existencia de problemas ambientales<sup>2</sup>. La medicina en conjunto con la ciencia está en una búsqueda constante de nuevas aplicaciones y descubrimientos de moléculas con actividad biológica que permitan justificar el desarrollo de la medicina tradicional; y así darle un valor agregado al material que no es usado para consumo humano.

### 1.1 Origen y distribución.

El plátano se originó en Asia Meridional y se conoce en el mediterráneo desde el año 650 cuando la especie llegó a las Islas Canarias en el siglo XV; desde allí fue llevado a América en el año 1516<sup>3</sup>.

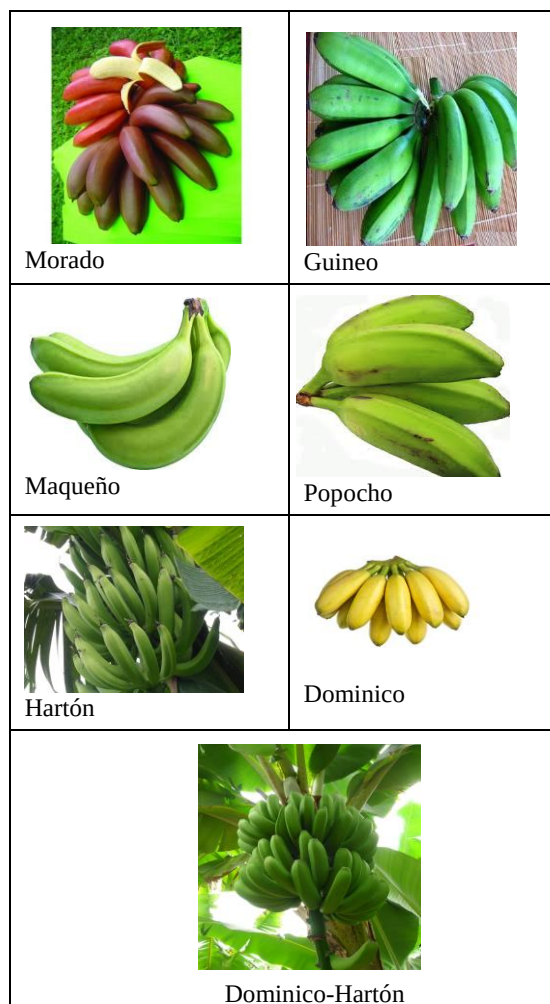
En diferentes países, alrededor de 300 variedades de plátanos son cultivados, cuya gran mayoría ha crecido en Asia, India,

Malasia y trópicos de Australia y ahora se encuentran ampliamente en todos los países tropicales y subtropicales como: India, Filipinas, China, Ecuador, Brasil, Indonesia, México, Costa Rica, Colombia y Tailandia. Se cultiva extensamente como una planta frutal en todo Bangladesh<sup>4</sup>.

### 1.2 Clasificación y descripción botánica.

El plátano es una planta herbácea monocotiledónea, de la familia Musaceae, originaria del sudeste asiático y traída a nuestro país por los españoles en el siglo XVI. Es considerado el cuarto cultivo más importante del mundo, por tratarse de un producto básico y de exportación, fuente de empleo e ingresos en numerosos países del trópico y subtrópico<sup>6</sup>. Fue descrita por primera vez por Linneo en el año 1753<sup>7</sup>.

Las variedades de plátano cultivadas en Colombia son: dominico-hartón, dominico, hartón, pelipita, morado, cachaco, popocho, pompo, maqueño, guineo y trucho<sup>8</sup>, las cuales se detallan en la Figura 1.

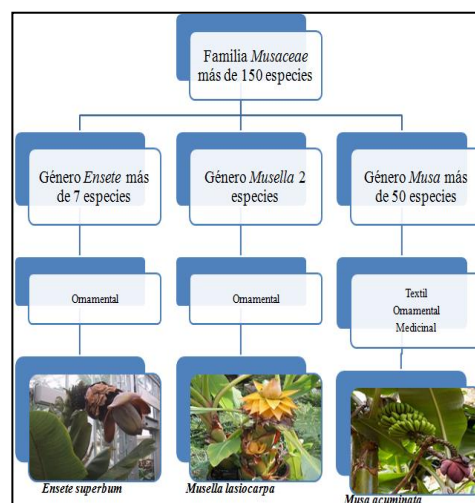


**Figura 1.** Variedades características de plátano cultivadas en Colombia<sup>9</sup>.

Las partes principales de una platanera *M. paradisiaca* está conformada por elseudotallo que mide 2-5 m, y su altura puede alcanzar 8 m con las hojas. Es una planta estolonífera, con hojas erguidas, oblongas de 1 a 2 m de largo por 30- 55 cm de ancho, redondeadas en el ápice y en la base, cara superior verde claro y con envés más tenue. Su inflorescencia colgante mide de 1 a 1,5 m, con brácteas violáceas de 15 a 30 cm de largo, persistentes o caducas, oblongo-lanceoladas u oblongo-aovadas, flores blancas o cremosas de 3 a 5 cm de largo. Los frutos son bayas falsas sin semillas, cilíndricos distribuidos en manos de racimos con 30-70 plátanos que miden 20-40 cm de largo y 4-7 cm de diámetro<sup>9</sup>.

### 1.3 Clasificación taxonómica.

La *M. paradisiaca* pertenece a la familia de las Musaceae donde comprenden más de 150 especies repartidas en tres géneros<sup>10</sup>.



**Figura 2.** Clasificación de la familia Musaceae<sup>11</sup>.

El género Musa lo integran más de 50 especies entre las más características se encuentran (Figura 2): Musa acuminata, Musa coccínea, Musa textiles, Musa velutina, Musa balbisiana o sapientum, Musa cavedishii y **M. paradisiaca**<sup>10</sup>.

En la Tabla 1 se describe la taxonomía para la especie *M. paradisiaca*.

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica para la especie *M. paradisiaca*<sup>12</sup>.

| TAXONOMÍA |                         |
|-----------|-------------------------|
| Reino     | Plantae                 |
| División  | Magnoliophyta           |
| Clase     | Liliopsida              |
| Orden     | Zingiberales            |
| Familia   | Musaceae                |
| Género    | Musa                    |
| Especie   | <i>Musa paradisiaca</i> |

### 1.4 Actividad biológica.

Las empresas procesadoras de plátano, generan grandes cantidades de residuos (cáscaras), que se convierten en un problema sanitario que propicia la proliferación de insectos, hongos, bacterias y olores por descomposición, pero que, a su vez, son usados como alimento para bovinos por su alto contenido en fibras y energía; el resto sólo se desecha y se descompone al aire libre.

Se ha encontrado diferentes aplicaciones de la cáscara del plátano en la industria alimenticia, de plásticos, y en la industria farmaceuta. En la actualidad la medicina tradicional se ha utilizado para el tratamiento de diferentes enfermedades. Este conocimiento tradicional, ha sido transmitido de generación a generación significativamente al desarrollo de diferentes sistemas de medicina, así como a la ayuda en la exploración de diferentes plantas medicinales para encontrar la base científica de sus tradicionales usos.

#### 1.4.1 Medicina Tradicional.

A la medicina tradicional de la Tribu Embera Chami ubicada en el Departamento de Risaralda se le ha atribuido el uso de la infusión en agua de la cáscara del plátano para el tratamiento de las lesiones necróticas generadas por el pie diabético (comunicación oral contada por el profesor de la Universidad del Valle José Hipólito Isaza). Las personas diabéticas pierden la sensibilidad en la piel, dando lugar a que no puedan sentir el dolor y quemaduras, etc., produciéndose heridas pequeñas (Figura 3) como consecuencia de la neuropatía diabética que daña los vasos sanguíneos y los nervios; sin el cuidado y el tratamiento adecuado se puede llegar a presentar la amputación de las extremidades afectadas.



**Figura 3.** Representación del estado necrótico del pie de una persona con Diabetes avanzada.

Esta afección está estrechamente relacionada con la actividad de cicatrización de heridas. La cual ha sido informada con el uso del extracto metanólico y acuoso de la banana *M. sapientum* var. *paradisiaca* en ratas. En ambos extractos se ha identificado la presencia de compuestos de tipo fenólicos, flavonoides y terpenos, que presentan propiedades cicatrizantes y generan la reducción de glutatión. También se le atribuye la disminución del área de la herida, la cicatriz y peroxidación de lípidos<sup>13</sup>. Los efectos han sido atribuidos a la propiedad antioxidante del plátano.

#### 1.4.2 Actividad Antidiarreica.

Este efecto de combatir las enfermedades intestinales fue atribuido al contenido de pectina del plátano. La dieta del plátano fue efectiva para la disentería bacilar en un estudio en 127 pacientes de nueve meses a cuarenta ocho años. Los copos del plátano también han sido probados y se ha encontrado eficaz en el tratamiento de la diarrea en estado crítico<sup>14</sup>.

Recientes estudios han revelado que la savia de la especie *M. paradisiaca* ha sido útil para el tratamiento de la diarrea; esto se le atribuye al contenido de metabolitos como alcaloides, compuestos fenólicos, saponinas y flavonoides presentes. Este estudio ha sido desarrollado en ratas usando el método de diarrea inducida por aceite de ricino mejorando el tiempo de inicio de la diarrea, la absorción de fluidos y electrolitos<sup>15</sup>.

#### 1.4.3 Actividad Antiulcerativa.

La pectina y la fosfatidilcolina encontradas en el plátano verde fortalecen los fosfolípidos de la capa que protegen la mucosa gástrica. El extracto metanólico de *M. sapientum* var. *paradisiaca* contiene flavonoides del tipo leucocianidina y es utilizado para el tratamiento de la úlcera péptica. El estudio se basó en la inducción de úlceras gástricas duodenales con fármacos como aspirina, indometacina, fenilbutazona y prednisolona en

comparación con el efecto que ejerce el fármaco omeprazol y el extracto metanólico en el organismo de ratas<sup>16</sup>.

#### 1.4.4 Actividad Antimicrobiana.

El extracto acuoso de las cáscaras del plátano verde y hojas de *M. paradisiaca* var. *sapientum* ha sido reportado por mostrar actividad antimicrobiana contra las especies *Staphylococcus* y *Pseudomonas*. Se ha informado que tanto extracto etanólico como acuoso del fruto inmaduro de *M. sapientum* mostró buena actividad contra *S. aureus*, *Salmonella paratyphi*, *Shigella flexnerii*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *B. subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa*<sup>17</sup>.

La pulpa del plátano verde ha sido estudiada para evaluar la influencia de la administración simultánea de *M. paradisiaca* y ciprofloxacina en conejos. Mejorando el efecto final de la administración del fármaco frente a la actividad antimicrobiana contra la *E. coli*<sup>18</sup>.

Se ha evaluado la actividad antibacteriana del extracto alcohólico (isopropanol) y acuoso de la cáscara de *M. paradisiaca* contra los patógenos periodontales como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) atribuyendo estas propiedades a la presencia de compuestos tipo glucósidos, alcaloides, flavonoides y taninos mientras que el extracto acuoso solo presentaba compuestos de tipo glucósidos y alcaloides<sup>19</sup>.

#### 1.4.5 Actividad Hipoglicémica.

Se ha informado que el extracto hidrometanólico de la raíz de *M. paradisiaca* tiene efecto hipoglicémico debido a la estimulación de la producción de insulina y la utilización de glucosa. El alto el contenido de potasio (K) y sodio (Na) se ha correlacionado con el efecto glicémico. Igualmente se encontró el mismo efecto para el jugo del tallo y el fruto verde<sup>20</sup>. La pectina aislada del extracto clorofórmico del jugo del tallo de las flores de *M. sapientum* mostraron reducción de la glucosa en sangre y la hemoglobina glicosilada después de la administración oral en ratas<sup>21</sup>.

#### 1.4.6 Actividad Hipocolesterolémica.

El fruto inmaduro *M. paradisiaca* y el extracto metanólico de la raíz mostraron una baja absorción de glucosa y colesterol, flavonoides aislados de frutos inmaduros mostraron actividad hipolipídica evidenciado por la disminución de colesterol, triglicéridos, en suero, hígado, riñón y cerebro de ratas. El contenido de pectina en el jugo del tallo de la inflorescencia de *M. sapientum* también posee disminución de los niveles de colesterol y triglicéridos<sup>22</sup>.

#### 1.4.7 Actividad antihipertensiva.

El efecto antihipertensivo del extracto acuoso del fruto maduro de *M. paradisiaca* en ratas albinas ayudó a generar una disminución de la presión arterial y a su posible prevención.

Esta actividad se atribuye posiblemente a los altos contenidos de triptófano y carbohidratos que aumenta los niveles de serotonina<sup>23</sup>.

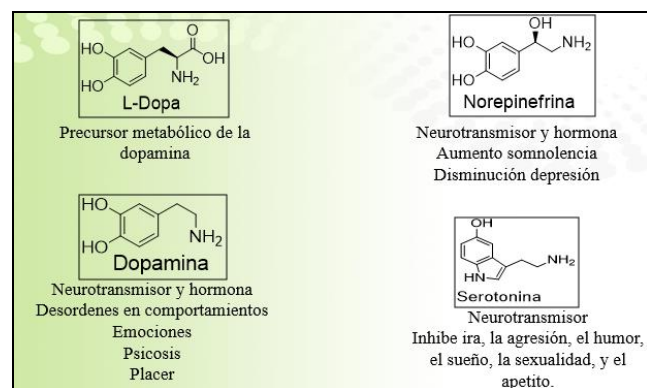
#### 1.4.8 Actividad antioxidante.

La cáscara y la pulpa de *M. paradisiaca* posee compuestos antioxidantes (Galocatequina y Dopamina) que actúan en contra de enfermedades del corazón, así como algunos tipos de cáncer, arteroesclerosis, artritis, Parkinson y Alzheimer<sup>24</sup>. De acuerdo a estudios realizados de la inflorescencia de *M. cavendishii* también poseen una alta capacidad antioxidante y se han utilizado como ingredientes con propiedades funcionales para la prevención del estrés oxidativo. Estos estudios también se han realizado para seudotallo y rizoma de las plataneras encontrando resultados positivos<sup>25</sup>. La cáscara del fruto maduro también se ha encontrado antocianinas (delfinidina y cianidina) y catecolaminas<sup>26</sup>.

## 2. FITOQUÍMICA.

Los neurotransmisores son sustancias químicas que transmiten información de una neurona a otra. Dentro de su clasificación se encuentran las catecolaminas que son un grupo de aminos biogénicas que poseen un anillo de fenilo 3,4-dihidroxi-sustituido (Figura 4) y son sintetizadas a partir de la L-Tirosina. Estos compuestos incluyen la Dopamina, Norepinefrina (Noradrenalina) y Epinefrina (Adrenalina). Las indolaminas también hacen parte de la familia de neurotransmisores entre ellos se encuentran la serotonina sintetizada a partir del triptófano<sup>27</sup>.

Las catecolaminas precursoras de neurotransmisores están involucradas en la transmisión de impulsos en el sistema nervioso central de los animales. También han estado implicadas en la función hormonal, en particular en la regulación del metabolismo del glucógeno por la epinefrina y la norepinefrina. Estas catecolaminas funcionan como transmisores en la rama del sistema nervioso periférico, conocido como el sistema nervioso autónomo<sup>28</sup>.

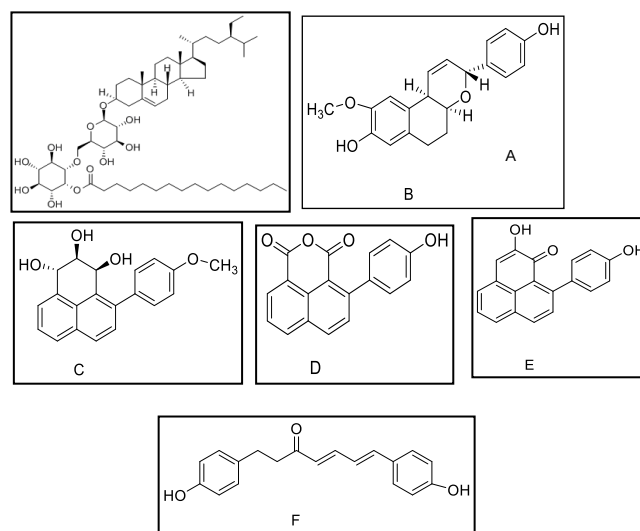


**Figura 4.** Estructura química y funcionalidad de los neurotransmisores de estudio: L-Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Serotonina.

Neurotransmisores como la serotonina, norepinefrina, dopamina; triptófano, compuestos de indol, pectina, taninos, almidón, azúcares, vitamina C, vitaminas B, albuminoides, grasas y sales minerales se han encontrado en la pulpa de la fruta de *M. paradisiaca* y *M. sapientum*<sup>29</sup>.

Alguno flavonoides y compuestos relacionados (leucocianidina, quercetina y su 3-O-galactósido, 3-O-glucósido y 3-O-ramnosil glucósido) fueron aislados de la cáscara del plátano<sup>30</sup>. Acil esteril glucósidos tales como sitoindosido-I, sitoindosido-II, sitoindosido-III, sitoindosido-IV (Figura 5 A) y esteril glucósidos tales como sitosterol gentiobioside, sitosterol mio-inositol-β-D-glucósido se han aislado de frutos de *M. paradisiaca*<sup>31</sup>. Se ha aislado un diarilheptanoide bicíclico, rel-(3S, 4aR, 10bR) -8-hidroxi-3-(4-hidroxifenil)-9-metoxi-4a, 5,6,10b-tetrahidro-3H-nafto [2,1-b] pirano (Figura 5 B), y 1,2-dihidro-1,2,3-trihidroxi-9- (4-metoxifenil) fenaleno (Figura 5 C), hidroxianigorufona (Figura 5 D), anhídrido 2- (4-hidroxifenil) naftálico (Figura 5 E), 1,7-bis (4-hidroxifenil) hepta-4 (E), 6 (E) -dien-3-ona (Figura 5 F)<sup>32</sup>.

Se ha informado sobre el aislamiento de varios triterpenos tales como ciclusalenol, ciclusalenona, 24- metilenecicloartanol, estigmast-7-metilenecicloartanol, estigmast-7-en-3-ol, lanosterol y β-amirina<sup>33</sup>. Un principio antihipertensivo 7,8-dihidroxi-3-metilisocroman-4-ona, se aisló de la cáscara de la fruta de *M. sapientum*<sup>34</sup>. Cicloartanos triterpénicos como 3-epicicloeucaleanol, 3-epiciclusalenol, 24- metillenpollianastanona, 28-norciclusalenona, 24-oxo-29- norcicloartanona se han aislado de la cáscara de la fruta de *M. sapientum*<sup>35</sup>.



**Figura 5.** Estructuras químicas de compuestos representativos aislados de *M. paradisiaca*: A. Sitoindosido IV: estigmast-5-en-3-il 6-o-[2-(hexadecanoiloxi)-3,4,5,6 tetrahydrociclohexil]hexo-piranosido. B. Diarilheptanoides bicíclicos(a)rel-(3S,4aR,10bR)-8-Hidroxi-3-(4-hidroxifenil)-9-metoxi-4a,5,6,10b-tetrahidro-3H-nafto[2,1-b]piran; C. 1,2-Dihidro-1,2,3-trihidroxi-9-(4 metoxifenil) fenaleno; D. Hidroxianigorufone; E. 2-(4-Hidroxifenil) anhídrido naftálico; F. 1,7-Bis(4-hidroxifenil)hepta-4(E),6(E)-dien-3-ona.

Celulosa, hemicelulosa, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, leucina, valina, fenilalanina y treonina han sido aisladas de la pulpa y la cáscara de *M. paradisiaca*<sup>36</sup>. Hemiterpenoide glucósido (1,1-dimetilalil alcohol), siringina, (6S, 9R)-roseosida, alcohol bencílico, (24R) -4 $\alpha$ , 14  $\alpha$ , 24-trimetilsacolesta-8,25 (27) -dien-3 $\beta$ -ol se ha aislado de la flor de *M. paradisiaca*<sup>37</sup>.

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

#### 3.1 Instrumentación general.

Los disolventes que se usaron en los procesos de extracción y en las diferentes cromatografías de columna, TLC y cromatografía analítica fueron grado HPLC. Los estándares y reactivos necesarios para los ensayos, fueron adquiridos a casas de suministro de reactivos como Merck y Sigma-Aldrich.

Las separaciones por cromatografía en columna se realizaron sobre SiGel 60 (63-230 Mesh) Merck, Diaion HP20 y en columnas de vidrio. La cromatografía en capa fina TLC se realizó sobre placas de Sílica gel 60 F254 (Merck) y RP- 18 F254 (Merck). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) analítica se realizó en un equipo Shimadzu Corp. LC-2010 (Kyoto, Japón), equipado con un controlador de sistema CBM-20A, un desgasificador DGU-20A, una bomba LC-20AD, un horno de columna CTO-20AC, un automuestreador SIL-20AHT y detector de arreglo de diodos PDA SPD-M20A; Se usó la columna Restek Pinnacle DB C18 de 5  $\mu$ m (250 x 4,6mm).

Para la determinación de la actividad antioxidante y contenido de fenoles totales se utilizaron microplacas de 96 pozos y un lector de microplacas Metertech AccuReader M965+.

Los espectros UV-visibles se tomaron usando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 PharmaSpec. Los espectros de fluorescencia se tomaron usando un espectrofluorómetro Jasco FP- 8500.

#### 3.2 Recolección de la muestra.

La especie *M. paradisiaca* se colectó de uno de los restaurantes particulares de la Universidad del Valle. Se tomaron 1,082 kg de cáscara húmeda y picada. El material fue almacenado en bolsas de cierre hermético y bajo refrigeración 10 °C.

##### 3.2.1 Obtención de los extractos de la cáscara de *M. paradisiaca*.

Las cascaras húmedas y picadas (1.082 kg) fueron secuencialmente extraídas por ultrasonido marca Branson 2510 a 30 °C con agua (3 veces x 15 minutos), el extracto acuoso fue posteriormente liofilizado *Mp* 1; seguido de la extracción con metanol *Mp* 2 (3 veces x 15 minutos) concentrado a presión reducida. El extracto obtenido de metanol fue secuencialmente separado por extracción líquido-líquido con cloroformo y acetato de etilo por triplicado. Con lo anterior se obtuvieron

los extractos de cloroformo *Mp* 3, acetato de etilo *Mp* 4 y el marco acuoso *Mp* 5.

##### 3.2.2 Fraccionamiento del extracto acuoso liofilizado.

Se realizó el fraccionamiento del extracto acuoso liofilizado *Mp* 1 por cromatografía de columna Diaion HP-20 (resina polimérica de poliestireno-divinilbenceno) realizando eluciones con agua:metanol 90:10 hasta 30:70 volúmenes respectivamente. Las fracciones obtenidas fueron fraccionadas nuevamente por cromatografía de columna con cartucho RP-18 con eluciones metanol y ácido fosfórico 0,05% 1:2 obteniendo fracciones *Mp* 1.1 – *Mp* 1.12 unificadas según su similitud en los espectros UV.

##### 3.2.3 Fraccionamiento del extracto clorofórmico.

Se realizó el fraccionamiento al extracto clorofórmico obtenido de las extracciones líquido-líquido por cromatografía de columna Sílica gel realizando eluciones con butanol 100% y sucesivamente BAW (butanol:ácido acético:agua) 80:10:10 hasta 60:10:25. Se llevaron las fracciones obtenidas a concentración por rotaevaporación. Se obtuvieron fracciones *Mp* 3.1-*Mp* 3.14 unificadas según su similitud en los espectros UV.

##### 3.2.4 Fraccionamiento del marco acuoso de la extracción líquido-líquido.

Se realizó la liofilización del extracto, para luego realizar cromatografía de columna con Diaion HP-20 realizando con agua, agua:metanol, metanol y cloroformo:metanol y cloroformo:hexano. Obteniéndose fracciones *Mp* 5.1-*Mp* 5.18 unificadas según su similitud en los espectros UV.

#### 3.3 Obtención de los extractos para identificación y cuantificación de catecolaminas y actividad antioxidante.

Se tomaron 10 g de cáscara picada y húmeda de las muestras de plátano en los estados de maduración verde, pintón y maduro; esta muestra fue tomada de un almacén de cadena. Se realizaron extracciones independientes (4 veces x 15 minutos) en medio ácido, neutro y básico; con ácido clorhídrico 0.5 N, agua y carbonato de sodio 5 % (p/v). Posteriormente cada extracto fue filtrado.

##### 3.2.1 Determinación de actividad antioxidante por colorimetría.

Se determinó la actividad antioxidante de los extractos utilizando el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo DPPH. El procedimiento usado es una adaptación del método descrito por Sdiri<sup>38</sup>. Se usó como estándar o control positivo la Quercetina (Sigma-Aldrich) en diluciones seriadas de 515 ppm a 0,5 ppm. Todos los extractos se usaron a una concentración inicial de 1030 ppm. En la reacción se utilizó una solución isopropanólica de DPPH 103 ppm. En las microplacas se prepararon diluciones seriadas desde una concentración de 515 ppm hasta 0,5 ppm, posteriormente se adicionaron a todos los pozos 100  $\mu$ L de DPPH a 103 ppm. La microplaca se deja a temperatura



ambiente durante una hora y se midió el cambio de la absorbancia a 520 nm en un lector de microplacas. Los resultados corresponden al promedio de tres réplicas y fueron expresados en términos de la capacidad captadora de radicales de las muestras y el estándar que reduce en un 50% al radical DPPH (FRS<sub>50</sub>) en µg/mL. El tratamiento de los datos y los gráficos se hicieron con el programa GraphPad Prism® versión 5.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA).

### 3.3.2 Determinación de contenido de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.

La actividad antioxidante está relacionada generalmente con metabolitos que contienen grupos fenólicos, por ello se determinó el contenido de fenoles totales (CTF) por el método de Folin-Ciocalteu. Este método fue aplicado en formato de microplaca de 96 pozos y analizado colorimétricamente de acuerdo al método descrito previamente por Sdiri<sup>38</sup> con algunas modificaciones. Las muestras de los extractos estaban a una concentración inicial de 1030 ppm disueltos previamente en isopropanol se mezclaron con 50 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (solución al 20% en agua) con agitación durante 10 segundos. Posteriormente se adicionaron 50 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.6% p/v). La microplaca se incubó durante 1 hora a 60 °C, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos y finalmente se midió la absorbancia a 650 nm en el lector de microplacas. Se utilizó ácido gálico (AG) como estándar en una curva de calibración con un rango óptimo de 256 ppm a 16 ppm. Los resultados corresponden al promedio de tres réplicas se expresaron como mg de AG/mg de extracto húmedo (EH).

### 3.4 Cuantificación de catecolaminas presentes en los extractos de *M. paradisiaca* por Fluorescencia y HPLC.

#### 3.4.1 Fluorescencia.

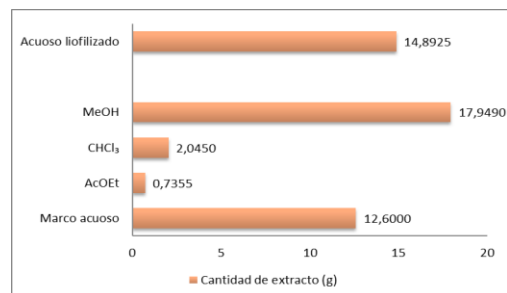
Para la determinación y cuantificación de catecolaminas en los extractos verde, pintón y maduro de la cáscara del plátano, se utilizó el equipo espectrofluorometro Jasco FP- 8500 teniendo en cuenta las longitudes de onda de emisión y excitación para las muestras es los extractos y para los estándares de catecolaminas L-Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Serotonina Sigma Aldrich. Se realizó la curva de calibración de los estándares con diluciones sucesivas en un rango de concentraciones de 0,024x10<sup>-7</sup> hasta 1,00 ppm. Las mediciones se realizaron por cuadruplicado.

#### 3.4.2 HPLC.

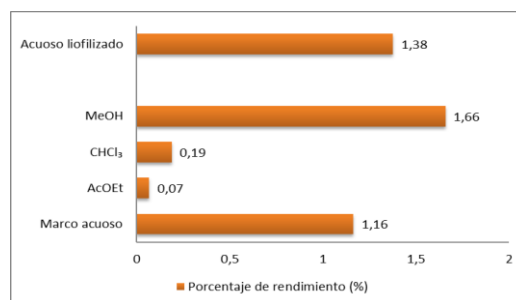
Se determinó y cuantificó el contenido de catecolaminas y serotonina en los extractos verde, pintón y maduro de la cáscara del plátano, utilizando los tiempos de retención determinados para cada uno de los estándares de las catecolaminas L-Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Serotonina Sigma Aldrich. Se realizó la curva de calibración para los estándares con concentraciones de 5,0 a 100 ppm por cuadruplicado.

## 4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

El rendimiento para los extractos obtenidos a partir de las cáscaras de *M. paradisiaca* en agua, metanol, cloroformo, acetato de etilo se presentan en la Figura 6 y Figura 7).



**Figura 6:** Cantidades obtenidas para el extracto acuoso liofilizado, metanol, cloroformo y el marco acuoso de *M. paradisiaca*.

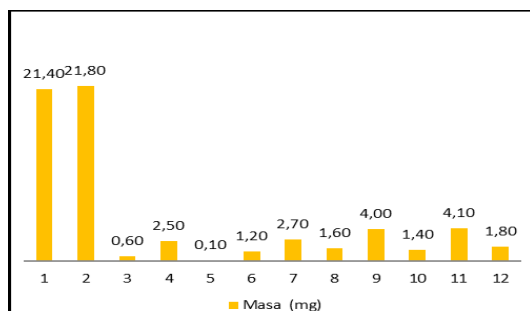


**Figura 7.** Porcentajes de rendimiento para los extractos de *M. paradisiaca*.

Como se observa en la Figura 6 y la Figura 7 la masa de los extractos de cloroformo, acetato de etilo y el marco acuoso es menor al obtenido para el extracto metanólico ya que parte de este extracto fue almacenado como contramuestra. Los extractos acuosos y metanólico presentan mayores porcentajes de rendimiento debido a que estos extractos no son llevados a sequedad totalmente.

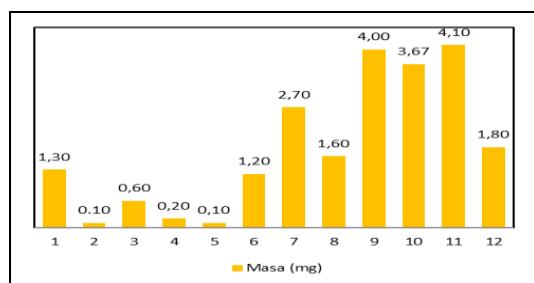
#### 4.1 Extracto acuoso liofilizado.

En el extracto acuoso liofilizado Mp1 (1,38 %) es de esperar compuestos de naturaleza polar en cada una de las 72 fracciones obtenidas que posteriormente fueron reunidas por la similitud en sus espectros UV tomados a 254 nm (compuestos aromáticos), 280 nm (fenoles) y 330 nm (flavonoides) esta relación se puede detallar en la sección (Anexos: Figura 1). Finalmente quedaron 12 fracciones con sus respectivas masas obtenidas (Figura 8).



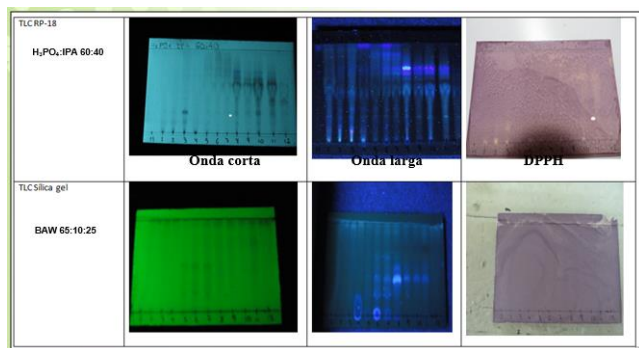
**Figura 8.** Distribución de masas para las fracciones obtenidas por cromatografía de columna Diaion del extracto acuoso liofilizado de *Mp1*.

Realizado el fraccionamiento de las 12 fracciones anteriormente descritas utilizando cartuchos de RP-18 se observa una distribución de masas correspondiente a la Figura 9. Con respecto a la Figura 8 se observa una disminución considerable en las masas obtenidas para las fracciones *Mp1.1* y *Mp1.2* ya que en estas dos primeras fracciones los compuestos de tipo glicosídicos pasan directo por los cartuchos de RP-18.



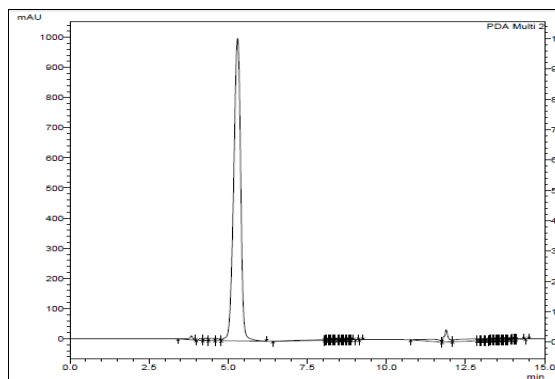
**Figura 9.** Distribución de masas para las fracciones obtenidas de C.C. Cartucho RP-18 en el extracto acuoso de *Mp1.1-12*.

El seguimiento realizado por TLC se observa que hay muy poca actividad antioxidante tanto en sílica gel como en RP-18 como se muestra en la Figura 10. Esto sucede porque el reactivo DPPH es de color púrpura que al entrar en contacto con compuestos con actividad antioxidante se revela y se torna de color amarillo.

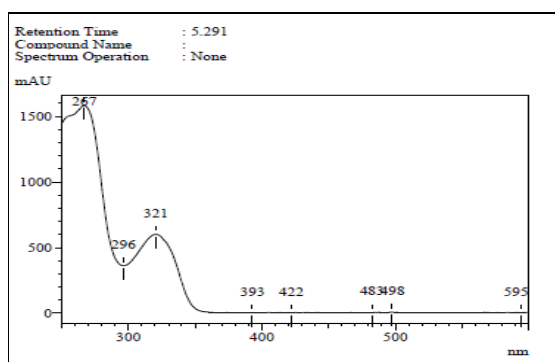


**Figura 10.** Análisis por TLC de las fracciones del cartucho RP-18 por sílica gel y RP-18 para el extracto acuoso de *M. paradisiaca*.

Igualmente se realizó el análisis preliminar por UV (Anexos: Figura 2) se obtuvo para la fracción *Mp1.6* un espectro UV característico para compuestos de tipo fenilpropanoides (Figura 11 A y 11 B. No se hace profundización sobre esta fracción ya que la masa obtenida fue de 1,20 mg y no fue posible realizarle análisis adicionales.



A

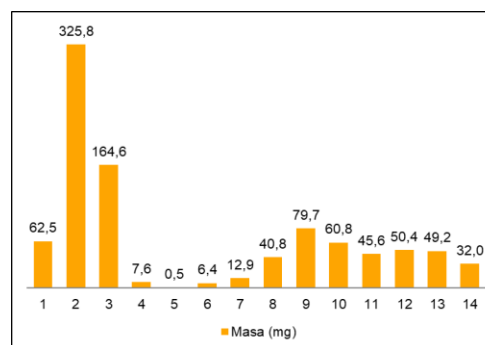


B

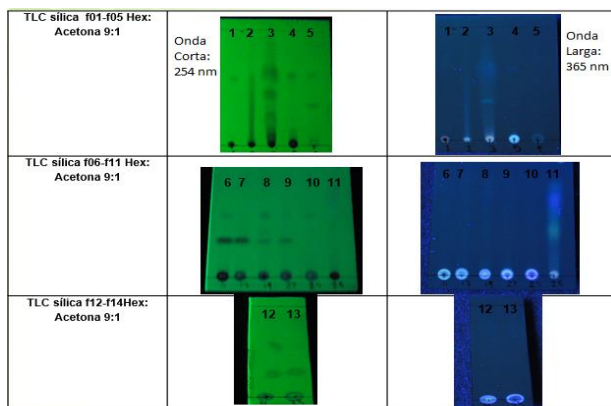
**Figura 11.** Cromatograma (A) y espectro UV (B) para la fracción *Mp1.6* obtenida por cartucho RP-18 en el extracto acuoso de *Mp1*. Fase móvil  $H_3PO_4:MeOH$  (10-100%) y fase estacionaria: Columna Restek Pinnacle DB C18 250 mm x4,6 mm x 5  $\mu m$ .

#### 4.2 Extracto clorofómico.

Se obtuvo la siguiente distribución de masas para el extracto clorofómico *Mp3* obtenido a partir del extracto metanólico *Mp2* (Figura 12).

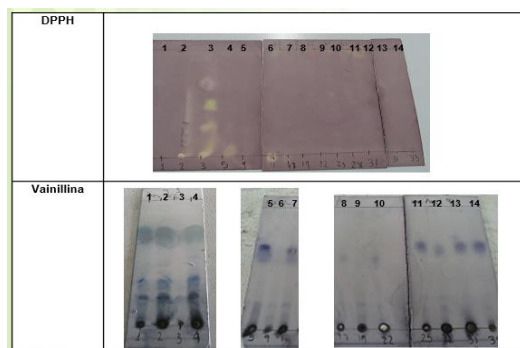


**Figura 12.** Distribución de masas para las fracciones obtenidas de cromatografía de columna sílica gel en el extracto clorofómico *Mp3*.



**Figura 13.** Análisis por TLC en sílica gel de las fracciones del extracto clorofórmico *Mp3*.

En la Figura 13 se observa marcadamente que en las primeras 5 fracciones hay presencia de compuestos de baja polaridad con poca actividad fluorescente; diferente a lo que ocurre en las fracciones 6 a la 14 donde la actividad fluorescente está presente en todas las fracciones de forma más marcada en los compuestos que quedan retenidos en la placa y no en los de menor polaridad; a excepción de la fracción 11 que indica la presencia de compuestos de baja polaridad con actividad fluorescente.

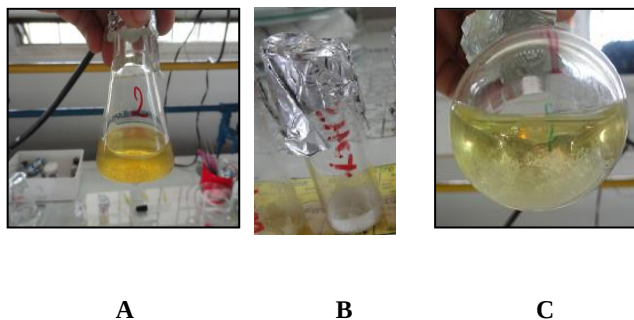


**Figura 14.** Análisis por TLC en sílica gel de las fracciones del extracto clorofórmico *Mp3*. Fase móvil: Hexano:Acetona 9:1.

En la Figura 14 se hace análisis por DPPH cualitativo y revelación con vainillina. En la fracción *Mp3.3* se evidencia una marcada actividad antioxidante tanto en los compuestos de baja polaridad como los que quedan retenidos en la placa.

El revelado con vainillina es usado para identificar la posible presencia de fenoles, esteroides, alcoholes y aceites esenciales. Como se observa en la Figura 14 los compuestos de baja polaridad son los que muestran revelación positiva con la vainillina<sup>39</sup>.

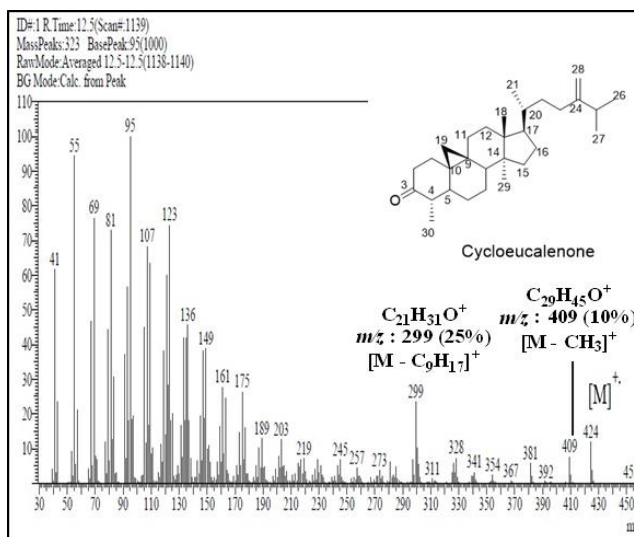
Durante el proceso de concentración la fracción *Mp3.2* y *Mp3.3* se observó la formación de un precipitado grumoso para *Mp3.2* y en la fracción *Mp3.3* el precipitado la formación de cristales (Figura 15).



**Figura 15:** A. Fracción obtenida de la concentración del extracto *Mp3.2*. B. Producto obtenida de la recrystalización en hexano de la fracción *Mp3.2*. C. Fracción obtenida del extracto *Mp3.3*.

A la fracción *Mp3.2* y *Mp3.3* se realizaron pruebas de recrystalización con lavados de metanol, acetona, cloroformo ó hexano dependiendo de su solubilidad. Obteniéndose de la fracción *Mp3.2* en los lavados con hexano 25,8 mg y *Mp3.3* en lavados con acetona y luego hexano 15,6 mg.

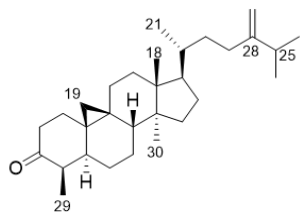
Razón por la cual se realiza el análisis por espectrometría de masas para la fracción *Mp3.2* en colaboración con la Universidad de Manizales. A la fracción *Mp3.3* no se le realiza ningún análisis.



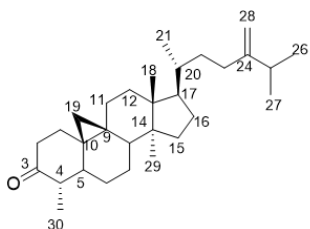
**Figura 16.** Espectro de masas para *Mp3.2*.

Para la fracción *Mp3.2* se obtuvo el espectro de masas de la Figura 16 donde aparece registrado el pico del ion molecular  $m/z$  424. Se ha encontrado según la literatura la existencia de dos posibles compuestos a los que pertenece el pico de ion molecular. El primero es un cicloterpeno o cicloabissinone<sup>40</sup> (4 $\beta$ ,14-dimetil-9,19-ciclo-5 $\alpha$ ,9 $\beta$ -ergost-24(28)-en-3-ona) (Figura 17) aislado de la especie *Harrisonia abyssinica* o el triterpeno cicloeculene<sup>41</sup> aislada de la cáscara de *M. paradisiaca* en extracto etanólico 70% como se observa en Figura 18.





**Figura 17:** Cicloabissinona aislada en la especie *Harrisonia abyssinica*.



**Figura 18:** Cicloeucalenona aislada de *M. paradisiaca*.

La diferencia encontrada en las dos estructuras presentadas en la Figura 17 y 18 es que para la cicloabissinona tiene el grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) de la posición 29 saliendo del plano; mientras que para la cicloeucalenona el grupo metilo de la posición 30 se encuentra hacia atrás del plano, esteroquímicamente son diferentes. Para estos dos compuestos se ha reportado actividad biológica contra la leishmaniasis, gonorrea, tuberculosis y mordeduras de serpiente<sup>40,41</sup>.

Queda como estudio posterior realizar los análisis completos para el compuesto aislado en *Mp3.2* como RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (1D y 2D) e infrarrojo que permitan corroborar con mayor certeza el compuesto y su estereoquímica.

#### 4.3 Extracto acetato de etilo.

Para el extracto en acetato de etilo se obtuvo un polvo de color beige (Figura 19) el cual sólo mostró solubilidad en agua considerando ser algún tipo de sal. Por lo cual no es de interés para este estudio.

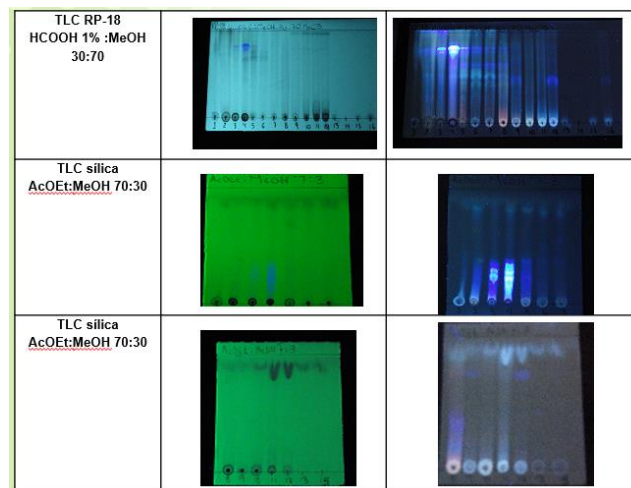


**Figura 19:** Extracto concentrado de acetato de etilo *Mp4*.

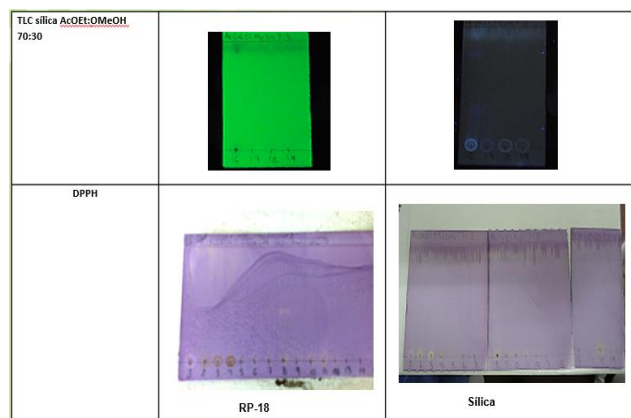
#### 4.4 Marco acuoso obtenido de las extracciones líquido-líquido.

En el marco acuoso de las extracciones líquido-líquido se obtuvieron 18 fracciones después de ser fraccionadas con Diaion HP20 y posteriormente cartucho RP-18. En esta extracción las fracciones obtenidas no presentaron pesos significativos para realizar posteriores análisis, sólo se realizó el seguimiento por TLC-RP-18 y sílica gel para las fracciones *Mp5.1-Mp5.15*. Cabe resaltar que las fracciones *Mp5.3* y *Mp5.4* presentan la mayor actividad fluorescente tanto en onda

corta (254 nm) como en onda larga (365 nm) indicando la presencia de compuestos de alta polaridad que revelan a estas longitudes de onda con este comportamiento (Figura 20).



**Figura 20:** Análisis por TLC de las fracciones de RP-18 y sílica gel para el marco acuoso de *Mp5.1-Mp5.15*.



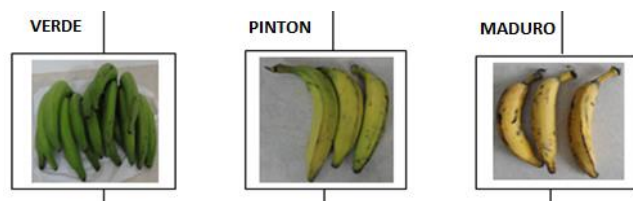
**Figura 21:** Análisis por TLC y TLC-DPPH de las fracciones *Mp5.16-Mp5.18* en RP-18 y sílica gel para el marco acuoso.

Se observa poca actividad antioxidante para estas fracciones (Figura 21). Y gran complejidad en las fracciones para ser evaluadas por HPLC.

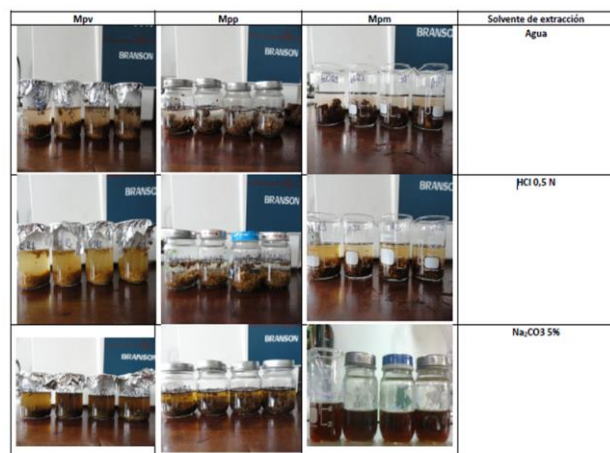
#### 4.5 Identificación y cuantificación de catecolaminas.

Químicamente, las catecolaminas son monoaminas. La estructura en anillo no solamente hace que estos compuestos sean naturalmente fluorescentes, sino que también los tornan sensibles a la luz y fácilmente oxidables<sup>40</sup>. Por ello se emplearon técnicas como la espectrofotometría, espectrofluorimetría y el HPLC para su cuantificación.

Preparada la muestra de la cáscara de *M. paradisiaca* en los tres estados de maduración verde, pintón y maduro (Figura 22) y en los tres medios de extracción ácido ( $\text{HCl}$  0,5N), neutro (agua) y básico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  5% p/v), como se enseña en la Figura 22 y Figura 23.



**Figura 22:** Muestras de *M. paradisiaca* utilizada para las preparaciones de los extractos.



**Figura 23:** Extractos obtenidos de la cáscara de *M. paradisiaca* en los tres estados de maduración y en los tres medios de extracción. Mpv(Verde), Mpp(pintón) y Mpm(maduro).

#### 4.5.1 Cuantificación por fluorescencia.

En la Tabla 2 se observan las longitudes de onda de excitación y de emisión obtenidos por ultravioleta y fluorescencia. Las mediciones en cada uno de los extractos se realizaron de forma directa.

**Tabla 2.** Longitudes de onda de excitación y emisión por fluorescencia para los extractos MpvA(verde-ácido), MpvN (verde-neutro), MpvB(verde-básico), MppA(pintón-ácido), MppN (pintón-neutro), MpB(pintón-básico), MppA(maduro-ácido), MppN (maduro-neutro), MpB(maduro-básico).

| Extracto | Longitud de onda excitación (nm) | Longitud de onda emisión (nm) |
|----------|----------------------------------|-------------------------------|
| MpvA     | 276,3±1,16                       | 311,3±1,11                    |
| MpvN     | 279,7±0,73                       | 316,5±2,38                    |
| MpvB     | 281,2±0,91                       | 300,2±1,58<br>339,6±0,85      |
| MppA     | 280,5±0,65                       | 314,0±1,32                    |
| MppN     | 281,3±0,97                       | 318,0±1,76                    |
| MppB     | 279,0±1,32                       | 331,3±1,89                    |
| MpmA     | 277,1±0,55                       | 309,5±1,26                    |
| MpmN     | 276,8±0,83                       | 314,8±1,26                    |
| MpmB     | 290,2±0,34                       | 357,3±3,00                    |

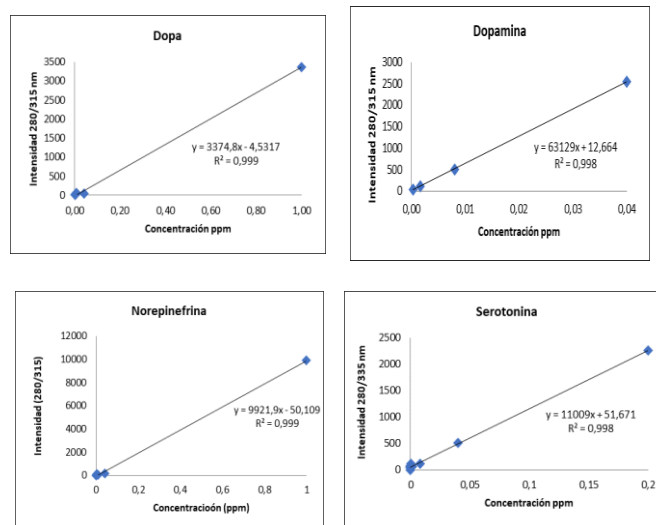
Los resultados obtenidos fueron comparados con los estándares de L-Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Serotonina obtenidos de la casa Sigma-Aldrich. Para ello se prepararon solucio-

nes stock de 1000 ppm de cada uno de los estándares disueltos previamente en isopropanol que arrojaron las longitudes de onda presentadas en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Longitudes de onda de excitación y emisión por ultravioleta y fluorescencia para los estándares de L-Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Serotonina.

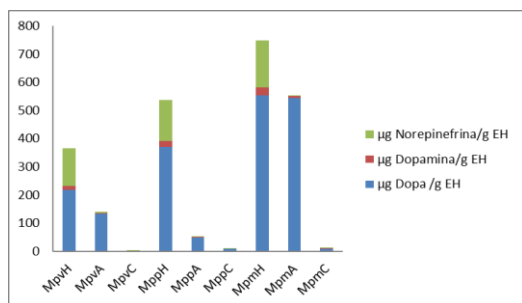
| Estándar catecolamina 1000 ppm | Longitud de onda excitación (nm) | Longitud de onda emisión (nm) |
|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| L-Dopa                         | 283,5                            | 316,0                         |
| Dopamina                       | 283,5                            | 315,5                         |
| Norepinefrina                  | 282,5                            | 314,0                         |
| Serotonina                     | 278,0<br>301,5                   | 335,0                         |

Se realizó la cuantificación de las catecolaminas presentes en cada uno de los extractos de *M. paradisiaca* en los tres estados de maduración y en medio ácido, neutro y básico; para ello se prepararon estándares con un rango de concentración de  $0,024 \times 10^{-7}$  ppm a 1,0 ppm usando diluciones sucesivas y se elaboró la curva de calibración realizando las medidas por cuadruplicado. Se usaron longitudes de onda de 280 nm (excitación) y 315 nm (emisión) para Dopa, Dopamina y Norepinefrina y para serotonina según la emisión es a 335 nm.



**Figura 24:** Curvas de calibración para cada uno de los estándares Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Serotonina por fluorescencia.

A partir de las curvas de calibración establecidas para cada uno de los estándares (Figura 24) se determinaron los  $\mu\text{g}$  de estándar/g EH, que corresponden a los mg de estándar contenidos en un gramo de extracto húmedo como aparece en la Figura 24.



**Figura 25:** Comparación de la concentración de los estándares de Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Serotonina en los extractos de verde, maduro y pintón de cáscara de *M. paradisiaca* en medio ácido, básico y neutro por fluorescencia.

En la Figura 25 se observa que la relación en concentración va de Dopa>Norepinefrina>Dopamina; la serotonina no fue cuantificable ya que no mostró señal en ninguno de los extractos. Según lo mencionado anteriormente, a medida que va aumentando el estado de maduración de la cáscara de *Mp* la concentración de catecolaminas es mayor. Verde<Pintón<Maduro.

Evaluando el medio de extracción para la muestra se obtiene que el medio ácido es el medio por el cual hay mejores resultados frente a la concentración de catecolaminas determinadas en cada extracto.

#### 4.5.2 CUANTIFICACIÓN POR HPLC

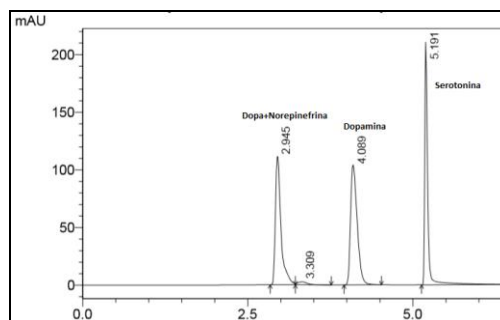
La segunda técnica de cuantificación usada fue HPLC. Para ello se prepararon soluciones stock de cada uno de los estándares Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Serotonina entre 5,0 ppm y 100 ppm con diluciones seriadas y por cuadruplicado.

Se usó como fase móvil  $H_3PO_4$  al 0,05% (A) y Metanol (B). A:B (95%:5%), con un flujo de 1,0 mL/min.

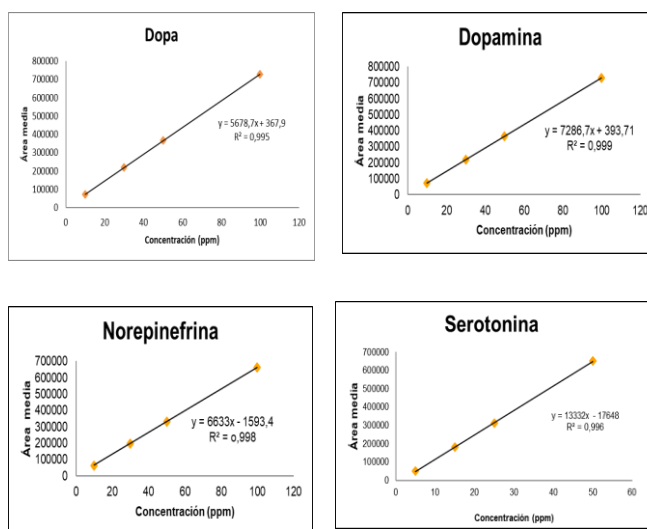
**Tabla 4:** Datos sobre los tiempos de retención y longitudes de onda para los estándares Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Serotonina.

| Muestra            | Tiempo retención (min) | Longitud de onda (nm) |
|--------------------|------------------------|-----------------------|
| Dopa+Norepinefrina | 2,945                  | 278                   |
| Dopamina           | 4,089                  | 279                   |
| Serotonina         | 5,191                  | 275 y 305             |

Según se observa en la Tabla 4 la Dopa y la Norepinefrina presentan tiempos de retención muy cercanos de tal forma que no fue posible su separación (Figura 26).

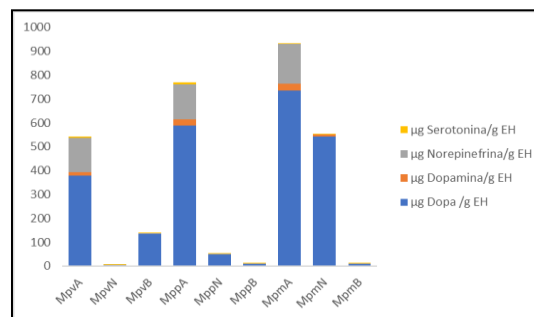


**Figura 26:** Cromatograma obtenido para la mezcla de los 4 estándares de Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Serotonina: Fase móvil  $H_3PO_4$  0.05%:MeOH (95:5) y fase estacionaria Columna Restek Pinnacle DB C18 250 mm x4,6 mm x5 µm.



**Figura 27:** Curvas de calibración para cada uno de los estándares Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Serotonina por HPLC.

A partir de las curvas de calibración obtenidas por HPLC como se observa en la Figura 27 se determinaron los µg de cada estándar en un gramo de extracto húmedo.



**Figura 28:** Comparación de la concentración de los estándares de Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Serotonina en los extractos de verde, maduro y pintón de cáscara de *M. paradisiaca* en medio ácido, básico y neutro por HPLC.

Según se observa en la Figura 28 el patrón de comportamiento es similar al arrojado por fluorescencia, a medida que aumenta

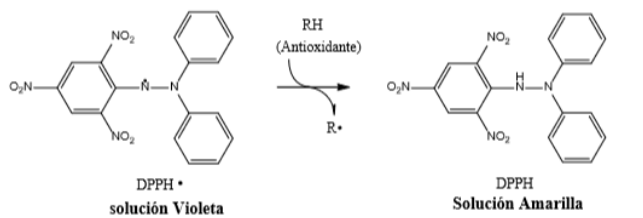
el estado de maduración de la cáscara de *M. paradisiaca* aumenta la concentración de las catecolaminas y que el medio más óptimo para lograr su identificación es el medio ácido.

Tanto para fluorescencia como para HPLC la catecolamina presentada en mayor concentración es la Dopa que es considera el precursor metabólico de la Dopamina, que a su vez es la encargada de los desordenes en los comportamiento, la sicosis, el placer y la euforia en los seres humanos.

#### 4.6 Actividad antioxidante por colorimetría.

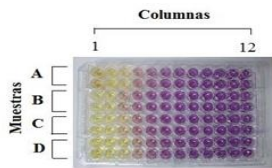
##### 4.6.1 Análisis por DPPH.

El radical DPPH es altamente estabilizado debido a la deslocalización de los spines por toda la molécula, que le otorga un color violeta oscuro en soluciones etanólicas con una banda de absorción característica alrededor de 517nm, en función de lo cual se llevan a cabo las determinaciones respectivas considerando su mecanismo de acción (Figura 29).



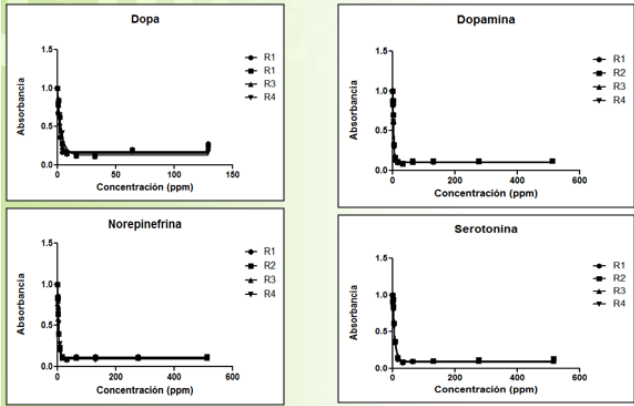
**Figura 29.** Mecanismo propuesto para la reacción entre DPPH• y compuestos antioxidantes.

En consecuencia, la actividad antioxidante se determinó en con base en la disminución de la absorbancia del radical DPPH mediante el uso de microplacas de 96 pozos (Figura 30) y un lector de microplacas Metertech AccuReader M965+. Por esta metodología los resultados son expresados normalmente como valores de FRS50 (Concentración inhibitoria) que corresponden a la concentración del compuesto o extracto necesaria para reducir en un 50 % la concentración inicial de DPPH. En el caso de estudio se usan además ácido ascórbico y quercetina dos antioxidantes comerciales como patrones de referencia.



**Figura 30:** Placa con muestras para la determinación de la actividad antioxidante con DPPH.

En la Figura 31 se observan las curvas de calibración por cuadruplicado con decaimiento exponencial en primera fase.



**Figura 31.** Curvas de calibración de los estándares de catecolaminas para determinar el FRS<sub>50</sub>.

La simbología que aparece en la parte derecha de las gráficas corresponde a designación dada para cada replica.

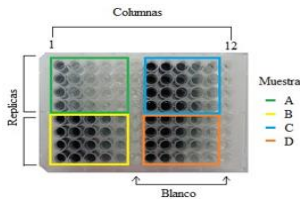
**Tabla 5:** Resultados obtenidos de FRS<sub>50</sub> para los estándares Dopa, Dopamina, Norepinefrina, Serotonina y las muestras de cáscara de *Mp* verde, pintón y maduro en medio ácido, neutro y básico.

| Muestra | FRS <sub>50</sub> (µg/mL)                    |
|---------|----------------------------------------------|
| MpvA    | 1,89±0,996                                   |
| MpvN    | 312,90±0,561                                 |
| MpvB    | 124,67±0,345                                 |
| MppA    | 4,54x10 <sup>-4</sup> ±9,06x10 <sup>-4</sup> |
| MppN    | 545,89±0,532                                 |
| MppB    | 345,78±0,145                                 |
| MpmA    | 5,12±0,735                                   |
| MpmN    | 621,31±0,490                                 |
| MpmB    | 515,56±0,178                                 |

En la Tabla 5 se observa que la actividad antioxidante de los extractos según el estado de maduración y el medio de extracción es mayor para *MppA* con 4,54x10<sup>-4</sup> µg/mL, *MpvA* 1,89 µg/mL y *MpmA* 5,12 µg/mL; el estado de maduración pintón y el medio de extracción ácido es el más promisorio.

##### 4.6.2 Análisis de contenido de fenoles totales.

La preparación del plato se muestra en la Figura 32. En donde los valores de absorbancia se trasforman a equivalentes de ácido gálico/ gramos de extracto por medio de la ecuación resultante de la curva de calibración del ácido gálico.



**Figura 32:** Disposición de las muestras en el plato para la Cuantificación de Fenoles por el método de Folin -Ciocalteu.



La actividad antioxidante está relacionada generalmente con metabolitos que contienen grupos fenólicos, por ello se determinó el contenido de fenoles totales (CTF) por el método de Folin-Ciocalteu.

**Tabla 6:** Contenido de fenoles totales en las muestras de cáscara de *Mp* verde, pintón y maduro en medio ácido, neutro y básico.

| Muestra | Contenido total de fenoles (uEq AG/g EH) |
|---------|------------------------------------------|
| MpvA    | 169,0±0,093                              |
| MpvN    | 21,0±0,52                                |
| MpvB    | 24,6±4,42                                |
| MppA    | 169,0±0,093                              |
| MppN    | 39,9±0,87                                |
| MppB    | 40,1±1,31                                |
| MpmA    | 1403,3±1,39                              |
| MpmN    | 70,2±0,16                                |
| MpmB    | 65,6±3,05                                |

En la Tabla 6 se observan los resultados para el contenido de fenoles totales en los extractos. El mayor contenido de fenoles por el método Folin-Ciocalteu según el estado de maduración y medio de extracción corresponden a MpmA 1403,3 µEq AG/gEH, MppA 169 µEq AG/gEH y MpvA 92,7 µEq AG/gEH; a medida que el estado de maduración aumenta el contenido fenólico se incrementa maduro>pintón >verde. El medio de extracción más promisorio es el medio ácido. Se encuentra que existe una relación directa entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante en todos los extractos de cáscara de *M. paradisiaca*.

## 5. CONCLUSIONES

- ❖ Se aisló un compuesto terpenoide cíclico del extracto clorofórmico de la cáscara de *M. paradisiaca* correspondiente a la cicloabissinone ó clicloeucaleanona reportados en la literatura los cuales presentan el m/z:424. Se recomienda realizar estudios posteriores de RMN e IR para completar el estudio espectroscópico y corroborar su estructura y su estereoquímica.
- ❖ Se determinó por TLC-DPPH que el extracto más promisorio en cuanto actividad antioxidante fue el extracto clorofórmico en donde la fracción *Mp3.2* y *Mp3.3* corresponden al terpenoide cíclico aislado con características antioxidantes.
- ❖ Se logró identificar de forma cualitativa por HPLC la presencia de compuestos de tipo fenil propanoides en los extractos polares de cáscara de *M. paradisiaca*.
- ❖ Se permitió la cuantificación de catecolaminas por fluorescencia y HPLC encontrando que la catecolamina que se encuentra en mayor concentración en los extractos de cáscara de *M. paradisiaca* es la Dopa.
- ❖ Debido a los tiempos de retención entre la Dopa y la Norepinefrina tan cercanos entre sí tr: 2,945 min y tr:3,309 min no fue posible realizar su separación por HPLC.
- ❖ Usando HPLC se logró cuantificar la serotonina que no fue posible por hacerlo por fluorescencia.
- ❖ Se determinó que por fluorescencia y HPLC a medida que aumenta el grado de maduración de la cáscara

de *M. paradisiaca* aumentaba la concentración de catecolaminas y que el mejor medio de extracción es el ácido.

- ❖ Los extractos con mayor actividad antioxidante según el estado de maduración y el medio de extracción corresponden a MppA con  $4,54 \times 10^{-4}$  µg/mL, MpvA 1,89 µg/mL y MpmA 5,12 µg/mL; el estado de maduración pintón y el medio de extracción ácido es el más promisorio.
- ❖ Los extractos con mayor contenido de fenoles por Folin-Ciocalteu según el estado de maduración y medio de extracción corresponden a MpmA 1403,3 µEq AG/gEH, MppA 169 µEq AG/gEH y MpvA 92,7 µEq AG/gEH; a medida que el estado de maduración aumenta el contenido fenólico se incrementa maduro>pintón >verde. El medio de extracción más promisorio es el medio ácido.

## 6. REFERENCIAS

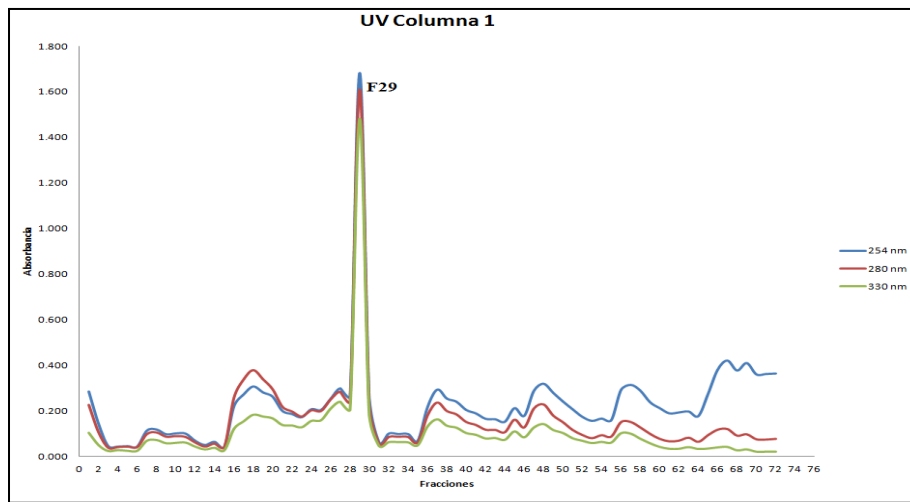
1. Agarwal P.K., Singh A., Gaurav K., Goel S., Khan H.D., Goel R.K. Evaluation of wound healing activity of extracts of plantain banana (*Musa sapientum* var. *paradisiaca*) in rats. Indian J. Exp. Biol. 2009; 47: 322-40.
2. Ahmad I., Beg A.Z. 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. J. Ethnopharmacol. 2001; 74: 113-123.
3. Akihisa T., Kimura Y., Tamura T. Cyclotrane triterpenes from the fruit peel of *Musa sapientum*. Phytochemistry 1998; 47(6): 1107-1110.
4. Alarcon-Aguilara F.J., Roman-Ramos R., Perez-Gutierrez S., Aguilar-Contreras A., Contreras-Weber C.C., Flores-Saenz J.L. Study of the antihyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. J. Ethnopharmacol. 1998; 61:101-110.
5. Alisi C.S., Nwanyanwu C.E., Akujobi C.O., Ibegbulem C.O. Inhibition of dehydrogenase activity in pathogenic bacteria isolates by aqueous extracts of *Musa paradisiaca* (var. *sapientum*). Afr. J. Biotechnol. 2008; 7(12): 1821-1825.
6. Andrade C.U.B., Perazzo F.F., Maistro E.L. Mutagenicity of the *Musa paradisiaca* (Musaceae) fruit peel extract in mouse peripheral blood cells in vivo. Genet. Mol. Res. 2008; 7(3): 725-732.
7. Anhwange B.A. Chemical Composition of *Musa sapientum* (Banana) Peels. J. Food Tech. 2008; 6(6): 263-266.
8. Benitez M.A., Navarro E., Feria M., Trujillo J., Boada J. Pharmacological study of the muscle paralyzing activity of the juice of the banana trunk. Toxicon. 1991; 29: 511-515.
9. Block L.H., Tarnowski A. Banana Diet in Bacillary Dysentery. Am. J. Dig. Dis. Nutr. 1941; 7(1): 3-8.
10. Borges M.H., Alves D.L.F., Raslan D.S., Piló-Veloso D., Rodrigues V.M., Homs-Brandeburgo M.I., de Lima M.E. Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A2, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. J. Ethnopharmacol. 2005; 98: 21-29.
11. Chodera A., Dabrowska K., Sloderbach A., Skrzypczak L., Budzianowski J. Effect of flavanoid



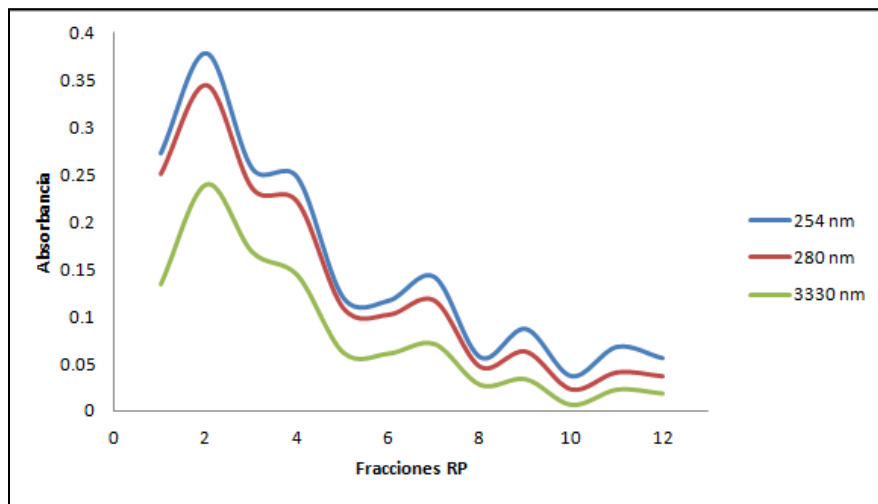
- fractions of *Solidago virgaurea* L. on diuresis and levels of electrolytes. *Acta. Pol. Pharm.* 1991; 48: 35-37.
12. Coe F., Anderson G.J. Ethnobotany of the Sumu (Ulwa) of southeastern Nicaragua and comparisons with Miskitu plant lore. *Econ. Bot.* 1999; 53: 363-383.
13. Duita P.K., Das A.K., Banerji N. A Tetracyclic Triterpenoid from *Musa paradisiaca*. *Phytochem.* 1983; 22(11): 2563-2564.
14. Dunjić B.S., Svensson I., Axelsson J., Adlercreutz P., Ar'Rajab A., Larsson K., Bengmark S. Green banana protection of gastric mucosa against experimentally induced injuries in rats. A multicomponent mechanism? *Scand. J. Gastroenterol.* 1993; 28(10):894-598.
15. Emaga T.H., Andrianaivo R.H., Wathelet B., Tchan-go J.T., Paquot M. Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. *Food Chem.* 2007; 103: 590–600.
16. Emery E.A., Ahmad S., Koethe J.D., Skipper A., Perlmutter S., Paskin D.L. Banana flakes control diarrhea in enterally fed patients. *Nutr. Clin. Pract.* 1997; 12(2): 72-75.
17. Fagbemi J.F., Ugoji E., Adenipekun T., Adelowotan O. Evaluation of the antimicrobial properties of unripe banana (*Musa sapientum* L.), lemon grass (*Cymbopogon citratus* S.) and turmeric (*Curcuma longa* L.) on pathogens. *Afr. J. Biotechnol.* 2009; 8(7): 1176-1182.
18. Ghani A. Medicinal Plants of Bangladesh: Chemical Constituents and Uses. 2nd Ed. The Asiatic Society of Bangladesh, Dhaka, Bangladesh (2003) 315.
19. Ghoshal S. Steryl Glycosides and Acyl Steryl Glycosides from *Musa paradisiaca*. *Phytochem.* 1985; 24(8): 1807-1810.
20. Goel R.K., Sairam K. Anti-ulcer Drugs from Indigenous Sources with Emphasis on *Musa sapientum*, *Tamrabhasma*, *Asparagus racemosus* and *Zingiber officinale*. *Indian J. Pharmacol.* 2002; 34: 100-110.
21. Gomathy R., Vijayalekshmi N.R., Kurup P.A. Hypolipidemic principle of the inflorescence stalk of plantain (*Musa sapientum*). *J. Biosci.* 1989; 14: 301-309.
22. Gomathy R., Vijayalekshmi N.R., Kurup P.A. Hypoglycemic action of the pectin present in the juice of the inflorescence stalk of plantain (*Musa sapientum*)—Mechanism of action. *J. Biosci.* 1990; 5(4): 297-303.
23. Jachak S.M., Saklani A. Challenges and opportunities in drug discovery from plants. *Curr. Sci.*, 2007; 92(9): 1251-1257.
24. Jain D.L., Baheti A.M., Parakh S.R., Ingale S.P., Ingale P.L. Study of antacid and diuretic activity of ash and extracts of *Musa sapientum* L. fruit peel. *Phcog. Mag.* 2007; 3(10): 116-119.
25. Jang D.S., Park E.J., Hawthorne M.E., Vigo J.S., Graham J.G., Cabieses F., Santarsiero B.D., Mesecar A.D., Fong H.H.S., Mehta R.G., Pezzuto J.M., Kinghorn A.D. Constituents of *Musa × paradisiaca* Cultivar with the Potential to Induce the Phase II Enzyme, Quinone Reductase. *J. Agr. Food Chem.* 2002; 50(22): 6330–6334.
26. Kaou A.M., Mahiou-Leddé V., Hutter S., Aïnouddine S., Hassani S., Yahaya I., Azas N., Ollivie E. Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 116: 74–83.
27. Ketiku A.O. Chemical composition of unripe (green) and ripe plantain (*Musa paradisiaca*). *J. Sci. Food Agr.* 1973; 24(6): 703 – 707.
28. Khare C.P. (Ed.). *Indian Medicinal Plants*, Springer Science+BusinessMedia, New York, USA (2007) 426.
29. Lewis D.L., Field W.D., Shaw G.P. A natural flavonoid present in unripe plantain banana pulp (*Musa sapientum* L. var. *paradisiaca*) protects the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 65: 283–288.
30. Lewis D.A., Shaw G.P. A natural flavonoid and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. *J. Nutr. Biochem.* 2001; 12: 95-100.
31. Saraswathi, N.T., Gnanam, F.D. Effect of medicinal plants on the crystallization of cholesterol. *J. Cryst. Growth* 1997; 179: 611-617.
32. Shanmugavelu K.G., Rangaswami G. Tryptophan and Indole Compounds in Banana Ovaries. *Nature* 1962; 194: 775–776. Singh Y.N., Dryden W.F. The Augmenting Action of Banana Tree Juice on Skeletal Muscle Contraction. *Toxicon.* 1990; 28(10): 1229-1236.
33. Singh S.K., Kesari A.N., Rai P.K., Watal G. Assessment of Glycemic Potential of *Musa paradisiaca* Stem Juice. *Indian J. Clin. Biochem.* 2007; 22(2): 48-52.
34. Sood A.R., Bajpai A., Digits M. Pharmacological and biological studies on saponins. *Indian J. Pharmacol.* 1985; 17: 178-179. Tewtrakul S., Itharat A., Thammaratwasik P., Ooraikul B. Antiallergic and anti-microbial activities of some Thai crops. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2008; 30(4): 467-473.
35. Usha V., Vijayammal P.L., Kurup P.A. Effect of dietary fiber from banana (*Musa paradisiaca*) on cholesterol metabolism. *Indian J. Exp Biol.* 1984; 22(10): 550-554.
36. Vettorazz G. 5-Hydroxytryptamine Content of Bananas and Banana Products. *Food Cosmet. Toxicol.* 1974; 12: 107-113.
37. Vijayakumar S., Presannakumar G., Vijayalakshmi N.R. Antioxidant activity of banana flavonoids. *Fitoterapia* 2008; 79: 279–282.
38. Sdiri, S.; Bermejo, A.; Aleza, P.; Navarro, P.; Salvador, A. Phenolic composition, organic acids, sugars, vitamin C and antioxidant activity in the juice of two new triploid late-season mandarins. *Food Research International.* 2012. 49(1): 462-468.
39. Vijayakumar S., Presannakumar G., Vijayalakshmi N.R. Investigations on the Effect of Flavonoids from Banana, *Musa paradisiaca* L. on Lipid Metabolism in Rats. *J. Diet. Suppl.* 2009; 6(2): 111–123.
40. Balde AM, Apers S, De Bruyne T et al. *Planta Med* 2000;66-67.
41. Akihisa T., Kimura Y., Tamura T. Cyclotran triterpenes from the fruit peel of *Musa sapientum*. *Phytochemistry* 1998; 47(6): 1107-1110.



## ANEXOS



**Figura 1.** Relación de los espectros UV para las fracciones del extracto acuoso de la *Musa Paradisiaca*.



**Figura 2.** Relación de los espectros UV para las fracciones obtenidas por C.C. RP-18 del extracto acuoso de la *Musa Paradisiaca*.

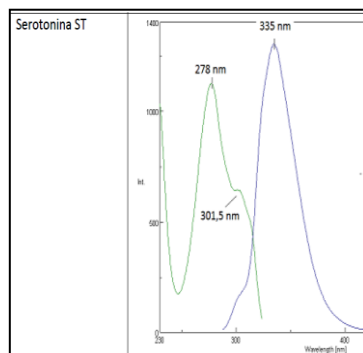
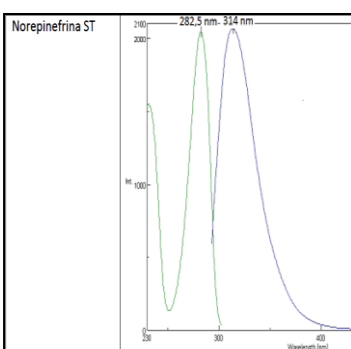
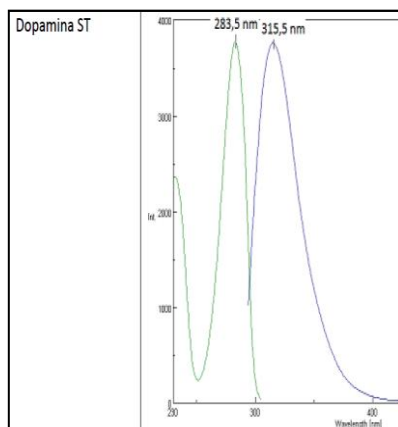
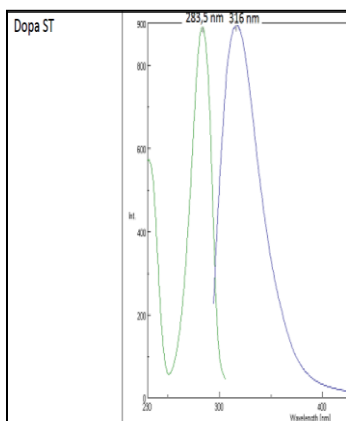


Figura 3: Espectro de excitación y emisión por fluorescencia para los estándares de catecolaminas Dopa, Dopamina, Norepinefrina y Serotonina.