



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL
PSEUDOTALLO DE MUSA X PARADISIACA (BANANO)

MURGUEITIO MANZANARES ERWIN LEONARDO
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

MACHALA
2018



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA
SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL
PSEUDOTALLO DE MUSA X PARADISIACA (BANANO)

MURGUETTIO MANZANARES ERWIN LEONARDO
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

MACHALA
2018



UTMACH

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA
SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL PSEUDOTALLO DE
MUSA X PARADISIACA (BANANO)

MURGUEITIO MANZANARES ERWIN LEONARDO
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

CAMPO FERNANDEZ MERCEDES

MACHALA, 24 DE SEPTIEMBRE DE 2018

MACHALA
2018

Nota de aceptación:

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL PSEUDOTALLO DE Musa x paradisiaca (Banano), hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.



CAMPO FERNANDEZ MERCEDES

0959164625

TUTOR - ESPECIALISTA 1



MARQUEZ HERNANDEZ INGRID

0959479577

ESPECIALISTA 2



GONZALEZ CARRASCO VICTOR HUGO

0702323809

ESPECIALISTA 3

Machala, 24 de septiembre de 2018

Urkund Analysis Result

Analysed Document: Tesis URKUN.docx (D41014722)
Submitted: 8/28/2018 2:32:00 PM
Submitted By: mcampo@utmachala.edu.ec
Significance: 6 %

Sources included in the report:

para urkund.docx (D41014585)
Trabajo de Titulacion_Lenin Alvarez_Alex Tene.docx (D40910226)
TESIS BASTIDAS-FERNANDEZ.docx (D16302363)
NEIRA QUEZADA CELIINDA MARISOL_PT-010518.pdf (D41004883)
BASTIDAS BASTIDAS ELSA VIVIANA_SOJOS ASECIO CARLA GABRIELA_PT-010517.pdf
(D30208007)
finalllllllllllllllllll.docx (D16040636)
finalllllllllllllllllll.docx (D16342371)
<https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/1413/Tesis%20Doctoral%20Vicente%20Gianna%202013.pdf;sequence=1>

Instances where selected sources appear:

22

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

El que suscribe, MURGUEITIO MANZANARES ERWIN LEONARDO, en calidad de autor del siguiente trabajo escrito titulado COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL PSEUDOTALLO DE *Musa x paradisiaca* (Banano), otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

El autor declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

El autor como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 24 de septiembre de 2018

Erwin Murgueitio

MURGUEITIO MANZANARES ERWIN LEONARDO
0705697662

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a Dios por haberme dado la vida y permitirme que haya llegado a este momento tan importante en mi formación profesional.

La presente tesis está dedicada a mi mamá y hermano por todo el amor y apoyo brindado durante toda la etapa de estudios, por ser un pilar fundamental dentro de este proceso para lograr dicho objetivo y a mis amigas por acompañarme en este largo proceso de estudios.

Erwin Murgueitio

AGRADECIMIENTO

Mis agradecimientos sinceros a mi tutora de tesis Lcda. Mercedes Campo Fernández PhD, por ser la guía durante mi trabajo de titulación brindándome sus conocimientos y apoyo constante de igual manera a mi cotutor Lcdo. Mauro Nirchio Tursellino.

Agradezco a mi familia de manera muy especial por apoyarme en cada paso de este proceso y ser una fuente de inspiración para ser una mejor persona cada día

También agradezco a mis amigas por todos los gratos momentos compartidos durante todo el periodo académico

Erwin Murgueitio

RESUMEN

La industria del banano para exportación es un rubro importante en la economía de países de América Latina y del Caribe, Asia y África. La cosecha y postcosecha del banano o del plátano genera grandes cantidades de residuos que, sin el debido tratamiento, podrían representar un riesgo para el medio ambiente. Por tal motivo el objetivo general de la investigación fue evaluar las propiedades químicas y biológicas de extractos acuosos e hidroalcohólicos obtenidos del pseudotallo de la *Musa x paradisiaca* L.

A la droga cruda molida se le determinó, como control de la calidad, la humedad residual, reflejando un 5,887%, parámetro que se encuentra dentro de los límites permisibles; para las cenizas totales se obtuvo un 16,287%, el que, aunque es elevado, entra dentro del variable rango referido por otros autores para la especie.

Dada la necesidad de determinar cuáles eran los elementos inorgánicos presentes en la droga cruda, se realizó la determinación, no sólo de minerales beneficiosos, sino también de los metales pesados. En tal sentido, la droga vegetal se destacó por la presencia de potasio, como el macronutriente de mayor abundancia, con un 5,81%; seguido de los micronutrientes hierro y manganeso con 169,70 y 129,80 ppm, respectivamente. Los metales pesados (As y Pb) no superan los límites permisibles.

Se elaboraron tres tipos de extractos mediante maceración por ultrasonido (acuoso, hidroalcohólico 8:2 y 1:1), buscando la extracción, fundamentalmente, de saponinas. Se realizó la evaluación química preliminar, sugiriendo, en los tres extractos, la existencia de saponinas (resultado muy positivo), además de flavonoides y azúcares reductores. Solo el extracto acuoso exhibió la presencia de aminoácidos. El análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) de los tres extractos, evidenció un revelado característico de saponinas, discreta existencia de compuestos con grupos cromóforos conjugados, sobre todo, de alta polaridad, los que justifican el modesto poder antioxidante observado en el revelado con DPPH.

Ante los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico y por el análisis mediante CCD, se decidió cuantificar la cantidad de saponinas presentes en los tres extractos, demostrándose que la mayor concentración de saponinas se logró en el acuoso e hidroalcohólico (1:1). Además, se realizó la cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu, observándose que el extracto hidroalcohólico (1:1), posee

la mayor cantidad de compuesto fenólicos, con 4,343 mg EAG/ por cada gramo de extracto seco obtenido.

El estudio químico más preciso se desarrolló mediante CLAE/DAD/EM, utilizando una columna Accucore RP-MS C18, de dimensiones (100 x 2,1 mm: 2 µm) y como fase móvil acetonitrilo y agua ácida (ácido fórmico al 0,1 % en agua), aplicando una elución en gradiente. El análisis por espectrometría de masas se realizó en modo positivo, optimizando las condiciones (archivo de sintonía), en base a una infusión de una disolución de quercetina (15 ppm). El análisis permitió la identificación de tres flavonoides (rutina, isorhamnetin-3-O-rutinósido y kaempferol-3-O-rutinósido) y dos glicósidos de ácido fenólico como lo son (glucogalina y ácido ferúlico-hexósido).

Los estudios biológicos preliminares se realizaron en dos direcciones, se ensayó la actividad expectorante del extracto hidroalcohólico (1:1), siguiendo el modelo de rojo fenol en secreciones de ratón y utilizando como control positivo Bisolvon (bromhexina). La dosis ensayada (500 mg/kg de peso del animal) mostró un efecto mucolítico similar al control positivo (Bisolvon) el que presenta reconocida actividad como expectorante a una baja dosis.

La posible actividad molusquicida del mismo extracto fue desarrollada sobre el gasterópodo *Cerithidea valida*. Si bien no fue posible establecer efecto tóxico letal del extracto hidroalcohólico (1:1) de pseudotallo de *M paradisiaca*, si se detectó un efecto de retracción del cuerpo en la concha y cierre de la cavidad que provocó la inmovilidad de los moluscos.

Palabras claves: *Musa x paradisiaca* L, pseudotallo, saponinas, expectorante, molusquicida

ABSTRACT

The banana industry for export is an important item in the economy of countries in Latin America and the Caribbean, Asia and Africa. The harvest and post-harvest of bananas or plantains generates large amounts of waste that, without proper treatment, could represent a risk to the environment. For this reason, the general objective of the research was to evaluate the chemical and biological properties of aqueous and hydroalcoholic extracts obtained from the pseudostem of *Musa x paradisiaca* L.

To the raw milled drug was determined, as a quality control, residual moisture reflecting a 5.887%, parameter that is within the permissible limits; for the total ashes, 16.287% was obtained, which, although it is high, falls within the range variable referred to by other authors for the species.

Given the need to determine which were the inorganic elements present in the crude drug, the determination was made, not only of beneficial minerals, but also of heavy metals. highlighted by the presence of potassium, as the macronutrient of greatest abundance, with 5.81%; followed by iron and manganese micronutrients with 169.70 and 129.80 ppm, respectively. Heavy metals (As and Pb) do not exceed the permissible limits.

Three types of extracts were elaborated by ultrasonic maceration (aqueous, hydroalcoholic 8: 2 and 1: 1), seeking the extraction, mainly, of saponins. The preliminary chemical evaluation was carried out, suggesting, in the three extracts, the existence of such natural products (very positive result), in addition to flavonoids and reducing sugars. Only the aqueous extract exhibited the presence of amino acids. The analysis by thin layer chromatography (CCD) of the three extracts, showed a characteristic revelation of saponins, discrete existence of compounds with conjugated chromophore groups, especially of high polarity, which justify the modest antioxidant power observed in the development with DPPH.

In view of the results obtained in phytochemical screening and by CCD analysis, it was decided to quantify the amount of saponins present in the three extracts, demonstrating that the highest concentration of saponins was achieved in the aqueous and hydroalcoholic (1: 1). In addition, the quantification of phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu method was performed, observing that the hydroalcoholic extract (1: 1), has the highest amount of phenolic compounds, with 4.343 mg EAG / per gram of dry extract obtained

The most precise chemical study was developed by CLAE / DAD / EM, using an Accucore RP-MS C18 column, with dimensions (100 x 2.1 mm: 2 µm) and as mobile phase acetonitrile and acidic water (formic acid 0, 1% in water), applying a gradient elution. The analysis by mass spectrometry was performed in positive mode, optimizing the conditions (tuning file), based on an infusion of a solution of quercetin (15 ppm). The analysis allowed the identification of three flavonoids (rutin, isorhamnetin-3-O-rutinósido and kaempferol-3-O-rutinoside) and two glycosides of phenolic acid as they are (glucogalin and ferulic acid-hexoside).

The preliminary biological studies were carried out in two directions, the expectorant activity of the hydroalcoholic extract was tested (1: 1), following the phenol red model in mouse secretions and using Bisolvon (bromhexine) as a positive control. The dose tested (500 mg/kg of animal weight) showed a mucolytic effect similar to the positive control (Bisolvon) which has recognized activity as an expectorant at a low dose.

The possible molluscicidal activity of the same extract was developed on the valid Cerithidea gastropod. Although it was not possible to establish a lethal toxic effect of the hydroalcoholic extract (1: 1) of pseudotallo of *M paradisiaca*, if a retraction effect of the body was detected in the shell and closure of the cavity that caused the immobility of the molluscs.

Keywords: *Musa x paradisiaca* L, pseudostem, saponins, expectorant, molluscicide

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

Problema

Hipótesis

Objetivo general

Objetivos específicos

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 3

1.1 Generalidades 3

1.2 Descripción botánica de la *Musa x paradisiaca* L (banano) 3

1.3 Composición química del banano 6

1.4 Actividad biológica 7

1.5 Saponinas 7

1.5.1 Métodos para el estudio fitoquímico de las saponinas 8

1.5.2 Propiedades físico-químicas 9

1.5.3 Usos y actividad terapéutica 10

1.5.4 Efecto molusquicida 10

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS 12

2.1. Cosecha de *Musa x paradisiaca* 12

2.2 Tratamiento postcosecha 12

2.3 Determinación de humedad residual 12

2.4 Determinación de cenizas totales 12

2.5 Determinación de minerales 13

2.6 Determinación de metales pesados arsénico (As) y plomo (Pb) 13

2.7 Preparación de los extractos secos acuoso e hidroalcohólicos del seudotallo de *M. paradisiaca* 13

2.8 Tamizaje fitoquímico 14

| | | |
|--------------------------------------|---|----|
| 2.9 | Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) de los tres extractos del pseudotallo de <i>M. paradisiaca</i> | 15 |
| 2.11 | Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu | 16 |
| 2.13 | Evaluación preliminar de la actividad mucolítica | 18 |
| 2.14 | Evaluación de la actividad molusquicida en el gasterópodo <i>Cerithidea valida</i> | 19 |
| CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | | 22 |
| 3.1 | Análisis físico-químico a la droga vegetal | 22 |
| 3.2 | Preparación de los extractos acuoso e hidroalcohólico del pseudotallo de <i>M. paradisiaca</i> | 25 |
| 3.3 | Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) | 28 |
| 3.4 | Cuantificación de saponinas y fenoles totales | 30 |
| 3.5 | Análisis químico por CLAE/EM | 33 |
| 3.7 | Evaluación del efecto del extracto de <i>Musa x paradisiaca</i> en el gasterópodo <i>Cerithidea valida</i> | 36 |
| CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES | | 39 |
| CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES | | 41 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | | 42 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Clasificación taxonómica de la <i>M. x paradisiaca</i> (banano) | 15 |
| Tabla 2. Ensayos realizados en extractos acuoso, e hidroalcohólico (8:2, 1:1) | 25 |
| Tabla 3. Grupos de ensayo empleados en la determinación preliminar del efecto mucolítico | 30 |
| Tabla 4. Parámetros de calidad determinados a la droga cruda. | 34 |
| Tabla 5. Minerales identificados en el pseudotallo de la <i>M. paradisiaca</i> . | 35 |
| Tabla 6. Análisis de metales pesados en el pseudotallo de la <i>M. paradisiaca</i> . | 36 |
| Tabla 7. Resultados de los ensayos del tamizaje fitoquímico para los tres extractos | 38 |
| Tabla 8. Cuantificación de saponinas y fenoles en los extractos acuoso e hidroalcohólicos | 42 |
| Tabla 9. Productos naturales identificados por CLAE/DAD/EM | 44 |
| Tabla 10. Resultados del ensayo mucolítico preliminar realizado para el extracto hidroalcohólico (1:1) de la <i>M. paradisiaca</i> | 46 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Planta de banano adulta (<i>M. paradisiaca</i>) | 16 |
| Figura 2. Estructuras de los núcleos correspondientes a las saponinas | 19 |
| Figura 3. Análisis por CCD de tres extractos del pseudotallo de <i>M. paradisiaca</i> . FM: BAW (65:25:10). FE: Placas de Sílica Gel GF ₂₅₄ con soporte de aluminio. B1: H ₂ O; B2: 20% ETOH; B3: 50% ETOH; Psap: patrón (<i>Quijalla saponaria</i>) | 40 |
| Figura 4. Cromatograma de la corriente iónica principal obtenido para el extracto hidroalcohólico (1:1) de la <i>M. paradisiaca</i> | 44 |
| Figura 5. Gráfica del modelo ajustado con intervalos de confianza al 95% | 48 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| ANEXO 1. Prueba de Múltiple Rangos para Cuantificación de saponinas | 65 |
| ANEXO 2. Prueba de Múltiple Rangos para Cuantificación de fenoles | 65 |

INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales a lo largo de tiempo se ha vuelto una práctica muy común. Según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80 % de la población tercermundista recurre a la utilización de los productos naturales, debido a sus beneficios terapéuticos. En el año 2000 un estudio publicado por el mismo organismo, promueve el estudio de las plantas medicinales como fuente terapéutica, sin embargo, es necesario conocer las limitantes que poseen dichas plantas al momento de su administración (Buedo & Giagante, 2015).

Los productos naturales en la actualidad tienen muchas aplicaciones en el campo de la acuicultura debido a que presentan menos riesgos frente a los productos sintéticos. Estudios relacionados con el uso de los productos naturales en el ámbito de la acuicultura, afirman que funcionan como desinfectantes, herbicidas, pesticidas, parasiticidas y antibióticos (Mioso *et al.*, 2014).

Tanto el fruto como los productos de desecho de la *Musa x paradisiaca* (banano), son aprovechados en la actualidad para usos muy diversos, tales como: elaboración de bioplásticos, dándole un valor agregado a la cáscara, así como la producción de alcohol carburante, utilizando el fruto (Afanador, 2005; López *et al.*, 2014).

Desde el punto de vista terapéutico, existen estudios que demuestran el interés de los investigadores en el aprovechamiento de este recurso natural. Una investigación realizada en Cuba, donde se utiliza el polvo de pseudotallo de banano para tratar a pacientes con asma, refiere que el jugo del pseudotallo de *M. paradisiaca* ayuda en el tratamiento de enfermedades de tipo respiratorio como: asma, tuberculosis, úlcera péptica, entre otras (Zapata *et al.*, 1998).

Es importante señalar que esta investigación se inició teniendo en cuenta que la Universidad Técnica de Machala se encuentra localizada en una zona que se destaca por la producción y exportación de banano. Cuando las bananeras se encuentran en las etapas de cosecha y postcosecha, se generan grandes cantidades de residuos tales como: hojas, pseudotallos, bellotas, raquis entre otros, que, al carecer de un tratamiento o disposición adecuada, se convierten en contaminantes del ambiente (Meneses *et al.*, 2012). Por tal motivo, se considera de gran pertinencia y aplicación estudiar alternativas de aprovechamiento de los residuos de la cosecha y postcosecha del plátano, específicamente

del pseudotallo, con el objetivo de poder brindarle un valor agregado al cultivo de la especie y contribuir con la disminución de desechos.

Las saponinas son glucósidos naturales que existen en las plantas, que consisten, químicamente, en una genina (triterpénica o esteroidal) unida a diferentes azúcares. Esta estructura confiere propiedades naturales tensoactivas a las saponinas, además de relacionarse con efectos biológicos como: antifúngicas, anticancerígenas, expectorantes, laxantes, diuréticas, molusquicida, entre otros (Bruneton, 2001; Stuardo & San Martín, 2008).

Los moluscos constituyen un eslabón en la cadena de transmisión de las enfermedades que requieren hospederos intermediarios, por lo que para su control se han ensayado varios métodos, entre los que encuentran el uso de molusquicidas derivados de extractos vegetales. Actualmente existen algunas investigaciones dirigidas hacia la búsqueda de tales productos a partir de plantas cuyos resultados, a nivel de laboratorio y campo, arrojan resultados meritorios, con escasa o nula toxicidad sobre otros organismos (Fernández & Rojas, 2014).

Tomando en consideración que en la *M. paradisiaca* se ha identificado la presencia de saponinas, podría ser esta especie vegetal también aprovechada por su posible efecto molusquicida.

Problema

La necesidad de evaluar las propiedades químicas y biológicas de extractos acuosos e hidroalcohólicos obtenidos del pseudotallo de la *Musa x paradisiaca* L, para validar el posible aprovechamiento de un recurso que se considera residuo de la producción agrícola del banano.

Hipótesis

Es posible aprovechar los extractos acuosos e hidroalcohólicos del pseudotallo de la *Musa x paradisiaca* L (banano) en la industria farmacéutica y acuícola, considerando las propiedades físico-químicas y biológicas que presenta.

Objetivo general

Evaluar las propiedades químicas y biológicas de extractos acuosos e hidroalcohólicos obtenidos del pseudotallo de la *Musa x paradisiaca* L.

Objetivos específicos

1. Determinar los requisitos de calidad de la materia prima vegetal.
2. Analizar las propiedades físico-químicas y biológicas de tres tipos de extractos obtenidos a partir del pseudotallo.
3. Evaluar, preliminarmente, la actividad expectorante del extracto hidroalcohólico (1:1).
4. Evaluar la actividad molusquicida del extracto hidroalcohólico (1:1).

CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Generalidades

El banano es una fruta originaria de la India, cultivada y consumida por su aroma y sabor característico, además de poseer un alto valor nutritivo (Mohapatra *et al.*, 2010; Khawas *et al.*, 2014). Es la quinta materia prima agrícola en el comercio mundial, después de los cereales, azúcar, café y cacao, y la segunda fruta más consumida en el mundo por tener alto valor calórico y ser rica en minerales y vitaminas A, C y B₆ (Kuttimani *et al.*, 2013).

La producción de banano y plátano a nivel mundial se aproxima a 145 millones de toneladas, correspondiendo al banano la mayor cantidad (106 millones de banano y 39 millones de plátano), de la cual el 85% de la producción se da para mercados locales y consumo interno (Foods, 2003).

Cuando se realiza la cosecha, sólo se utiliza del 20 al 30% de la biomasa del banano (Belalcázar *et al.*, 1991), quedando un residuo del 70 a 80% no aprovechado, lo que genera un gran problema ambiental, dado que en la mayoría de los casos, son desechados sin tratamiento alguno, lo que contribuye a que el ecosistema se degrade (Vidal *et al.*, 2001).

El pseudotallo es una fuente muy importante de fibra empleada para producir ropa, cordones, hilos, entre otras. La fibra extraída de los pecíolos secos y el pseudotallo del banano son utilizados en la fabricación de papel (Meneses & Agatón, 2012).

1.2 Descripción botánica de la *Musa x paradisiaca* L (banano)

Según la base de datos ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*) el banano presenta la clasificación taxonómica que se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la *M. x paradisiaca* (banano)

| Taxonomía | Nombre |
|-----------------------------|------------------------------|
| Reino | <i>Plantae</i> |
| Subreino | <i>Viridiplantae</i> |
| Superdivision | <i>Embryophyta</i> |
| División | <i>Tracheophyta</i> |
| Subdivisión | <i>Spermatophytina</i> |
| Clase | <i>Magnoliopsida</i> |
| Superorden | <i>Lilianaes</i> |
| Orden | <i>Zingiberales</i> |
| Familia | <i>Musáceas</i> |
| Género | <i>Musa</i> |
| Especie | <i>Musa x paradisiaca L.</i> |
| Fuente: (ITIS, 2018) | |

M. paradisiaca es una planta herbácea que presenta un pseudotallo que puede alcanzar los 7 metros de altura, de donde se generan conos carnosos y yemas laterales. Las hojas se distribuyen de una forma helicoidal y las bases foliares rodean el tallo verdadero, dando origen al pseudotallo de hasta 30 cm de diámetro y hasta 7 metros de altura (Cantillo, 2014; Molina, 2016).

Las hojas de esta planta tienen forma oblonga, son lisas y de textura tierna, presentan un color verde claro en el haz y más opaco en el envés, se acomodan en forma, y se despliegan hasta alcanzar 3 metros de largo con un peciolo de 60 cm. Las condiciones climáticas óptimas para su crecimiento requieren temperaturas medias de 27°C y humedad constante; crecen en zonas costeras, no exige muchos nutrientes, por lo que tiene la facilidad para crecer en suelos arcillosos, calizos o silíceos, especialmente, si posee materia nitrogenada en ellos (Cantillo, 2014).

El banano pertenece a la familia Musaceae, las variedades actuales surgen del cruzamiento de las plantas originarias del Asia las cuales tenían semillas. Los primeros cultivos tenían frutos de 6 a 8 cm de largo y con muchas semillas, sin embargo, producto

de la selección humana, actualmente se obtienen frutos de mayor tamaño y sin semillas (Cantillo, 2014).

Las raíces de las especies del género *Musa* crecen en grupos de 3 o 4, las cuales se desarrollan muy cerca de la superficie del suelo y están conformadas por raíces primarias secundarias y terciarias. Comparando el banano con el plátano el primero presenta más resistencia contra condiciones adversas como la sequía, debido a que las raíces secundarias del banano presentan más raíces terciarias que el plátano (Cantillo, 2014).

El tallo verdadero es un rizoma con gran contenido de almidón, que presenta yemas cuando la planta florece y fructifica, las cuales dan origen a los peciolos que formarán el pseudotallo o falso tallo. En la medida que se desarrolla, la yema terminal sube por el pseudotallo hasta alturas de 4 metros (Cantillo, 2014). En la figura 1 se muestra la planta de banano en etapa adulta

Figura 1. Planta de (*M. paradisiaca*) adulta



1.3 Composición química del banano

En las flores han sido encontrados componentes químicos como taninos, saponinas, azúcares tanto reductores como no reductores (Adegboyega, 2006), de donde ha sido aislada una estructura triterpénica conocida como (24R)-4 α -14 α ,24-trimetil-5-colesta-8,25(27)-dien-3 β -ol. En las brácteas se han identificado antocianinas monoméricas las cuales son un potente colorante natural (Pazmio-Durán *et al.* (2001).

Los principales componentes químicos que han sido reportados en los frutos son: carbohidratos y aminoácidos tales como arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, metionina y triptófano (Adegboyega & Ketiku, 2006).

A partir de los frutos han sido aislados, mediante cromatografía en capa delgada, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta resolución, compuestos como acil estéril glucósidos, Sitoindosida-III y Sitosterol mio-inositol-beta-D-glucósido (Ghosal, 1985).

Con el uso de la CLAE-EM-ESI se han identificado, en la piel y la pulpa, ácidos hidroxicinámicos, (ácido ferúlico, sinápico y cafeico) y flavonoides, entre otros metabolitos (Passo *et al.*, 2015).

Según un estudio titulado “Estudio del papel y la celulosa en el Ecuador”, de la FAO reporta que el pseudotallo de plátano tiene 7% de sustancia seca y dentro de ésta: fibra bruta 39%, azúcares 15%, pectina 16%, cenizas 28 % y otras (Yuri *et al.*, 1968).

Coomber y Chittenden (1952), reportaron un contenido de celulosa del 38% y 4% de cenizas; a su vez Martínez (1962) refirió que la materia seca obtenida de los pseudotallos de *Musa sapientum* posee la siguiente composición: Ceniza (2,30%), lignina (10,56%), pentosanos (14,05%), holocelulosa (57,99%), alfa celulosa (39,28%), sílice (3,23%), solubilidad en agua fría (21,22%), solubilidad en agua caliente (26,95%), solubilidad en NaOH (0,1%) (45,84%), extractivos en alcohol-benceno (2,32%), extractivos alcohólicos (4,56%).

Un tamizaje fitoquímico realizado a extractos de *Musa x paradisiaca* producida en el Ecuador sugirió la presencia de compuestos grasos, esteroides, triterpenos, saponinas y taninos (Pilco *et al.*, 2018).

1.4 Actividad biológica

En la medicina tradicional de la india “Ayurveda” se usa al banano para aliviar muchos trastornos. Las raíces poseen actividad antihelmíntica y astringente, también son usadas para ayudar a detener la hemoptisis. El fruto contiene una elevada cantidad de antioxidantes que ayudan a contrarrestar los efectos perjudiciales de los radicales libres; además, favorece la actividad de los riñones reduciendo el riesgo de cáncer en los mismos (Swathi *et al.*, 2011). También se emplea para tratar diarrea, dolores de estómago, falta de apetito, úlcera gástrica, fortalecimiento del sistema inmune, reducción del riesgo de hipertensión, *shock* mental y para mejorar la actividad muscular (Swathi *et al.*, 2011).

En la medicina popular varias partes de la planta han sido usadas como remedio tópico u oral cuya actividad medicinal ha sido demostrada mediante diversos estudios. Diferentes partes de *M. paradisiaca*, incluyendo al pseudotallo, han demostrado poseer actividad antioxidante, antimicrobiana y como protector gástrico, entre otras (Pannangpetch *et al.*, 2001; Eleazu *et al.*, 2010; Karadi *et al.*, 2011; Meneses & Agatón 2012).

Los estudios actuales en la especie han demostrado que la planta posee actividad contra la diabetes. (Ojewole and Adewunmi, 2003; Mallick *et al.*, 2006; Adewoye *et al.*, 2009).

1.5 Saponinas

Las saponinas son metabolitos secundarios constituidos principalmente por un anillo triterpenoide o esteroideal conocidos como sapogenina o aglicona, sustituidos por oligosacáridos mediante enlaces glicosídicos que les aporta un carácter anfifílico (Heng *et al.*, 2006).

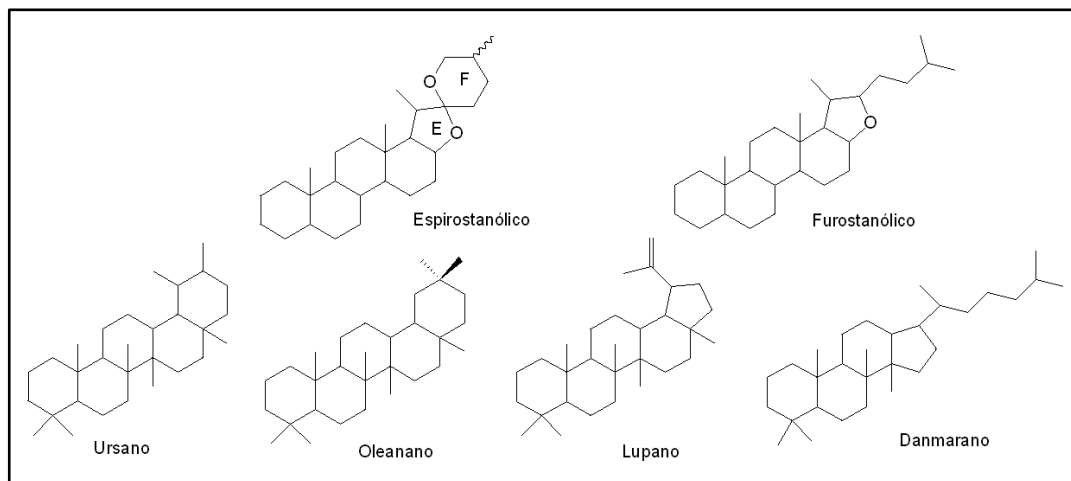
Son glicósidos que presentan una o más cadenas de azúcares unidos a una sapogenina de tipo esteroideal o triterpénica. Las saponinas se clasifican de acuerdo con el número de cadenas de azúcar unidas a su estructura en mono, di, o tri desmosídicas. Las saponinas monodesmosídicas tienen una sola cadena de azúcar unida al C3. Las saponinas bidesmosídicas presentan dos cadenas de azúcar, la primera unida a través de un enlace tipo éter en C3 y la segunda a través de un enlace tipo éster en el C28 (saponina tipo triterpeno) o un enlace éter en C26 (saponinas de tipo furostanólica) (Price *et al.*, 1987; Hostettmann & Marston, 1995; Guclu-Ustundag & Mazza, 2007).

Los azúcares presentes con mayor frecuencia son: D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), ácido D-glucurónico (GlcA), ácido D-galacturónico (GalA), L-ramnosa (Rha), L-

arabinosa (Ara), D-xilosa (Xyl) y D-fructosa (Fruc). La diversidad y el número de azúcares, el tipo de aglicona y los distintos grupos funcionales dan como resultado un grupo muy diverso de compuestos (Price *et al.*, 1987; Hostettmann & Marston, 1995).

En la figura 2 se muestran las estructuras de los núcleos correspondientes a las saponinas.

Figura 2. Estructuras de los núcleos correspondientes a las saponinas



1.5.1 Métodos para el estudio fitoquímico de las saponinas

Debido a la naturaleza polar de las saponinas, los métodos reportados de extracción indican que ésta puede realizarse en frío o caliente, con agua, con alcoholes de bajo peso molecular, sobre todo, metanol y etanol y con mezclas hidroalcohólicas en diferentes proporciones (Uribe, 1987).

Para identificar saponinas existen varios métodos que han sido desarrollados como son: el índice de hemólisis y el índice de espuma. Este último se basa en medir la altura y tiempo que permanece la espuma estable en una disolución acuosa sometida a agitación fuerte durante varios minutos (Soto *et al.*, 2005).

Otro ensayo muy importante emplea el reactivo de Liebermann Burchard, que permite diferenciar entre saponinas de tipo esteroidal y triterpénica, de acuerdo al color que produzca la reacción, pudiendo ser azul verdoso o rojo-púrpura, respectivamente (Miranda & Cuéllar, 2001).

Unos de los métodos de identificación de saponinas más utilizados es la cromatografía de capa delgada (CCD), utilizando como revelador ácido sulfúrico y vainillina. El método se basa en una determinación colorimétrica, tanto para las saponinas triterpénicas como esteroidales. Aunque existen varias reacciones para la detección de saponinas esteroidales, pocas son aplicadas a las saponinas triterpénicas o saponinas en general (Hiai *et al.*, 1976).

Otro de los métodos de identificación utilizado para las saponinas, al igual que para muchos metabolitos secundarios, es la cromatografía líquida de alta resolución CLAR (high performance liquid chromatography, HPLC, por sus siglas en inglés). El método utiliza columnas de un diámetro muy pequeño rellenas de diversas fases estacionarias (sílica gel, RP-18, cuyos diámetros de partículas varían entre 40-30 μm , pudiendo llegar hasta 1 μm (Oliveira da Costa, 1999).

Se necesita trabajar bajo una presión establecida, reguladas mediante bombas de alta presión que se activan según la necesidad. A la salida de los compuestos de la columna se encuentra un detector que facilita la visualización de los resultados obtenidos mediante cromatogramas (Oliveira da Costa, 1999).

1.5.2 Propiedades físico-químicas

Las saponinas resisten temperaturas de hasta 400°C, a la que se inicia el proceso de descomposición de la molécula, razón por la cual se utilizan métodos que incluyen la aplicación de calor para favorecer la extracción (Ahumada *et al.*, 2016).

La saponina, al ser una molécula anfifílica, presenta una alta actividad superficial, lo que le confiere propiedades de detergente natural y emulsificador en productos de limpieza. Se ven afectadas con cambios bruscos de temperatura y pH lo cual hace que los enlaces O-glucosídicos se rompan (Chen *et al.*, 2010; Diab *et al.*, 2012)

Debido a su naturaleza anfifílica, las saponinas son compuestos de superficie activa con propiedades detergentes, humectantes, emulsionantes y espumantes (Sarnthein-Graf and La Mesa, 2004; Wang *et al.*, 2005; Guclu-Ustundag & Mazza, 2007). La solubilidad en agua de las saponinas está favorecida por su alto peso molecular y la presencia de azúcares y otros grupos polares presentes en la aglicona (Foy Valencia *et al.*, 2005).

Las saponinas monodesmosídicas y bidesmosídicas presentan enormes diferencias entre sí, con excepción de la actividad superficial que aumenta conforme a la extensión del

oligosacárido que posee (Francis *et al.*, 2002; Kaiser *et al.*, 2010). A pesar de esto, los bidesmósidos inactivos se pueden activar mediante hidrólisis alcalina (Hostettmann & Marston, 1995).

1.5.3 Usos y actividad terapéutica

En la industria farmacéutica se emplean saponinas de tipo esteroidales en la hemisíntesis de corticoides (López, 2001). Se considera que un contenido mínimo de saponinas en las plantas genera un efecto diurético beneficioso.

Tienen un efecto de diuresis al aumentar la circulación sanguínea a nivel del riñón, incrementando la filtración glomerular. Además, estimulan la secreción traqueobronquial lo cual les confiere actividad expectorante (López, 2001).

La capacidad de interactuar con el colesterol, en la membrana de los hematíes, les confiere actividad hemolítica, sobre todo, para las saponinas de tipo esteroideal (Peng, 1999; Agustín *et al.*, 2011) y también presentan actividad anticoagulante, principalmente, las saponinas esteroidales encontradas en plantas del género *Allium* (Peng & Yao, 1996).

Las saponinas esteroidales de *Trigonella foenum-graecum* L y *Medicago sativa* reducen los niveles séricos del colesterol, debido a que promueven el aumento de la excreción de bilis (Venugopalan & Srivastava, 1996; Nakamura *et al.*, 1999).

Además ha sido demostrado que las saponinas de la soya (saikosaponina y ginsenosida) suprimen la actividad genotóxica del 2 acetoxiacetil-aminofluoreno, reduciendo la mutagenicidad de 2-(2-furil)-3-(5-nitro-2-furil) acrilamida en *Salmonella* y mejorando la reparación del ADN (Ohtsuka *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1998; Berhow *et al.*, 2000).

Las saponinas triterpénicas aisladas de *Treveria palmata* (De Tommasi *et al.*, 2000) presentan actividad anticarcinogénica, inhibiendo el cáncer de piel inducido en ratones, esta actividad fue observada en soya saponina I, afromosina, gymnocladus saponin G (Sung *et al.*, 1995).

1.5.4 Efecto molusquicida

Se ha reportado que las saponinas extraídas de vegetales tienen propiedades hemolíticas (destruyen los glóbulos rojos) y, por lo tanto, reducen las concentraciones de hemoglobina y la captación de oxígeno. También pueden dañar las branquias de organismos acuáticos. Debido a que los crustáceos parecen ser menos sensibles que los peces, las saponinas han

sido utilizadas en el cultivo de camarón para anestésicar selectivamente y/o matar peces invasores en estanques de camarones (Clearwater *et al.*, 2008).

Un problema importante asociado con el cultivo de camarón es la presencia de bivalvos (mejillones y almejas) y gasterópodos (caracoles) que colonizan el fondo de los estanques y se convierten en una plaga difícil de controlar.

Existen pocos estudios que aborden el uso de extractos de plantas con un alto contenido de saponinas, para el control de los gasterópodos terrestres. Los informes publicados están relacionados principalmente con el control de huevos, la disuasión de alimentos y la formulación de cebos (González-Cruz & San Martín, 2013). No obstante, recientemente, se ha señalado que las saponinas obtenidas como extracto acuoso de algunas plantas, poseen actividad molusquicida en *Pomacea canaliculata* (Kijprayoona *et al.*, 2014; Apaza *et al.*, 2016) y *Deroceras reticulatum* (Gonzalez-Cruz & San Martin, 2013). Por otro lado, Piña *et al.* (1998), han reportado actividad molusquicida frente al caracol *Lymnaea cubensis*, que pudiera atribuirse a las saponinas presentes en *Melia azedarach* L. (paraíso). La especie *Sapindus saponaria* es rica en sapogeninas del tipo triterpénico, las cuales presentan actividad molusquicida (Quiñonez *et al.*, 2007). Estudios sobre el uso de extractos de la cáscara de quinua, con alto contenido de saponinas triterpénicas, han evidenciado su capacidad de controlar los huevos de caracol *D. reticulatum* (Nijenstein & Ester, 1998).

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cosecha de *Musa x paradisiaca*

La cosecha del pseudotallo de banano (*Musa x paradisiaca*), se realizó en la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias (UACA). La identificación taxonómica de la especie fue realizada por el Ing. Agr. José Quevedo.

2.2 Tratamiento postcosecha

El pseudotallo cosechado se sometió a un proceso de selección, lavado y desinfección, utilizando para ello hipoclorito de sodio el 2% y se dejó escurrir para eliminar el exceso de agua.

Posteriormente, el pseudotallo fue cortado en trozos de, aproximadamente, 2 cm y deshidratado durante 60 horas, en una estufa con recirculación de aire forzado (MEMMERT UFSS), a una temperatura de 35°C, con 100 % de ventilación y 100 % de apertura de la trampilla.

La disminución de tamaño de partícula de la droga se realizó en un molino (MAGRICO) utilizando una criba de 1 mm de diámetro.

La droga molida se almacenó en fundas con cierre hermético en un lugar cerrado y fresco.

2.3 Determinación de humedad residual

La humedad residual fue determinada empleando una balanza provista de una fuente de calentamiento halógeno (Ohaus, modelo MB120). En el equipo se colocaron 2 g de muestra vegetal seca y de manera automática se procedió a la determinación, hasta alcanzar una masa constante a una temperatura de 105 °C. El análisis se realizó por triplicado, reportándose la media/desviación estándar.

2.4 Determinación de cenizas totales

La determinación de cenizas totales se inició tarando los crisoles de porcelana, se pesaron 2 g de muestra y se llevaron a la mufla (MAGRICO) por un lapso de 4 horas a una temperatura de entre 700 a 750°C.

Pasado este tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente en una desecadora, repitiendo el proceso hasta que dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0,5 mg por gramo (peso constante). Luego se procedió a pesar cada crisol, reportándose como resultado la media de las pesadas. El cálculo se realizó a través de la siguiente fórmula.

$$C_T = \frac{P_1 - P_2}{P - P_2} * 100$$

Dónde:

C_T= Porcentaje de cenizas totales en base hidratada

P= Peso del crisol más muestra (g)

P₁= Peso del crisol más cenizas (g)

P₂= Peso del crisol vacío (g)

100= Factor matemático

2.5 Determinación de minerales

Esta determinación fue realizada en los laboratorios NEMALAB S.A., utilizando para ello el método de digestión vía húmeda siguiendo la norma establecida por la AOAC y así reportar los minerales presentes en la muestra de pseudotallo de *Musa x paradisiaca*

2.6 Determinación de metales pesados arsénico (As) y plomo (Pb)

Esta prueba fue realizada en los laboratorios AVVE utilizando para ello el método de referencia MMQ-AAS-04 para determinar arsénico, mientras que para el plomo fue el método MMQ-AAS-28.

2.7 Preparación de los extractos secos acuoso e hidroalcohólicos del pseudotallo de *M. paradisiaca*

Se pesaron 90 g de droga, se agregó un volumen inicial de 300 mL de cada uno de los menstruos a utilizar: agua; agua:etanol (8:2) y agua:etanol (1:1) para su humectación, posteriormente, se completó su volumen a 500 mL y se realizó una primera extracción por baño ultrasónico (ULTRASONIC BATH 5.7 L, Fischer Scientific) durante 45 minutos. El extracto fue filtrado mediante un embudo buchner acoplado a una bomba de vacío (GAST mod. 1HAB-25B-100X). Se realizó una segunda extracción con 300 mL de menstruo por 45 minutos más, se filtró y ambos extractos se reunieron en un balón de 2 L, para ser concentrados.

El proceso de concentración se realizó en un rotoevaporador (HEIDOLPH LABOROTA 4001 efficient) unido a un criostato (LAUDA/ALPHA RA-8) y a una bomba de vacío (VACUUBRAND PC 600, Alemania). Se comenzó con un vacío de 90 mbar y se bajó paulatinamente hasta 5 mbar, por la generación abundante de espuma durante el proceso. Luego de llevar el extracto a sequedad se determinó el rendimiento del proceso de extracción.

2.8 Tamizaje fitoquímico

El ensayo de tamizaje se realizó en tres tipos de extractos: acuoso, hidroalcohólico (8:2 y 1:1). En los tres casos se pesaron 2 g de droga seca y molida y se mezclaron con el correspondiente menstro; se sonicó por 30 minutos en un baño ultrasónico (Fisher Scientific 5.7 L), luego se filtró y se tomó una alícuota de 1 mL para cada ensayo, según lo descrito por (Miranda & Cuéllar, 2001). En la tabla 2, se indican los ensayos realizados para obtener los tres extractos

Tabla 2. Ensayos realizados en extractos acuoso e hidroalcohólico (8:2, 1:1)

| Prueba | Metabolitos a identificar |
|-----------------|----------------------------------|
| Espuma | Saponinas |
| Ninhidrina | Aminoácidos |
| Baljet | Coumarinas |
| Cloruro Férrico | Compuestos fenólicos |
| Borntrager | Quinonas |
| Shinoda | Flavonoides |
| Dragendorff | Alcaloides |
| Fehling | Azúcares Reductores |

2.9 Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) de los tres extractos del pseudotallo de *M. paradisiaca*

Para el análisis cromatográfico se utilizó una cámara de vidrio ubicada en una campana de extracción de vapores y se trabajó a temperatura ambiente (21-24°C). Se estimó un tiempo de saturación de 10 min, aproximadamente.

Para el análisis cualitativo se emplearon placas de Sílica gel GF₂₅₄ (0,25 mm; Macherey-Nagel) sobre soporte de aluminio con dimensiones de 10 cm x 10 cm.

Se realizó el análisis cromatográfico de los extractos acuoso e hidroalcohólicos (8:2 y 1:1), los que se aplicaron mediante el uso de microcapilares, efectuándose un secado espontáneo de éstos. Para el estudio se realizaron dos aplicaciones de la muestra en cantidades diferentes. Adicionalmente, se utilizó como estándar de referencia saponinas de *Quijalla saponaria* (SIGMA-ALDRICH) en disolución acuosa.

Se desarrolló una corrida ascendente utilizando como fase móvil butanol: ácido acético: agua (65:25:10). Después de la corrida, el secado de la placa se efectuó a temperatura ambiente bajo la corriente de aire de la campana.

Se realizaron dos tipos de revelado, físico y mixto. El revelado físico se desarrolló a través de una lámpara UV modelo UV-5NF, a una longitud de onda de 254 nm. Para el revelado mixto se utilizó ácido sulfúrico al 50% en metanol, vainillina y calor, además una disolución etanólica al 0,2 % de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

2.10 Cuantificación de las saponinas en el extracto hidroalcohólico

Preparación de la muestra

Se pesaron 0,2077 g; 0,2043 g y 0,2082 g de los extractos secos acuoso, hidroalcohólico (8:2) e hidroalcohólico (1:1), respectivamente, y se llevaron a un volumétrico de 10 mL, enrasando con agua destilada.

Ensayo

El contenido total de saponinas se determinó colorimétricamente según el método de Hiai *et al.* (1976) utilizando vainillina y ácido sulfúrico.

Para la cuantificación de las saponinas totales en cada uno de los extractos ensayados, se mezclaron 0,5 mL de cada uno de los extractos o agua (blanco utilizado para el ensayo), 0,5 mL de vainillina recién preparada (8% en etanol absoluto, SIGMA ALDRICH) y 5 mL de ácido sulfúrico al 72%. La mezcla se calentó en un baño de agua a 60 °C durante 10 minutos, y luego se enfrió en un baño de agua helada.

Las lecturas se realizaron por triplicado con ayuda de un espectrofotómetro UV-visible (SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA) a una longitud de onda de 440 nm.

Los valores resultantes fueron calculados a través de una curva de calibración utilizando como patrón saponinas de *Quijalla saponaria* (SIGMA-ALDRICH) en concentraciones de 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 y 1 mg/mL. La curva de calibración obtenida arrojó la siguiente ecuación: $\text{absorbancia} = -0,0007143 + 0,731429 \cdot \text{concentración}$, con un coeficiente de correlación $R = 0,9825$.

2.11 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

Preparación de las muestras

Se pesaron 0,2046 g; 0,2037 g y 0,2075 g de los extractos secos acuosos, hidroalcohólico (8:2) e hidroalcohólico (1:1) y se procedió de la misma manera antes descrita en el epígrafe 2.10.

Ensayo

Para la determinación de polifenoles en cada una de las disoluciones de extracto de pseudotallo preparadas se siguió la metodología descrita por Singleton *et al.*, 1999, con algunas modificaciones. Se colocaron 50 µL de muestra o patrón (ácido gálico) y agua destilada (blanco), en tubos de ensayo de 10 mL de capacidad. Se le adicionaron 2,5 mL de Folin-Ciocalteu (10% diluido en agua destilada) y 450 µL de agua destilada, se agitó en un vortex (Thermo Scientific, USA) y se esperó 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 2 mL de Na₂CO₃ al 7,5%, se agitó otra vez y se dejó en reposo por 2 h. La lectura se realizó a 765 nm en un espectrofotómetro (UV-Visible SPECTROPHOTOMETER Evolution 201 Thermo Scientific, USA), empleando micro celdas de 2 mL.

La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración con ácido gálico en concentraciones 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 y 0,7 mg/mL. Las diluciones y las muestras se analizaron por triplicado.

La determinación de fenoles totales de los extractos fue realizada a partir de la curva de calibración para ácido gálico. Se hizo un análisis de regresión lineal dando como resultado la siguiente ecuación: $\text{absorbancia} = 0,0116667 + 1,12071 \cdot \text{concentración}$, con un coeficiente de correlación de 0,9993.

2.12 Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a espectrometría de masas (CLAE/EM)

Para analizar la muestra se utilizó un equipo UHPLC (Thermo Scientific, UltiMate 3000), compuesto por una bomba cuaternaria DIONEX UltiMate 3000 RS, un automuestreador DIONEX UltiMate 3000 RS, un sistema *DAD* (Detectores de diodos) DIONEX UltiMate 3000 RS. El equipo se encontraba acoplado con un espectrómetro de masas Thermo Scientific LTQ XL.

Para observar los cromatogramas se utilizó el software “Thermo Xcalibur”. El análisis de la muestra se realizó en una columna Accucore RP-MS C18, de dimensiones (100 x 2,1 mm: 2 μ m), se trabajó con un flujo de columna de 0,4 mL/min bajo una temperatura de 35°C con un volumen de inyección de 2 μ l.

La fase móvil que se utilizó fue acetonitrilo y agua ácida (ácido fórmico al 0,1 % en agua), aplicando una elución en gradiente: 0-2 min (10% B), 3-5 min (27% B), 5-6 (30% B), 6-9 (35% B), 9-20 (95% B), 21-28 (10% B).

La preparación de las muestras se realizó pesando 1 mg de extracto seco en una balanza analítica (RICE LAKE TA series Max/d 220/0,0001 g), se diluyó la muestra en un 1 mL de metanol grado HPLC en un tubo eppendorf. Se procedió a filtrar en filtros de 0,2 μ m de diámetro para luego ponerlo en el equipo para su análisis correspondiente.

El análisis por espectrometría de masas se realizó en modo positivo, optimizando las condiciones (archivo de sintonía), en base a una infusión de una disolución de quercetina (15 ppm).

Los parámetros utilizados fueron los siguientes: voltaje de spray 5,00 kV, voltaje capilar: 50,00 V, y temperatura del capilar 225 °C. El flujo de atomización constó de un gas principal, gas auxiliar y un gas de barrido (34:5:3) unidades arbitrarias, respectivamente.

La muestra se analizó mediante tres modos diferentes: modo “Full Scan” con rangos entre 100-1000 Da, escaneo de modo dependiente “MS/MS” y mediante “SIM” con iones m/z.

2.13 Evaluación preliminar de la actividad mucolítica

El ensayo se realizó en el Bioterio clase II de la UACQS de la UTMACH siguiendo el modelo de rojo fenol en secreciones de ratón, descrito por (Engler and Szelenyi, 1984).

Preparación de la muestra

La muestra sometida a ensayo fue el extracto hidroalcohólico (1:1). Fueron pesados 100 mg del extracto seco y se disolvieron en 5 mL de una mezcla conformada por agua:etanol:tween 80 (90:5:5).

Animales de experimentación

Se emplearon 15 ratones entre machos y hembras, reproducidos en el Bioterio de la UACQS, con un peso entre 31 y 52 g. Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales, de limpieza y alimentación propias para la especie.

Durante este periodo de tiempo no se observaron alteraciones de conducta, signos gastrointestinales anormales u otros que pudieran sugerir alguna patología en los animales que se sometieron al ensayo. El acceso al agua y a la comida fue "*ad libitum*".

Procedimiento

La muestra fue administrada por vía oral, empleando para ello una cánula intragástrica. Se confeccionaron tres grupos los cuales fueron dispuestos en cajas independientes, con un total de 5 animales por cada grupo, debidamente identificados. La distribución de los animales en los grupos se realizó de manera que en cada grupo existieran diferentes pesos y sexos. La descripción de los grupos formados se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Grupos de ensayo empleados en la determinación preliminar del efecto mucolítico

| Grupo | Tratamiento |
|---------------------------------------|---|
| Control negativo | Rojo fenol, 500 mg/kg, por vía intraperitoneal (0,2 mL/10 g de peso corporal de ratón) |
| Control positivo (Bisolvon) | 25 mg/kg por vía oral (0,156 mL/10 g de peso corporal de ratón) + rojo fenol, 500 mg/kg por vía intraperitoneal (0,2 mL/10 g de peso corporal de ratón) |
| Extracto hidroalcohólico (1:1) | Extracto, 500 mg/kg por vía oral + rojo fenol, 500 mg/kg por vía intraperitoneal (0,2 mL/10 g de peso corporal de ratón) |

Luego de transcurridos 30 minutos los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, posteriormente, se procedió a la disección y extracción de la tráquea realizándose el corte desde el cartílago tiroides hasta el inicio del árbol bronquial. Cada tráquea se lavó durante 15 min. con 1 mL de solución salina fisiológica contenida en cada tubo de ensayo, con ayuda de un equipo de ultrasonido. A continuación, se añadió 0,1 mL de la disolución de NaOH (1 mol/L) a cada tubo de ensayo con la muestra.

La concentración de rojo fenol fue determinada por espectrofotometría UV/Vis mediante una curva de calibración de rojo fenol, en un rango de concentraciones de 2 a 6 µg/mL. Para la determinación fue necesario un blanco, el mismo que está compuesto de 1 mL de disolución de NaCl (0,9 %) y 0,1 mL de NaOH (1 mol/L). Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 560 nm.

La curva de calibración obtenida, luego del análisis de regresión lineal, dió como resultado la siguiente ecuación: $\text{absorbancia} = 0,01524 * \text{concentración} - 0,027$, con un coeficiente de correlación $R = 0,9984$.

2.14 Evaluación de la actividad molusquicida en el gasterópodo *Cerithidea valida*

El propósito de este ensayo fue establecer las curvas de concentración del extracto hidroalcohólico de *M. paradisiaca* vs respuesta y los valores de las CL₅₀ a las 96 horas en el caracol *Cerithidea valida*.

Los ejemplares de *Cerithidea valida* empleados en el bioensayo fueron colectados manualmente en piscinas de cultivo de camarón infestadas con ese organismo y transportados en fundas plásticas hasta el laboratorio.

A fin de minimizar factores estresantes debidos a la transferencia desde el área de colecta hasta el sitio de confinamiento, los organismos fueron aclimatados durante 48 h en acuarios provistos de agua de mar filtrada y aireación continua, sin proporcionar alimento. Se consideraron aclimatados todos aquellos organismos que presentaron actividad normal (movimiento y que se mantengan adheridos a las paredes de los acuarios de aclimatación) los cuales fueron seleccionados para el bioensayo.

Descripción del bioensayo

El sistema utilizado para la realización del bioensayo fue de tipo estático, de corta duración (durante 96 h) y sin renovación, teniendo en cuenta las recomendaciones de protocolos internacionales estandarizados para la realización de pruebas ecotoxicológicas (Rodríguez & Esclapés, 1995; Hughes, 2003).

Fueron consideradas ocho concentraciones experimentales y un grupo testigo sin adición del extracto, con tres réplicas por cada concentración. Las concentraciones ensayadas fueron 1, 2, 4, 8, 17, 33, 67, 133 ppm, obtenidas por dilución a partir de una disolución al 6,5 % del extracto.

En cada cámara experimental (frascos de 400 mL) y para cada concentración fueron expuestos 10 organismos. Los organismos fueron elegidos y colocados al azar en los recipientes experimentales de exposición. La adición de la disolución de prueba fue efectuada de manera muy lenta con una agitación suave (para evitar una posible exposición de los organismos a la elevada concentración de la disolución madre), garantizando la completa mezcla del compuesto tóxico en el medio y cuidando de no estresar a los organismos expuestos.

El bioensayo fue realizado durante 96 h, efectuando una revisión del comportamiento (movilidad) a las 2, 4, 6 y 12 horas el primer día y posteriormente cada 24 horas.

Los resultados fueron analizados estadísticamente a través del método Probit mediante el programa estadístico *Statgraphics Centurión*.

Para obtener la concentración letal media (CL₅₀) con sus límites de confianza al 95% fue aplicado el método Dosis-Respuesta PROBIT (Finney, 1952). La relación entre la dosis y el porcentaje de mortalidad se ajusta más exactamente a una línea recta, cuando las

dosis son transformadas a logaritmo (base 10) y los porcentajes de mortalidad a unidades Probit. Las unidades Probit se basan en las frecuencias de la desviación estándar de una curva de distribución normal, en la cual el 50% de frecuencia acumulada es equivalente a 5 unidades probit, el 83,13 % equivale a 6 unidades probit y el 2,27 % a 3 unidades probit (Busvine 1971; Sokal & Rohlf 1981).

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis físico-químico a la droga vegetal

Las plantas medicinales, una vez recolectadas, deben ser debidamente tratadas para garantizar que se mantengan en condiciones óptimas hasta su utilización. En tal sentido el tratamiento postcosecha juega un papel importante, debiendo eliminarse las materias extrañas que acompañan el órgano que será objeto de estudio.

La adecuada selección de la parte de la planta a trabajar también es un elemento a considerar, no solo por la eliminación de los órganos no deseados, sino también porque se deben desechar aquellas que no cumplan con las debidas condiciones para su empleo como materia prima de posible uso farmacéutico.

Por tales razones el control de calidad de las materias primas vegetales es de particular importancia, pues estas pueden sufrir variaciones en el contenido de sus metabolitos, deterioros o contaminaciones.

Dentro de los factores para tener en cuenta en relación con el deterioro de las drogas se encuentra: contenido de humedad, temperatura, luz y presencia de oxígeno. Estas condiciones pueden propiciar que los organismos vivos (bacterias, hongos, arácnidos e insectos), se multipliquen rápidamente, utilizando la droga como fuente de nutrición. De ahí la importancia de estandarizar las materias primas vegetales preservando su calidad.

El proceso de secado es una operación de gran importancia dentro de los pasos a seguir para propiciar la conservación de las drogas. Todos los vegetales en su estado fresco contienen una cantidad de agua que puede variar en dependencia del órgano de que se trate. En tal dirección para el pseudotallo del banano se refieren altos contenidos de agua, alrededor del 90% (Moiseev *et al*, 1968), lo cual hace que el tiempo de secado sea mayor, si se compara con otros órganos vegetales como las hojas o flores.

Dada la textura, tamaño y contenido de agua del pseudotallo, fue preciso trocearlo para favorecer el aumento de la superficie de contacto y con ello la velocidad del proceso de secado. Colateralmente se constató que, gracias al uso de una estufa con recirculación de aire forzada, pudo realizarse de manera adecuada la deshidratación a baja temperatura. Este aspecto actúa favorablemente en la conservación de los bioactivos presentes. Experiencias preliminares con las estufas convencionales, luego de 24 horas, se observó

un producto con cambios de color y olores no agradables, sugiriendo haber ocurrido un proceso degradativo, probablemente, por la acción enzimática ante elevados porcentajes de humedad.

A la droga cruda molida (pseudotallo de *M. paradisiaca*) se le determinaron solo algunos de los parámetros de control de la calidad, tales como: humedad residual y contenido de cenizas totales. En la tabla 4 se presentan los resultados del estudio.

Tabla 4. Parámetros de calidad determinados a la droga cruda.

| Parámetros (%) | <i>Musa x paradisiaca</i> media / DS |
|-----------------------|---|
| Humedad residual | 5,89 / 0,228 |
| Cenizas totales | 16,29 / 0,312 |

La humedad recomendable según la literatura no debe superar el 12% e incluso, en algunos casos, este porcentaje es suficiente para propiciar la actividad enzimática que provoca la descomposición. Si se combina humedad con el efecto de la temperatura, la actividad enzimática puede ser acelerada. Según los resultados obtenidos la humedad residual lograda cumple con los límites establecidos (Miranda & Cuéllar, 2001).

El otro parámetro analizado fue las cenizas totales, las mismas son indicativas de la calidad del material vegetal objeto de estudio, y constituyen una base para juzgar la pureza e identidad de la droga, brindando información asociada con la posible presencia de materias inorgánicas (Miranda & Cuéllar, 2001). La literatura sugiere valores de cenizas totales que no excedan el 12 % (Farmacopea Española, 2002). En el estudio actual las cenizas totales (16,29 %) se encuentra por encima de este valor, lo cual pudiera estar asociado a las características del suelo donde se recolectó la planta o la capacidad acumulativa de minerales que la planta presenta.

La composición química de la materia seca del plátano es citada por varios autores desde tiempos muy antiguos, observándose gran diversidad de valores, tal vez atribuido, a los métodos de preparación de las muestras y/o al método analítico. En cenizas totales se refieren valores desde 2 hasta 28 % (Moiseev *et al.*, 1968).

Se debe tener presente que el suelo es un elemento vital para definir la calidad que pueda tener una materia prima vegetal, ya que dota de los nutrientes necesarios, sin embargo, también puede aportar compuestos que pudieran invalidar el uso de la misma, como son los metales pesados. Dada la necesidad de determinar cuáles eran los elementos inorgánicos presentes en droga cruda, se realizó la cuantificación, no sólo de minerales beneficiosos, sino también de aquellos que podrían resultar dañinos para el organismo, sobre todo, a largo plazo.

En la tabla 5 se muestra el análisis de minerales realizado al pseudotallo de la *M. paradisiaca*.

Tabla 5. Minerales identificados en el pseudotallo de la *M. paradisiaca*.

| DROGA SECA | | | | | | | | | | |
|-----------------------|--------------------------|----------|----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | % en materia seca | | | | | ppm | | | | |
| MUESTRA | N | P | K | Ca | Mg | Zn | Cu | Fe | Mn | Na |
| <i>M. paradisiaca</i> | 0,85 | 0,60 | 5,81 | 2,95 | 0,48 | 6,90 | 5,90 | 169,70 | 129,80 | 88,20 |

Lo más relevante del estudio resulta ser la presencia de altos niveles de los micronutrientes hierro y manganeso. Diversos metales pueden formar parte de los suelos como son: silicio, aluminio, hierro, calcio, sodio, potasio, magnesio o manganeso, este último, generalmente, se presenta como óxido y/o hidróxido. Algunos de estos metales son esenciales en la nutrición de las plantas e incluso, el Mn resulta imprescindible en el metabolismo vegetal (Prieto *et al.*, 2009).

Con relación al potasio este fue el macronutriente que la planta acumuló en mayor cantidad, lo que coincide con diversos trabajos, en los cuales se plantea que el potasio es requerido en grandes cantidades por las plantas de banano y sus niveles pueden fluctuar en dependencia del estadio fenológico de la planta (Fontaine *et al.*, 1989; Mostafa, 2005).

Considerando que dentro de los elementos inorgánicos pudieran encontrarse metales pesados, se realizó la correspondiente determinación. En la tabla 6, se puede observar que, si bien los niveles de materia inorgánica son elevados, estos no corresponden a la presencia de metales pesados.

Niveles elevados de metales pesados en suelos, tales como plomo, arsénico, níquel y cadmio, pueden provenir de los residuos de empresas mineras o incluso encontrarse en el agua utilizada para el riego agrícola. Estos elementos inorgánicos, por su carácter no biodegradable, la toxicidad que ejercen sobre los diferentes cultivos y su biodisponibilidad puede resultar peligrosos a la salud humana (Prieto *et al.*, 2009).

La muestra analizada cumple con los requisitos establecidos por la norma NTE INEN 2392:2017-04, ya que los niveles de metales pesados no superan los límites permisibles, lo que indica que la droga vegetal está apta para el consumo humano. En la tabla 6 se muestran los resultados de metales pesados realizados en el pseudotallo de la *M. paradisiaca*

Tabla 6. Análisis de metales pesados en el pseudotallo de la *M. paradisiaca*.

| Parámetros | Unidad | Resultados | Requisitos | Método de Referencia |
|------------|--------|------------|------------|----------------------|
| Arsénico | mg/Kg | < 0,005 | Máx 1,0 | MMQ-AAS-04 |
| Plomo | mg/Kg | < 0,09 | Máx 0,5 | MMQ-AAS-28 |

3.2 Preparación de los extractos acuoso e hidroalcohólico del pseudotallo de *M. paradisiaca*

Tomando en consideración la presencia de espuma en ensayos preliminares realizados a la biomasa vegetal, se propuso realizar extracciones que propiciarán la obtención de tales compuestos. Diversos autores han referido la extracción de saponinas empleando múltiples procedimientos, sin embargo, tomando en consideración el carácter polar de estos compuestos, todos los métodos coinciden en que la extracción sea en caliente o en frío, empleando agua o mezclas hidroalcohólicas, con alcoholes de bajo peso molecular (metanol, etanol, butanol) (Martínez, 2001; Soto *et al.*, 2005). Por tal motivo se elaboraron tres tipos de extractos (acuoso, hidroalcohólico 8:2 y 1:1), utilizando el método de maceración dinámica por sonicación.

Este método de sonicación permite una mejor extracción de metabolitos en comparación con otros métodos. La extracción por ultrasonido permite que las partículas del material vegetal vibren por efecto de la acción ultrasónica, lo que acelera el proceso de extracción.

Para favorecer el proceso se debe disminuir el tamaño de partícula de la droga y así aumentar la superficie de contacto con el disolvente (Azuola & Aguilar, 2007)

Para cada uno de los extractos se lograron los siguientes rendimientos: 4,51 (extracto acuoso); 9,97 (H₂O:EtOH 8:2) y 10,12 (H₂O:EtOH 1:1), respectivamente. Resulta evidente que el menstuo hidroalcohólico (1:1) fue el que logró extraer la mayor cantidad de metabolitos de la droga vegetal.

Los ensayos químicos preliminares (tamizaje fitoquímico) se les realizaron a los tres tipos de extractos (acuoso, hidroalcohólico 8:2 y 1:1). Este método se caracteriza por realizar pruebas rápidas y sencillas que permiten detectar, cualitativamente, la presencia de determinados grupos químicos, utilizando un mínimo de equipamiento de laboratorio.

Los resultados obtenidos no deben considerarse definitivos pues existen múltiples factores (intrínsecos y extrínsecos) que pueden propiciar variaciones en los mismos, como, por ejemplo: solubilidad en el disolvente empleado, la época de cosecha, el estado vegetativo de la planta, las características del suelo, posibles interferencias con otros metabolitos, calidad de los reactivos, entre otros.

En el estudio fue aplicada la metodología descrita por Miranda & Cuéllar, 2000, con algunas modificaciones en lo que a la preparación de los extractos se refiere.

Los resultados del tamizaje fitoquímico se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Resultados de los ensayos del tamizaje fitoquímico para los tres extractos

| Pruebas Realizadas | Extracto acuoso | Extracto hidroalcohólico (8:2) | Extracto hidroalcohólico (1:1) |
|---------------------------|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Espuma | ++ | ++ | ++ |
| Ninhidrina | + | - | - |
| Baljet | no | + | + |
| Cloruro férrico | - | - | +/- |
| Boroträger | no | - | - |
| Shinoda | + | + | + |
| Dragendorff | - | - | - |
| Fehling | + | + | + |

Leyenda: no (prueba no realizada); +/- (ligero cambio de color)

Como se puede apreciar el comportamiento de los tres extractos es bastante similar en las pruebas coincidentes para cada uno de ellos, resultando positivo en los tres casos para saponinas, flavonoides (shinoda) y azúcares reductores (Fehling). Solo en el extracto acuoso se observó la presencia de aminoácidos.

La prueba de espuma fue la más relevante, esta permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, sean del tipo esterooidal o triterpénicas, sin poder diferenciarlas. El ensayo se considera positivo si la espuma en la superficie del líquido presenta más de 2 mm de altura y persiste hasta 30 min. En el caso de que apareciera una capa de espuma que se desvaneciera a los pocos minutos, pudiera atribuirse a la presencia de algunos ácidos y de proteínas o a una baja concentración de saponinas.

En el caso que ocupa esta fue una de las determinaciones más evidentes, mostrando un resultado positivo para los tres extractos, siendo más significativo el resultado del extracto hidroalcohólico (1:1) en altura y permanencia en el tiempo.

Un estudio fitoquímico realizado en extractos etanólicos y metanólicos de la cáscara y tallo de la *M. paradisiaca* mostró la presencia de cianuro de hidrógeno, taninos, alcaloides, esteroides, saponina y flavonoides (Okorundu *et al.*, 2012). Amutha & Selvakumari, (2016) estudiaron un extracto metanólico del tallo de la especie citada, refiriendo en el estudio fitoquímico la presencia de compuestos tales como alcaloides, glucósidos, flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas.

Una investigación desarrollada por Ogofure & Emoghene, (2016) reporta la detección de alcaloides, flavonoides, taninos y esteroides en extractos de etanol y acetona del pseudotallo y tallo de *M. paradisiaca*.

Por otra parte, el tamizaje fitoquímico del extracto acuoso del tallo de *M. paradisiaca*, publicado por (Onyenekwe *et al.*, 2013) manifiesta la presencia de taninos y glucósidos en abundancia; alcaloides, saponinas, flavonoides, polifenoles y azúcares reductores en cantidades moderadas.

3.3 Análisis por cromatografía en capa delgada (CCD)

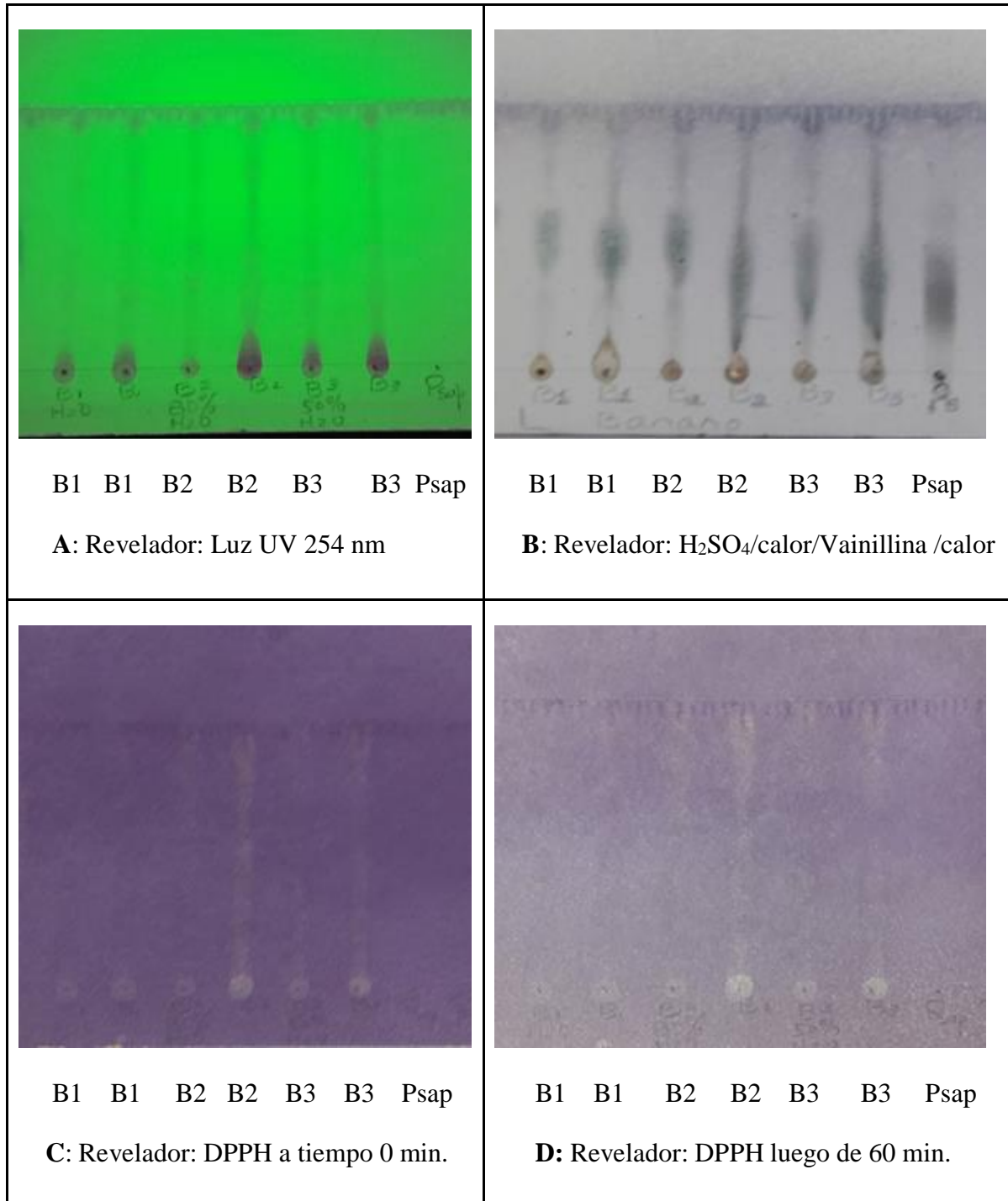
Los estudios de cromatografía en capa delgada se realizaron con el objetivo de verificar el resultado obtenido en el tamizaje fitoquímico y, además, analizar comparativamente la complejidad cromatográfica de los tres extractos.

Como se puede apreciar se utiliza para el método de separación una fase estacionaria de características polares (sílica gel GF₂₅₄) y como fase móvil la combinación butanol:ácido acético:agua. La elección de esta fase móvil responde a que los extractos obtenidos resultan ser de elevada polaridad, por lo que para lograr el desplazamiento del punto de aplicación se precisa de una fase móvil con alto poder de elución. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3, haciendo notar que cada tipo de extracto fue aplicado por duplicado y en cantidades crecientes, con el objetivo de buscar el revelado de aquellos metabolitos que pudieran presentarse en bajas concentraciones.

Analizando la imagen A de la figura 3, este revelado físico pretende identificar la presencia de metabolitos con grupos cromóforos conjugados, los cuales tienen la capacidad de absorber la luz ultravioleta. Como se puede apreciar en la corrida las manchas de mayor intensidad revelan muy cercanas al punto de aplicación, lo cual habla a favor de que sean compuestos con alta polaridad. No se muestran diferencias

apreciables entre los dos punteos de una misma muestra, salvo un incremento de la intensidad de revelado de las manchas observadas en la segunda aplicación.

Figura 3. Análisis por CCD de tres los extractos del pseudotallo de *M. paradisiaca*. FM: BAW (65:25:10). FE: Placas de Sílica Gel GF₂₅₄ con soporte de aluminio. B1: H₂O; B2: 20% ETOH; B3: 50% ETOH; Psap: patrón (*Quijalla saponaria*)



En todos los casos, a lo largo de la corrida parecen existir compuestos de diferente polaridad con una discreta fluorescencia. Se debe resaltar que el patrón utilizado para verificar la existencia de saponinas, lógicamente, no revela bajo tales condiciones, pues su estructura, no presenta grupos cromóforos conjugados. El extracto de *Q. saponaria* está constituido por una mezcla compleja de saponinas triterpenoides que presentan como genina al ácido quillaico, que está glicosilado con oligosacáridos en C3 y en la mayoría de los casos en C28 (Roner *et al.*, 2010).

Si se analiza la imagen B, placa revelada con H₂SO₄/calor/vainillina /calor, se puede apreciar que las manchas más notables que revelan bajo tales condiciones tienen una apariencia muy similar a la obtenida para el patrón de *Q. saponaria*. Adicionalmente, si se comparan las zonas de tales manchas de coloración gris violácea, con la misma zona, pero con el revelado físico (imagen A), se aprecia que esas manchas no muestran fluorescencia, lo cual sugiere que en esas zonas se encuentran las saponinas responsables de la espuma obtenida en el tamizaje fitoquímico. Este revelado realizado, unido a la fase móvil empleada en el análisis cromatográfico, son condiciones descritas por la literatura para la identificación de saponinas (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008).

Finalmente, se realizó igual análisis cromatográfico, pero utilizando como revelador una disolución al 0,2 % de DPPH en etanol. Las imágenes se tomaron a tiempo 0 y luego de 30 min, pues la capacidad secuestradora de radicales libres pudiera, cinéticamente hablando, ocurrir paulatinamente en el tiempo (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Las imágenes C y D muestran que existe una discreta actividad antioxidante por secuestro del radical libre DPPH, en aquellas zonas donde se apreció el revelado con la luz ultravioleta a 254 nm. El DPPH puede reaccionar con moléculas con actividad antioxidante y como consecuencia, se produce un cambio del color púrpura a diferentes tonalidades de amarillo (Marston, 2011). Las imágenes sugieren que los extractos hidroalcohólicos presentan una decoloración ligeramente superior a la del extracto acuoso. Además, la decoloración no se incrementa luego de transcurridos 30 min.

3.4 Cuantificación de saponinas y fenoles totales

La cuantificación de saponinas se ha realizado a través de diversos métodos, la mayoría de éstos se basan en reacciones colorimétricas como el realizado en esta investigación. El uso de vainillina y ácido sulfúrico permite la formación de grupos cromóforos en las saponinas, los que pueden ser determinados por espectroscopia visible a longitudes de

onda entre 455 a 460 nm. Sin embargo, aunque los cromóforos producidos mediante esta reacción son característicos, la interferencia es muy marcada, razón por la cual se considera una técnica poco repetible (Hernández *et al.*, 2005).

Luego de realizado el ensayo se obtuvieron los resultados que se refieren en la tabla 8.

Tabla 8. Cuantificación de saponinas y fenoles en los extractos acuoso e hidroalcohólicos

| Parámetros | Extracto acuoso | Extracto hidroalcohólico (8:2) | Extracto hidroalcohólico (1:1) |
|--|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Cuantificación de saponinas (g equivalentes a <i>Quijalla saponaria</i> /g de extracto seco) /DE | 0,098/0,003 ^a | 0,072/0,003 ^b | 0,099/0,001 ^a |
| Cuantificación de fenoles (mg EAG/gramo de extracto seco) /DE | 1,890/0,115 ^a | 2,584/0,177 ^b | 4,343/0,237 ^c |

Nota: Letras iguales demuestran que no hay diferencia estadísticamente significativa

Del estudio se puede apreciar que la mayor concentración de saponinas se logra en los extractos acuoso e hidroalcohólico (1:1), entre ellos no hay diferencia significativa según el análisis de varianza y rangos múltiples (anexo 1), sin embargo, si existe entre estos y el contenido de saponinas obtenido con el extracto 8:2.

Como parte del estudio fitoquímico se realizó la cuantificación de polifenoles totales, equivalentes a ácido gálico.

El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul que se determina, espectrofotométricamente, a 765 nm.

Como se puede apreciar en la tabla 8, el extracto que logró extraer la mayor cantidad de compuestos fenólicos fue el extracto hidroalcohólico (1:1) con un total de 4,343 mg EAG/ por cada gramo de extracto seco obtenido, luego de concentrar el extracto a baja temperatura y vacío. El análisis de varianza logró determinar que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos con los tres disolventes, dado que el valor P es menor que 0,05, con un nivel del 95,0 % de confianza (anexo 2).

Los compuestos polifenólicos presentan en su estructura química uno o más anillos aromáticos que pueden presentar diversos sustituyentes, como, por ejemplo: hidroxilos, metoxilos, glicósidos, etc. Se trata de moléculas muy reactivas que frecuentemente, se encuentran glicosidadas, presentando como azúcares: glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa o los ácidos, glucorónicos y galacturónicos.

Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico, que reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso. El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como una medida de la actividad antioxidante total.

La oxidación de los compuestos fenólicos de la muestra causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm. Se cuantifica por espectrofotometría UV-Vis en base a una recta patrón de ácido gálico, tal como se describió en materiales y métodos. Folin-Ciocalteu es un método preciso y sensible, que puede padecer numerosas variaciones, fundamentalmente en lo relativo a los volúmenes utilizados de la muestra a analizar, concentración de reactivos y tiempo de reacción (Lacueva *et al.*, 2009).

Luego de evaluados los resultados obtenidos, se puede observar que en la medida que se incrementa la concentración de etanol en el menstruo, se incrementa la concentración de compuestos polifenólicos.

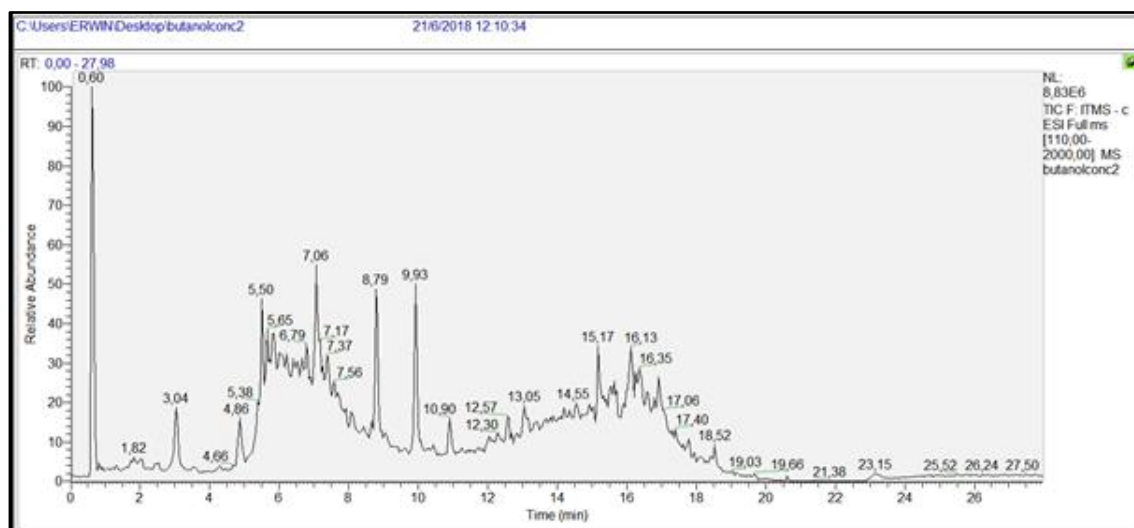
Los extractos acuosos u orgánicos de productos vegetales contienen una gran cantidad de biomoléculas. Se refiere que algunas moléculas no polifenólicas pueden interaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, lo que puede influir en una sobreestimación. Dentro de los principales compuestos que pueden interferir son: azúcares reductores (fructosa y glucosa), aminoácidos y ácido ascórbico (Shanmugavelan *et al.*, 2013; Granato *et al.*, 2016).

Haciendo un análisis integral de los resultados obtenidos hasta este punto, se decidió continuar los estudios químicos y biológicos con el extracto hidroalcohólico (1:1). Este extracto, aunque mostró similar concentración de saponinas que el extracto acuoso, logró extraer la mayor cantidad de compuestos fenólicos. Lógicamente, no se descarta que en trabajos futuros puedan ser analizados los restantes extractos.

3.5 Análisis químico por CLAE/EM

Para identificar los compuestos presentes en la muestra se utilizó la CLAE-EM. En la figura 4 se puede apreciar el cromatograma correspondiente a la corriente iónica principal. Los compuestos eluidos de la columna pudieron ser identificados mediante espectrometría de masas.

Figura 4. Cromatograma de la corriente iónica principal obtenido para el extracto hidroalcohólico (1:1) de la *M. paradisiaca*



Dicho método permitió la identificación de cinco productos naturales, los cuales se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Productos naturales identificados por CLAE/DAD/EM

| TR (min) | Producto natural | [M+H] | MS ² | Bibliografía |
|----------|---------------------------|-------|-----------------|---|
| 0,93 | Glucogalina | 331 | 169 | Gómez-Caravaca <i>et al</i> , 2016 |
| 2,32 | Ácido ferúlico-hexósido | 355 | 193*, 175 | Passo <i>et al</i> , 2015 |
| 5,56 | Rutina | 609 | 301 | López-Cobo <i>et al</i> , 2014; Passo <i>et al</i> , 2015 |
| 5,87 | Kaempferol-3-O-rutinósido | 593 | 285 | López-Cobo <i>et al</i> , 2014 |

| | | | | |
|------|-----------------------------|-----|-----|---------------------------|
| 5,91 | Isorhamnetin-3-O-rutinósido | 623 | 315 | Passo <i>et al</i> , 2015 |
|------|-----------------------------|-----|-----|---------------------------|

Como se puede apreciar, del estudio cromatográfico se pudieron identificar 5 compuestos, dos ácidos fenólicos (glucogalina y ácido ferúlico-hexósido) y tres flavonoides glicosidados (rutina, kaempferol-3-O-rutinósido, isorhamnetin-3-O-rutinósido).

Con relación a los compuestos fenólicos se sabe que una de las principales características que presentan estos, es que potencian la actividad antioxidante, un ejemplo son los ácidos ferúlicos y cafeicos (Gimeno, 2004), esta actividad antioxidante es la responsable de prevenir enfermedades, principalmente, de tipo cardiaco e inmunológico (Echavarría & Franco, 2009).

Los fenoles se presentan en la mayoría de los alimentos tales como cebolla, el té, el cacao, el aceite de oliva y el vino. En este último caso se encuentra el resveratrol (estilbeno) el cual ha sido demostrado por estudios en animales y humanos que posee un efecto protector frente a enfermedades cardiovasculares (Gimeno, 2004).

En el caso de los flavonoides, la estructura de la molécula y las posiciones de los sustituyentes influyen directamente en la actividad biológica de los mismos, sin embargo, la sustitución de grupos hidroxilos por azúcares disminuye su poder antioxidante.

Los flavonoides presentan actividad como antiarrítmicos influido por el número y posición de los grupos hidroxilos, siendo la misma más marcada cuando se presentan los grupos hidroxilos en las posiciones 4 y 5 de la molécula (Cartaya & Reynaldo, 2001).

Las verduras, frutas, el té son fuentes ricas en flavonoides, estos compuestos ayudan a prevenir enfermedades como, hipertensión, cáncer y diabetes (Muñoz & Ramos, 2017).

Con referencia a la actividad expectorante se ha reportado que el aceite esencial del tomillo rico en compuestos fenólicos como el timol y el carvacrol ayuda a licuar las secreciones bronquiales favoreciendo su expulsión (Folcará & Vanaclocha, 2000).

Los estudios químicos desarrollados se consideran de gran interés, pues la revisión bibliográfica realizada para dicha investigación no refiere la identificación de tales metabolitos. Adicionalmente, la composición química que se reporta del seudotallo de *M. paradisiaca*, solo hace alusión a métodos de tamizaje fitoquímico, por lo que continuar con dichos estudios resultaría de gran utilidad.

3.6 Evaluación preliminar del efecto mucolítico

El método realizado permite identificar compuestos mucosecretolíticos usando la secreción traqueal de rojo fenol en ratones. Luego de la aplicación del rojo fenol, parte del colorante es secretado en el tracto traqueobronquial y se recoge mediante lavados con solución salina. La concentración de rojo fenol secretado se mide espectrofotométricamente a 546 nm. Se plantea que la mayoría de los fármacos expectorantes suelen aumentar la secreción traqueobronquial de dicho colorante en el ratón (Coppi & Gatti, 1989).

La razón de por qué se evaluó este efecto se atribuye a la presencia de saponinas en la droga analizada. Las saponinas se han referido con efecto expectorante fluidificando las secreciones bronquiales y estimulando su expulsión. Muchas drogas con saponinas se utilizan, tradicionalmente, por sus propiedades antitusivas y/o expectorantes, sin embargo, aún el mecanismo por el que actúan no está totalmente esclarecido (Bruneton, 2001).

Los expectorantes son drogas que activan la expulsión del esputo, bien porque aumentan las secreciones traqueo bronquiales para reducir su viscosidad, o porque estimulan el reflejo de la tos (Flórez, 1998).

Los resultados de la evaluación preliminar del efecto mucolítico se presentan en la tabla 10. Como se puede apreciar la dosis ensayada (500 mg/kg de peso del animal) mostró un efecto mucolítico similar al control positivo (Bisolvon), el que presenta reconocida actividad como expectorante a una baja dosis.

Tabla 10. Resultados del ensayo mucolítico preliminar realizado para el extracto hidroalcohólico (1:1) de la *M. paradisiaca*

| Grupo | Concentración de rojo fenol (µg/mL) | DS |
|---|-------------------------------------|------|
| Control negativo | 1,963 | 0,41 |
| Control positivo (Bisolvon) | 2,802 | 0,54 |
| Extracto hidroalcohólico de <i>M. paradisiaca</i> (1:1) | 2,832 | 0,53 |

Evidentemente, el ensayo que se presenta es de carácter preliminar, pues solo fue ensayada una sola dosis y además es elevada. Los resultados obtenidos abren una nueva brecha de investigación donde se recomienda realizar el ensayo evaluando varias dosis, para establecer el efecto dosis-respuesta.

El uso del extracto hidroalcohólico delseudotallo de *M. paradisiaca* podría ser una opción fitoterapéutica, solo o, tal vez combinado con otros productos naturales, para lograr un efecto mucolítico (expectorante).

Existen diversas plantas a las que se les ha demostrado actividad antitusígena y expectorante, relacionando dicha actividad con la presencia, entre otros compuestos, de saponinas. Dentro de las plantas estudiadas se encuentran: *Acacia concinna* wild. DC (hojas), *Alhagi pseudalhagi* Bieb. Desv (toda la planta), *Allium odorum* L. (hojas), *Allium porrum* Linn (hojas), *Anagallis arvensis* Linn. (hojas), *Balanites aegyptiaca* Linn. Delile. (tallo), *Platycodon grandiflorum* Jacq. A. DC (raíz), *Polemonium reptans* L. (raíz), *Viola odorata* L. (hojas, raíz, florez), *Momordica grosvenori* (Guo et al., 2009; Gairola et al., 2010).

3.7 Evaluación del efecto del extracto de *Musa x paradisiaca* en el gasterópodo *Cerithidea valida*

El bioensayo realizado sobre el gasterópodo *Cerithidea valida* durante 96 horas permitió establecer que durante las primeras 24 horas del estudio, a excepción del grupo control, todos los caracoles permanecieron en el fondo del recipiente, resguardándose dentro de su concha y cerrando el opérculo, probablemente a causa de irritabilidad del medio donde fueron confinados. Con el transcurrir del tiempo, los organismos comenzaron a subir por las paredes del recipiente para salir de los frascos, excepto en los recipientes con mayor concentración de extracto en los que permanecieron en el fondo, aparentemente muertos.

Durante el ensayo fue posible observar deposición de heces por parte de los caracoles, de manera tal que a mayor concentración de extracto mayor cantidad de heces. Debido a que las saponinas tienen efecto laxante Valle, (2016), es probable que la exposición a la solución con saponinas haya promovido una estimulación de las mucosas intestinales provocando la eliminación de heces en los organismos ensayados.

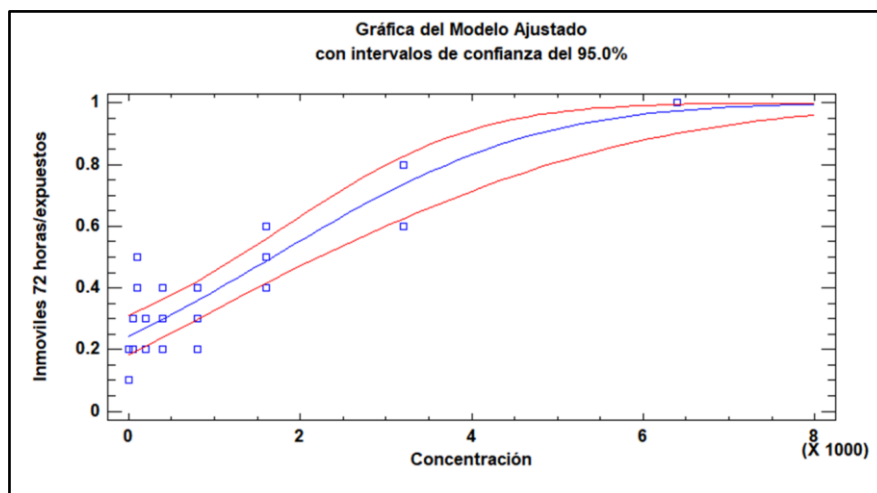
Al cabo de las 96 horas fue suspendido el bioensayo y como medida de precaución fueron sustituidas las soluciones con las diferentes concentraciones ensayadas, por agua de mar

limpia para verificar la mortalidad efectiva de los caracoles que permanecieron inmóviles. Sin embargo, al cabo de los primeros 30 minutos, todos los caracoles en todas las concentraciones antes mencionadas presentaron total movilidad.

A la luz de los resultados obtenidos, es obvio que no pudo determinarse actividad molusquicida del extracto ensayado. Por el contrario, y en oposición a lo esperado, el extracto parece haber tenido más bien un efecto beneficioso en los caracoles. Por lo tanto, la ausencia de movilidad en los caracoles, en las mayores concentraciones, permite suponer que ese comportamiento es el resultado de la adopción de una respuesta ante las condiciones, probablemente irritantes del extracto, a dosis altas que podría ser provocada por algún compuesto químico del extracto o del alcohol que éste contiene. De hecho, el opérculo es un disco córneo (orgánico) o calcáreo adherido a la parte superior del pie del molusco, que encaja perfectamente en la apertura de la concha para cerrarla como mecanismos de protección ante sustancias líquidas nocivas o de los efectos deshidratantes del sol y el aire. Por lo tanto, ante la imposibilidad de establecer efecto letal, se decidió calcular la dosis media de extracto que provoca la inmovilidad del 50% (ID_{50}) de los caracoles mediante análisis Probit.

En la figura 5, se muestra la gráfica del modelo ajustado con intervalos de confianza al 95%.

Figura 5. Gráfica del modelo ajustado con intervalos de confianza al 95%



La ecuación del modelo ajustado obtenida fue:

$$\text{Inmóviles 72 horas/expuestos} = -0,693332 + 0,000413843 \times \text{Concentración}$$

A partir de las predicciones inversas obtenidas del modelo ajustado que indican el valor de concentración al cual el modelo alcanza ciertos porcentajes se obtuvo el valor correspondiente a $p=50\%$ (ID50) que resultó igual a 1675,35 con los siguientes intervalos de confianza: $1266,52 \leq \text{LD50} \leq 2209,88$.

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

- ❖ El control de calidad realizado a la droga cruda mostró resultados que se encuentran dentro de los límites permisibles, tanto para humedad mas no para cenizas totales.
- ❖ El análisis de la composición química inorgánica permitió la cuantificación de macro y micronutrientes en la droga vegetal seca, resaltando la presencia de potasio, hierro y manganeso. Los metales pesados, As y Pb, se encontraron dentro de los límites permisibles por las normas ecuatorianas.
- ❖ La evaluación química preliminar de los tres tipos de extractos elaborados mediante maceración por sonicación (acuoso, hidroalcohólico 8:2 y 1:1), mostró la existencia de saponinas, además de flavonoides y azúcares reductores. Solo el extracto acuoso exhibió la presencia de aminoácidos.
- ❖ El análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) de los tres extractos permitió la identificación de saponinas; metabolitos con grupos cromóforos conjugados y una discreta capacidad secuestradora de radicales libres.
- ❖ La mayor concentración de saponinas se logró en los extractos acuoso e hidroalcohólico (1:1), presentando este último la mayor cantidad de compuestos fenólicos.
- ❖ El análisis mediante CLAE/DAD/EM propició la identificación de tres flavonoides glicosilados y dos glicósidos de ácido fenólico.
- ❖ El extracto hidroalcohólico (1:1), a la dosis de 500 mg/kg de peso del animal mostró un efecto mucolítico similar al control positivo (Bisolvon).
- ❖ Aunque no fue posible establecer efecto tóxico letal del extracto hidroalcohólico (1:1) de pseudotallo de *M paradisiaca*, con las concentraciones y tiempo de exposición ensayados, si se detectó un efecto de retracción del cuerpo en la concha

y cierre de la cavidad que provocó la inmovilidad de los moluscos y que fue atribuido a un mecanismo de defensa ante una probable acción irritante del extracto.

CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES

- ❖ Continuar el estudio fitoquímico de los extractos acuosos e hidroalcohólicos (8:2)
- ❖ Evaluar otros posibles métodos de extracción, que favorezcan la obtención en mayor cantidad de saponinas.
- ❖ Analizar otras posibles técnicas analíticas que permitan la cuantificación del crudo de saponinas.
- ❖ Profundizar en el ensayo mucolítico *in-vivo* del extracto hidroalcohólico y evaluar la posible toxicidad aguda del mismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adegboyega, O.; Ketiku, J. *Sci. Food Agric.* **2006**, 24 (6), 703-707.

Adewoye, E. O.; Taiwo, V. O.; Olayioye, F. A. Anti-Oxidant and Anti-Hyperglycemic Activities of Musa Sapientum Root Extracts in Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Afr. J. Med. Med. Sci.* **2009**, 38 (2), 109–117.

Afanador, A. M. El banano verde de rechazo en la producción de alcohol carburante. *Revista EIA.* **2005**, (3), 511–568.

Ahumada, A.; Ortega, A.; Chito, D.; Benítez, R. Saponinas de Quinoa (Chenopodium Quinoa Willd.): Un Subproducto Con Alto Potencial Biológico. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* **2016**, 45 (3), 438–469.

Alcazar, E. Caracterización de Saponinas de Agave Durangensis y Salmiana, y Su Efecto En La Pared y Membrana Celular de Kluyveromyces Marxianus y Saccharomyces Cerevisiae, CIATEJ, **2016**.

Amutha, K.; Selvakumari, U. Wound Healing Activity of Methanolic Stem Extract of Musa Paradisiaca Linn. (Banana) in Wistar Albino Rats. *Int. Wound J.* **2016**, 13 (5), 763–767.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. Method ce **2003**: 2-66

Apaza, R.; Smeltekop, H.; Flores, Y.; Almanza, G.; Salcedo, L. Efecto de Saponinas de Chenopodium Quinoa Willd contra el fitopatógeno Cercospora Beticola Sacc. *Braz. J. Plant. Physiol.* **2016**, 31 (1), 63–69.

Augustin, J. M.; Kuzina, V.; Andersen, S. B.; Bak, S. Molecular Activities, Biosynthesis and Evolution of Triterpenoid Saponins. *Phytochemistry.* **2011**, 72 (6), 435–457.

Azuola, R.; Vargas, P. Extracción de Sustancias Asistida Por Ultrasonido (EUA). *Tecnol.*

en Marcha. **2007**, 20 (4), 30-40.

Belalcazar, C.; Valencia, M.; Lozada, Z. La planta y el fruto. El cultivo del platano. **1991**, 43-89.

Berhow, M. A.; Wagner, E. D.; Vaughn, S. F.; Plewa, M. J. Characterization and Antimutagenic Activity of Soybean Saponins. *Mutat. Res.* **2000**, 448 (1), 11–22.

Blasco López, G.; Gómez, F. J. Propiedades Funcionales Del Plátano (Musa Sp). *Rev. Médica La Univ. Veracruzana* **2014**, 14 (2), 22–26.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, 28 (1), 25–30.

Bruneton, J. Farmacognosia Fitoquímica plantas medicinales. Acribia, S.A. España, **1993**.

Buedo, P.; Giagante, C. Utilización de Plantas Medicinales Como Alternativa a Las Benzodiazepinas: Revisión Bibliográfica. *Arch. Med. Fam. y Gen.* **2015**, 12 (2), 1–7.

Busvine JR. Techniques for Testing Insecticides. 2nd Ed. C.A.B. England. **1971**. 345 p.

Cantillo, J. Manual de las Buenas Prácticas Agrícolas [online]; Antioquia Colombia), **2009**; pp. 33-40. <https://es.slideshare.net/JeverCan/manual-de-las-buenas-practicas-agricolas> (accessed Aug 16, 2018).

Cartaya, O.; Reynaldo, I. Flavonoides: Características Químicas y Aplicaciones. *Cultiv. Trop.* **2001**, 22 (2), 5–14.

Chen, Y. F.; Yang, C. H.; Chang, M. S.; Ciou, Y. P.; Huang, Y. C. Foam Properties and Detergent Abilities of the Saponins from *Camellia Oleifera*. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, 11 (11), 4417–4425.

Clearwater, S. J.; Hickey, C. W.; Martin, M. L. Overview of Potential Piscicides and

Molluscicides for Controlling Aquatic Pest Species in New Zealand. *Sci. Conserv.* **2008**, 283, 1–74.

Coomber, H.; Chittenden, H. Colonial Plant and Animal Products. *Nature* **1952**, 170, 405.

Coppi, G.; Gatti, M. T. A Method for Studying Expectorant Action in the Mouse by Measurement of Tracheobronchial Phenol Red Secretion. *Farmacologia* **1989**, 44 (5), 541-545

D'Alessandro, M. Plátano <https://www.flores.ninja/platano/> (accessed Aug 25, 2018).

De Tommasi, N.; Autore, G.; Bellino, A.; Pinto, A.; Pizza, C.; Sorrentino, R.; Venturella, P. Antiproliferative Triterpene Saponins from *Trevesia Palmata*. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63 (3), 308–314.

Diab, Y.; Ioannou, E.; Emam, A.; Vagias, C.; Roussis, V. Desmettianosides A and B, Bisdesmosidic Furostanol Saponins with Molluscicidal Activity from *Yucca Desmettiana*. *Steroids* 2012, 77 (6), 686–690.

Echavarría, B.; Franco, A.; Martínez A. Evaluación de la Actividad Antioxidante y La Determinación Del Contenido de Compuestos Fenólicos En Extractos de Microalgas Del Caribe Colombiano. *Vitae* **2009**, 16 (1), 126–131.

Eleazu, C. O.; Okafor, P. N.; Ahamefuna, I. Total Antioxidant Capacity, Nutritional Composition and Inhibitory Activity of Unripe Plantain (*Musa Paradisiaca*) on Oxidative Stress in Alloxan Induced Diabetic Rabbits. *Pakistan J. Nutr.* **2010**, 9 (11), 1052–1057.

Engler, H.; Szelenyi, I. Tracheal Phenol Red Secretion, a New Method for Screening Mucosecretolytic Compounds. *J. Pharmacol. Methods.* **1984**, 11 (3), 151–157.

Farmacopea Española. Real Farmacopea Española; Publicada por el Ministerio de Sanidad y Consumo, por mandato de la Ley 25/1990, de 20 de diciembre, del Medicamento: Madrid, **2002**.

Fernández, J.; Rojas, J. Estudios molusquicidas en sustancias naturales derivadas de plantas. *Fitoquímica*. Editorial Académica Española. **2014**. 40p

Finney, D. J. *Probit Analysis*, Second edic.; Cambridge, **1952**.

Flórez J. Fármacos antitusígenos, mucolíticos, surfactante pulmonar y estimulantes de la respiración. *Farmacología Humana*. 3ra. ed. Barcelona: Masson, SA; **1998**. pag 721-30.

Folcará, S. C., Vanaclocha, B. Usos terapéuticos del tomillo. *Rev. Fitoter.* **2000**, 1, 5–13.

Fontaine, S.; Delvaux, B.; Dufey, J. Herbillon, A.J. Potassium exchange behavior in Caribbean volcanic ash soils under banana cultivation. *Plant and Soil*. **1989**, 120: 283-290.

Foods, M. H. I. N. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **2003**.

Foy Valencia, E.; Donald, D. M.; Cuyos, M.; Dueñas, R. Extracción, identificación y evaluación de saponinas en *Aguaricus Bisporus*. *Biotempo* **2005**, 5, 31–36.

Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H.; Becker, K. The Biological Action of Saponins in Animal Systems: A Review. *Br. J. Nutr.* **2002**, 88 (6), 587–605.

Gairola, S.; Gupta, V.; Bansal, P.; Singh, R.; Maithani, M. Herbal Antitussives And Expectorants—A Review. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2010**, 5 (2), 5–9.

Ghosal, S. Steryl Glycosides and Acyl Steryl Glycosides from *Musa Paradisiaca*. *Phytochemistry*. **1985**, 24 (8), 1807–1810.

Gimeno, E. Compuestos Fenólicos. *Ámbito Farm. Nutr.* **2004**, 23 (6), 80–84.

González-Cruz, D.; Martín, R. S. Molluscicidal Effects of Saponin-Rich Plant Extracts on the Grey Field Slug. *Cienc. e Investig. Agrar.* **2013**, 40 (2), 341–349.

Granato, D.; Santos, J. S.; Maciel, L. G.; Nunes, D. S. Chemical Perspective and Criticism

on Selected Analytical Methods Used to Estimate the Total Content of Phenolic Compounds in Food Matrices. *Trends Analyt. Chem.* **2016**, 80, 266–279.

Guclu-Ustundag, O.; Mazza, G. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, 47 (3), 231–258.

Guo, C.; Tang, X.; Dong, X.; Yang, Y. Studies on the Expectorant, Antitussive and Antiasthmatic Properties of Asterosaponin Extracted from *Luidia Quinaria*. *Afr. J. Biotechnol.* **2009**, 8 (23), 6694–6696.

Heng, L.; Vincken, J.; Hoppe, K.; Van Koningsveld, G.; Decroos, K.; Gruppen, H.; Van Boekel, M.; Voragen, A. Stability of Pea DDMP Saponin and the Mechanism of Its Decomposition. *Food Chem.* **2006**, 99 (2), 326–334.

Hernández S, R.; Lugo C, E. C.; Díaz J, L.; Villanueva, S. Extracción Y Cuantificación Indirecta de las saponinas de *Agave Lechuguilla Torrey*. *E-Gnosis [online]* 2005, 3 (11), 1–9.

Hiai, S.; Oura, H.; Nakajima, T. Color Reaction of Some Sapogenins and Saponins with Vanillin and sulfuric Acid. *Planta Med.* **1976**, 29 (02), 116–122.

Hostettmann, K.; Marston, A. Saponins (Chemistry and Pharmacology of Natural Products). University Press, Cambridge **1995**.

Hughes, W. Essentials of environmental toxicology. CRC Press, **2003**.

ITIS Standard Report Page. *Musa x paradisiaca* Taxonómico Número de serie: 42391. **2018**.

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=42391 (accessed Jul 21, 2018).

Kaiser, S.; Pavei, C.; Ortega, G. G. Estudo Da Relação Estrutura-Atividade de Saponinas Hemolíticas E/ou Imunoadjuvantes Mediante Uso de Análise Multivariada. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2010**, 20 (3), 300–309.

Karadi RV, Shah A, Parekh P, Azmi P Antimicrobial activities of *Musa paradisiaca* and *Cocos nucifera*. *Int J Res Pharm Biomed Sci.* **2011**, 2 (1), 264-267.

Khawas, P.; J. Das, A.; Sit, N.; S. Badwaik, L.; C. Deka, S. Nutritional Composition of Culinary *Musa ABB* at Different Stages of Development. *Am. J. Food Sci. Technol.* **2014**, 2 (3), 80–87.

Kijprayoon, S.; Tolieng, V.; Petsom, A.; Chaicharoenpong, C. Molluscicidal Activity of *Camellia Oleifera* Seed Meal. *Science Asia.* **2014**, 40 (6), 393–399.

Kuhajda, F. P.; Pizer, E. S.; Li, J. N.; Mani, N. S.; Frehywot, G. L.; Townsend, C. A. Synthesis and Antitumor Activity of an Inhibitor of Fatty Acid Synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, 97 (7), 3450–3454.

Kuttimani, R.; Velayudham, K.; Somasundaram, E.; Jothi, N. J. Effect of Integrated Nutrient Management on Corm and Root Growth and Physiological Parameters of Banana. *Int. J. Adv. Res.* **2013**, 1, 46–55.

Lacueva, C; Medina, A; Llorach, R; Urpi, M; Khan, N; Chiva-Blanch, G; Zamora-Ros, R; Rotches-Ribalta, M; Lamuela-Raventós, R. Phenolic Compounds. In *Chemistry and occurrence in fruits and vegetables*; Barcelona, **2009**; pp 53–88.

Lee, B. H.; Lee, S. J.; Hur, J. H.; Lee, S.; Sung, J. H.; Huh, J. D.; Moon, C. K.; Hui, J. H. In Vitro Antigenotoxic Activity of Novel Ginseng Saponin Metabolites Formed by Intestinal Bacteria. *Planta Med.* **1998**, 64 (6), 500–503.

López, J.; Cuarán, J.; Arenas, L.; Flórez, L. Usos Potenciales de La Cáscara de Banano: Elaboración de Un Bioplástico. *Rev. Colomb. Investig. Agroindustriales.* **2014**, 1, 7–21.

López, T. Saponósidos. *Fitoterapia.* **2001**, 124–128.

López-Cobo, A.; Gómez-Caravaca, A. M.; Cerretani, L.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. Distribution of Phenolic Compounds and Other Polar Compounds in the Tuber of *Solanum Tuberosum* L. by HPLC-DAD-q-TOF and Study of Their Antioxidant Activity. *J. Food Compos. Anal.* **2014**, 36 (1–2), 1–11.

Mallick C, Maiti R, Ghosh D. Comparative study on antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of separate and composite extract of seed of *Eugenia jambolana* and root of *Musa paradisiaca* in streptozotocin-induced diabetic male albino rat. *Iran J Pharmacol Ther.* **2006**, 5: 27-33.

Marston, A. Thin-Layer Chromatography with Biological Detection in Phytochemistry. *J. Chromatogr. A.* **2011**, 1218 (19), 2676–2683.

Martinez, A. Abstract Bulletin; *Institute of Paper Chemistry*, **1962**.

Martínez, M. A. Saponinas Esteroides. *Rev. Universidad de Antioquia.* **2001**.

Meneses, M. M., Agatón, L. L., Gutiérrez, L. F. M., Mendieta, L. E. G., Botero, J. D. Aprovechamiento industrial de residuos de cosecha y poscosecha del plátano en el departamento de Caldas. *Revista Educación en Ingeniería.* **2012**, 5(9), 128-139.

Mioso, R.; Toledo, F.; Bravo de Laguna, I.; Bessonart, M. Química de Productos Naturales Aplicados a La Acuicultura: Una Revisión Interdisciplinar. *Quim. Nova.* **2014**, 37 (3), 513–520.

Miranda M. M.; Cuéllar A. C. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Ciudad Habana. **2000**, 25-49, 74-79.

Miranda, M.; Cuéllar, A. Farmacognosia Y Productos Naturales. La Habana: Editorial Félix Varela. **2001**, 141.

Mohapatra, D.; Mishra, S.; Sutar, N. Banana and Its By-Product Utilisation: An Overview. *J. Sci. Ind. Res.* **2010**, 69 (5), 323–329.

Mostafa, E. A. M. Response of Williams Banana to Different Rates of Nitrogen and Potassium Fertilizers. *J. Appl. Sci. Res.* **2005**, 1, 67–71.

Muñoz, A.; Ramos, F. Componentes Fenólicos de La Dieta y Sus Propiedades

Biomedicinales. *Horiz. Med.* **2007**, 7 (1), 23–31.

Nakamura, Y.; Tsumura, Y.; Tonogai, Y.; Shibata, T. Fecal Steroid Excretion Is Increased in Rats by Oral Administration of Gymnemic Acids Contained in *Gymnema Sylvestre* Leaves. *J. Nutr.* **1999**, 129 (6), 1214–1222.

Nijenstein, J.; Ester, A. Fototoxicidad y control de la babosa de campo *Deroceras reticulatum* por plaguicidas aplicados a la semilla en trigo, cebada y ballica perenne. *Seed Sci. Technol.* **1998**, 26: 501-513.

Ogofure, A. G. Emoghene, A. O. Evaluation of Proximate, Phytochemical and Antibacterial Properties of the Pseudostem and Hand of Plantain (*Musa Paradisiaca*). *Niger. J. Agric. Food Environ.* **2016**, 12 (2), 19–26.

Ohtsuka, M.; Fukuda, K.; Yano, H.; Kojiro, M. Effects of Nine Active Ingredients in Chinese Herbal Medicine Sho-Saiko-to on 2-(2-Furyl)-3-(5-Nitro-2-Furyl) acrylamide Mutagenicity. *Jpn. J. Cancer Res.* **1995**, 86 (12), 1131–1135.

Ojewole, J. A. O.; Adewunmi, C. O. Hypoglycemic Effect of Methanolic Extract of *Musa Paradisiaca* (Musaceae) Green Fruits in Normal and Diabetic Mice. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **2003**, 25 (6), 453–456.

Okorundu, S. I.; Akujobi, C. O.; Nwachukwu, I. N. Antifungal Properties of *Musa Paradisiaca* (Plantain) Peel and Stalk Extracts. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* **2012**, 6, 1527–1534.

Oliveira da Costa, L.O. Purificacao de saponinas de estratos de quilaia usando fracionamento em coluna de espuma. Tesis doctoral, Universidade Estadual de Campinas, Janeiro **1999**.

Onyenekwe, P. C.; Okereke, O. E.; Owolewa, S. O. Phytochemical Screening and Effect of *Musa Paradisiaca* Stem Extrude on Rat Haematological Parameters. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* **2013**, 5 (1), 26–29.

Pannangpetch, P.; Vuttivirojana, A.; Kularbkaew, C.; Tesana, S.; Kongyingyoes, B.;

Kukongviriyapan, V. The Antiulcerative Effect of ThaiMusa Species in Rats. *Phytother. Res.* **2001**, 15 (5), 407–410.

Passo, C. V.; Herent, M. F.; Tomekpe, K.; Happi, T.; Quetin-Leclercq, J.; Rogez, H.; Larondelle, Y.; Andre, C. Effect of Boiling on Phenolic Profiles Determined Using HPLC/ESI-LTQ-Orbitrap-MS, Physico-Chemical Parameters of Six Plantain Banana Cultivars (Musa Sp). *J. Food Compos. Anal.* **2015**, 44, 158–169.

Pazmio-Durán, E.; Giusti, M.; Wrolstad, R.; Glória, M Anthocyanins from Oxalis Triangularis as Potential Food Colorants. *Food Chem.* **2001**, 75 (2), 211–216.

Peng, J. P.; Yao, X. S. 19 New Steroidal Saponins from Allium Plants: Isolation, Structural Elucidation and Effect on Blood Coagulability. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, 404, 511–526.

Peng, W. D. Hypotensive Effect of Tenuifolic Saponin and Its Mechanism. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **1999**, 20 (7), 639–642.

Pilco, G.; Borja, D.; Goetschel, L.; Andrade, P.; Irazabal, J.; Vargas-Jentzsch, P.; Guil-Guerrero, J. L.; Rueda Ayala, V.; Ramos, L. Caracterización Bromatológica y Evaluación de La Actividad AntimiCrobiana En Cáscara de Banano Ecuatoriano (Musa x paradisiaca). *Enfoque UTE.* **2018**, 9 (2), 48–58.

Piña, M.; Dieguez, L.; Abreu, O.; Vásquez, R.; Gonzalez, G. Actividad Molusquicida Del Paraíso (Melia Azedarach L.) (Meliaceae) Sobre Lymnaea Cubensis, Molusco Vector de Fasciolosis. *Revista de Saúde Pública.* **1998**, 32, 262–266.

Price, K. R.; Johnson, I. T.; Fenwick, G. R.; Malinow, M. R. The Chemistry and Biological Significance of Saponins in Foods and Feedingstuffs. *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1987**, 26 (1), 27–135.

Prieto, J.; Gutiérrez, R.; Alma, D.; García, P. Contaminación y Fitotoxicidad En Plantas Por Metales Pesados Provenientes de Suelos y Agua. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* **2009**, 10, 3–17.

Prieto-García, F.; Callejas, J.; Lechuga, M.; Gaytán, J.; Barrado, E. Acumulación en tejidos vegetales de arsénico proveniente de aguas y suelos de Zimapán, Estado de Hidalgo, México. *Revista Bioagro*. **2005**, 17 (3), 129-35.

Quiñones, W.; Echeverri, F.; Cardona, D.; Vélez, I. D.; Herrera, N.; Correa, E.; Archbold, R.; Torres, F.; Robledo, S. Estructura Y Actividad de Sapogeninas Triterpénicas. *Scientia et Technica*. **2007**, 1 (33), 87–90.

Rodríguez, J.; Esclapés, M. Protocolos estándares para bioensayos de toxicidad con especies acuáticas. Versión 1.0. Gerencia General de Tecnología. Departamento de Ecología y Ambiente. INTEVEP, PDVSA, Venezuela, **1995**, 109 pp.

Roner, M. R.; Tam, K. I.; Kiesling-Barrager, M. Prevention of Rotavirus Infections in Vitro with Aqueous Extracts of Quillaja Saponaria Molina. *Future Med. Chem.* **2010**, 2 (7), 1083–1097.

Sarnthein-Graf, C.; La Mesa, C. Association of Saponins in Water and Water–gelatine Mixtures. *Thermochim.* **2004**, 418 (1), 79–84.

Shanmugavelan, P.; Kim, S. Y.; Kim, J. B.; Kim, H. W.; Cho, S. M.; Kim, S. N.; Kim, S. Y.; Cho, Y. S.; Kim, H. R. Evaluation of Sugar Content and Composition in Commonly Consumed Korean Vegetables, Fruits, Cereals, Seed Plants, and Leaves by HPLC-ELSD. *Carbohydr. Res.* **2013**, 380, 112–117.

Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Am. J. Enol Vitic.* **1974**, 25 (119), 152–178.

Sokal, R. R.; Rohlf, F. J. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. New York **1995**, 3 (San Francisco, California, USA), 887.

Stuardo, M.; San Martín, R. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. *Ind. Crop. Prod.* **2008**, 27, 296-

302.

Sung, M. K.; Kendall, C. W.; Koo, M. M.; Rao, A. V. Effect of Soybean Saponins and Gypsophilla Saponin on Growth and Viability of Colon Carcinoma Cells in Culture. *Nutr. Cancer* **1995**, 23 (3), 259–270.

Swathi, D.; Jyothi, B.; Sravanthi, C. A Review: Pharmacognostic Studies and Pharmacological Actions of Musa Paradisiaca. *Int. J. Innov. Pharm. Res.* **2011**, 2 (2), 122–125.

Uribe-Lamas, A. Tesis Licenciatura. Métodos usados para la determinación de saponinas (trabajo monográfico). Facultad de Química UNAM. México. 1987

Utara, U. S. Musa x paradisiaca. **2003**, 261-266.

Venugopalan, C.; Srivastava, K. N. Hypocholesterolemic Activity of Saponin on Cholesterol Added Bengalgram (Cicer Arietinum) Diet in Rats. *J. Food Sci. Technol.* **1996**, 33 (5), 389–392.

Vidal, F. I.; Pereira, E., Sotolongo R., Quintana Y., Ortiz, A., García A., Ly, J. Efecto de la suplementación con pseudotallo de plátano sobre la salud y el peso al sacrificio de cerdos comerciales. *Rev. Prod. Anim.*, **2001**, 13 (1), 67-69.

Waksmundzka-Hajnos, M.; Sherma, J.; Kowalska, T. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry, CRC Press, **2008**.

Wang, Z.; Gu, M.; Li, G. Surface Properties of Gleditsia Saponin and Synergisms of Its Binary System. *J. Dispersion Sci. Technol.* **2005**, 26 (3), 341–347.

Yuri, M.; Henry, B.; Damian, D. Estructura Morfológica Y Composición Química Del Pseudotallo de Plátano Para Su Utilización Como Material Celulcísico. *IV Conferencia de Química. Universidad de Oriente.* **1968**, 2 (3), 26–52.

Zapata Martínez, A.; González Álvarez Garriga Rodríguez, S.; Melo Gonzalez, M.

Ensayo Clínico Con Polvo de Musa Paradisiaca En El Tratamiento Intercrisis Del Asma Bronquial En Adultos. *Rev Cuba. Invest Biomed.* **1998**, 17 (3), 208–213.

ANEXO 1

Prueba de Múltiple Rangos para Cuantificación de saponinas

Método: 95,0 porcentaje LSD

| <i>Disolvente</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| Hidroalcohólico (8:2) | 3 | 0,0723333 | X |
| Acuoso | 3 | 0,0977 | X |
| Hidroalcohólico (1:1) | 3 | 0,099 | X |

| <i>Contraste</i> | <i>Sig.</i> | <i>Diferencia</i> | <i>+/- Límites</i> |
|---|-------------|-------------------|--------------------|
| Acuoso - Hidroalcohólico (1:1) | | -0,0013 | 0,00480789 |
| Acuoso - Hidroalcohólico (8:2) | * | 0,0253667 | 0,00480789 |
| Hidroalcohólico (1:1) - Hidroalcohólico (8:2) | * | 0,0266667 | 0,00480789 |

* indica una diferencia significativa.

ANEXO 2

Prueba de Múltiple Rangos para Cuantificación de fenoles

Método: 95,0 porcentaje LSD

| <i>Disolvente</i> | <i>Casos</i> | <i>Media</i> | <i>Grupos Homogéneos</i> |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------------------|
| Acuoso | 3 | 1,88967 | X |
| Hidroalcohólico (8:2) | 3 | 2,58433 | X |
| Hidroalcohólico (1:1) | 3 | 4,34367 | X |

| <i>Contraste</i> | <i>Sig.</i> | <i>Diferencia</i> | <i>+/- Límites</i> |
|---|-------------|-------------------|--------------------|
| Acuoso - Hidroalcohólico (1:1) | * | -2,454 | 0,365941 |
| Acuoso - Hidroalcohólico (8:2) | * | -0,694667 | 0,365941 |
| Hidroalcohólico (1:1) - Hidroalcohólico (8:2) | * | 1,75933 | 0,365941 |

* indica una diferencia significativa.