

**ALGUNOS ESTERES CON ACTIVIDAD FUNGISTATICA PRESENTES
EN LA CASCARA DEL PLATANO HARTON
(MUSA PARADISIACA) MADURO**

Resumen de la tesis presentada como requisito parcial
para optar al Título de Químico Farmacéutico por
MARÍA MERCEDES BEJARANO DE TALERO
Y XIMENA VEJARANO ALVARADO

Director de tesis: Dra. TERESA SALAZAR DE BUCKLE

I N T R O D U C C I O N

Recientes investigaciones han mostrado que extractos de plantas superiores contienen sustancias que inhiben el crecimiento de hongos y bacterias. En estudios preliminares se demostró que aproximadamente el 40% de los extractos de 80 plantas ensayadas presentan actividad antibacteriana o antifúngica o ambas (1). Entre las plantas estudiadas estuvo el banano cuyo extracto ha sido utilizado clínicamente con propósitos dietéticos y para controlar algunos desórdenes intestinales; la cáscara ha sido mencionada como envoltura protectora contra los microorganismos de la naturaleza. Se ha demostrado que cuando se sumergen bananos en líquidos que contienen cultivos de microorganismos conocidos, no hay evidencia de una penetración en el interior (1).

El banano en el curso de su maduración produce dos sustancias: el butirato de isoamilo y el isovalerato de isoamilo, sustancias que se presentan tanto en la corteza como en la pulpa; estos

dos compuestos se revelan activos retardando el crecimiento del *Gloeosporium musarum*, hongo parásito del banano (2).

Trabajo posterior (3), muestra la actividad que contra algunos hongos como el *Tricophyton mentagrophites* y una variedad de *Penicillium*, tiene el extracto acuoso de la cáscara del plátano hartón maduro.

Una revisión bibliográfica completa reveló que actualmente se desconoce la identidad de los principios que tienen actividad sobre los hongos, y que están presentes en la cáscara del plátano hartón maduro. Por esta razón y sobre la base de investigaciones realizadas en el banano (2), el objeto de nuestro trabajo fue el de investigar en la cáscara del plátano hartón maduro la presencia del butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo.

El trabajo comprendió, principalmente, la extracción e identificación de los ésteres citados anteriormente y posterior establecimiento de su actividad biológica sobre siete hongos previamente seleccionados.

El trabajo se desarrolló en varias etapas:

A. Determinación del grado de madurez del plátano sobre el cual se hicieron los estudios.

B. Extracción de butirato e isovalerato de isoamilo a partir de cáscara de plátano hartón maduro, utilizando el método de destilación azeotrópica bajo condiciones de temperatura y presión previamente seleccionadas. Sobre el extracto acuoso obtenido se efectuó una extracción con solvente (éter etílico). El extracto se concentró por medio de destilación simple.

C. Análisis del extracto obtenido usando el método de cromatografía de gases.

D. Determinación de la actividad biológica del extracto sobre siete tipos de hongos.

EXPERIMENTACION

A. DETERMINACION DEL GRADO DE MADUREZ DEL FRUTO.

1. Objeto.

H. Von Loesecke en su libro "Bananas" (4), describe los cambios químicos y físicos que sufre el banano (*Musa sapientum* L.) durante el proceso de maduración.

El informe presentado por el Instituto de Investigaciones Tecnológicas, como resultado del trabajo "Almacenamiento y maduración del plátano hartón" (5), establece como el cambio más importante durante la maduración del plátano hartón, la conversión de almidones en azúcares, mediante acción enzimática. El plátano verde contiene alto nivel de almidón, que acumula mientras está en la planta. Una vez que el plátano comienza a madurar, el contenido de azúcares aumenta progresivamente mientras disminuye el contenido de almidón.

La rata de maduración puede acelerarse o retardarse mediante un control de la temperatura. En el caso del banano, a temperatura de 18.9°C — 21.1°C, se logra maduración rápida; a 17.8°C, una maduración mediana y a 14.0°C, una maduración lenta (4).

Almacenando plátano hartón a 16 — 18°C y humedad relativa 80 — 87% e iniciando el proceso, la maduración total se obtiene en tiempo que oscila entre 9 — 11 días (5).

Se utilizaron los siguientes índices, determinados en la pulpa de la fruta como criterios para establecer el grado de madurez del plátano hartón:

a. *Color de la cáscara*: durante la maduración, el color pasa de verde a amarillo debido en gran parte a disminución del contenido de clorofila, luego se oscurece hasta carmelito. La utilización del color como único criterio para determinar el grado de madurez, puede conducir a resultados erróneos, pues el cambio de color puede estar influenciado por acción de la luz, presencia de gases, etc.

b. *Azúcares reductores*.

c. *Azúcares totales*.

d. *Sólidos solubles*: El contenido de sólidos solubles es proporcional al contenido de azúcares.

e. *Humedad*: El contenido de humedad de la pulpa aumenta a medida que la fruta madura.

Según los resultados obtenidos en trabajo anterior, los ésteres butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo, se presentan en el banano en un estado caracterizado por un color amarillo de la cáscara (2).

Con base en esta información escogimos, para la extracción de los ésteres, un plátano con un color amarillo y algunas manchas carmelitas en la cáscara, al cual se le determinó, de acuerdo a crite-

rios anteriores, el grado de madurez, iniciando y controlando un proceso de maduración a partir de plátano hartón verde.

2. Procedimiento.

a. El plátano hartón (*Musa paradisiaca* L. clón hartón Cardenosa) (6) con el cual se llevó a cabo el trabajo, es ampliamente cultivado en el país, fue adquirido en un mercado de Bogotá, procedente de la región de los Llanos Orientales.

b. *Proceso de maduración a partir de plátano hartón verde.*

(1) Equipo.

Como equipo madurador se adaptó en el laboratorio una cámara que consiste de una vitrina de seguridad provista de un baño de agua a temperatura del laboratorio 19°C, necesario para mantener un alto nivel de humedad relativa en la cámara y para prevenir una excesiva pérdida de agua en los frutos; y unas rejillas de madera sobre el baño de agua, en donde se colocaron los frutos.

Con un termohigrómetro se registró en la cámara la temperatura y humedad relativa durante el proceso de maduración.

(2) Descripción.

La determinación se hizo utilizando un lote de 40 plátanos en estado completamente verde; estos plátanos se lavaron con agua corriente, después se enjuagaron con agua destilada y se secaron con una toalla de tela.

El material así preparado se colocó sobre las rejillas de madera en la cámara de maduración. Al iniciar el proceso y luego periódicamente, se retiraron muestras de 4 plátanos que se sometieron a las siguientes determinaciones:

(a) Color: Se observó el cambio de color que sufre la cáscara del plátano hartón verde durante el proceso de maduración bajo condiciones controladas.

(b) Azúcares reductores (7) (8).

(c) Azúcares totales (7).

(d) Sólidos solubles (7) (9).

(e) Humedad (7).

Para estas determinaciones se utilizó un lote de 4 plátanos. El material se preparó así: manualmente con cuchillos de acero inoxidable se retiró la cáscara, la pulpa se cortó en cubos pequeños, se hizo cuarteo; utilizando siempre el lote completo. La muestra fue triturada en mortero de porcelana. La muestra usada para determinación de azúcares reductores y totales fue secada previamente en la estufa Mitchell a temperatura: 50°C; presión: 20 pulgadas de vacío; tiempo: 8 horas.

Concluido el secado, las muestras se pasaron por un molino Raymond mezclando con nieve carbónica (para evitar desdoblamiento de azúcares debido a la temperatura elevada que se produce por la alta velocidad de giro en el molino). Se empleó en el molino la malla standard número 100.

3. Resultados y comentarios.

T A B L A I

CAMBIOS QUIMICOS DURANTE EL PROCESO DE MADURACION DEL PLATANO HARTON

ANALISIS DE LA PULPA

Estado de maduración	Días de maduración	Contenido de azúcares *		Lectura Refractométrica **	Humedad %
		Reductor %	Total %		
1	0	2.8	3.2	3.0	55.9
2	2	4.5	— ***	— ***	56.8
3	3	8.0	— ***	4.0	57.6
4	4	15.3	16.6	6.5	57.0
5	6	24.0	25.6	7.5	58.0
6	7	23.8	24.7	9.0	58.5
7	8	35.0	41.4	11.5	59.0
8	9	45.5	46.1	12.4	59.0
9	10	42.3	43.1	12.5	60.2

Condiciones medidas durante el proceso:

Temperatura : 16 — 18°C.

Humedad relativa : 70 — 80%

* Valores expresados como glucosa sobre base seca.

** Suspensión acuosa de la pulpa, 1:1.

*** Los guiones corresponden a determinaciones que no se llevaron a cabo.

Los análisis químicos demuestran según los resultados anotados en la tabla anterior, que el contenido de azúcares reductores, azúcares totales y sólidos solubles, aumenta durante el proceso de maduración.

B. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO A PARTIR DE LA CÁSCARA.

La extracción comprendió las siguientes etapas:

1. *Obtención del puré.*

a. *Procedimiento.*

(1) Equipo: Licuadora marca Osterizer.

(2) Descripción: Se empleó cáscara de plátano cuyo grado de madurez corresponde al estado número 7.

La muestra seleccionada fue lavada, seguidamente la cáscara se separó de la pulpa. Usando cuchillos de acero inoxidable la cáscara se dividió en pedazos pequeños con el objeto de facilitar la preparación del puré (22) (3). Con los trozos de cáscara (320 gm.) en la licuadora se preparó un puré, en proporción 1:3 en agua destilada. El agua se adicionó en esa proporción para facilitar la extracción y la formación de mezcla azeotrópica posteriormente. Se obtuvo un puré bastante viscoso (espeso) debido a que en la cáscara hay gran cantidad de fibra y de principios insolubles.

El puré así obtenido sufre oxidación por reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Las primeras tienen lugar entre polifenoles (catecol y derivados), oxidasas y peroxidasas. Las reacciones de tipo no enzimático: entre compuestos de tipo aldosas-aminas, ácidos urónicos-aminas, reacciones que incluyen proteínas, ácidos orgánicos e inorgánicos y álcalis (11) (12).

Debido a la oxidación, el puré toma diferentes colores, inicialmente rosado, comienza a oscurecerse y pasa a violeta, azul oscuro luminiscente y finalmente toma color carmelito oscuro. Este oscurecimiento tiene lugar en el plátano y en muchas otras frutas (11) (12). Los ésteres butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo no participan en el proceso de oscurecimiento.

2. *Destilación azeotrópica.*a. *Objeto.*

Se aprovechó la formación de mezclas azeotrópicas de butirato de isoamilo-agua e isovalerato de isoamilo-agua, en condiciones de temperatura y presión determinadas.

Se corrigió la temperatura de punto de ebullición a 760 mm. de Hg (13), a la presión de 76.2 mm. de Hg utilizada en el proceso, de acuerdo con los siguientes datos de referencia (14).

	Datos Azeotrópicos (760 mm. de Hg)		
	Punto de Ebullic.	Punto de Ebullic.	% Peso de H ₂ O
Butirato de isoamilo	178.5°C	98.05°C	63.5
Isovalerato de isoamilo	193.5°C	98.8 ° C	74.1

Teóricamente se obtuvieron los siguientes valores (76,2 mm. Hg) :

Butirato de isoamilo-agua	: 67.85°C.
Isovalerato de isoamilo-agua	: 67.6 ° C.

Inicialmente se hicieron ensayos individuales con porciones de aguas saturadas con butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo, para determinar experimentalmente la temperatura de destilación de cada uno de los azeótropos a la presión de 76.2 mm. de Hg.

b. *Procedimiento.*

(1) Equipo. Para este proceso se utilizó un equipo de destilación con uniones esmeriladas. La presión fue registrada por medio de un vacuómetro marca Buhler, adaptado adecuadamente al equipo.

(2) Descripción. Se llevó a cabo un proceso de destilación-extracción, adicionando porciones de agua sobre el puré, destilando a temperatura constante (58°C).

Sobre el destilado obtenido se hicieron ensayos químicos cualitativos con el fin de tener un criterio sobre grado de extracción de los ésteres. Se llevó a cabo la prueba del hidroxamato férrico (15) (7) (16) con las sustancias patrones y con el extracto obtenido, con el fin de comparar coloraciones. Con los ésteres patrones

la coloración obtenida fue rojo sangre; al ensayar con el extracto no hubo reacción de coloración.

El único criterio útil para el control de la extracción de los ésteres fue la temperatura de la destilación.

3. *Extracción líquido-líquido.*

a. *Objeto.*

Con el fin de separar el azeótropo se llevó a cabo una extracción con solvente. Para favorecer esta operación se aprovechó "salting-out" con cloruro de sodio. El solvente usado para la extracción fue éter etílico (13) (17) (18).

b. *Procedimiento.*

(1) Equipo. En este proceso se empleó un equipo de agitación mecánica rotatorio, con una velocidad de 30 r.p.m., provisto de probetas con tapón, en donde se colocó el líquido objeto de la extracción junto con el solvente.

(2) Descripción. Las porciones de destilado saturado (4 ml.) fueron extraídas con tres porciones de solvente (50 ml. cada una) agitando durante treinta minutos cada vez.

Se utilizó la prueba de Kubel-Tiemann para determinación de materia orgánica (10). No se obtuvieron resultados positivos.

4. *Concentración del extracto etéreo.*

a. *Procedimiento.*

Las porciones etéreas obtenidas en 3, fueron destiladas prescandando sobre sulfato de sodio anhidro. El extracto fue sometido a concentración por medio de destilación sencilla, recuperando el solvente a temperatura de 27°C. El extracto se concentró hasta un volumen de 40 ml.

5. *Resultados y comentarios.*

En el ensayo llevado a cabo con las sustancias patrones, el objeto de obtener experimentalmente el punto de destilación de los azeótropos, se obtuvieron los siguientes resultados:

Butirato de isoamilo-agua : 52°C.
Isovalerato de isoamilo-agua : 54°C.

Los datos calculados fueron:

Butirato de isoamilo-agua : 67.85°C.
Isovalerato de isoamilo-agua : 67.6 ° C.

En iguales condiciones de presión (76.2 mm. de Hg) se llevó a cabo la destilación a partir del puré de cáscara de plátano har-
tón maduro. La temperatura de destilación registrada fue de 58°C; sin embargo el proceso se llevó a cabo dentro de un límite de $\pm 10^\circ\text{C}$ teniendo en cuenta que el punto de ebullición del azeótropo sufre variación debido a la presencia de no azeótropos y de otros azeótropos (18).

La presión registrada no fue nunca inferior a 70 mm. de Hg para asegurar la presencia del azeótropo, ya que según Merriman, Swietolaski y Anderson (18) por debajo de esta presión no se forman mezclas azeotrópicas.

Se presume que la cantidad de ésteres extraída en las fraccio-
nes individuales, no estuvo dentro del límite de sensibilidad de la prueba del hidroxamato férrico (*) (16), prueba utilizada para controlar cualitativa y cuantitativamente la separación de los és-
teres en el azeótropo, con éter etílico, proceso llevado a cabo pos-
teriormente a la destilación.

Según Carl Carlson (18) un exceso del componente necesario para formar el azeótropo dificulta la posterior separación del mis-
mo; en nuestro caso el agua en exceso dificultó la separación de los ésteres. Además se presentó formación de otras mezclas azeotró-
picas indeseadas.

C. ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE GASES DEL EXTRACTO ETEREO DE LA CASCARA.

1. *Objeto.*

La investigación de los ésteres butirato de isoamilo e isovale-
rato de isoamilo en el extracto etéreo concentrado se efectuó por
el método de cromatografía de gases (19) (20) (21) (22).

(*) Sensibilidad del método: 5-15 microlitos (16).

La identificación de los ésteres en el extracto se hizo por comparación en iguales condiciones de trabajo de los tiempos de retención que presentan las distintas sustancias separadas, con los tiempos de retención característicos del butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo, sustancias patrones. También se usó el método de adición (21).

2. Procedimiento.

a. Identificación de sustancias patrones.

(1) Material. Equipo utilizado para la separación e identificación por cromatografía de gases, de las sustancias patrones.

Cromatógrafo de gases: Varian Aerograph modelo 1868-40.

Columna de acero inoxidable 12 pies por $\frac{1}{8}$ pulgada DEGS 20% en CHROMOSORB W 60/80 (a. w.) (El DEGS favorece la separación de compuestos con grupo funcional éster).

Gas de transporte: Nitrógeno.

Detector: Ionización de llama.

Registrador: Varian modelo 30, doble registro. Velocidad variable.

Jeringas: marca Hamilton.

Capacidad: 5 microlitros, graduada en 0.1 microlitro.

Capacidad: 50 microlitros, graduada en 1.0 microlitro.

Butirato de isoamilo: Sustancia de referencia.

Isovalerato de isoamilo: Sustancia de referencia.

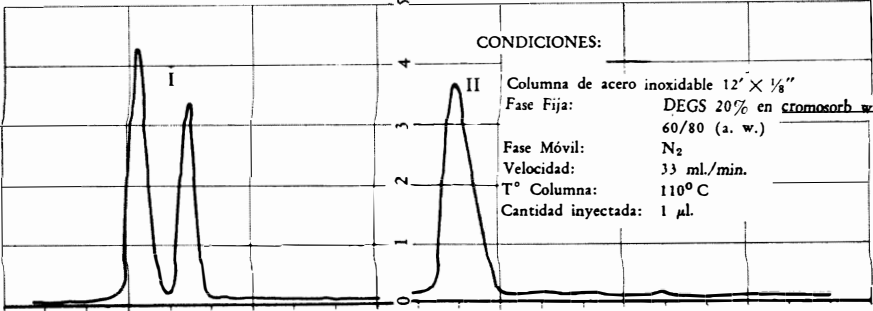
(2) Descripción. Se seleccionaron temperaturas para el inyector, la columna y el detector del cromatógrafo de gases, de acuerdo con los puntos de ebullición de los ésteres (13) (17), se inyectó una muestra de una solución preparada en partes iguales de las sustancias patrones. Se modificó la temperatura de la columna con el fin de optimizar su eficiencia y en esta forma lograr una resolución adecuada de los ésteres (Cromatogramas N° 1 * y N° 2).

* Cromatograma N° 1: Permitió establecer las condiciones de trabajo con las sustancias patrones (tipo de columna, pureza de los ésteres, etc.).

CROMATOGRAMA Nº 1

SUSTANCIAS PATRONES

BUTIRATO DE ISOAMILO — ISOVALERATO DE ISOAMILO
(I) (II)

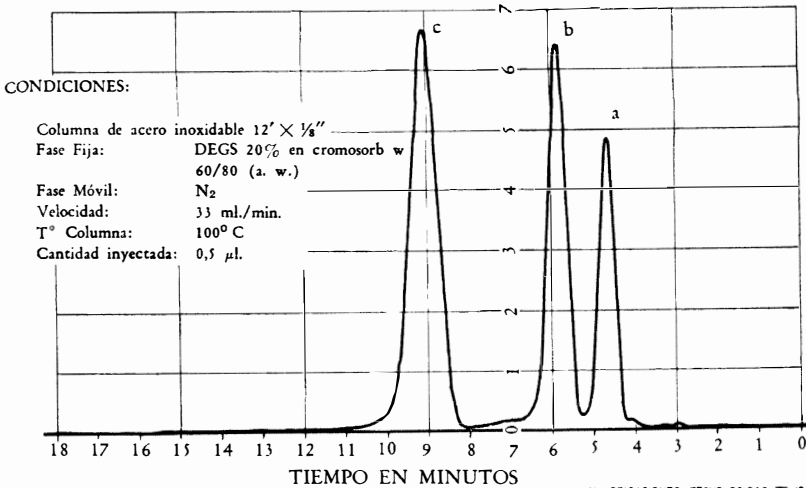


CROMATOGRAMA Nº 2

MEZCLA PATRON

ISOVALERATO DE ISOAMILO — BUTIRATO DE ISOAMILO

MEZCLA 1:1

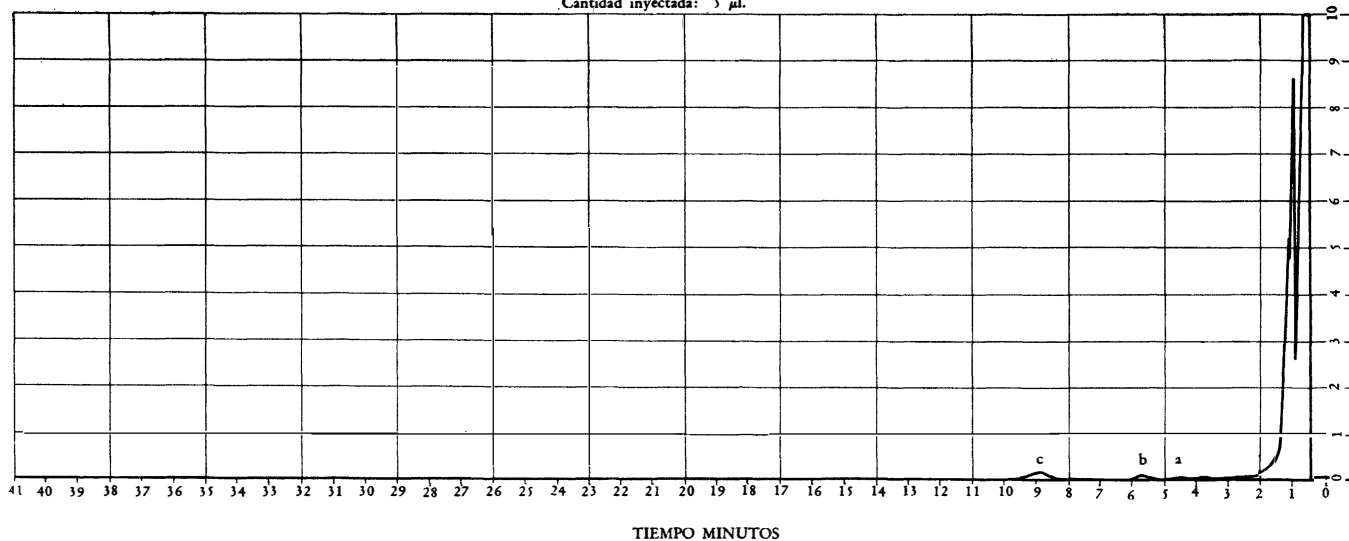


CROMATOGRAMA No. 3

EXTRACTO ETereo CONCENTRADO

CONDICIONES:

Columna de acero inoxidable 12' x 1/8"
Fase Fija: DEGS 20% en cromosorb w 60/80 (a. w.)
Fase Móvil: N₂
Velocidad: 33 ml./min.
T° Columna: 100°C
Cantidad inyectada: 5 µl.



Las siguientes condiciones de trabajo hicieron posible la identificación y separación de los ésteres:

Temperatura del inyector: 150°C.

Temperatura de la columna: 100°C.

Temperatura del detector: 190°C. (Cromatograma N° 2).

b. *Investigación de los ésteres en el extracto.*

Para el análisis del extracto etéreo se mantuvieron constantes las condiciones de trabajo anteriores.

(1) Descripción. Con jeringa de 50 microlitros se inyectó la muestra del extracto concentrado.

Los tiempos de retención característicos de las sustancias patrones se calcularon y compararon con tiempos de retención presentados por los diferentes picos del extracto etéreo; dos de estos picos presentan tiempos de retención iguales a los correspondientes a butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo, sustancias de referencia (Cromatogramas números 2 y 3).

c. *Comprobación de los ésteres en el extracto.*

Para verificar la presencia de los ésteres se repitió el análisis cromatográfico con adición de standard interno (21) al extracto.

3. *Cuantificación de los ésteres en el extracto etéreo concentrado.*

a. *Procedimiento.*

(1) Soluciones patrones:

(a) Solución de butirato de isoamilo en éter etílico, concentración: 0.6746 mg./ml.

(b) Solución de isovalerato de isoamilo en éter etílico, concentración: 0.9040 mg./ml.

(c) Se inyectó al cromatógrafo de gases 1 microlitro de cada una de las soluciones (a) y (b).

(d) Integración de las áreas de los picos que corresponden al butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo, sustancias puras (ver cromatograma número 4).

Método utilizado: Triangulación.

RESPUESTA DEL DETECTOR DE IONIZACION DE LLAMA PARA BUTIRATO DE ISOAMILO E ISOVALERATO DE ISOAMILO
SENSIBILIDAD: 4×10^{-10} Amp./milivoltio

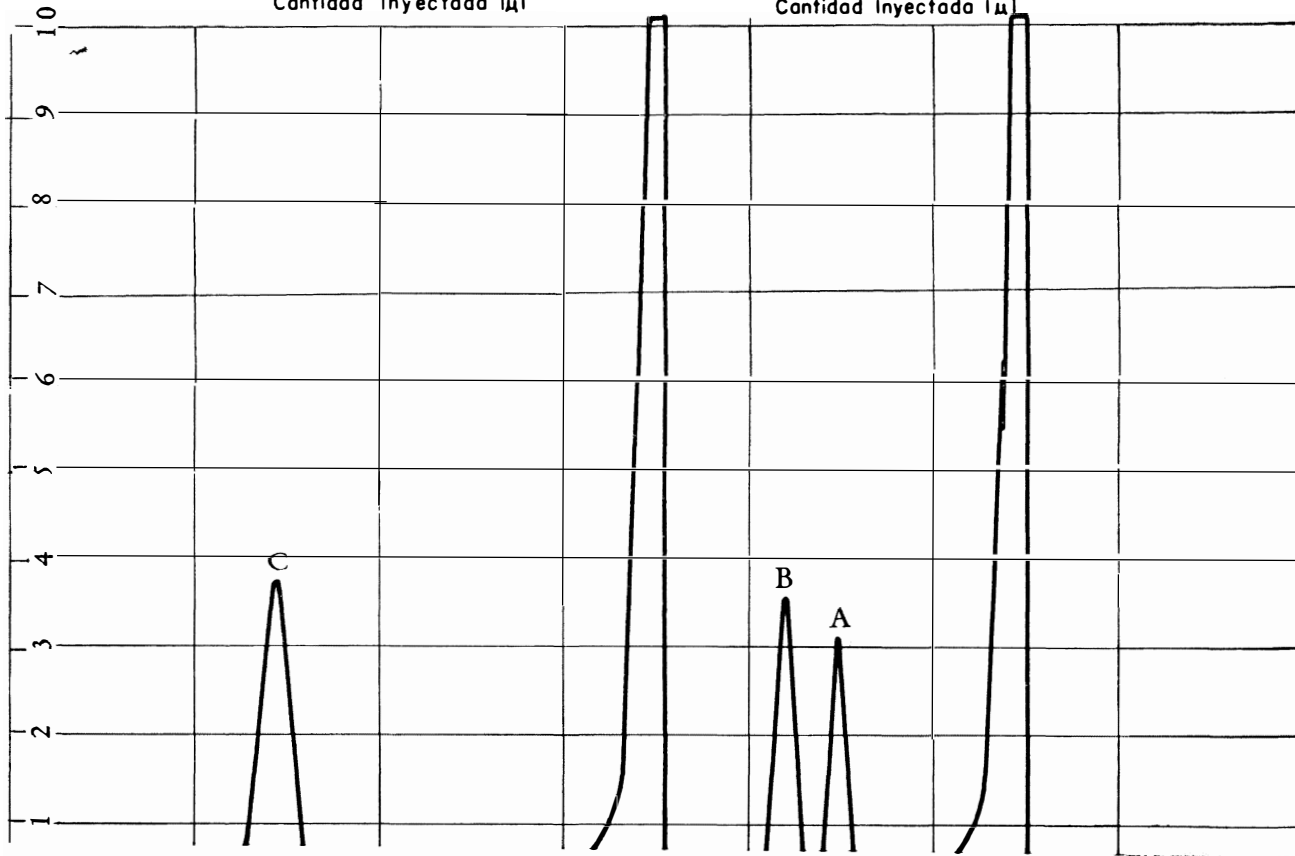
ISOVALERATO DE ISOAMILO

BUTIRATO DE ISOAMILO

CROMATOGRAMA No. 4

Solución Eterea
Cantidad Inyectada μ l

Solución Eterea
Cantidad Inyectada μ l



0.6746 microgramos de butirato de isoamilo producen área de 56.000 mm².

0.9040 microgramos de isovalerato de isoamilo producen área de 79.900 mm².

(e) Sensibilidad del detector: La mínima cantidad detectable de butirato de isoamilo: 0.024×10^{-3} microgramos. La mínima cantidad detectable de isovalerato de isoamilo: 0.026×10^{-3} microgramos.

(2) Integración de área para los picos B y C del cromatograma número 3:

(a) Cantidad de extracto etéreo concentrado inyectado: 5 microlitros.

Relacionando las áreas de los picos A y B con los patrones correspondientes se obtuvieron los siguientes resultados:

Butirato de isoamilo = 0.51 microgramos/5 microlitros.

Isovalerato de isoamilo = 1.13 microgramos/5 microlitros.

4. Resultados y comentarios.

T A B L A I I

TIEMPO DE RETENCION CARACTERISTICO DE SUSTANCIAS PATRONES Y DE ALGUNAS DE LAS SUSTANCIAS PRESENTES EN EL EXTRACTO (CROMATOGRAMAS Nos. 2 y 3)

Curva	Tiempo de retención, min.		Compuesto
	Nº 2	Nº 3	
a	4.7	4.6	Isómero del butirato de isoamilo.
b	5.8	5.7	Butirato de isoamilo.
c	9.1	8.9	Isovalerato de isoamilo.

Observaciones a los cromatogramas.

De acuerdo con los resultados anotados en la tabla II, comparando los tiempos de retención correspondientes a las sustancias patrones con tiempos de retención que presentan dos de los componentes del extracto etéreo, se deduce que el butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo están presentes en la cáscara del plátano hartón maduro. El butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo se encuentran en el extracto en baja cantidad.

Resultados obtenidos en la cuantificación de los ésteres. Cromatograma número 3.

Butirato de isoamilo : 0.01 % p/v. en el extracto etéreo.

Isovalerato de isoamilo: 0.023% p/v. en el extracto etéreo.

D. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DEL EXTRACTO CON RELACION A LA DE LOS ESTERES PATRONES

1. Objeto.

El butirato de isoamilo y el isovalerato de isoamilo son dos de las sustancias producidas por el banano durante su maduración; estos dos productos tienen acción sobre el crecimiento y desarrollo del *Gloeosporium musarum*, hongo que parasita el banano (2) (23). Con base en estos trabajos y de acuerdo con los resultados anteriores del capítulo C, que establecen la presencia de dichos ésteres en el extracto etéreo, se determina la actividad biológica del mismo por su contenido en butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo, mediante ensayos con el *Gloeosporium musarum* y otros seis hongos, según los siguientes criterios:

— Crecimiento del hongo.

— Aspecto general del cultivo: Forma del micelio y esporulación.

Los hongos utilizados en el trabajo fueron los siguientes:

- 1G — *Gloeosporium musarum*: Este hongo es patógeno para el banano, produce la enfermedad conocida como antracnosis (descomposición de la fruta madura), ataca las hojas, el tallo y la fruta en estado verde (26) (24) (23).
- 2C — *Fusarium oxysporum cubense*: Este hongo produce en el banano la enfermedad de Panamá (se marchita y seca la planta) (27) (28) (29).
- 3L — *Fusarium oxysporum lycopersici*: Al igual que el anterior *Fusarium oxysporum cubense*, este hongo produce en el banano la enfermedad de Panamá (invade los ductos de la planta e impide el suministro de agua) (30) (1) (28).
- 4T — *Tricophyton mentagrophites*: Este microorganismo es patógeno al hombre; en los pies produce la enfermedad conocida como Pie de Atleta, en las uñas ocasiona la enfermedad llamada Tiña, también infecta el cuero cabelludo (3) (31).

- 5N — *Aspergillus niger*: Este microorganismo abunda en lugares de almacenamiento de alimentos, es contaminante de productos elaborados a base de harinas y con algún contenido de humedad (3).
- 6G¹ — *Aspergillus glaucus*: Este hongo crece en alimentos con alta concentración de azúcar, sal y bajo contenido de humedad (3).
- 7P — *Penicillium expansum*: Este hongo se encuentra como contaminante del medio ambiente y de productos alimenticios (3).

2. Procedimiento.

a. Determinación de la actividad biológica del extracto etéreo.

(1) Material utilizado.

(a) Medios biológicos adecuados para el crecimiento de los microorganismos:

i. Papa-Dextrosa-Agar: Este medio es óptimo para el desarrollo del *Gloeosporium musarum*, recomendado por American Type Cultural Collection y por el Department of Primary Industries, Brisbane, Australia.

ii. Malta-Agar: Medio de cultivo favorable para el crecimiento de los hongos: *Tricophyton mentagrophites*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus glaucus* y *Penicillium expansum*.

iii. Agar-Nutriente: Los hongos *Fusarium oxysporum cubense*, *Fusarium oxysporum lycopersici* crecen abundante y rápidamente en este medio de cultivo.

iv. Sabouraud líquido: Medio empleado como vehículo para el inóculo.

(b) Discos de papel Wathman, A. A. Antibiotic Assay Discs. Diámetro: 13 mm.

(2) Resultados y comentarios.

Analizando los resultados obtenidos concluimos que el extracto etéreo concentrado no tiene ninguna actividad sobre los hongos, bajo las condiciones de ensayo.

Cada microorganismo presenta un desarrollo y crecimiento normales y muestra las mismas características en igual período de incubación al cultivo patrón respectivo.

Este resultado negativo nos plantea una pregunta: la concentración en que se encuentran los ésteres en el extracto etéreo:

144.00 microgramos de butirato de isoamilo por caja de Petri, 325.44 microgramos de isovalerato de isoamilo por caja de Petri, ¿es muy baja para permitir detectar actividad sobre los microorganismos bajo las condiciones de ensayo?

Con el fin de despejar esta incógnita se hicieron ensayos sobre los mismos hongos y en las mismas condiciones anteriores, con las sustancias patrones a tres niveles de adición. Los resultados de estos ensayos se anotan a continuación.

b. *Determinación de la actividad biológica del butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo* (sustancias químicamente puras).

(1) Objeto.

En los ensayos realizados con el extracto no se obtuvo resultado positivo de inhibición o degeneración sobre los hongos; debido a esto los ensayos biológicos se orientaron a evaluar la actividad biológica de las sustancias patrones: Butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo (2) sobre los siete hongos ya ensayados, a diferentes concentraciones.

(2) Procedimiento.

(a) Material: Véase material empleado en "Determinación de la actividad biológica del extracto etéreo".

Sustancias utilizadas:

i. Butirato de isoamilo: Sustancia A, químicamente pura, usada sin diluir.

ii. Isovalerato de isoamilo: Sustancia B, químicamente pura, usada sin diluir.

(b) Descripción: El ensayo se hizo con tres discos saturados de la sustancia, la concentración de saturación de los discos fue igual a 0.18 ml. (92.28 mg. de butirato de isoamilo; 154.44 mg. de isovalerato de isoamilo) por cada caja de Petri, medidos con una microbureta. Este ensayo se realizó a dos temperaturas 19°C y 30°C; la primera de las temperaturas correspondió a la temperatura del ambiente en el laboratorio, la temperatura de 30°C se escogió por ser óptima para el crecimiento de los hongos.

Durante el tiempo de observación se hizo referencia a un cultivo patrón: medio de cultivo, más el inóculo del microorganismo desarrollado en condiciones normales y sin influencia de sustancias

extrañas. Este tiempo correspondió a 120 horas (cinco días de observación).

En las cajas de ensayo se colocó medio de cultivo, más el inóculo del microorganismo más tres discos impregnados con las sustancias.

Para cada microorganismo el ensayo se efectuó 12 veces.

(3) Resultados y comentarios.

Las dos sustancias ensayadas en cantidades de 92.28 mg. de butirato de isoamilo y 154.44 mg. de isovalerato de isoamilo, por caja de Petri, actúan retardando el crecimiento de los microorganismos utilizados. La inhibición para todos los microorganismos es total a la temperatura de 19°C; a la temperatura de 30°C se presenta un crecimiento pobre caracterizado por micelio escaso y pocos conidióforos, excepción hecha del *Gloeosporium musarum* (2) y *Penicillium expansum* que son inhibidos totalmente a esta temperatura.

Los resultados obtenidos permiten concluir que a 19°C el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de los hongos podría sumarse al efecto de los ésteres, lo cual resulta en una inhibición final del crecimiento.

c. *Determinación de la acción del butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo a dos niveles de adición sobre los microorganismos.*

(1) Material y método empleados: Véase ensayo anterior.

(2) Descripción: Se usaron dos cantidades diferentes de las sustancias:

- 0.06 ml. (equivale a 30.76 mg. de butirato de isoamilo y a 51.48 mg. de isovalerato de isoamilo) cantidad absorbida en un solo disco colocado en la caja que contenía el inóculo.
- 0.12 ml. (equivale a 61.52 mg. de butirato de isoamilo y a 102.96 mg. de isovalerato de isoamilo) cantidad absorbida en dos discos colocados en la caja de Petri.

Los ésteres puros no son solubles. Por esta razón no se hizo ninguna dilución respecto de la primera cantidad usada (0.18 ml.). Estos ésteres son solubles en alcohol y éter (19.33). No se hizo solución en alcohol por su acción antiséptica; como tampoco en

éter etílico porque este solvente hace muy difícil la cuantificación de la sustancia; por esta razón la adición se redujo a las 2/3 partes; usando dos discos (0.12 ml.) y a 1/3 parte usando un solo disco (0.06 ml.).

(3) Resultados y comentarios.

Con el objeto de tabular los datos obtenidos se hizo la siguiente codificación, ejemplo:

Para el *Gloeosporium musarum*:

- 1GA₁ : Corresponde al ensayo sobre dicho microorganismo, usando la sustancia butirato de isoamilo en concentración de 30.76 mg. por caja de Petri. El subíndice indica el número de discos.
- 1GA₂ : Idem al anterior (el mismo microorganismo, la misma sustancia) en concentración de 61.52 mg., absorbida en dos discos.
- 1GB₁ : Corresponde al ensayo sobre el mismo microorganismo, usando sustancia isovalerato de isoamilo en concentración de 51.48 mg. p. caja de Petri, absorbida en un disco.
- 1GB₂ : Idem al anterior (el mismo microorganismo, la misma sustancia) en concentración de 102.96 mg. por caja de Petri, absorbida en dos discos.

La codificación se hizo de la misma manera para los demás hongos.

Las dos sustancias ensayadas A y B en sus dos concentraciones tienen un efecto inhibitorio neto sobre el *Penicillium expansum* haciendo excepción de este microorganismo, ninguna de las dos sustancias tienen esa misma acción sobre los otros microorganismos. Inicialmente existe una acción inhibitoria pero posteriormente se nota el crecimiento normal, solamente retardado respecto del cultivo patrón; al comparar con éste la morfología es igual.

Al observar sobre cada microorganismo en particular tenemos:

- Acción sobre el *Gloeosporium musarum*: Se observó un efecto inhibitorio mayor con A₂ respecto de A₁. Ambas concentraciones inicialmente inhiben parcialmente el crecimiento, pero a cabo de 120 horas la diferencia en el crecimiento con respecto al cultivo patrón es mínima.

La sustancia B, a la concentración B₂ tiene una acción de inhibición total; B₁ también es activa aunque con menor efecto.

- Acción sobre *Fusarium oxysporum cubense*: Bajo concentraciones diferentes de A y B el hongo se desarrolla. Hay una pequeña diferencia pues se observa mayor efecto a la mayor concentración.
- Acción sobre *Fusarium oxysporum lycopersici*: Se observa mayor efecto con A₂ y B₂ aunque la diferencia respecto del patrón es mínima.
- Acción sobre *Tricophyton mentagrophytes*: Ninguna de las dos concentraciones de las dos sustancias es efectiva netamente.
- Acción sobre *Aspergillus niger*: A₂ y B₂ parecen tener mayor efecto que A₁ y B₁, pero al comparar con el patrón la diferencia es mínima.
- Acción sobre *Aspergillus glaucus*: Parece hay mayor efecto en B₂, sin embargo A y B en sus dos concentraciones permiten el desarrollo normal sólo con pequeñas diferencias respecto del patrón.
- Acción sobre *Penicillium expansum*: Acción neta de inhibición de las dos sustancias A y B en las dos concentraciones ensayadas.

TABLA III
 ACTIVIDAD BIOLÓGICA
 EXTRACTO DE CASCARA DE PLATANO MADURO CON RELACION A DIFERENTES CANTIDADES
 DE SUSTANCIAS PATRONES

HONGO	Gloeosporium musarum		F. oxysporum cubense Tiempo en horas		F. oxysporum lycopersici		T. mentagrophites		Aspergillus niger		Aspergillus glaucus		Penicillium expansum	
	24	120	24	120	24	120	24	120	24	120	24	120	24	120
Butirato de Isoamilo														
0.18 ml./caja de Petri.	—	+++	—	+	—	++	—	++	—	++	—	++	—	+++
Isovalerato de Isoamilo														
0.18 ml./caja de Petri.	—	+++	—	++	—	++	—	+	—	++	—	++	—	+++
Butirato de Isoamilo														
0.12 ml./caja de Petri.	+	ZB	+	ZBA	+	ZB	+	HD	+	HD	+	HD	—	+++
Isovalerato de Isoamilo														
0.12 ml./caja de Petri.	—	+++	+	HD	+	ZB	+	ZA	+	ZBN	+	ZAO	—	+++
Butirato de Isoamilo														
0.06 ml./caja de Petri.	—	ZB	—	HD	—	HD	—	HD	—	HD	—	HD	—	+++
Isovalerato de Isoamilo														
0.06 ml./caja de Petri.	—	ZB	—	HD	+	ZBA	+	HD	ZB	ZBN	+	ZAO	—	+++
Extracto de cáscara de plátano hartón maduro.	ICN	DTN	ICN	DTN	ICN	DTN	ICN	DTN	ICN	DTN	ICN	DTN	ICN	DTN

NOTAS:

— : Aun no se ha iniciado el crecimiento.

+++ : Inhibición total del crecimiento.

++ : Inhibición parcial del crecimiento.

+ : Poca inhibición del crecimiento.

ZB : Zona blanca = hongo que empieza a crecer, pocas colonias = poco micelio = no conidióforos.

ZBA : Zona blanca algodonosa abundante = colonias blancas en forma de copos de algodón.

HD : Hongo desarrollado normalmente, presencia de micelio y conidióforos normales, idénticas características al ensayo patrón.

ZA : Zona amarilla = hongo en desarrollo = pocas colonias amarillas, pocos conidióforos.

ZBN : Zona blanca con puntos negros = hongo que empieza a crecer, pocos conidióforos de color negro.

ZAO : Zona amarilla ocre = hongo desarrollado, numerosas colonias, numerosos conidióforos color amarillo ocre.

ICN : Iniciación del crecimiento normal.

DTN : Desarrollo total y crecimiento normal.

Butirato de Isoamilo

0.18 ml./caja de Petri = 92.28 mg./caja de Petri

0.12 ml./caja de Petri = 61.52 mg./caja de Petri

0.06 ml./caja de Petri = 30.76 mg./caja de Petri

Isovalerato de Isoamilo

154.44 mg./caja de Petri

102.96 mg./caja de Petri

51.48 mg./caja de Petri

3. *Discusión de resultados.*

La tabla anterior resume los resultados obtenidos en el capítulo D. El extracto de la cáscara del plátano hartón maduro no presenta ninguna acción sobre los hongos ensayados.

El extracto etéreo adicionado por caja, contiene las siguientes cantidades de ésteres:

Butirato de isoamilo : 144.00 microgramos.

Isovalerato de isoamilo : 325.44 microgramos.

El ensayo con las sustancias patrones establece una acción neta de inhibición y retardo sobre el crecimiento de los microorganismos a un nivel de adición que corresponde a 92.28 mg. de butirato de isoamilo y 154.44 mg. de isovalerato de isoamilo.

En ensayos posteriores, con sustancias patrones, usando niveles de adición inferiores: 61.52 mg. de butirato de isoamilo y 102.96 mg. de isovalerato de isoamilo, en un ensayo inicial y luego, butirato de isoamilo: 30.76 mg., isovalerato de isoamilo: 51.48 mg. se establece solamente una acción retardatoria sin obtener inhibición.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en los capítulos anteriores permiten deducir las siguientes conclusiones:

Los ésteres butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo están presentes en la cáscara del plátano hartón maduro.

El extracto obtenido a partir de la cáscara según las condiciones de trabajo anotadas, no presentó acción de inhibición o retardo sobre el crecimiento de los microorganismos.

Los ensayos microbiológicos llevados a cabo con los dos ésteres de isoamilo, sustancias de referencia, demostraron que dichas sustancias ejercen actividad fungistática, inhibiendo o retardando el crecimiento de los microorganismos ensayados. La cantidad de ésteres presente en el extracto y la cantidad usada en los ensayos como sustancias patrones, están en relación aproximada de 1:1000. Esta diferencia podría explicar por qué los microorganismos no sufren ninguna alteración bajo la acción del extracto.

Sobre la base de resultados y conclusiones obtenidos en el estudio, sería de interés ampliar este trabajo en la siguiente forma:

Ensayar otros métodos de extracción y comparar su eficiencia con el método utilizado en este estudio. La metodología empleada en el presente trabajo para la identificación y cuantificación puede aprovecharse.

Podría ensayarse también, la elaboración de un extracto etéreo a partir de la cáscara, directamente; teniendo en cuenta que se extraerán otros principios que puedan tener propiedades antifúngicas.

Aprovechando la acción fungistática de los ésteres puede estudiarse la factibilidad económica de su aplicación para conservación de frutas durante la maduración y el transporte.

RESUMEN

El objeto de este trabajo fue investigar en la cáscara del plátano hartón (*Musa paradisiaca* L. clón hartón Cardeñosa) maduro, la presencia de butirato de isoamilo e isovalerado de isoamilo, sustancias que se presentan en el banano (*Musa sapientum* L.) en avanzado estado de madurez y que retardan e inhiben el crecimiento de algunos hongos.

La investigación comprendió:

a) Obtención de un extracto acuoso a partir de cáscara de plátanos madurados bajo condiciones controladas. El extracto se obtuvo aprovechando el fenómeno de azetropía formado entre los ésteres y el agua.

b) Posterior separación de los ésteres por extracción con éter etílico.

c) Identificación y cuantificación de los ésteres por cromatografía de gases.

d) Se estableció la actividad del extracto etéreo de la cáscara del plátano maduro y de los ésteres, sustancias puras, frente a *Gloeosporium musarum*, *Fusarium oxysporum cubense*, *Fusarium oxysporum lycopersici*, *Tricophyton mentagrophites*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus glaucus*, *Penicillium expansum*.

El extracto de cáscara del plátano hartón maduro no presentó acción de inhibición o retardo sobre el crecimiento de los microorganismos.

SUMMARY

The purpose of this work was to search for isoamyl butyrate and isoamyl isovalerate in the peel of the platano harton (*Musa paradisiaca* L. clón hartón Cardeñosa). These compounds are found in the peels of overripen bananas (*Musa sapientum* L.) and they retard or inhibit the growth of several fungi.

This research includes:

a) Water extraction of the compounds from the banana peels of fruits which were previously ripen under controlled conditions. The extraction was based on the azeotropic properties of the mixture.

b) Isolation of the esters by ether extraction.

c) Cualitative and cuantitative analysis of the esters by GLC.

d) The microbiological activity of the extracts from the banana peel as well as the activity of standard compounds against the growth of *Gloeosporium musarum*, *Fusarium oxysporum cubense*, *Fusarium lycopersici*, *Tricophyton mentagrophites*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus glaucus* and *Penicillium expansum* were determined.

The extracts from the peels of the ripen bananas did not show any partial or complete inhibition of the growth of the microorganisms tested.

RÉSUMÉ

On a isolé et identifié le butyrate et l'isovalérianate d'isoamyle présents dans les pelures de *Musa paradisiaca* L. (Clón hartón, Cardeñosa). Ces composés ont une action inhibitrice sur la croissance de certains cryptogames et se trouvent également dans la banane (*Musa sapientum* L.) en état de maturité avancée.

L'extrait aqueux azéotrope des pelures mûries dans des conditions contrôllées a été traité par l'éther éthylique et les esters obtenus ont été identifiés et dosés par chromatographie en phase gazeuse.

L'activité inhibitrice de l'extrait étheré - comparée à celle d'une solution d'isovalérianate d'isoamyle - a été déterminée sur des

cultures de *Glycosporium musarum*, *Fusarium oxysporum cubense*, *Fusarium licopersici*, *Tricophyton mentagrophites*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus glaucus*, *Penicillium expansum*. On n'a constaté ni inhibition ni retard dans la croissance des microorganismes.

BIBLIOGRAFIA

1. SCOTT, W. E., H. H. MC KAY, P. S. SCHAFFER, T. D. FONTAINE. 1949. — "The Partial Purification and Properties of Antibiotic Substances from the Banana (*Musa sapientum*)". *J. Clin. Invest.* 28, p. p. 899-902.
2. RAZAKAMANANTSOA, S. 1966. — "Action des Différentes Produits Volatils émis par la Banana au cours de sa Maduration sur la Croissance du *Gloeosporium musarum*". *Fruits*. Vol. XXI, N° 11 p. p. 597-604.
3. ROJAS, M. A., C. B. DE MORA. 1968. — *Caracterización Química y Biológica de la cáscara del plátano dominico hartón (Musa paradisiaca) verde y maduro*. Tesis presentada para optar al título de Químico de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
4. VON LOESECK, H. W. 1949. — *Bananas*. New York - London Interscience Publishers Ltd.
5. Instituto de Investigaciones Tecnológicas. 1963. — *Almacenamiento y Maduración del Plátano Hartón*. Informe presentado al 3er. Congreso Nacional de Químicos e Ingenieros Químicos. Bogotá. Octubre.
6. CARDEÑOSA, B. R. 1954. — *El Género Musa en Colombia*. Publicación técnica de la Estación Agrícola Experimental, Ministerio de Agricultura y Ganadería. Palmira, Colombia.
7. HORWITZ, W., CHAIRMAN (Ed.) 1960 — *Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*. 9th. Edition Washington D. C. Published by the Association of Official Agricultural Chemists. Editorial Board.
8. KOLTHOFF, E. — *Treatise on Analytical Chemistry*. Vol. I, parte I. Theory and Practice. New York. The Interscience Encyclopedia Inc.
9. SPENCER, G. L., G. P. MEADE. 1959. — *Cane Sugar Handbook*. 8th. Edition. London. John Wiley and Sons, Inc.
10. FAIR, G. M., J. C. GEYER. *Water Supply and Waste Water Disposal*. New York - London. John Wiley and Sons, Inc.
11. BRAVERMAN, J. B. S. 1963 — *Introduction to the Biochemistry of Foods*. New York - London. Elsevier Publishing Company.
12. CHICHESTER, C. O., E. M. MRAK, G. F. STEWART. (Ed.). 1965 — *Advances in Food Research*. Vol. XIV. New York - London. Academic Press.
13. LANGE, N. A. (Ed.) 1961. — *Handbook of Chemistry*. 10th. Edition. New York - London. McGraw Hill.
14. HORSLEY, L. M. and COWORKERS. 1952 — *Azeotropic Data*. Advances in Chemistry Series N° 6. American Chemical Society. Washington, D. C.
15. BUCKLES, R. E., C. J. THELEN. 1950 — "Qualitative Determination of

- Carboxylic Esters". *Analytical Chemistry*. Vol. XXII, Nº 5, mayo p. p. 676.
16. PAECH, R., M. V. TRACEY (Ed.). 1955. — *Modern Methods of Plant Analysis*. Vol. II. Berlin. Springer-Verlag.
 17. *The Merck Index*. 7th. Edition. 1960. — Rahway, New York. Merck and Co. Inc.
 18. WEISSBERGER ARNOLD. (Ed.) — *Technique of Organic Chemistry*. Vol. IV. New York. Interscience Publishers Inc.
 19. *Chromatography*. E. Merck. Ag.
 20. MC CARTHY, ALICE, I., H. WYMAN, J. K. PALMER. 1964 — "Gas Chromatographie Identification of Banana Fruit Volatiles". *J. of Gas Chromat.* April. p. p. 121-124.
 21. MC NAIR, H. M., E. J. BONELLI. — *Basic Gas Chromatography*. Berkeley. California.
 22. MUÑOZ, C. H. 1965 — *Algunos Compuestos Volátiles del Aroma de Guayaba*. Tesis presentada para optar al título de Químico de la Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
 22. CHERONIS, D. N., J. B. ENTRIKIN. 1963 — *Identification of Organic Compounds*. New York. Wiley International Edition. Interscience Publishers.
 23. SUTTON, B. C., J. M. WATERSON. 1970. — *Colletotrichum Musae*. Editado por The Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey. England.
 24. SIMMONDS, J. H. 1963 — "Studies in the Latent Phase of Colletotrichum Species Causing Ripe Rots of Tropical Fruits" *Queensland J. Agric. Sci.* Vol. XX, Nº 4, p. p. 373-424.
 25. RAGHUNATHAN, R., A. MAHADEVAN, G. RANGASWAMI. 1966 — "A Comparative study of the Resistant and Susceptible Banana Varieties to Fungal Diseases". *Indian Phytopathology*. Vol. XIX, Nº 2, p. p. 141-149.
 26. GOOS, R. D., M. TSCHIRSH. 1962 — "Effect of Environmental Factors on Spore Germination Spore Survival and Growth of *Gloeosporium musarum*". *Mycologia*. Vol. LIV, p. p. 353-367.
 27. BUXTON, E. W. 1962 — "Roots Exudates from Banana and their Relationship to Strains of Fusarium Causing Panama Wilt". *Ann. Appl. Biol.* Vol. L, p. p. 269-282.
 28. STEVENS, F. Z. 1925 — *Plant Diseases Fungi*, New York. The Mc. Millan Company.
 29. STOVER, R. H. 1962. — "Studies on Fusarium Wilt of Bananas". *Canadian J. of Bot.* Vol. XL, p. p. 1467-1471.
 30. BECKMAN, C. H., G. E. ZAROOGIAN. 1967 — "Origin and Composition of Vascular Gel in Infected Banana Roots". *Phytopathology*. Vol. LVII, Nº 1, p. p. 11-13.
 31. VUILLEMIN, PAUL. 1931. — *Les Champignons Parasites et les Mycoses de l'Homme*. Paris. Paul Lechevalier et Fils. Editeurs.