

## CAPITULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Participantes

La presente investigación se realizó gracias al auspicio y apoyo financiero de Instituciones como **Cooperazione Italiana allo Sviluppo, Instituto Italo-Latinoamericano** y **Red Andina de la Seda**. El desarrollo de la parte experimental se lo realizó en los laboratorios del **Centro de Investigaciones Científicas** de la Escuela Politécnica del Ejército Campus Sangolquí y en los laboratorios de **CENTROCESAL Cia. Ltda.** , Quito.

#### 2.2 Zona de Estudio

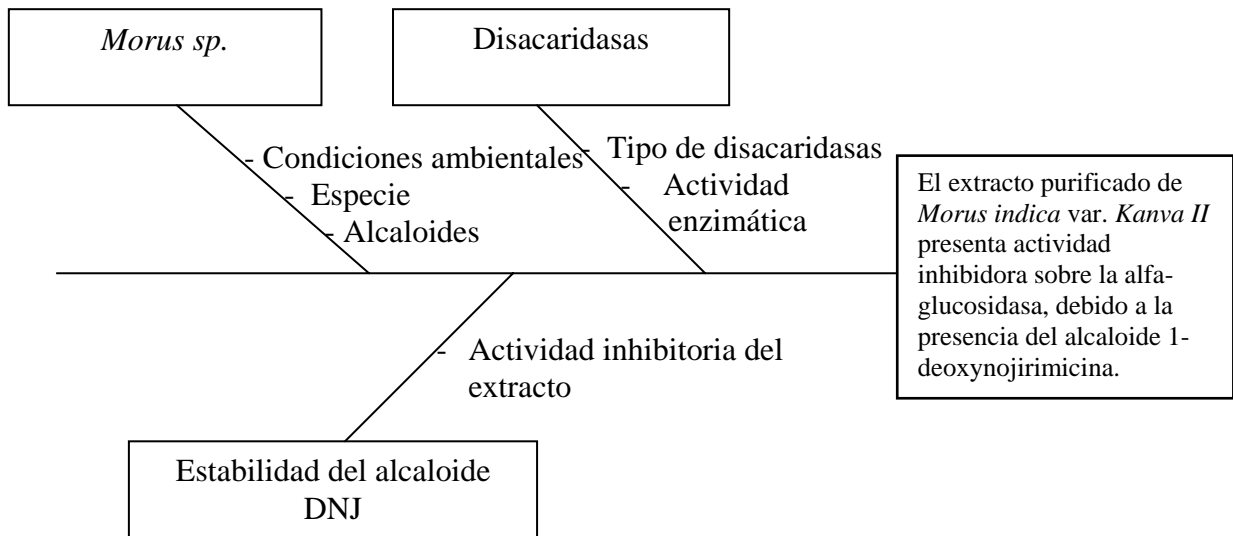
Las hojas de *Morus indica* variedad Kanva II, fueron recolectadas en un cultivo de Morera perteneciente a la Escuela Politécnica del Ejército, IASA II Campus Santo Domingo de los Colorados. Se encuentra a una altitud de 550 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m) goza de un clima subtropical y, con una precipitación media anual de 3.150 mm, es la zona de mayor pluviosidad del país (*EDUFUTURO, 2006*).

#### 2.3 Periodo de tiempo de investigación

El desarrollo de la investigación en el laboratorio tuvo una duración de nueve meses, iniciándose en noviembre del 2006 y culminando el mes de julio del 2007.

#### 2.4 Diseño

- **Variabes**
  - *Morus sp.*
  - Disacaridasa
  - Estabilidad del alcaloide DNJ



- **Operacionabilidad de variables**

HIPOTESIS	VARIABLES		INDICADOR
	DIRECTA	INDIRECTA	
El extracto purificado de <i>Morus indica</i> variedad <i>Kanva II</i> presenta actividad inhibitoria sobre la alfa-glucosidasa, debido a la presencia del alcaloide 1-deoxynojirimicina.	<i>Morus sp.</i>	Especie	<i>Indica</i>
		Variedad	<i>Kanva II.</i>
		Alcaloides	1-deoxynojirimicina (DNJ)
		Condiciones ambientales	Concentración del alcaloide
	Disacaridasas	Tipo de disacaridasas	alfa-glucosidasa
		Actividad enzimática	Hidrólisis de la maltosa (análisis espectrofotométrico)
	Estabilidad del alcaloide DNJ	Actividad inhibitoria del extracto	Inhibición o no

## 2.5 Procedimientos

### 2.5.1 Muestreo y preparación de muestras

Las hojas de Morera (*Morus indica* var. *Kanva II*) de dos meses de edad fueron recolectadas en el mes de noviembre del 2006 en un cultivo de Morera en Santo Domingo de los Colorados, las condiciones metereológicas locales fueron una temperatura de 13°C y una humedad del 94% (*msn clima*, 2007).

Se separaron las hojas que presentaban daños apreciables. Se lavaron con abundante agua y se extendieron sobre papeles absorbentes, dejándolas secar a temperatura ambiente en un cuarto con aireación y con poca entrada de luz durante un periodo de cuatro semanas y se pulverizaron (Hill & Sandoval, 2003).

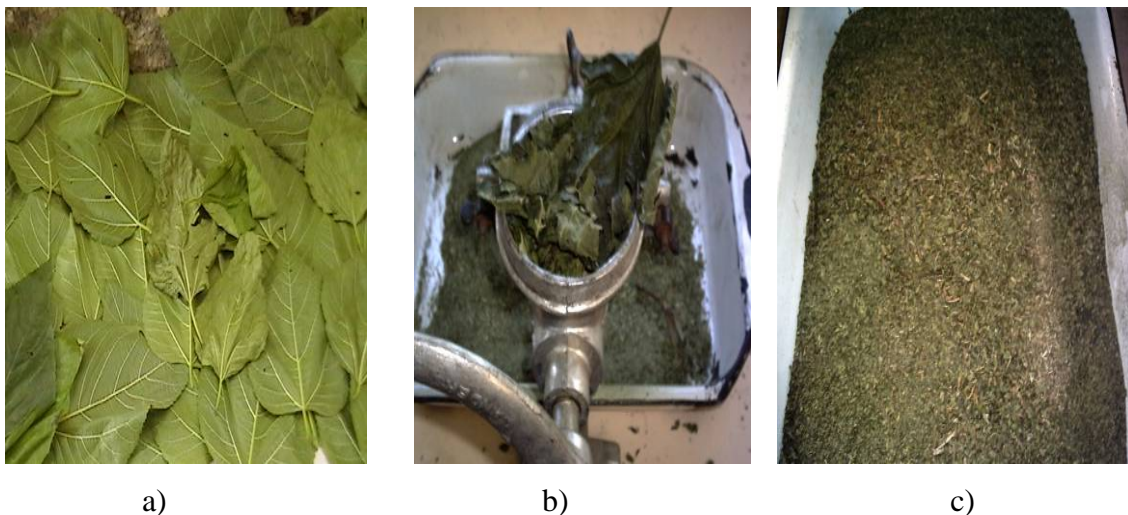


Figura 2.1 Procesamiento de la muestra, a) Secado de hojas de Morera a temperatura ambiente, b) y c) pulverizado de las hojas.

Se separó el material fresco necesario para realizar la caracterización de la muestra foliar de Morera.

## 2.5.2 Caracterización de la muestra

Las hojas frescas separadas para esta etapa fueron lavadas con HCl 0.1 N y enjuagadas con abundante agua con el propósito de eliminar todas las impurezas.

### 2.5.4.1 Contenido de humedad

La muestra fue triturada, pesada y secada en la estufa a una temperatura de 105°C por 6 horas aproximadamente hasta alcanzar un peso constante.

### 2.5.4.2 Cenizas

**Principio:** Los constituyentes minerales permanecen en el residuo como óxidos, sulfatos, fosfatos, silicatos y cloruros, dependiendo de las condiciones de incineración y la composición del producto incinerado. Este residuo inorgánico es lo que constituye las cenizas. (A.O.A.C. 1980)

Para este estudio la muestra se calcinó en la mufla a una temperatura de 300°C por aproximadamente 2 horas, y la parte mineral obtenida se pesó y se calculó el porcentaje de ceniza

#### **2.5.4.3 (Nitrógeno total) Método Kjeldahl — Digestión ácida**

**Principio:** El método consiste en realizar una digestión de la muestra con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (ácido sulfúrico) a una temperatura de alrededor de 338° C (que corresponde al punto de ebullición del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). De esta forma la muestra se carboniza pasando todo el carbono [C] a dióxido de carbono [CO<sub>2</sub>] y todo el Nitrógeno [N] a Sulfato de Amonio [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]. (TORRES, 2006).

La técnica empleada para la determinación de este parámetro fue el método 978.04 Nitrógeno (total) (Proteína cruda) en plantas. (A.O.A.C. 1980, p. 17)

Para la práctica se pesaron 50g del material seco y se trataron con 3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, se agregaron 5 ml de agua oxigenada al 30%, se colocó un catalizador de Selenio con sulfato de cobre (Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), y se llevó a digestión. Posteriormente la destilación se llevó a cabo en el micro Kjeldahl agregando 30 ml de NaOH al 30% para que el nitrógeno pase a formar amoniaco (NH<sub>3</sub>), el cual se recibe en un balón con ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), se agregaron los indicadores rojo de metilo y azul de metilo y se llevó a digestión para que se desprenda el amoniaco, se tituló con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El contenido total de Nitrógeno conseguido se multiplicó por un factor de 6.25 con lo que se obtuvo el contenido total de proteína.

#### **2.5.4.4 Contenido de grasa**

**Principio:** Este método se basa en la adsorción de grasas y aceites, los cuales son extraídos en un Soxhlet empleando hexano como disolvente. Una vez terminada la extracción se evapora el hexano y se pesa el residuo que ha quedado en el recipiente; siendo este valor el contenido de grasas y aceites.

Para la obtención de este parámetro se pesó 10g de la muestra seca en un dedal de extracción, se colocó en el equipo de extracción Soxhlet con 200 ml de hexano y se llevó a destilación por aproximadamente 10 horas.

#### **2.5.4.5 Contenido de Fibra**

La técnica empleada para la determinación de este parámetro fue el método 930.10 Fibra (cruda) en plantas. Método de digestión. (A.O.A.C. 1980)

Para la práctica se pesaron 2 gramos del material seco libre de grasa, se colocó 100 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.25% y se llevó a ebullición por 30 minutos, controlando que no se evapore, posteriormente se lavó con abundante agua caliente para eliminar todo el ácido, se agregó 100 ml de NaOH 1.25% y se llevó a ebullición por 30 minutos, se lavó nuevamente, y se pesó la cantidad de material sólido que quedó de residuo.

#### **2.5.4.6 Carbohidratos**

Se resta del peso total declarado en gramos, la suma de los gramos de proteínas, grasa, fibra, humedad y cenizas y se obtiene los gramos de carbohidratos en los gramos de muestra declarada.

### **2.5.3 Extracción, separación y purificación del alcaloide**

La muestra se deberá pulverizar hasta grano fino, debido a que los alcaloides están normalmente contenidos en vacuolas y es preciso romper la célula para que se liberen, además de esta forma se alcanza una mayor superficie de contacto que permite la extracción rápida del alcaloide.

#### **2.6.1 Desengrasado de la muestra**

Se pesaron 220 g de las hojas secas y pulverizadas de *Morus indica.*, se dejaron en maceración con 1500 mililitros de hexano, se filtró la muestra y se llevó a extracción continua en el soxhlet por un tiempo de 4 horas/25g muestra como se muestra en la figura a continuación. Terminada la extracción se secó la muestra evaporando todo el hexano al ambiente (*Dominguez, 1973*).

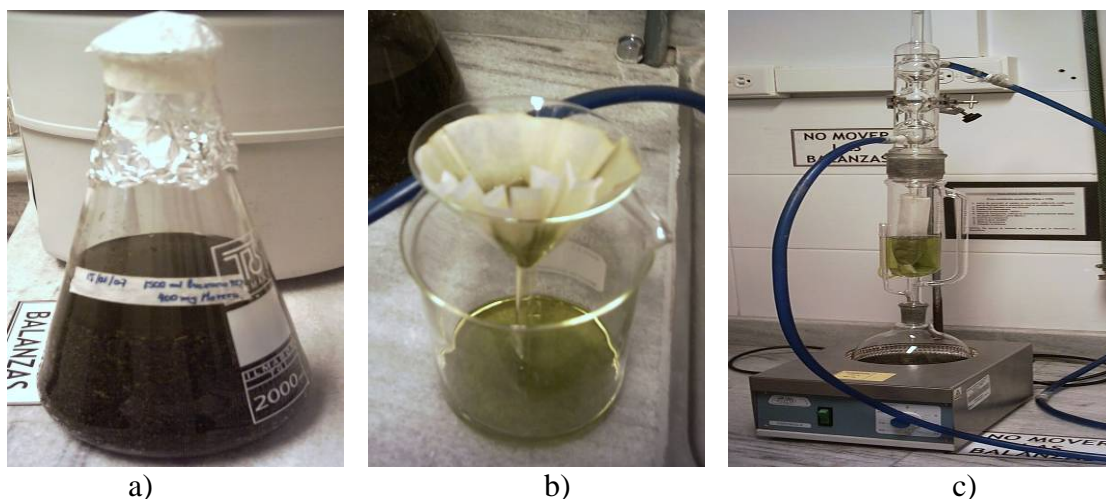


Figura 2.2 Desengrasado de la muestra, a) Maceración en hexano de la muestra pulverizada por 24h, b) Filtrado de la muestra y c) Extracción continua en el equipo Soxhlet.

### 2.6.2 Extracción continua con metanol puro

Se comenzó la extracción de alcaloides con 193 g de muestra desengrasada, llevando a reflujo en el equipo soxhlet con metanol puro 99.99% a una temperatura de 64.5°C (punto de ebullición del metanol) por un tiempo de tres horas por cada 25 g de muestra desengrasada. Después de cada extracción se realizaron las pruebas de identificación de alcaloides utilizando los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner. Al final de este proceso se obtuvo un total de 2450 ml de extracto metanólico (*Sputnik Drug Information Zone, 1995*).

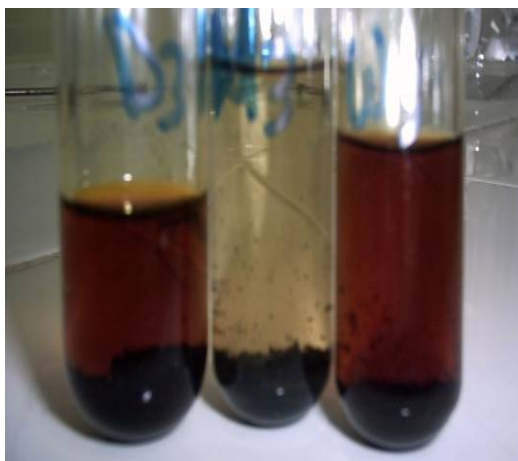


Figura 2.3 Reacciones de coloración y precipitación que demuestran la presencia de alcaloides en el extracto metanólico, Reactivo de Dragendorff, Mayer y Wagner.

### Reactivos de coloración y precipitación usados en test de reconocimiento.

Por la gran heterogeneidad de los alcaloides aparecen numerosas pruebas coloridas o de precipitación, que solo son positivas con ciertos grupos de alcaloides

(DOMINGUEZ, 1973). Estas reacciones se fundamentan en la propiedad que tienen los alcaloides de combinarse con los metales pesados Bi, Hg o con el yodo.

- Reactivo de Dragendorff.

Solución A: 0.2g de nitrato básico de Bismuto + 2.5 ml de ácido acético + 10 ml de agua destilada.

Solución B: 4 g de KI en 10 ml de agua destilada

Mezclar 10 ml de solución A, 10 ml de solución B, 20 ml de ácido acético y 10 ml de agua destilada. Los alcaloides dan precipitado marrón-anaranjado.

- Reactivo de Wagner (Yodo-Yoduro de potasio)

1.27 g de  $I_2$  + 2 g de KI / 5 ml de agua destilada y diluir a 100 ml

Los alcaloides dan precipitado floculento color marrón.

- Reactivo de Mayer (Yoduro de Mercurio y Potasio)

Solución A: 1.36 g de  $HgCl_2$  / 60 ml de agua destilada.

Solución B: 5 g de KI / 10 ml de agua destilada

Mezclar ambas soluciones y diluir a 100 ml. Los alcaloides precipitan color anaranjado-marrón (*Métodos físicos de separación y purificación, 2005; Relevamiento fitoquímico de especies vegetales, 2001*).

Las pruebas de identificación de alcaloides en el extracto metanólico se realizaron en medio ácido para lo cual se utilizó una solución de  $H_2SO_4$  al 10 % a pH 3.

### **2.6.3 Concentrado del extracto metanólico en rotavapor**

El extracto metanólico obtenido se concentró a presión reducida en el rotavapor a 64.5°C/50 rpm (Pto. De ebullición del Metanol) durante 8 horas obteniéndose 100 ml de extracto concentrado. Aproximadamente un 4% del extracto total.

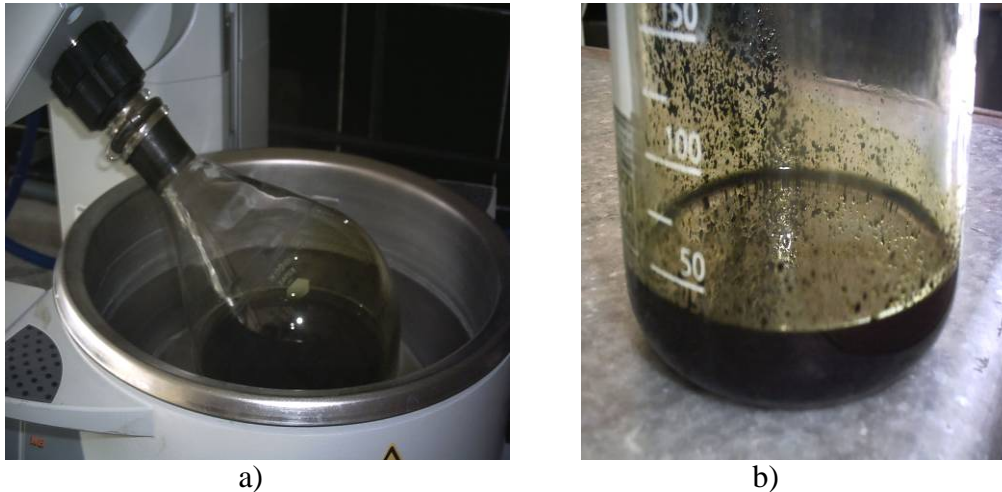


Figura 2.4 Concentrado del extracto metanólico, a) Rotavapor donde se realizó a concentración; b) Extracto concentrado

#### **2.6.4 Purificación de 1-deoxinojirimicina por cromatografía en capa fina (TLC)**

La técnica cromatográfica de purificación consiste en separar mezclas de compuestos mediante la exposición de dicha mezcla a un sistema bifásico equilibrado. Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, llamada también activa, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria (*Métodos físicos de separación y purificación*, 2005).

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos ya que la técnica que precisa es más simple. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor. Pueden usarse reveladores corrosivos, que sobre papel destruirían el cromatograma. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos (*Cromatografía en capa fina*, 2005).



Para la purificación de DNJ se utilizaron placas cromatográficas de sílica gel con indicador fluorescente de 20x20 cm<sup>2</sup>, como fase móvil se utilizó una solución de Cloroformo:Metanol (6:4).

Las placas cromatográficas se marcaron con un lápiz a 1.5 cm del borde inferior, 1.5 cm del borde superior y 2 cm de los bordes laterales como guía para colocar la muestra y hasta donde se dejará correr la cromatografía. Con una micropipeta se colocaron 80 µl del extracto concentrado sobre la línea guía, y se colocó de igual forma 10 µl del estándar 1-DNJ (*Ejercicios de Cromatografía*, 2003).

Las placas con la muestra se colocaron en el tanque desarrollador de cromatografía que contenía la solución de CH<sub>3</sub>OH:CHCl<sub>3</sub> (4:6) a menos de 1 cm de profundidad para evitar que entre en contacto directo con la muestra, se selló herméticamente la tapa del tanque y se dejó que el solvente suba por capilaridad hasta la marca del borde superior durante un tiempo de 1 hora y 50 minutos.

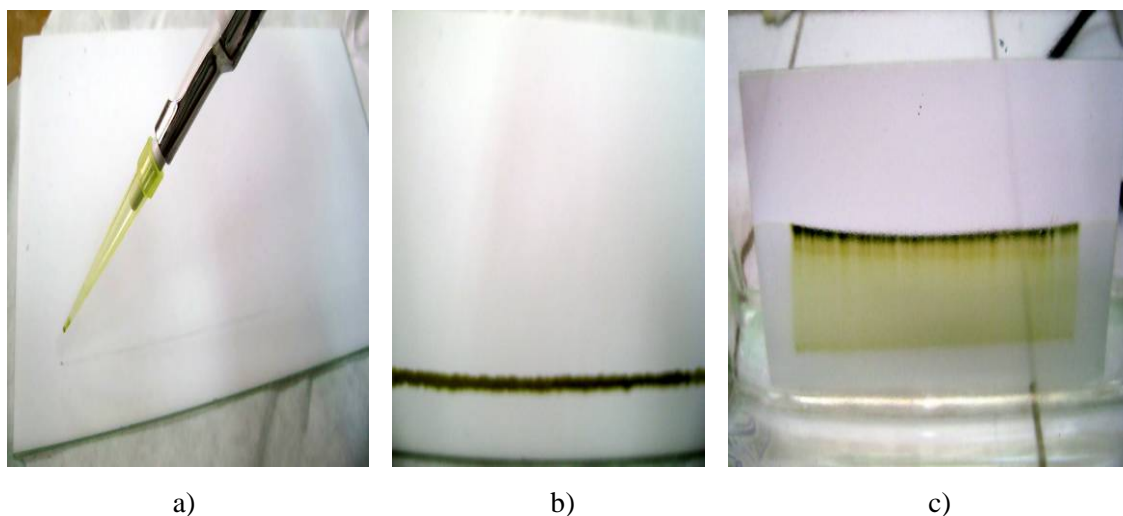


Figura 2.5 Cromatografía en capa fina; a) y b) colocación del extracto concentrado en la placa, c) separación de la muestra en el tanque desarrollador de cromatografía

Pasado este tiempo se retiró la placa del tanque y se dejó secar a temperatura ambiente. Como revelador se utilizó el reactivo de Dragendorff, el cual presentó resultados positivos a la presencia de alcaloides. Para observar mejor la separación del alcaloide se colocaron las placas en el transiluminador y así se pudo delimitar la franja donde se realizará el raspado de la sílica para su recuperación.

La sílica obtenida del raspado se colocó en 10 ml de agua purificada, de manera que el alcaloide 1-DNJ que es polar pase al agua, se agitó y se dejó decantar y se filtró, el filtrado se almacenó en un recipiente hermético a  $-20^{\circ}\text{C}$  que es la temperatura a la que permanece estable el alcaloide.

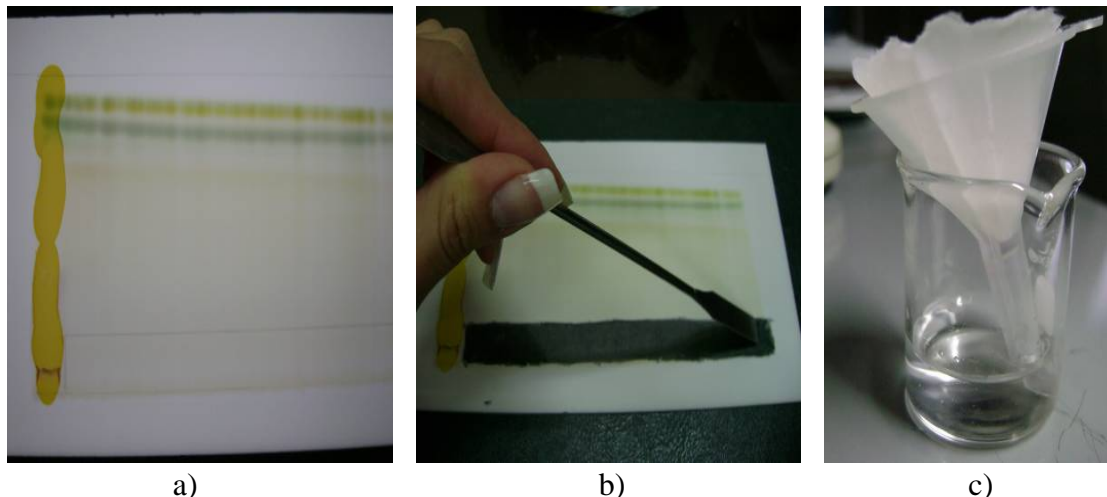


Figura 2.6 Recuperación de alcaloides, a) Identificación de alcaloides con reactivo de Dragendorff; b) Obtención de la franja de separación de alcaloides; c) Paso de alcaloides a fase acuosa.

### 2.6.5 Identificación de 1-deoxinojirimicina en el Ultravioleta Visible.

La espectroscopia Ultravioleta Visible es una técnica de espectroscopía de absorción, se utilizan longitudes de onda de 750-200 nm. El U.V. se utiliza como sistema de detección de compuestos orgánicos en procesos cromatográficos.

El espectro UV-visible se caracteriza por bandas anchas. Compuestos con los mismos grupos funcionales tienen absorción similar, por lo que fármacos y metabolitos con estructura semejante no se diferencian. Las ventajas de la espectroscopía de absorción son la simplicidad de operación y equipamiento. Las limitaciones se centran en su baja especificidad y sensibilidad (SIBSIB).

Para la identificación de 1-DNJ en la muestra purificada, se utilizó un espectrofotómetro de doble haz (SHIMADZU V-160A), celdas de cuarzo de 5mm, solución del estándar DNJ a una concentración de 5mg/10ml de agua purificada y como blanco de absorción agua purificada. En el Anexo A se presenta el certificado de análisis del estándar DNJ y sus propiedades físico-químicas.



Figura 2.7 Espectrofotómetro de doble haz (Shimadzu V-160A)

Se realizó un barrido espectral con el estándar DNJ a longitudes de onda ( $\lambda$ ) entre 400nm y 200nm para detectar la banda máxima de absorción. Se repitió el mismo procedimiento con la muestra purificada y se comparó el espectro de absorción con el del estándar para de esta manera determinar la presencia del alcaloide de interés en la muestra y la longitud de onda de absorción para su identificación en los ensayos de cromatografía líquida.

### **2.6.6 Cuantificación de 1-deoxinojirimicina por Cromatografía líquida de alta resolución.**

La cromatografía líquida es una técnica que permite separar y cuantificar los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla, esta técnica permite gran cantidad de variables y muchas ventajas: elevada resolución, gran rapidez, columnas reutilizables, automatización total, lo que implica que es reproducible.

De acuerdo a *Comunidades de Divulgación Científico Técnica 2005*, una de las ventajas que presenta sobre otros cromatógrafos es la columna, que en éste es muy corta, aprovechando la alta presión (300 atm), conseguida gracias a la bomba de inyección. A la salida de la columna se encuentra un detector de U.V que nos da un cromatograma en forma de picos. La columna es reutilizable y suele ser de acero, con el fin de aguantar la presión, esta se encuentra rellena de esferas sílice para aumentar la superficie de contacto.

En el ensayo se empleó un cromatógrafo con detector UV/VIS (SHIMADZU) ajustado a 275 nm, un inyector SIL 6B (SHIMADZU), un horno de columnas ajustado a 35°C. La separación se realizó isocráticamente sobre una columna Acclaim Polar Advantage C16 5µm 120 Å (4.6x150 mm) (Dionex). (En el Anexo B se presenta un reporte de garantía de calidad de la columna). La fase móvil empleada consistió en una mezcla desgasificada de CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O en proporción (2:8), con una velocidad de flujo de 2,0 mL/min y una presión de 32 atmósferas.

Para el estudio de la linealidad de la respuesta del detector se prepararon soluciones del estándar 1-DNJ en un rango de concentraciones de 0.005 a 0.025 mg/ml (Tabla 2.1) para realizar la curva de calibrado evaluándose el coeficiente de correlación para determinar la concentración de DNJ en la muestra. La dilución del estándar se hizo en agua purificada la cual se colocó en el ultrasonido durante algunos minutos para una mejor disolución.

Tabla 2.1 Preparación de estándares de DNJ para elaboración de la curva de calibrado

<b>Solución madre 1-DNJ (2.5mg/ml)</b> <b>1-DNJ [µl] /H<sub>2</sub>O[ml]</b>	<b>Concentración del estándar</b>
200 µl/100ml	0.005
400 µl/100ml	0.01
600 µl/100ml	0.015
800 µl/100ml	0.020
1000 µl/100ml	0.025

La muestra purificada fue filtrada a través de un filtro de nylon de 0.45 µm, se inyectó a un flujo constante de 2ml/min a las mismas condiciones de temperatura, presión y longitud de onda que se utilizó para inyectar el estándar 1-DNJ.

Todos los resultados obtenidos fueron procesados con la ayuda del software Chromeleon (v. 630, Dionex)

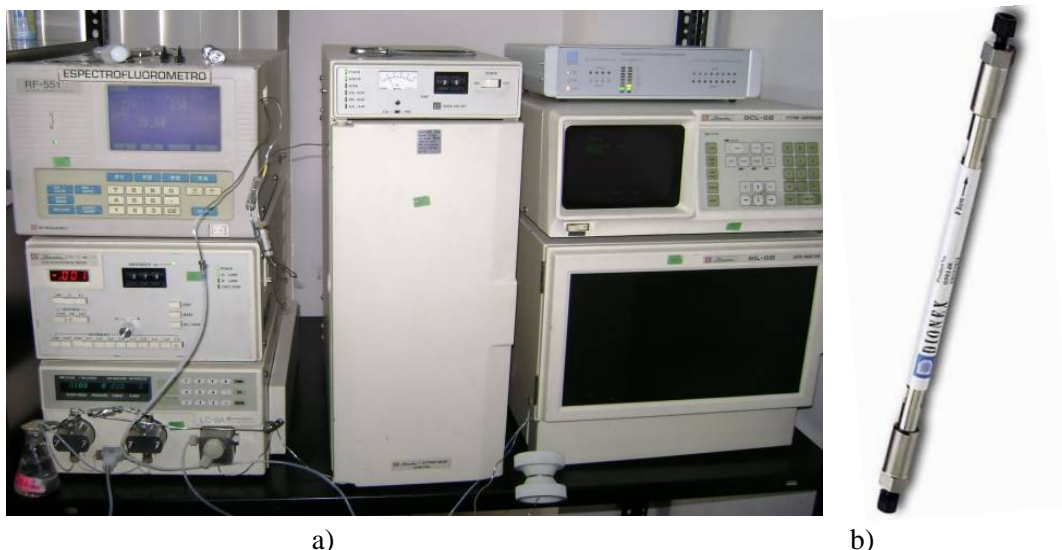


Figura 2.8 Equipo de cromatografía líquida, a) detector UV/VIS, horno de columnas, inyector; b) Columna Acclaim Polar Advantage.

### 2.6.7 Determinación de la actividad inhibitoria de 1-DNJ purificado

El estudio de la cinética de una enzima permitirá elucidar los detalles de su mecanismo catalítico, su papel en el metabolismo, cómo es controlada su actividad en la célula y cómo puede ser inhibida su actividad por drogas o venenos o potenciada por otro tipo de moléculas.

La importancia del estudio de la cinética enzimática reside en dos principios básicos. En primer lugar, permite explicar cómo funciona una enzima, y en segundo lugar, permite predecir cómo se comportará esa enzima in vivo. Las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$ , son los pilares fundamentales a la hora de intentar comprender el funcionamiento de las enzimas en el control del metabolismo (CHAVEZ, 1990).

Los métodos cinéticos se basaron en medir la cantidad de sustrato no transformado o el producto de reacción, durante un tiempo de incubación generalmente no prolongado (CHEDIAK, 1980). Los productos finales son determinados en el espectro visible mediante métodos colorimétricos, cuando el producto formado es coloreado o da color en una reacción posterior (*Cinética Enzimática*, 2007).

La primera parte del ensayo consistió en la obtención de la curva de calibrado de la D-Glucosa (Dextrosa), que se utilizará para calcular la concentración de glucosa a partir de las absorbancias obtenidas. Para dicho estudio se utilizó un reactivo comercial para

la determinación cuantitativa de glucosa en sangre, suero y plasma de RANDOX (Anexo C), cuyo principio se basa en la determinación de glucosa después de una oxidación enzimática en presencia de la glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona bajo la catálisis de la peroxidasa con el fenol y la 4-aminophenazone para formar una quinoneimina color roja-violeta como indicador. (Manual-Glucose\_GL 2623)

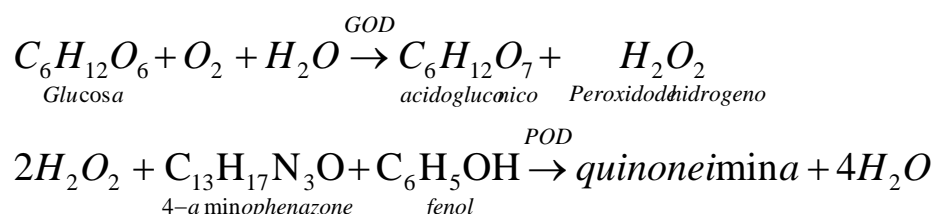


Tabla 2.2 Composición del reactivo de glucosa (Manual-Glucose\_GL 2623)

Contenido	concentración inicial de soluciones
Reactivo de Glucosa	
Buffer fosfato	50 mmol/l, pH 7.0
Buffer MOPS	50 mmol/l, pH 7.0
Fenol	11 mmol/l
4-aminophenazone	0.77 mmol/l
Glucosa oxidasa	≥ 1.5 kU/l
Peroxidasa	≥ 1.5 kU/l

Se realizaron 6 mediciones de absorbancias para lo cual se utilizó una solución madre de D-Glucosa 16.7 mM a diferentes volúmenes (1-7µl). Se hizo reaccionar la solución de glucosa con 500µl de reactivo, se incubó por 10 minutos a 35°C y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 546 nm contra el blanco de reacción en el espectrofotómetro de doble haz.

Una vez obtenidos estos datos se graficó la curva de calibrado (concentración de glucosa vs. Absorbancia) y se determinó el coeficiente de correlación.

La actividad de la maltasa fue monitoreada usando como sustrato Maltosa [37mM]. Se prepararon 6 tubos de reacción, cada uno contenía 250 µl de Buffer acetato [100 mM] pH 7.4, el sustrato Maltosa a diferentes rangos de volúmenes (25, 50, 100, 150, 250 y 300 µl), 50µl de agua purificada y se adicionó 50 µl de alfa-glucosidasa [1.5kU/l] para iniciar la reacción, se incubó a 35°C por 10 minutos. La reacción se detuvo calentando el medio a 100°C por 5 minutos en un baño de tierra. Este

procedimiento fue desarrollado de acuerdo al método de (Miwa *et al.*, 1972, Nishioka *et al.*, 1998) con algunas modificaciones (*citado por* Pongpiriyadacha, 2003).

La glucosa liberada fue determinada por el método de la glucosa-peroxidasa, para lo cual de cada tubo de reacción se tomaron 500  $\mu$ l y se hicieron reaccionar con 500  $\mu$ l del reactivo de identificación de glucosa, se incubaron por 10 minutos y se leyeron las absorbancias a una longitud de onda de 546 nm, como blanco de reacción se utilizó la mezcla de reacción sin adicionar la enzima y el sustrato.

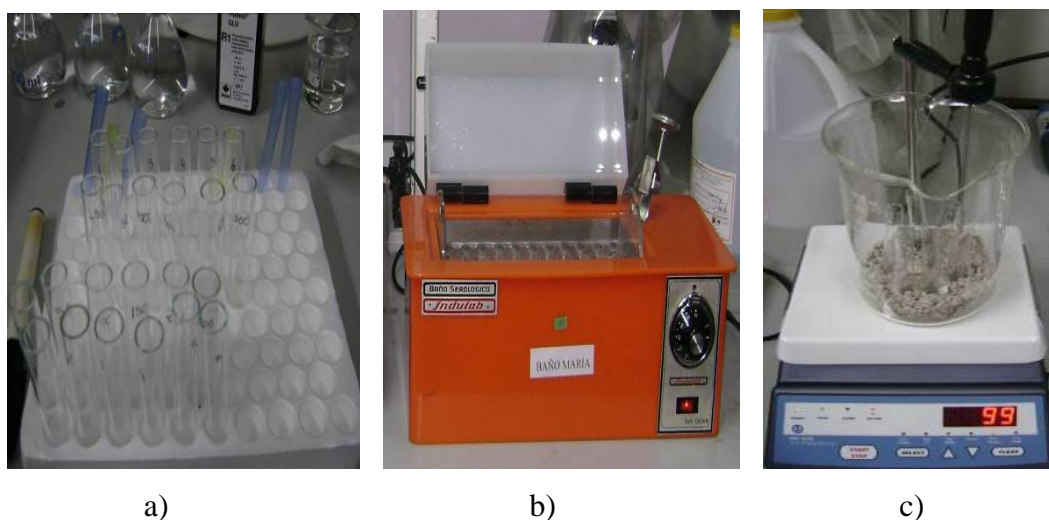


Figura 2.9 Actividad de la maltasa, a) Tubos de reacción; b) Incubación de los tubos de reacción a 35°C por 10 min; c) Desactivación de la Enzima por calentamiento a 100°C en un baño de tierra.

Para la evaluación de la actividad inhibitoria los 50  $\mu$ l de agua purificada fueron remplazados por el inhibidor (DNJ aislado del extracto de hojas de Morera) a una concentración final de [0.01215 mg/ml]. Se leyeron las absorbancias de cada tubo a 546nm.

Se interpoló el valor de las absorbancias leídas tanto en presencia del inhibidor como sin inhibidor en la recta patrón de la glucosa con el fin de conocer la concentración del producto obtenido.

## 2.6 Análisis de Datos

### 2.6.1 Concentración de 1-DNJ en el extracto de hojas de *Morus indica*

La concentración de 1-deoxinojirimicina en el extracto purificado se determinará con la interpolación de los valores de absorbancia del estándar 1-DNJ, los datos se procesan con la ayuda del Software Chromoleon (v. 6.8, Dionex). Una vez

obtenido este resultado se calculará la concentración total de 1-DNJ en las hojas de *Morus indica* en base a los datos de cantidad de muestra utilizada en cada etapa de purificación.

### 2.6.2 Actividad inhibitoria de 1-DNJ sobre la alfa glucosidasa.

Una vez obtenidos los datos de concentración de producto (glucosa) se podrá determinar la velocidad o actividad enzimática ( $v$ ) que se define como cantidad de sustrato transformado o de producto formado en la unidad de tiempo (Cinética Enzimática, 2007).

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}$$

A continuación se realiza un estudio del efecto de la  $[S]$  sobre la velocidad de reacción enzimática representando ( $v$ ) en función de  $[S]$ , para una enzima que obedece la cinética de Michaelis-Menten. Este estudio se lo hace tanto en presencia como en ausencia del inhibidor. Los datos se procesan con la ayuda del Software Enzyme Kinetics 1.3 de SigmaPlot 10.0.

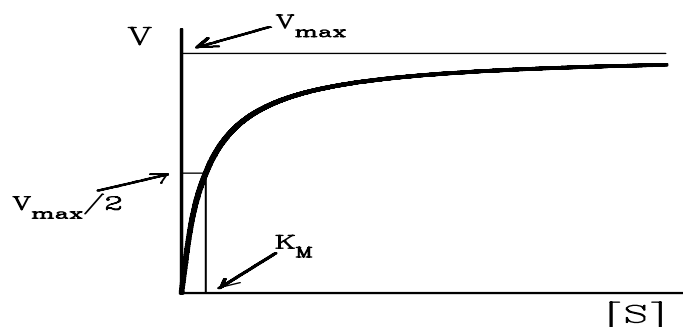


Figura 2.10 representación de  $v$  en función de  $[S]$ , para una enzima que obedece la cinética de Michaelis-Menten.

Los parámetros cinéticos de la maltasa,  $V_{\text{máx}}$ ,  $K_m$ ,  $V_{\text{máx}_{\text{ap}}}$ ,  $K_{\text{m}_{\text{ap}}}$ , se calcularán utilizando la representación gráfica de Lineweaver-Burk de dobles recíprocos ( $(1/v)$  vs.  $(1/[S])$ ), y a partir de la ecuación de la recta ( $y=ax+b$ ) se podrán despejar los valores de  $K_m$  y  $V_{\text{max}}$ . (CHAVEZ, 1990).

$$\frac{1}{V_o} = \left( \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \right) \left( \frac{1}{S_o} \right) + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$



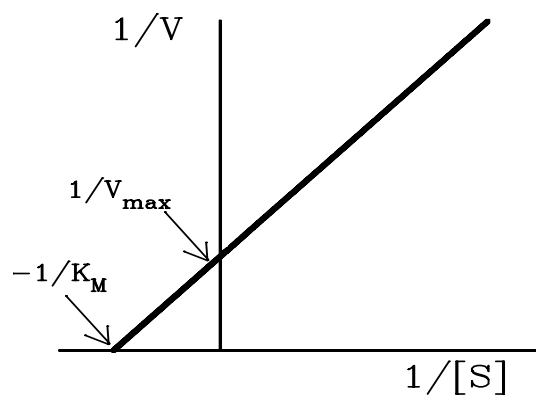


Figura 2.11 Representación de dobles recíprocos de la cinética enzimática

El porcentaje de inhibición del 1-DNJ sobre la alfa-glucosidasa se calculará en base a la constante de inhibición obtenida y a la concentración del inhibidor mediante las siguientes fórmulas (Boxenbaum, 1999):

$$K_i = \frac{K_m \cdot [I]}{K_{m_{ap}} - K_m}$$

$$\% \text{Inhibición} = \frac{100 \times [I]}{[I] + K_i}$$