

## CAPITULO IV

### DISCUSIÓN

Las hojas de Morera a los 15 días de brote mostraron una composición química muy buena con un porcentaje superior al 13% de proteína cruda, menor al 50 % de fibra y un gran aporte energético de 167.4 kcalorías, por dicha razón se viene utilizando con buenos resultados en la alimentación de rumiantes como suplemento de dietas basales de pastos; además de que en otros países la Morera es apreciada por sus propiedades para consumo humano, por lo cual se pretende con este proyecto dar a conocer los usos y beneficios de *Morus sp.*

En trabajos previos realizados sobre especies de *Morus sp.*, en países asiáticos (Oku *et al.*, 2006); se encontraron valores del alcaloide 1-deoxinojirimicina que variaban entre 100 y 240 mg/100g de producto seco. Los resultados obtenidos en la presente investigación no concuerdan con tales valores, dado que la concentración de DNJ en hojas de *Morus indica* arroja resultados inferiores.

Para determinar 1-DNJ por HPLC, fue necesario identificar la columna más apropiada que permita la separación de 1-deoxinojirimicina que es un compuesto altamente polar. La columna Acclaim Polar Advantage C16 5µm 120 Å (4.6x150 mm) (Dionex) (Anexo B) es comúnmente aplicada para la determinación de compuestos relativamente polares por HPLC. La capacidad de retención de esta columna depende básicamente de la hidrofiliidad del analito.

*Kimura et al.*, 2004, en su artículo “Simple and rapid determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves” se refiere a una técnica simple y confiable de extracción e identificación de 1-DNJ que consiste en poner las hojas liofilizadas de Morera en un solvente orgánico, sonificar, centrifugar y el sobrenadante resultante inyectarlo directamente en la columna HPLC; la detección se hace por medio de un detector evaporativo de dispersión de luz (HPLC-ELSD). Los resultados presentados en este artículo muestran que eluído se observa como una banda definida a un tiempo de retención de 24.5 minutos y los porcentajes de 1-DNJ encontrados en distintas especies de Morera de 0.10-0.14 %.

El detector ELSD descrito por *Kimura et al., 2004*, tiene la ventaja de dar una respuesta relacionada a la masa del compuesto e independiente de sus propiedades cromofóricas, por tal razón presenta una mayor sensibilidad al momento de detección.

Existen evidencias de que la concentración de DNJ varía en cada especie dentro de un mismo género, también la concentración de alcaloides y otras sustancias activas de las plantas varían en respuesta a condiciones y factores externos como: clima, edad de la planta, época de recolección, tipo de suelo, etc. Adicionalmente la baja recuperación del 1-deoxinojirimicina en la muestra en comparación con los resultados bibliográficos, se puede deber a diversos factores, entre los cuales se señalan: limitada absorptividad molar de la sustancia en la región ultravioleta, limitado poder extractivo de los solventes a las condiciones de ensayo anteriormente descritas, degradaciones y reacciones cruzadas de la muestra no determinadas y limitada disponibilidad de reactivos y equipos.

El procedimiento extractivo aplicado no garantiza alta recuperación ni reproducibilidad del ensayo, lo anterior debido a la imposibilidad de controlar sistemáticamente las variables que intervienen en el proceso como lo son: temperatura, presión, flujo de solvente, tiempo de reacción y evaporación.

Existen equipos en el mercado que permiten realizar la técnica de extracción de alcaloides de manera automatizada como lo es la extracción acelerada con solventes (ASE), esta técnica permite un ahorro de solventes y tiempo en un 95%, además que se pueden controlar las variables que intervienen en el proceso, la reproducibilidad de la técnica y una mayor recuperación del analito de interés.

En el proceso de purificación del DNJ, la técnica de cromatografía en capa fina (TLC) dio buenos resultados debido a que se obtuvo una buena recuperación del alcaloide, el tiempo de ensayo fue rápido y sencillo y la técnica fácilmente reproducible.

Los ensayos de cinética enzimática se trabajaron a una concentración constante de enzima [1.5kU/l] y se observó el efecto que produjo la variación de la concentración del sustrato sobre la velocidad de reacción. A muy bajas concentraciones de maltosa la tasa

de reacción fue baja, pero aumento conforme fue aumentando la concentración de sustrato, hasta que alcanzó un punto en el que la velocidad de reacción casi no varió, es decir alcanzó su velocidad máxima ( $V_{max}$ ) a una concentración saturante de sustrato. (Lehninger *et.al.*, 1993).

El valor de  $K_m$  obtenido en este ensayo es elevado en comparación a los valores de  $K_m$  para Maltosa descritos por Sivakami, 1976, en su artículo “Kinetic studies on glucoamylase of rabbit small intestine”. Dichos resultados indican que existe poca afinidad entre la enzima y el sustrato Maltosa, es decir el complejo ES es inestable, lo cual se puede atribuir a las condiciones del medio de reacción.

La velocidad de reacción puede verse afectada por dos factores que son el pH y la temperatura. La variación del pH no afecta la actividad enzimática directamente sino que modifica la concentración de protones. Los protones además de alterar la estructura de la enzima y el sustrato, pueden participar también en la reacción como sustrato o producto. En esos casos, la concentración de protones afecta directamente la velocidad de la reacción. Un aumento en la temperatura provoca un aumento de la velocidad de reacción hasta cierta temperatura óptima, y después se comienza a producir la desnaturalización térmica. Cuando mayor es la temperatura, mayor es la velocidad de reacción. (Lehninger *et.al.*, 1993).

Los datos de  $K_m$  y  $V_{max}$  conseguidos en la cinética de la alfa glucosidasa demuestran que la inhibición por el alcaloide DNJ es del tipo competitivo por cuanto el valor de  $V_{max}$  (0.01 mmol/min) no se ve afectado por la presencia del inhibidor, es decir el inhibidor no obstaculiza la catálisis en el complejo ES; en cambio el valor de  $K_m$  (13.6 mM) se ve afectado debido a que se observa un incremento en su valor aparente ( $K_{m_{ap}}$  15.85 mM), lo que implica que disminuye la afinidad de la enzima por el sustrato en presencia del alcaloide 1-deoxinojirimicina.

El valor de la constante de inhibición ( $K_i$ ) para la formación del complejo EI encontrado en este ensayo fue de  $4.449 \times 10^{-4}$  mM y el porcentaje de inhibición del DNJ sobre la actividad de la maltasa fue 14.32%. Estos valores difieren de los resultados de ensayos realizados con el extracto total de hojas de Morera (Oku *et.al.*, 2006), donde se señalan

porcentajes de inhibición superiores. Esta diferencia en los resultados de inhibición pueden ser por varias causas entre las cuales están: la posibilidad de que el 1-deoxinojirimicina trabaje en sinergismo con otros componentes de la hoja para ejercer el efecto inhibitorio, las condiciones del medio de reacción o la concentración del inhibidor. Sin embargo dichos resultados nos dan una idea de que las hojas de *Morus indica* variedad *Kanva II* provenientes de Santo Domingo de los Colorados pueden ser útiles en el control de la hiperglicemia del diabético dado que reduce la absorción intestinal de la glucosa, debido a la presencia del alcaloide 1-deoxinojirimicina que es un inhibidor competitivo de las alfa glucosidasas cuya molécula presenta una conformación espacial muy similar al sustrato Maltosa.