

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 Caracterización físico-química de las hojas de *Morus indica*.

En la tabla 3.1 se presentan resultados de la composición químico proximal de las hojas de *Morus indica* realizados en base seca por cada 100g de hojas.

Tabla 3.1 Composición químico proximal de las hojas de *Morus indica* en base seca.

PARAMETRO ANALIZADO	RESULTADO POR 100g DE PLANTA EN %P/P EN BASE SECA
Grasas	11.55
Proteínas	13.59
Carbohidratos totales	19.86
Cenizas	8.96
Fibra	45.97

La Tabla 3.2 muestra la composición químico proximal de las hojas de *Morus indica* en %P/P “AS IS”. Se observa que la materia prima presenta un elevado contenido de fibra (en torno a 32g/100 g), seguido por los carbohidratos totales (14g/100g), un reducido contenido de lípidos en torno a 8g/100g y un valor de cenizas cercano a 6g/100 g. Por otra parte presenta un amplio aporte energético, el cual arrojó un valor de 73 Kcal/100g.

Tabla 3.2 Composición químico proximal de las hojas de *Morus indica* “AS IS”.

PARAMETRO ANALIZADO	RESULTADO POR 100g DE PLANTA EN %P/P “AS IS”
Humedad	29.67
Grasas	8.12
Proteínas	9.60
Carbohidratos totales	13.97
Cenizas	6.30
Fibra	32.33
Contenido energético (Kcalorías)	167.4
Contenido energético de la grasa (Calorías)	73.11

3.2 Extracción de alcaloides con metanol puro

Se obtuvieron resultados positivos al extraer los alcaloides presentes en las hojas de Morera con Metanol puro, su presencia se demostró de manera indirecta y solo a través de las reacciones positivas de coloración y precipitación en el extracto previamente hidrolizado con H₂SO₄ 10%.

3.3 Purificación de 1-deoxinojirimicina por cromatografía en capa fina (TLC)

La técnica de cromatografía en capa fina fue la más adecuada para la purificación de 1-DNJ del extracto total de alcaloides. Al comparar directamente en placa analítica de silicagel, los alcaloides purificados del extracto con el estándar de referencia, se observa que presentan el mismo valor de R_f 0.13 en el sistema de solventes cloroformo:metanol (6:4), dicho valor del R_f permite determinar la presencia de 1-deoxinojirimicina en las hojas de Morera.

3.4 Identificación de 1-deoxinojirimicina en el espectro Ultravioleta.

Conforme se definió en el protocolo, se determinaron las longitudes de onda, en nanómetros (nm), donde se identificaba los máximos de absorción expresados en forma de bandas tanto en el estándar y en la muestra.

El barrido realizado en la región del ultravioleta (200-400 nm) tanto del estándar 1-deoxinojirimicina como de la muestra (alcaloide purificado), arrojó resultados de un máximo de absorción de la radiación emitida por la fuente de deuterio a una longitud de onda de 275 nm. Esta longitud de onda permitió conseguir la sensibilidad necesaria para la cuantificación de DNJ en el HPLC con detector UV/Vis..

3.5 Cuantificación de 1-deoxinojirimicina por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La figura 3.1 muestra la curva de calibración representativa de 5 concentraciones del estándar 1-DNJ. La respuesta de detección fue lineal en el rango de concentraciones de 0.005 a 0.025 mg/ml como se muestra en la tabla 3.3, obteniéndose la ecuación de la recta, que se expresa según $y=1318.8x$, y con correlación positiva entre las variables expresada como $R^2 = 0.999$.

Gracias a lo anterior es posible interpolar los datos de área de integración de la muestra y así determinar la concentración de 1-deoxinojirimicina en las hojas de *Morus indica*.

Tabla 3.3 Valores del área bajo la curva de los picos detectados en el HPLC a partir de las soluciones preparadas a diferentes concentraciones del estándar

Área bajo la curva	Concentración del estándar 1-DNJ [mg/ml]
6.3774	0.005
12.7572	0.01
19.4641	0.015
26.6029	0.02
33.1971	0.025

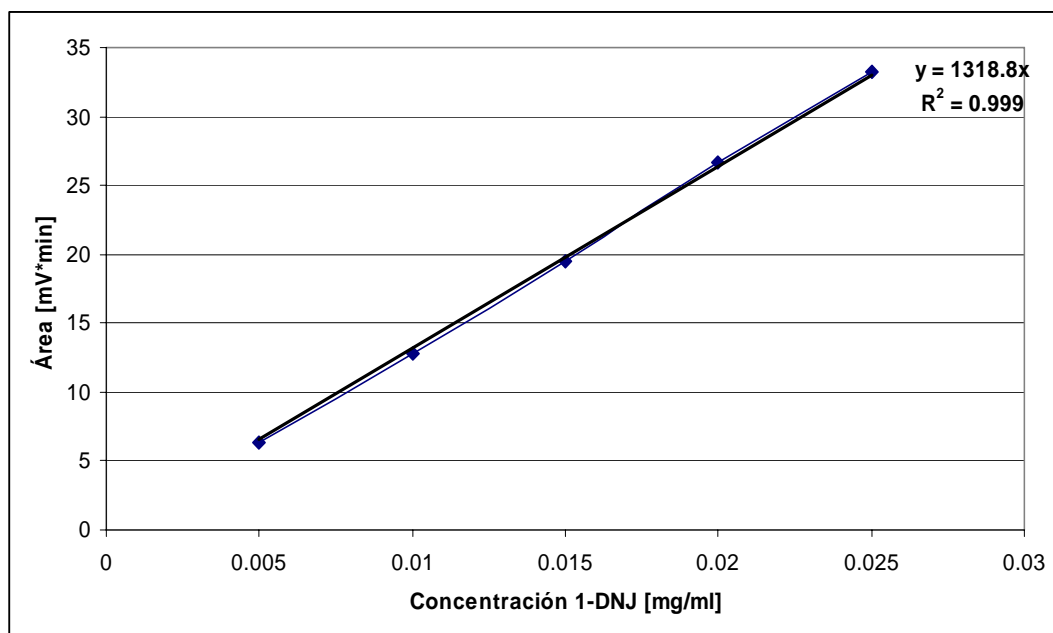


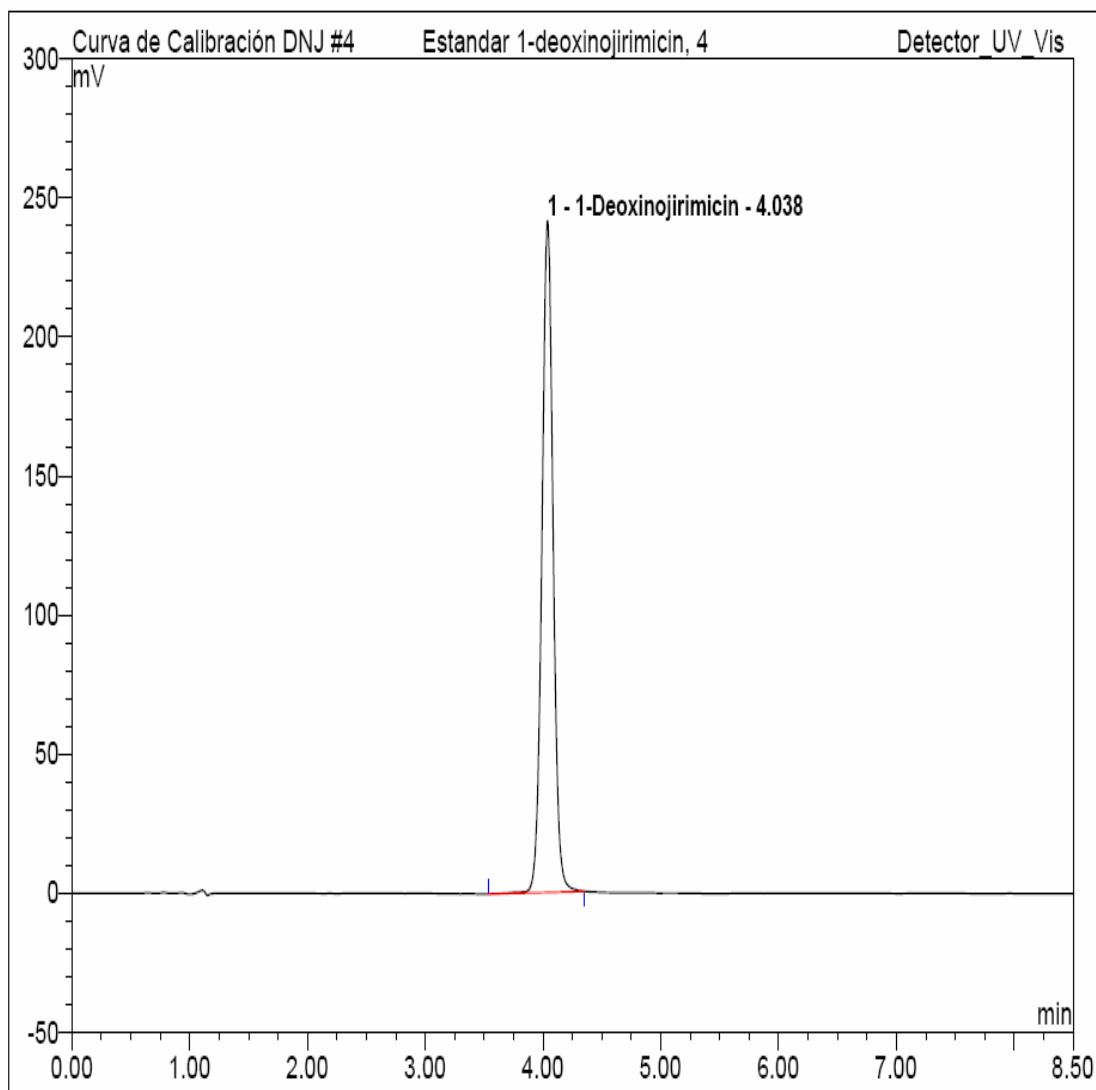
Figura 3.1 Curva de calibrado del estándar DNJ, en un rango de concentraciones de 0.005 a 0.025 mg/ml.

La figura 3.2 muestra el cromatograma obtenido con el estándar 1-DNJ a una concentración de 0.020 mg/ml, obteniéndose un área bajo la curva de 26.6029 mV/min y un tiempo de retención de 4.04 minutos. La figura 3.3 muestra el cromatograma obtenido en el estudio de cuantificación de 1-deoxinojirimicina en el extracto purificado de hojas de Morera. Como se observa el tiempo de retención del alcaloide es de 4.077 minutos, el área de 16.01 mV/min y la concentración del alcaloide en la

muestra de 0.01215 mg/ml, valor con el cual se hicieron los cálculos y se determinó la concentración total de 1-DNJ de 690.15 mg/kg en base seca.

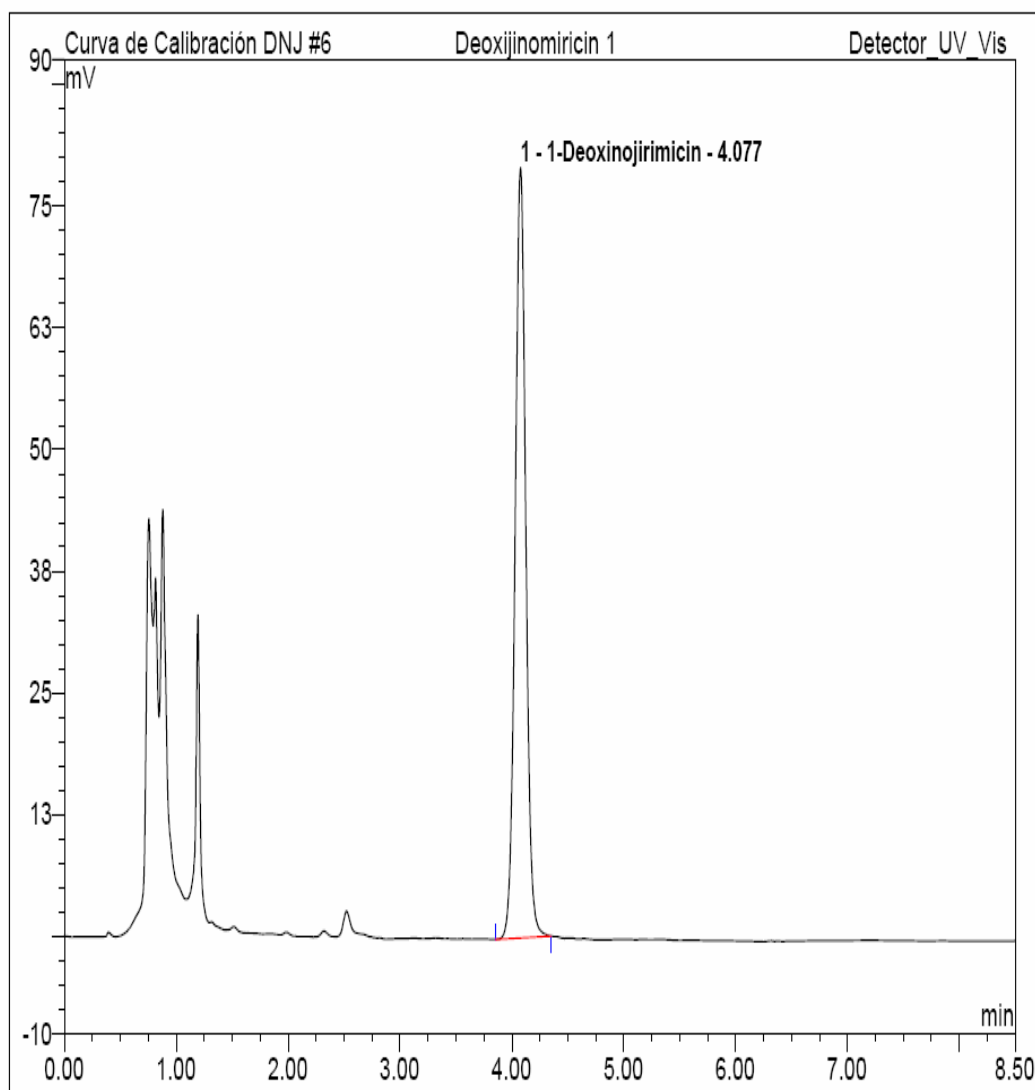
Cálculos para determinar la concentración final de 1-deoxinijirimicina en hojas de Morera

$$\frac{0.01215\text{mgDNJ}}{1\text{mlSolpurificada}} \times \frac{10\text{mlSolpurificada}}{0.08\text{mlExtracto}} \times \frac{100\text{mlExtracto}}{220\text{gHojasSecas}} \times 1000\text{gHojasSecas} = 690.15\text{mgDNJ}$$



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mV	Area mV*min	Rel.Area %	Amount mg/Kg	Type
1	4.04	1-Deoxinijirimicin	241.443	26.603	100.00	1.009	BMB
Total:			241.443	26.603	100.00	1.009	

Figura 3.2 Cromatograma del estándar 1-deoxinijirimicina de referencia.



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mV	Area mV*min	Rel.Area %	Amount mg/ml	Type
1	4.08	1-Deoxinojirimicin	79.105	16.01	100.00	0.012	BMB
Total:			79.105	16.01	100.00	0.000	

Figura 3.3 Cromatograma del alcaloide 1-DNJ purificado de las hojas de Morera.

3.6 Actividad inhibitoria de 1-DNJ purificado

La figura 3.4 presenta la curva de calibrado de la D-Glucosa (Dextrosa) en un rango de seis concentraciones que se muestran en la tabla 3.4, la respuesta de detección fue lineal obteniéndose un R^2 de 0.995 y el coeficiente de correlación lineal de 4.73, valor con el cual se pudo interpolar los datos de absorbancia de la mezcla de reacción y así determinar la concentración del producto final.

Tabla 3.4 Valores de concentración de Glucosa y absorbancia para la gráfica de la curva de calibrado.

Tubo	Reactivo glucosa [ml]	Volumen glucosa (V) [ml]	[Glucosa] (C)	Vol. Tubo (V1) [ml]	[Glucosa]tubo mmol/ml (C1)	Abs. 546 nm
1	0.5	0.001	16.7	0.501	0.0333	0.157
2	0.5	0.003	16.7	0.503	0.0996	16.7
3	0.5	0.004	16.7	0.504	0.1325	16.7
4	0.5	0.005	16.7	0.505	0.1653	16.7
5	0.5	0.006	16.7	0.506	0.1980	16.7
6	0.5	0.007	16.7	0.507	0.2306	16.7

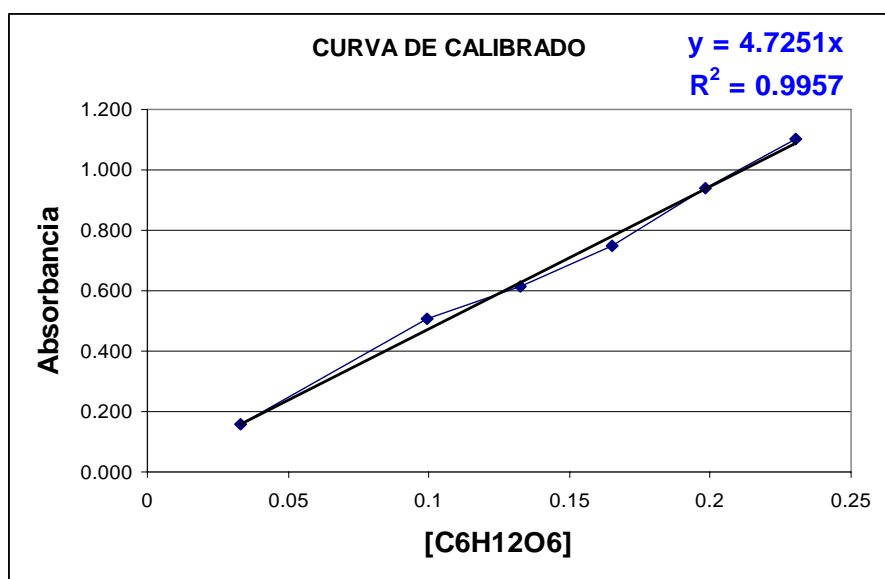


Figura 3.4 Linealización de la curva de calibrado de la concentración de D-Glucosa (Dextrosa) frente a las absorbancias.

En la tabla 3.5 se presentan los cálculos de concentración de Maltosa (sustrato) en cada tubo de reacción utilizando la relación $V_1.C_1=V_2.C_2$. Donde V representa el volumen de maltosa que se añade a cada tubo, C la concentración de la disolución de partida [33.4 mM], V' el volumen total en cada tubo y C' la concentración final de Maltosa en cada tubo.

Tabla 3.5 Cálculo de la concentración de sustrato [Maltosa] en cada tubo de reacción.

Tubo	VMaltosa (ml) (V1)	Maltosa [mM] (C1)	Vol. Tubo (ml) (V2)	Maltosa [mM] tubo (C2)
0	0	0	0	0
1	0.025	33.4	0.875	0.954
2	0.05	33.4	0.9	1.856
3	0.1	33.4	0.95	3.516
4	0.15	33.4	1	5.010
5	0.25	33.4	1.1	7.591
6	0.3	33.4	1.15	8.713

En la tabla 3.6 se presenta el estudio del efecto de la [S] sobre la velocidad de reacción enzimática (v) [mmol/min]. Se calculó en primer lugar la concentración final del producto (glucosa) en base a las absorbancias y al coeficiente de correlación obtenido anteriormente. La velocidad de reacción se calculó dividiendo la concentración del producto para el tiempo de reacción (20 minutos). La enzima de ensayo (maltasa) presentó una mejor actividad hidrolítica al trabajar con el buffer acetato a pH fisiológico de 7.4.

Tabla 3.6 Estudio del efecto de la [S] sobre la velocidad de reacción enzimática.

Tubo	Buffer acetato 100 mM (ul)	Maltosa (ul) 33,4 mM	glucosidasa (ul)	Reactivo glucosa [ul]	Agua	Abs. 546 nm Y	[Glucosa] producto mmol/L X	$v = \frac{[Gluc]}{t}$ [mmol/min]
0	250	0	50	500	50	0	0	0
1	250	25	50	500	50	0.074	0.01566	0.00078
2	250	50	50	500	50	0.129	0.02730	0.00137
3	250	100	50	500	50	0.219	0.04635	0.00232
4	250	150	50	500	50	0.313	0.06624	0.00331
5	250	250	50	500	50	0.421	0.08910	0.00445
6	250	300	50	500	50	0.42	0.08889	0.00444

En la figura 3.5 se representa la curva de la concentración de sustrato frente a la velocidad de reacción. Como se puede observar esta curva tiene un comportamiento Michaeliano. La gráfica de los dobles recíprocos de la cinética enzimática de la alfa glucosidasa se presenta en la figura 3.6, a partir de la ecuación de la recta conseguida ($y=1147.4x+88.066$) se determinaron los valores de K_m 13.6 mM y V_{max} 0.01 mmol/min

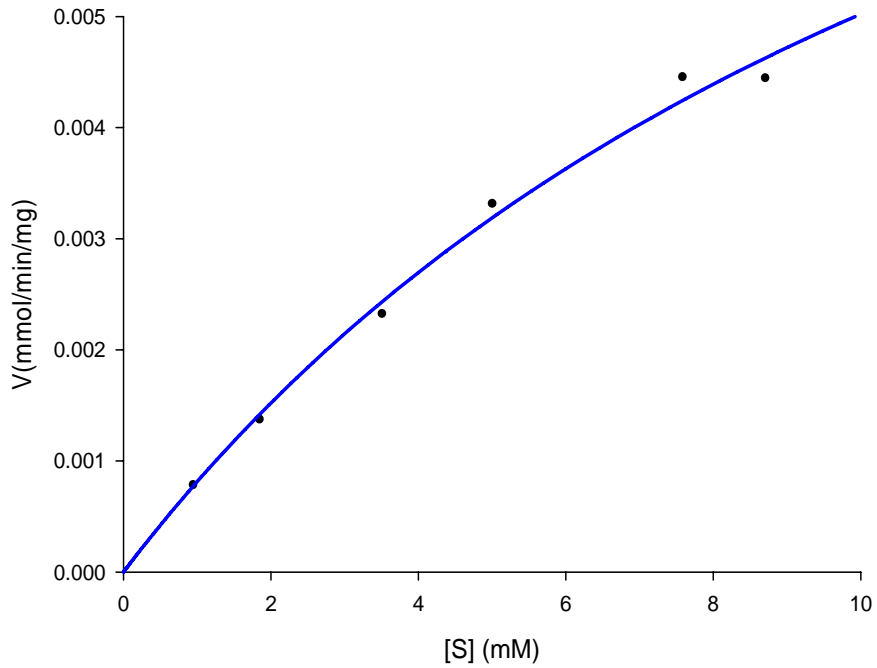
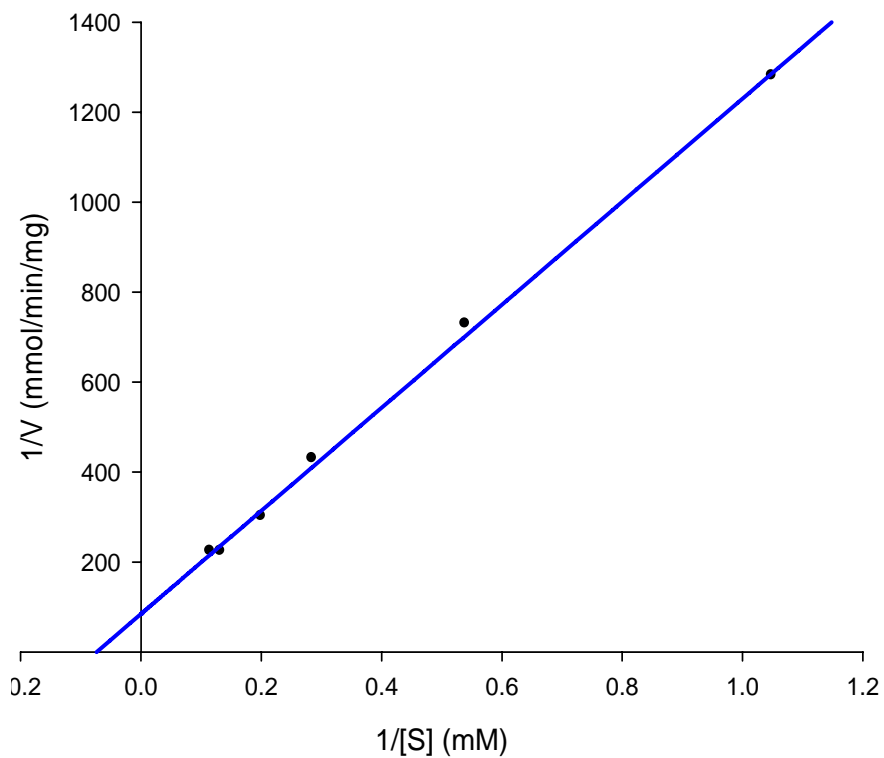


Figura 3.5 Curva de Michaelis-Menten. Concentración de sustrato [S] frente a velocidad de reacción (V) en ausencia de inhibidor



$V_{max} = 0.01183$

$K_m = 13.6$

Figura 3.6 Representación de los dobles recíprocos $1/[S]$ frente a $1/v$. (Lineweaver-Burk) en ausencia de inhibidor.

En la tabla 3.7 se presentan los resultados del estudio del efecto del inhibidor 1-deoxinojirimicina extraído de las hojas de *Morus indica* sobre la velocidad de reacción enzimática.

Tabla 3.7 Estudio del efecto del inhibidor sobre la velocidad de reacción enzimática.

Tubo	Buffer acetato 100 mM (ul)	Maltosa (ul) 33,4 mM	glucosidasa (ul)	Reactivo glucosa [ul]	Inhib DNJ	Abs. 546 nm Y	[Glucosa] producto mmol/L X	$v = \frac{[Gluc.]}{t}$ [mmol/min]
0	250	0	50	500	50	0	0	0
1	250	25	50	500	50	0.064	0.01354	0.00068
2	250	50	50	500	50	0.104	0.02201	0.00110
3	250	100	50	500	50	0.189	0.04000	0.00200
4	250	150	50	500	50	0.27	0.05714	0.00286
5	250	250	50	500	50	0.459	0.09714	0.00486
6	250	300	50	500	50	0.429	0.09079	0.00454

Las figuras 3.7 y 3.8 muestran la curva de la concentración de sustrato frente a la velocidad de reacción (Cinética Michaelis-Menten) y la gráfica de los dobles recíprocos de la cinética enzimática en presencia del inhibidor 1-DNJ a concentración constante, respectivamente.

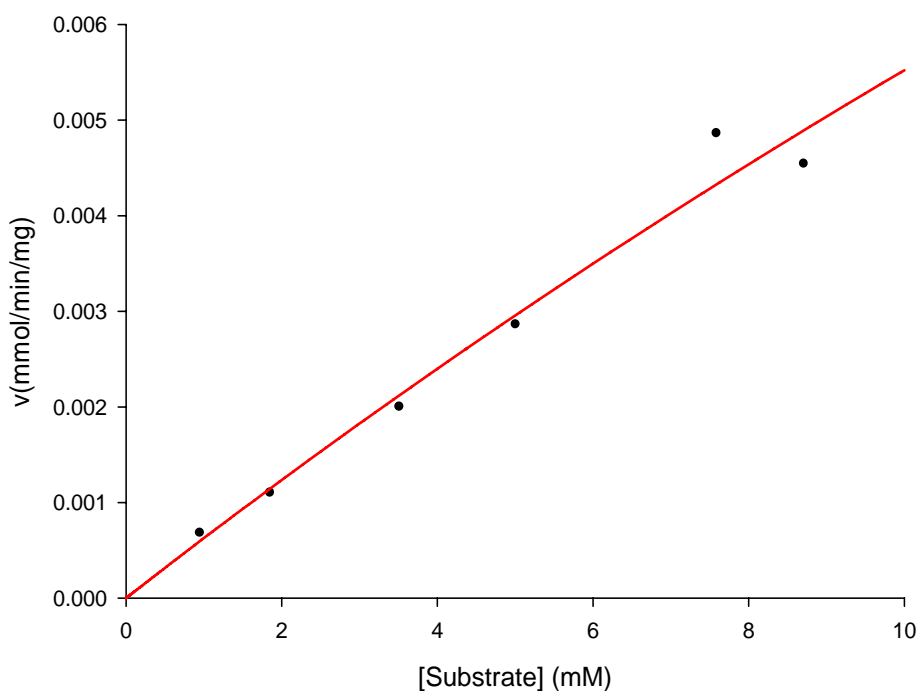


Figura 3.7 Curva de Michaelis-Menten. Concentración de sustrato [S] frente a velocidad de reacción (V), en presencia del inhibidor 1-DNJ

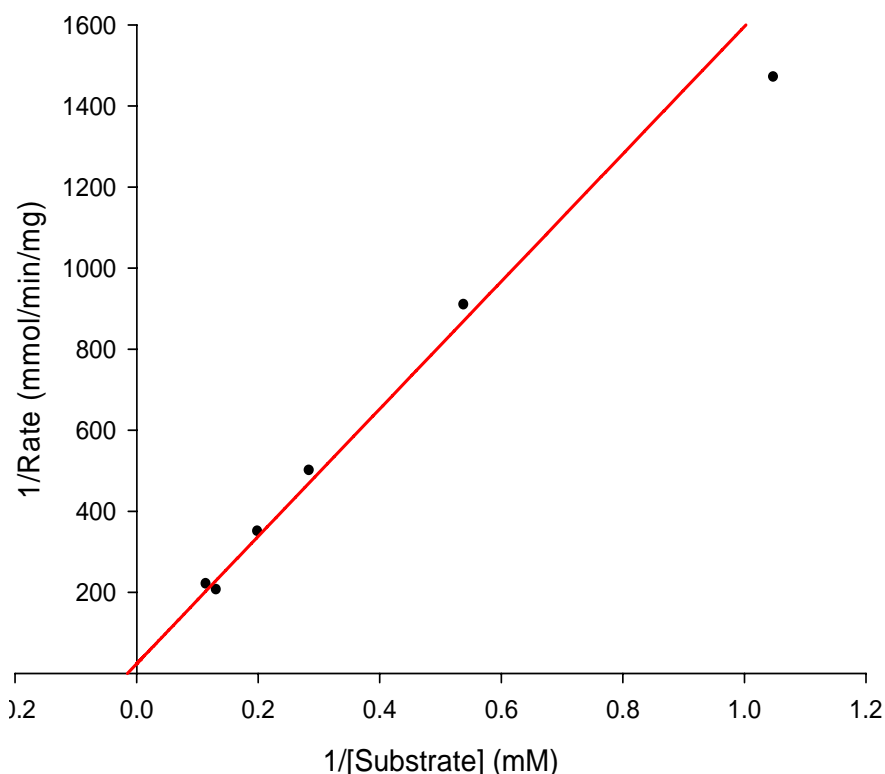


Figura 3.8 Representación de los dobles recíprocos 1/[S] frente a 1/v. (Lineweaver-Burk) en presencia del inhibidor 1-DNJ.

El efecto inhibitorio del 1-DNJ es competitivo para el sustrato maltosa, la ecuación de la recta que presenta al realizar la grafica de los dobles recíprocos es $y=1366.6x+86.202$, el valor de la pendiente es mayor a la obtenida en ausencia de inhibidor por tanto el valor de $K_{m_{ap}}$ aumenta (15.85mM), se observa también que el valor de $V_{max_{ap}}$ permanece constante (0.01 mmol/min), la constante de inhibición K_i es igual a 4.449×10^{-4} mM y el porcentaje de inhibición calculado de acuerdo a los datos de K_i y de concentración de sustrato es del 14.32%.

Cálculos para determinar la constante de inhibición K_i y %I

$$K_i = \frac{(K_m[I])}{K_{m_{ap}} - K_m} = \frac{13.6mM \times 7.36 \times 10^{-5} mM}{15.85mM - 13.6mM} = 4.449 \times 10^{-4}$$

$$\%I = \frac{100 \times [I]}{[I] + K_i} = \frac{100 \times 7.36E - 05}{7.36E - 05 + 4.449E - 04} = 14.32$$

Las figuras 3.9 y 3.10 muestran el efecto del inhibidor competitivo sobre la cinética de la reacción enzimática de la alfa glucosidasa (maltasa), se pueden observar ambas

curvas tanto en presencia como en ausencia del inhibidor. En la representación de los dobles recíprocos la pendiente de la recta en presencia del inhibidor aumenta, por lo que esta se mueve en contra de las manecillas del reloj a partir del punto de intersección ($1/V_{max}$ en el eje $1/v$), con respecto a la recta control.

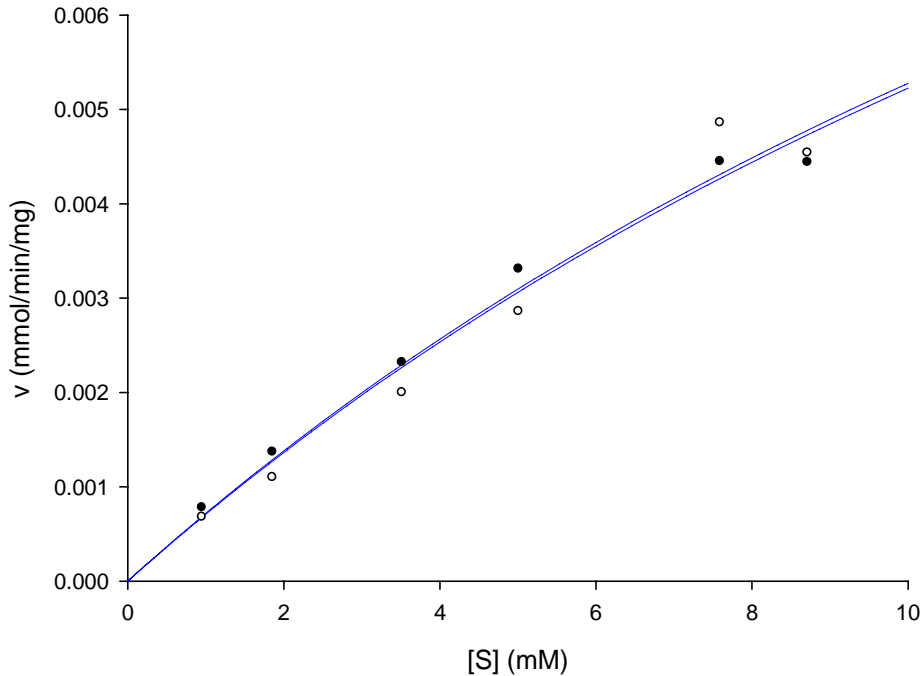


Figura 3.9 Representación de la curva de Michaelis-Menten $[S]$ frente a v , de la actividad de la alfa glucosidasa en presencia y ausencia del inhibidor. $\bullet I=0$, $\circ I=0.01215$ mg/ml

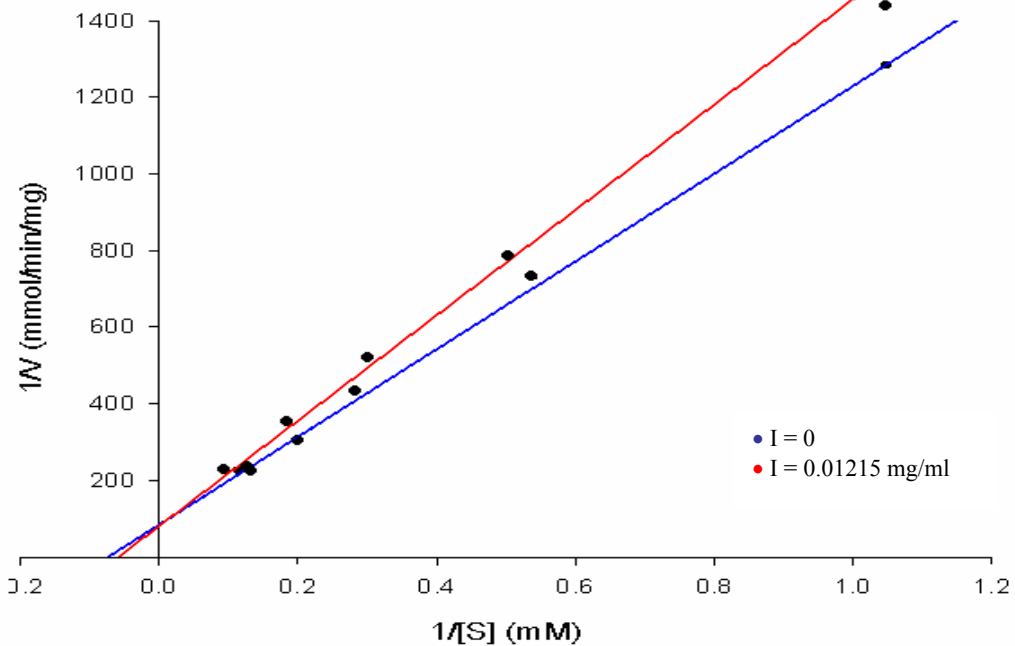


Figura 3.10 Representación de los dobles recíprocos $1/[S]$ frente a $1/v$, de la actividad de la alfa glucosidasa en presencia y ausencia del inhibidor