

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA



**ESTUDIO DEL PERFIL QUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIRADICAL DE VARIEDADES DE
MORUS ALBA EN VENEZUELA. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE
METABOLITOS EN LAS VARIEDADES BOCONÓ, MARACAY, TACHIRA Y YU-62.**

Trabajo Especial de Grado presentado ante
la Ilustre Universidad Central de Venezuela,
por el T.S.U. José Johnatan Quintero Meza,
para optar al título de Licenciado en
Química.

Caracas, Febrero 2016.

Nosotros, Profesora María Rodríguez, Investigador del Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y Dr. Ramon Rea, Investigador del centro de biotecnología agrícola del instituto de estudios avanzados (IDEA)

Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

“ESTUDIO DEL PERFIL QUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIRADICAL DE VARIEDADES DE MORUS ALBA EN VENEZUELA. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE METABOLITOS EN LAS VARIEDADES BOCONÓ, MARACAY, TÁCHIRA Y YU-62”

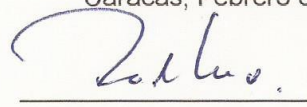
Que presenta el TSU. José Johnatan Quintero Meza, para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en el centro de biotecnología agrícola del Instituto de estudios avanzados (IDEA) y en el Laboratorio de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo nuestra dirección, durante los años 2013 y 2014, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, Febrero de 2016.



Dra. María Rodríguez.

(Directora).



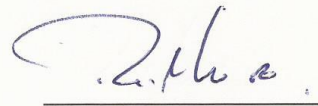
Dr. Ramón Rea.

(Director).

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: "ESTUDIO DEL PERFIL QUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIRADICAL DE VARIEDADES DE *MORUS ALBA* EN VENEZUELA. ANÁLISIS CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE METABOLITOS EN LAS VARIEDADES BOCONÓ, MARACAY, TÁCHIRA Y YU-62". Presentado por el TSU. José Johnatan Quintero Meza, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



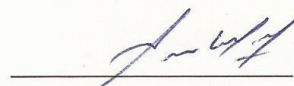
Dra. María Rodríguez.
(Directora).



Dr. Ramón Rea.
(Director).



Dra. Beth Díaz
(Jurado).



Dra. Sandy Molina
(Jurado).

Índice

	Página
1.- Introducción.....	5
2.- Morera.....	7
2.1.- Taxonomía, origen y distribución.....	7
2.2.- Valor nutricional (carbohidratos y aminoácidos).....	8
3.- Metabolitos secundarios.....	10
3.1.- Compuestos fenólicos.....	11
3.1.1.- Flavonoides.....	12
3.2.- Saponinas.....	13
4.- Antioxidante y antiradical.....	15
5.- Cromatografía de capa fina de alta eficiencia (densitometría óptica y TLC).....	18
6.- Antecedentes.....	19
7.- Objetivos.....	24
8.- Procedimiento experimental.....	25
8.1. – Material vegetal.....	25
8.2- Equipos, materiales y reactivos.....	25
8.3.- Procedimiento de extracción.....	28
8.3.1.- Extracción de proteínas.....	28
8.3.2.- Extracción de carbohidratos y aminoácidos.....	28
8.3.3.- Extracción de fenoles solubles y fenoles ligados a la pared celular.....	29
8.4.- Cuantificación de proteínas, carbohidratos, aminoácidos y fenoles totales en cuatro variedades de <i>Morus alba</i>	30
8.4.1.- Cuantificación de proteínas como albúmina.....	30
8.4.2.- Cuantificación de carbohidratos como glucosa.....	31
8.4.3.- Cuantificación de aminoácidos como L-prolina.....	31
8.4.4.- Cuantificación de fenoles como ácido clorogénico.....	32
8.5- Análisis por TLC. Condiciones de análisis	33

8.6- Cuantificación de saponinas y Rutina (Flavonoide) por el método de HPTLC.....	34
8.7- Análisis de la actividad antiradical de los extractos de morera. Reducción de DPPH.....	34
8.8- Análisis estadístico.....	35
9.- Discusión de resultados.....	36
9.1.- Análisis cualitativo. Visualización del perfil químico de las variedades estudiadas de Morera (Boconó, Maracay, Táchira y Yu-62).....	36
9.1.1.- Aminoácidos.....	37
9.1.2.- Carbohidratos.....	38
9.1.3.- Compuestos fenólicos.....	38
9.1.4.- Saponinas.....	41
9.2.- Cuantificación de proteínas, carbohidratos, aminoácidos y fenoles totales en las variedades de Morus alba (Boconó, Maracay, Táchira y Yu-62).....	42
9.2.1.- Metabolitos primarios.....	44
9.2.1.1.- Cuantificación de L- prolina libre en las variedades de <i>Morus alba</i> : Táchira, Maracay, Boconó, Yu-62.....	45
9.2.1.2.- Cuantificación de carbohidratos en las variedades de <i>Morus alba</i> : Táchira, Maracay, Boconó, Yu-62.....	48
9.2.1.3.- Cuantificación de proteínas en las variedades de <i>Morus alba</i> : Táchira, Maracay, Boconó, Yu-62.....	52
9.2.2.- Cuantificación de fenoles totales en las variedades de Morus alba: Táchira, Maracay, Boconó, Yu-62. (Metabolitos secundarios).....	56
9.3.- Cuantificación de rutina por HPTLC.....	61
9.4.- Actividad antiradical.....	64
9.5.- Análisis estadístico general.....	68
10.- Conclusiones.....	70
11.- Recomendaciones.....	72
12.- Referencias bibliográficas.....	73
13.- Anexos.....	79

Resumen

En el presente trabajo se realizó el estudio de los principales metabolitos primarios, secundarios así como la evaluación de la actividad antiradical de los extractos metanólicos de las cuatro variedades (Táchira, Boconó, Maracay y Yu-62) del género *Morus*, especie alba, cultivadas en Venezuela. Los estudios iniciales corresponden al desarrollo de un perfil cualitativo, por medio de la técnica de cromatografía de capa fina (TLC), de los metabolitos primarios y secundarios presentes en estas especies y posteriormente, la cuantificación de estos metabolitos por relación de marcadores quimiotaxonómicos L-prolina (aminoácidos), rutina (compuestos fenólicos, flavonoides glicosilados), diosgenina (saponina) y sacarosa, glucosa (carbohidratos). Sin embargo, debido a la poca cantidad de muestra foliar utilizada en los ensayos, no fue posible detectar la presencia de saponinas en las cuatro variedades y Rutina en dos de ellas (Yu-62 y Bocono). La cuantificación de los metabolitos primarios y secundarios se realizó a través de ensayos colorimétricos encontrándose valores para aminoácidos: Táchira $4,50 \pm 0,06$ mg/g, Boconó $4,39 \pm 0,22$ mg/g, Yu-62 $3,34 \pm 0,18$ mg/g y Maracay $1,96 \pm 0,10$ mg/g. Carbohidratos solubles: Táchira $51,59 \pm 1,06$ mg/g, Boconó $76,23 \pm 3,88$ mg/g, Yu-62 $68,61 \pm 3,37$ mg/g y Maracay $68,15 \pm 3,28$ mg/g. Proteínas: Táchira $21,41 \pm 0,06$ mg/g, Boconó $21,24 \pm 0,83$ mg/g, Yu-62 $6,86 \pm 0,31$ mg/g y Maracay $23,81 \pm 1,13$ mg/g. Fenoles totales: Táchira $22,19 \pm 0,49$ mg/g, Boconó $22,96 \pm 0,77$ mg/g, Yu-62 $24,01 \pm 0,95$ y Maracay $14,23 \pm 0,16$ mg/g, todos calculados con respecto a una base húmeda. Los análisis estadísticos plantean que se presentan similitudes entre las variedades para estos metabolitos como son los casos de Táchira y Boconó para proteínas y aminoácidos, Yu-62 y Maracay para carbohidratos, Yu-62 y Boconó para fenoles ligados a la pared celular. La cuantificación de rutina se realizó por la técnica de HPTLC encontrando valores de $0,87$ mg/g para Táchira y $1,36$ mg/g para Maracay. La concentración de rutina en las variedades Yu-62 y Boconó no fue cuantificada pues el método no era capaz de detectar la cantidad de este metabolito presente en estas muestras. Se evaluó también la capacidad antiradical de las variedades analizadas

encontrando que la variedad Táchira presentó a la mayor capacidad antiradical con un IC_{50} : $(553,58 \pm 3,23)$ $\mu\text{g/mL}$ seguida de Maracay IC_{50} : $(1054,01 \pm 1,76)$ $\mu\text{g/mL}$, Boconó IC_{50} : $(1398,93 \pm 2,23)$ $\mu\text{g/mL}$ y Yu-62 IC_{50} : $(3817,89 \pm 18,08)$ $\mu\text{g/mL}$.

Palabras claves: Morus alba, variedades, metabolitos primarios, metabolitos secundarios, perfil cualitativo, cuantificación, capacidad antiradical.

1.- Introducción.

El mejoramiento del sector agroalimentario se enfoca en la optimización de los recursos primarios y por lo tanto en la calidad de la materia prima. En el sector ganadero o de cría de animales para el consumo, se buscan diferentes opciones para que la alimentación del mismo se haga de manera que sea rentable y se pueda mantener en el tiempo con resultados satisfactorios. Esto motivado a factores negativos que afectan la productividad como es la poca disponibilidad de pastizales, el bajo valor nutricional y que son influenciados por las épocas de lluvia y sequía en Latinoamérica.^[1]

Las investigaciones se realizan en torno a especies vegetales de fácil crecimiento, con adaptabilidad al medio ambiente donde se desarrolla la actividad productiva, fácil control de plagas y que cumpla con los requerimientos nutricionales que aporten beneficios al crecimiento del animal. Es por ello, que los estudios se han concentrado en plantas leñosas nativas e introducidas que no son utilizadas frecuentemente en los sistemas de producción del sector agrícola.^[2] Entre los tipos de plantas que pueden ser utilizadas como sistemas silvopastoriles se encuentran árboles y arbustos con potencial forrajero, debido a que presentan un elevado contenido de proteínas (superior a 20%) y una alta digestibilidad.^[3]

En este sentido, las especies del género *Morus* sobresalen como fuentes forrajeras constituyendo una buena opción para la alimentación animal debido a que presenta excelentes condiciones de: adaptabilidad, composición química, disponibilidad, degradabilidad por parte del animal y producción de biomasa^[1] presentando un comportamiento particular en cuanto a su cultivo, manejo y sistemas de explotación.^[2]

Los estudios realizados en Venezuela sobre *Morera* comenzaron en el año 2006, sin embargo, la literatura sobre el tema es escasa. Las investigaciones han estado enfocadas fundamentalmente al comportamiento de la planta en fase de vivero, en la alimentación de cabras en desarrollo y productoras de leche, evaluación del crecimiento

de conejos, valor nutritivo y arreglos alimenticios. ^[2] A nivel global, son conocidos los valores para variedades de especies de *Morera* correspondientes a los análisis bromatológicos y han sido identificadas (en algunos casos cuantificados) algunos de los metabolitos secundarios presentes en la planta para diferentes especies y de diferentes regiones geográficas. Sin embargo, en Venezuela no se tiene esta información sobre las variedades actualmente cultivadas. En el país, el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) ha colectado material de siembra de diferentes localidades del país, desconociendo las relaciones genéticas (ISSR IDEA) entre ellas, así como el perfil químico y capacidad antioxidante de las variedades colectadas. Este trabajo se enfocará en la cuantificación de algunos de los metabolitos secundarios presentes en variedades de *Morus* colectadas en el país, la identificación de algunos de compuestos pertenecientes a grupos de estos metabolitos y la capacidad antioxidante de las mismas, que puede ser muy beneficiosa para la salud.

La importancia de la realización de este trabajo recae en la información inicial que podrá suministrar al investigador sobre esta planta (*Morera*), ya que proporcionará una serie de datos sobre metabolitos primarios y secundarios (fenoles y saponinas específicamente) de cuatro variedades presentes en Venezuela (Maracay, Táchira, Boconó, Yu-62) que no habían sido estudiadas con anterioridad y que permitirán comparaciones al modificar variables de ensayo, condiciones ambientales y/o otros parámetros a analizar para una posterior caracterización más exhaustiva de esta,

2.- Morera.

2.1.- Taxonomía y origen.

La morera es un árbol o arbusto de porte bajo, con hojas verde claro brillosas, venas prominentes blancuzcas por debajo y con la base asimétrica. [7] Sus frutos son de color morado, blanco, negro o rosado-blanco y tienen una longitud de 5cm. [8]



Morus alba: Fuente (de izquierda a derecha):

<http://www.asturnatura.com/fotografia/flora-ornamental/morus-alba-pendula-3/7249.html>

<http://foro.fuentepermacultura.org/index.php?topic=349.0>

<http://elfogondelena.blogspot.com/2013/04/mora-morus-alba.html>

Figura 1. Árbol y frutos de la especie *Morus alba*.

2.1.1.- Clasificación taxonómica [1], [4]

- Reino: Plantae.
- División: Spermatophyta.
- Clase: Angiosperma.
- Subclase: Dicotiledónea.
- Orden: Urticales.
- Familia: *Moraceae*.
- Género: *Morus*.
- Especie: alba, nigra, indica, laevigata, bombycis. (Las más conocidas)

2.1.2.- Origen y distribución.

La morera es una planta proveniente de los países asiáticos cuyo uso para la sericultura, propició su distribución a otros continentes así como un gran proceso de selección y mejoramiento del género. Esto ha propiciado la creación y extensión de una gran cantidad de variedades con excelente producción de biomasa, calidad nutritiva y alta resistencia al ataque de plagas y enfermedades, para un amplio rango de condiciones de clima y suelo. ^[2]

Existen un total de 24 especies agrupadas en el género *Morus* y una subespecie con al menos 100 variedades conocidas. ^[5] Entre las especies más conocidas, se encuentran *M. alba*, *Morus nigra*, *Morus indica*, *Morus laevigata* y *Morus bombycis*. Estas especies se encuentran distribuidas por casi todo el mundo, desde áreas templadas (hasta una altitud: 4000 m) hasta zonas tropicales (secas y húmedas). ^[6] Los lugares en donde se agrupan se han dividido en 5 regiones: ^[1]

1. Este del continente Asiático.
2. Archipiélago de Malasia.
3. Suroeste de Asia,
4. Norte, Centro y Sur América.
5. Oeste de África.

2.2.- Valor nutricional:

- Inicialmente su uso más extendido es en la sericultura (cría del gusano de seda).
- Es consumida como alimento por los humanos debido a sus propiedades medicinales (frutas, tallos y hojas).
- Alimento para animales.

Para consumo humano se ha utilizado para la fabricación de vinos (amplio consumo en Europa), colorantes para los alimentos, jugos, elaboración de postres, infusiones (hojas), tratamiento de algunas enfermedades. ^[5] ^[9]

El valor nutricional de la morera es conocido por su especial contenido de proteínas, carbohidratos y aminoácidos que son los que participan directamente en el mantenimiento del ciclo vital de los organismos vivos.

Los carbohidratos son la fuente principal de energía en los organismos. Estos metabolitos constituyen un papel importante en la recuperación de la poda en las plantaciones de morera. ^[10] Las proteínas juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas ya que participan en diferentes procesos como el transporte de electrones, transporte de enzimas a través de las membranas celulares, generación de energía ^[11] (entre otras), siendo este último proceso, un elemento muy importante para la alimentación de animales, lo cual ha propiciado muchos trabajos hacia su efectividad en la dieta de animales de cría: Blanco, Sierra. 2005 (conejos); González, Cáceres. 2002 (ovinos); Medina.et al. 2012 (vacas); Hurtado et al. 2012 (cuyes).

Los aminoácidos tienen que ser biosintetizados por la misma planta debido a que no tienen otra forma de obtenerla así como los animales. Son las unidades primarias para la formación de las proteínas y ya que estas tienen un periodo limitado necesita estar completamente abastecida de los 20 aminoácidos esenciales para cumplir su objetivo de desarrollo y crecimiento. ^[11]

En la literatura, algunos autores han realizado estudios encaminados a cuantificar estos compuestos, resaltando los trabajos de:

- **García, et al., (2005)** ^[9] **(Cuba)**: realizaron estudios sobre la cuantificación de carbohidratos solubles en cuatro variedades de morera: Cubana, indonesia, tigreada y acorazonada encontrándose valores de (11,78-19,85) % en hojas y (3,86-10,92) % en tallos.
- **González, Cáceres (2002)** ^[12] **(Cuba)**: en su estudio se basaron en la determinación del valor nutritivo de especies forrajeras para los rumiantes: kenaf (*Hibiscus cannabinus*), yuca (*Manihot sculenta*), aralia (*Polyscias guilfoylei bailey*), morera (*Morus alba*), cayena (*Hibiscus rosa-sinensis*), amapola (*Malvaviscus arboreous*), leucaena (*Leucaena leucocephala cvs. Cunningham* y *CNIA-250*), bauhinia (*Bauhinia purpurea*), albizia (*Albizia lebbeck*), mata raton (*Gliricidia sepium*), y erythrina (*Erythrina berteroana* y *Erythrina poeppigiana*). Las variables analizadas fueron: materia seca, materia orgánica, proteína cruda y fibra cruda. La determinación se realizó en base a la digestibilidad de grupos de ovinos obteniéndose resultados para la morera de: 22,7%: PLL (periodo lluvioso) y 23,1%: Pnll (periodo no lluvioso) en proteína cruda.
- **Blanco, Sierra (2005)** ^[6] **(Colombia)**: mencionan en su trabajo, la composición de aminoácidos de cuatro especies arbóreas (entre la que se encuentra la morera) presentes en la semilla, tallos, hojas y fruto citándolo de la revista de Ciencias Pecuarias Colombianas (no menciona información sobre la revista).

3.- Metabolitos

El metabolismo se constituye de un conjunto de reacciones químicas concatenadas con el fin de transformar compuestos complejos en sustancias más simples, necesarias para el correcto funcionamiento del organismo. Estas sustancias son denominadas

como metabolitos primarios porque provienen de procesos importantes para el mantenimiento de la vida (aminoácidos, carbohidratos, proteínas).^[17] En el caso de las plantas y de algunos animales, en forma paralela, se biosintetizan otras sustancias que no influyen en los procesos vitales, sino que cumplen otras funciones de protección y defensa contra agentes externos, en otras palabras; la biosíntesis, transformación y degradación de sustancias que atentan contra la estabilidad del sistema por medio de compuestos especializados para tales fines. Estos son denominadas como metabolitos secundarios ^[17] ^[18]. En el caso de este trabajo se estudiaron los compuestos fenólicos (fenoles totales y flavonoides) y los glicósidos (saponinas específicamente).

3.1- Compuestos fenólicos.

Son todas aquellas sustancias que contienen en su estructura la presencia de fenol unida a otras estructuras aromáticas y/o alifáticas. Comprenden desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como las ligninas (polímeros ramificados) y los taninos (polímeros unidos a proteínas). Además, entran en esta clasificación, los flavonoides, las cumarinas (familia de lactonas), los fenil propanoides (contienen un anillo de benceno y una cadena lateral de 3 carbonos) ^[17]. Una de las excepciones a esta definición son los ácidos shikimico y quinico que no poseen anillos aromáticos en su estructura. ^[19]

Los compuestos fenólicos en las plantas son frecuentemente una referencia de los metabolitos secundarios presentes en estas, ya que muchos de estos juegan un papel importante en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas y la interacción de estos con otros sistemas. ^[23] Además, los compuestos fenólicos contribuyen a la identificación de sabores, olores y colores de las plantas y frutos comestibles: son los que producen una sensación de degustación en los seres vivos: entre ellos la familia de flavonoides

3.1.1- Flavonoides.

Los flavonoides son compuestos que se caracterizan por tener una estructura con un esqueleto común correspondiente a un sistema básico cuyo arreglo es ($C_6-C_3-C_6$) (dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo).

Se encuentran generalmente como mezclas de agliconas y glicósidos (mayor proporción). Pueden encontrarse unido a 1 ó 3 unidades de azúcares siendo las más comunes glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa. Se encuentran en todas las partes de la planta. ^[24]

En función al grado de oxidación e insaturación del anillo heterocíclico se pueden obtener diferentes estructuras con diferentes funciones. Los flavonoides se encuentran hidroxilados generalmente en las posiciones 3, 5, 7, 3', 4', 5' y su clasificación se debe al factor sobre la posición 3. A cambio los flavanoles, flavanonoles, flava-3,4-dioles o leucoantocianinas, antocianidinas, proto-antocianidinas o taninos condensados presentan sustitución en el C_3 . Por el contrario, las isoflavonas, flavonas, flavanonas no se presentan. ^[25]

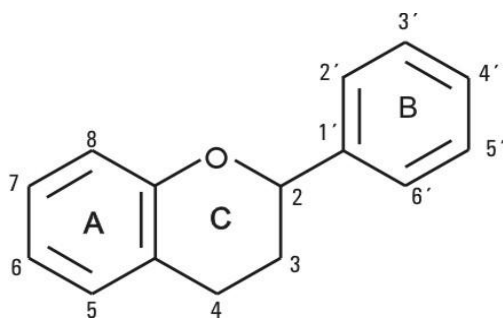


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.

En la especie *Morus alba* se ha determinado el contenido de flavonoides totales especialmente a sus compuestos mayoritarios quercitina y rutina, para los cuales se encuentran valores reportados para cada compuesto.

Otros flavonoides presentes en la morera: isoquercitina, luteína, astragalina, quercitina 3,7-diglicosido, quercitina 3-glucosido, chalconoracina ^[26]

Los flavonoides y polifenoles en las plantas y frutos constituyen una fuente natural de agentes antioxidantes. La mayor actividad se presenta en sistemas *in vitro* ya que estabiliza los radicales donando electrones o átomos de hidrogeno mientras en sistemas *in vivo* es baja su actividad debido a los factores de baja absorción y disponibilidad, además de una alta tasa de degradabilidad. ^[27]

La actividad antioxidante de los flavonoides se enfoca en su capacidad como agentes quelantes del hierro, inhibidores de oxidasas y atrapa radicales libres (interfieren en la reacción de propagación de estos y en su formación). ^[28]

Un ejemplo de esta actividad es que los flavonoides, pueden inhibir la peroxidación de lípidos mediante la intercepción de radicales peroxilos formados en las membranas nodulares. La habilidad de filtrar la luz de algunos de estos compuestos, puede reforzar su potencial antioxidante el cual provee una elevada protección sobre los daños oxidativos que puedan ser generados térmicamente o por la acción de la luz en cloroplastos u otros organelos de la planta. ^[23]

3.2- Saponinas

Las saponinas son estructuras que pueden ser glicosiladas (su estructura principal está unida a unidades de azúcares) o no (agliconas) cuya unidad principal está conformada por triterpenos o esteroides. Pueden ser utilizadas para la elaboración de detergentes (propiedades surfactantes).

Los triterpenos son compuestos con esqueletos carbonatados que contienen 6 unidades de isopreno. Tienen estructuras complejas funcionalizadas las cuales se

pueden encontrar como anillos tetracíclicos o pentacíclicos. ^[24] Por otro lado, los esteroides son compuestos parecidos a la estructura tetracíclica con 27 átomos de carbono o más. ^[29]

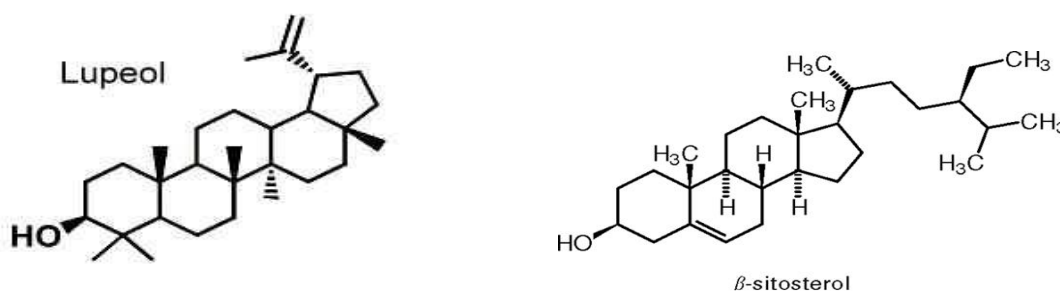


Figura 3. Triterpeno y esteroil. (De izquierda a derecha).

Las saponinas triterpénicas son las más abundantes en la naturaleza y muchas de ellas solo se diferencian por la cantidad de unidades de azúcares que contienen su estructura. En las plantas se encuentran principalmente en la clase angiosperma dicotiledóneas. ^[29]

Las saponinas esteroidales son fuentes principales para la elaboración de productos farmacéuticos (ejemplo: hormonas sintéticas). Se encuentran exclusivamente en la clase angiosperma monocotiledóneas. ^[29]

En la literatura se puede citar específicamente para la especie *Morus alba*, un estudio sobre saponinas presentes en hojas y tallos, en el cual se cuantifica como contenido de saponinas esteroidales los valores en hojas: 14,38 mg/g de materia seca, para el período lluvioso y en los tallos: 2,52 mg/g de materia seca para el período poco lluvioso, siendo estos los niveles más altos obtenidos ^[30] García et al. (2005)

El efecto primario que posee las saponinas sobre la planta es la interacción con los compuestos celulares y la membrana ^[31]. Las saponinas actúan como mecanismo de

defensa químico contra microorganismos patógenos siendo importante para la supervivencia de las plantas. La diversidad de estructuras de las saponinas se refleja en sus diferentes propiedades biológicas y fisicoquímicas, además de los múltiples usos en la fabricación de jabones, antimicrobianos, anticancerígenos, hemolíticos entre otros ^[31] siendo una de las características más conocidas de esta, la actividad hemolítica y propiedades que permiten la formación de espuma ^[32]. Posee efectos nutricionales positivos tales como efectos hipercolesteromícos y crecimiento en animales. Estos aspectos son importantes para el bienestar humano ^[31]. Sin embargo, las saponinas glicoalcaloides producen efectos antinutricionales que son tóxicos para todo ser vivo, lo cual crea la necesidad de eliminar este tipo de químico cuando estén presentes en alimentos ^[32], además afectan la permeabilidad de células de la mucosa intestinal impidiendo la absorción total de nutrientes ^[31]. Para la morera las saponinas identificadas en la literatura son del tipo esterooidal y por su género se espera también la presencia del tipo triterpénica.

4.- Actividad antioxidante, antiradical.

Se dice que una sustancia tiene propiedad antioxidante cuando es capaz de neutralizar la acción oxidante de una molécula inestable (radicales libres) sin perder su propia estabilidad electroquímica. ^[25] La actividad antioxidante está determinada por: 1) reactividad química del antioxidante, 2) capacidad antioxidante para acceder al sitio de reacción y 3) estabilidad de los productos formados después del proceso de estabilización de radicales. ^[27]

En las plantas se encuentran presentes muchos compuestos fenólicos con potencial antioxidante tales como flavonoides, taninos, ligninas que pueden trabajar como compuestos capaces de atrapar radicales actuando mediante un conjunto de

reacciones REDOX. ^[23] Y estas propiedades antioxidantes presentes son de gran utilidad en la industria médica y farmacéutica.

La morera posee propiedades farmacológicas importantes debido a la presencia de estos compuestos, de los cuales se han identificado ácidos fenólicos, vitaminas, flavonoides y terpenos que pueden proteger de patologías producidas por el estrés oxidativo, atribuyéndole además, efectos terapéuticos como por ejemplo actividad cardiotónica, antiinflamatoria etc. ^[33] ^[34]

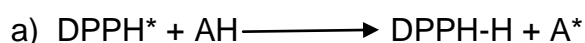
Al comparar la actividad antiradical con la actividad antioxidante se tiene que la primera se caracteriza por la reactividad de la especie antioxidante frente a radicales libres donde influye la velocidad de la reacción, mientras que para la restante, mide la capacidad para retardar la degradación oxidativa, por lo tanto no necesariamente una alta actividad antiradical implica una alta actividad antioxidante debido a que hay algunos compuestos fenólicos sintéticos que funcionan como antiradical, pero como antioxidante moderado. Para realizar una determinación de la actividad de antioxidantes naturales o actividad antiradical se utiliza el ensayo con DDPH (1,1 Difenil-2-picrihidrazil), un radical estable en solución que reaccionara directamente con estos compuestos, ^[27] ^[35] siendo un método indirecto.

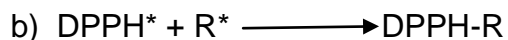
Reacciones involucradas:

- a) El efecto de los antioxidantes sobre el DPPH* se centra en su capacidad de donar un hidrogeno a este. ^[33]
- b) El radical DPPH reacciona con otro radical ó hidrogeno radical para formar una molécula diamagnética estable. ^[20].

Así

AH: molécula antioxidante. R*: radical libre.





Por ello se puede cuantificar por espectrofotometría el decrecimiento de la absorbancia del radical en función de la concentración del antioxidante presente, cuya característica es que tiene la capacidad de estabilizar por resonancia su forma radical.

El valor que se obtiene IC_{50} permite realizar comparaciones sobre la actividad antioxidante de un extracto indirectamente (cantidad de muestra requerida para reducir el 50% la concentración inicial de DPPH en el periodo de tiempo específico). Valores pequeños indican una alta actividad. [35] [36]

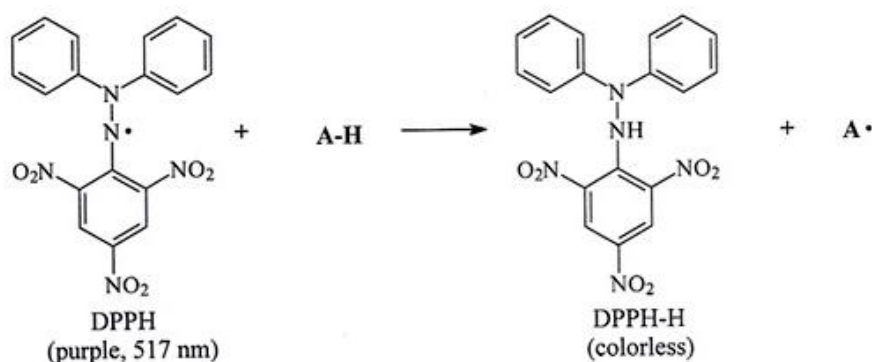


Figura 4. Estructura del DPPH antes y después de reaccionar.

La actividad antioxidante es importante en las plantas porque constituye un mecanismo de protección contra el estrés oxidativo: Según Arrete Lacalle (2007) [37] el mecanismo antioxidante comprende tres grupos: primario (previene la formación de los radicales libres), secundarios (capturan los radicales “seguros” evitando que reacciones en cadena) y terciario (“reconstruyen” las biomoléculas dañadas por la acción de los radicales libres). La aparición de radicales libres por efecto del estrés en los seres vivos desequilibran los sistemas biológicos produciendo daños que pueden desencadenar en patologías. Es por ello la importancia de su consumo, para la regulación de esta serie de reacciones por medio de alimentos naturales bien sea vía oral o tópica

5.- Cromatografía de capa fina de alta eficiencia (HPTLC)

Entre las herramientas analíticas modernas se encuentra el HPTLC que es un método muy poderoso con el que se puede hacer análisis cualitativo y cuantitativo de muestras complejas: no sustituye el método de HPLC, pero se considera un método complementario ^[38]. Esta técnica combina una aplicación de la muestra en forma automatizada y un escáner densitométrico que proporciona una alta sensibilidad para los ensayos a realizar. Estos son características nuevas en comparación de la técnica aplicada tradicionalmente y que constituyen una mejora sustancial en la obtención de datos en forma, exacta, precisa y rápida.

La técnica consiste en la aplicación de la cromatografía de capa fina con un método en donde la introducción de la muestra (siembra en la placa cromatográfica) es automatizada permitiendo en su fase final la detección precisa por densitometría (por medio de un escáner fotográfico) en donde la información obtenida es procesada en el ordenador como medida de la absorción y/o fluorescencia de los compuestos separados y que mediante la utilización de sustancia patrones, hace una relación lineal de esa intensidad registrada con la concentración del compuesto de estudio. Los datos obtenidos son presentados como cromatogramas y el tratamiento es el mismo que para la técnica de cromatografía en general. ^[39]

En la literatura se encuentran análisis por cromatografía de capa fina como herramienta para realizar separaciones de compuestos específicos en forma cualitativa como test de prueba para la utilización de otros métodos si son necesarios. Uno de los casos citados (Guevara, et al 2007) es la separación y purificación de un alcaloide proveniente de un extracto de *Morus indica* en la cual se utilizaron placas cromatograficas con silicagel con indicador fluorescente, como fase móvil cloroformo – metanol (6:4) y como agente revelador el reactivo de Dragendoff. ^[40]

6.- Antecedentes.

En la literatura encontramos investigaciones de diferentes autores que han determinado la composición de los compuestos flavonoides, proteína cruda, proteína bruta, en diferentes variedades y especies del género *Morus*, tal como se reseña a continuación. La mayoría de los trabajos proceden de investigaciones realizadas fundamentalmente en países asiáticos como por ejemplo: China (Zhishen et al, 1999), Pakistán, (Cheema et al 2011; Imran et al, 2010; Sajjad et al, 2009; Memon et al 2010); India (Rana et al 2006; Kumar et al, 2011; Mahadeva et al 2011; Reddy et al. 2013) Irán (Karami et al. 2010), Japón (Katsube et al. 2006), Corea (Bae. et al 2007) Tailandia (Wanio et al. 2009) aunque también encontramos reportes de Serbia (Radojković et al, 2012); Grecia (Geraspopoulos et al. 1997) entre otros.

Los estudios realizados sobre morera en países latinoamericanos se adjudican en su mayor parte a Cuba, aunque encontramos estudios realizados en México (García et al, 2005; Rodríguez et al. 2012); Venezuela (Medina M, et al. 2009, 2012; Aguas et al. 2012; Moreno et al. 2005; García et al. 2006), Costa Rica (Benavides 1995; Boschini 2003; Boschini et al. 2009; Elizondo 2007) Colombia (Hurtado et al. 2012), destacando los estudios como planta forrajera para la alimentación de animales. (Véase valor nutricional).

- **[García, Ojeda. (2004)]** ^[22] **(Cuba):** realizaron estudios de contenido fenólico total utilizando el método de Folin-Dennis para cuatro variedades de morera (acorazonada, cubana, indonesia y tigreada) en hojas y tallos tiernos, siendo plantaciones de cuatro años de edad sometida a una frecuencia de corte de 90 días, observando la interacción variedad-fertilizante.

- **[García et al., 2006]** ^[41] **Venezuela.** Se enfocaron en determinar los valores correspondientes a los análisis bromatológicos para diferentes plantas con potencial forrajero (entre las que se encuentra la especie *Morus alba*). Encontraron fenoles, flavonoides, cumarinas, mucílagos, esteroides, saponinas y esteroides, detectando 1,50% de polifenoles (como equivalente de ácido tánico) y 0,07% de alcaloides. Estas plantas analizadas constituyen una fuente de forraje importante siendo significativo el aporte de la especie *Azadirachta indica*, como alimento para rumiantes.
- **[Martín et al., 2007]** ^[42] **Cuba** Presentan un estudio de nueve variedades de morera perteneciente a la especie *Morus alba*, entre las cuales se encontraban 3 híbridos, realizando análisis que van desde la caracterización del germoplasma y su composición fitoquímica (en hojas y tallos). Se investigaron 15 grupos de metabolitos secundarios: fenoles, flavonoides, cumarinas, carbohidratos solubles, esteroides, alcaloides y saponinas. Cuantificaron carbohidratos solubles y aminoácidos, aunque no se mencionan los métodos analíticos utilizados. Se encuentran diferencias en los valores obtenidos entre las variedades estudiadas.
- **[Medina et al., 2009]** **Venezuela** ^[2] Realizan una investigación documental en la cual presentan aspectos sobre la ecología, taxonomía, composición nutricional y presentan valores obtenidos en otros estudios sobre la planta de manera general en el campo de metabolitos secundarios resaltando su importancia como recurso forrajero. En base a estos estudios llegaron a la conclusión de que la morera es una planta poco conocida en Venezuela y en las regiones de Suramérica (exceptuando Brasil), a pesar de su gran potencial en el desarrollo agropecuario siendo subutilizada debido a las condiciones.

- **[Memon et al., 2010]^[21] Pakistán.** Realizaron estudios de las especies de *Morus alba*, *nigra*, *laevigata* provenientes de Pakistán en hojas y frutos. Para el análisis de ácidos fenólicos utilizaron 3 diferentes tipos de extracción y para cada caso fue cuantificado los compuestos presentes por HPLC, siendo estos (en el caso específico de las hojas provenientes del *Morus alba*): ácido p-hidroxibenzoico, ácido vainillico, ácido clorogénico, ácido seringico, sirangealdehído y ácido m-cumarico. Es el primer trabajo que realizan sobre las variedades presentes en Pakistán aportando información de gran valor sobre esta especie para ser considerada para la comercialización de esta en el país.

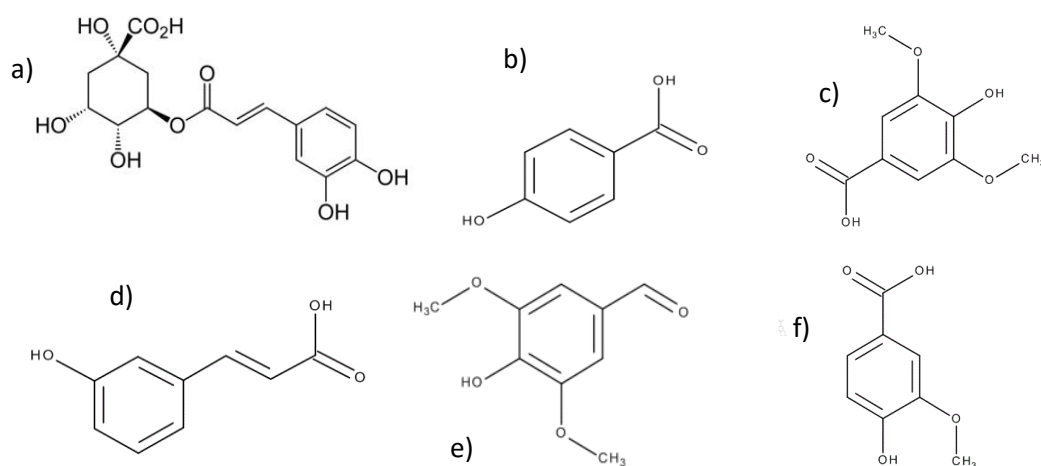


Figura 5. Compuestos identificados por Memon *et al.*, en *Morus alba*: a) ácido clorogénico, b) ácido p-hidroxibenzoico, c) ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico (Syringic acid), d) ácido 3-hidroxicinámico (ácido m-cumarico), e) 3,5-Dimetoxi-4-hidroxibenzaldehído (Syringaldehyde) y f) ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico (ácido vainillico).

- **[Radojkovic et al., 2012]^[20] Serbia.** Enfocaron sus estudios en las especies de morera: *Morus alba* y *Morus nigra* cultivadas en Serbia, de las cuales analizaron hojas, raíz y fruta. Entre los compuestos fenólicos cuantificados se encuentran

ácido gálico, ácido clorogénico, rutina (hoja, raíz, fruta); quercitina (fruta); ácido ferúlico, ácido sinápico (hoja, raíz) utilizando como técnicas HPLC y MS. Determinaron el contenido total de fenoles (TPC), contenido total de flavonoides (TFC) y la actividad antiradical en cada caso. Los resultados obtenidos contribuirán a la evaluación de nuevos suplementos dietéticos y productos alimenticios que sean beneficiosos para el ser humano, debido a que contienen una alta actividad antioxidante, así como de ácidos fenólicos que incrementan el potencial nutritivo y fitomedicinal de la planta. Los mayores valores obtenidos se encuentran para la raíz de la planta en comparación con las otras partes analizadas y para la variedad *Morus nigra*.

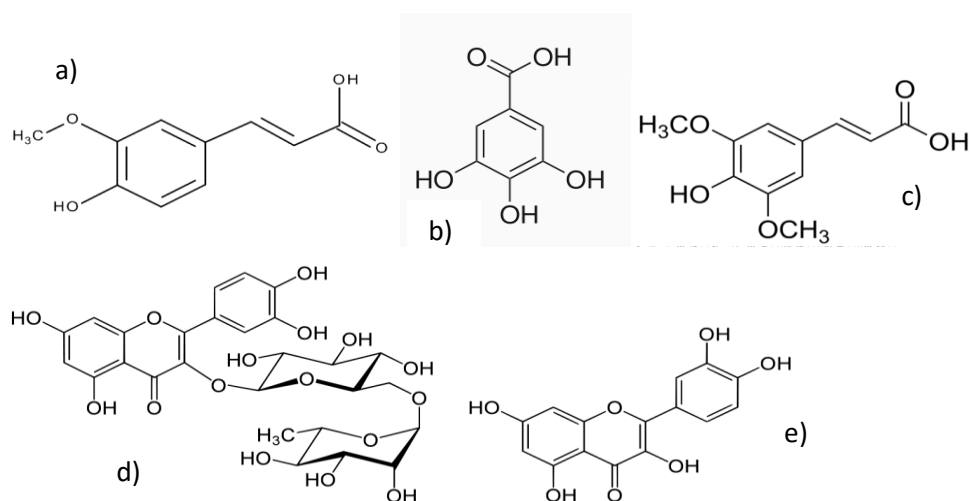


Figura 6. Compuestos identificados por Radojkovic *et al.*, en *Morus alba*: a) ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico), b) ácido gálico (ácido 3,4,5 trihidroxibenzoico), c) ácido sinápico (ácido 3,5-Dimetoxi-4-hidroxicinámico), d) rutina (quercetin-3-o-rutinosido) y e) quercitina.

- [Radojkovic *et al.*, 2012]^[43] **Serbia** realizaron un estudio sobre la morera en donde se aplica la metodología de superficie de respuesta para optimizar los parámetros para cuantificar fenoles totales como ácido clorogénico y flavonoides

como rutina, además de su actividad antiradical utilizando diferentes proporciones de solventes (etanol, agua), temperaturas diferentes, relación líquido- sólido y volumen del disolvente por gramo de materia prima para su extracción. Esta información le es de importancia a los productores de morera para la generación de productos de comercialización.

- **[Reddy and Urooj 2013]** ^[31] **India.** Realizaron estudios sobre el perfil fitoquímico, composición aproximada y la actividad antioxidante de variedades de *Morus indica* cuantificando: humedad, fibra total, fibra soluble, fibra insoluble, cenizas, proteínas, grasas, carbohidratos totales, azúcares totales, glucosa total, minerales (hierro, calcio, fósforo, sodio, manganeso, zinc, cobre, potasio, magnesio y cromo, los compuestos: α -tocoferol, β -caroteno, glutatión. Polifenoles, flavonoides, saponinas, alcaloides, saponinas esteroideas y taninos. La actividad antioxidante fue estudiada en dos sistemas: presencia de microsomas y en lípidos. Adicionalmente se cuantificó el contenido total de polifenoles utilizando 4 tipos de solventes y para el caso del extracto desclorificado: metanol, agua caliente, agua fría, metanol-agua (80:20) teniendo valores elevados para este último y bajo la condición del extracto anteriormente mencionada. Los resultados indican la gran importancia de la *Morus indica* para la formulación de alimentos y medicinas para el ser humano. No indican datos sobre las condiciones de cultivo de las plantas estudiadas.

7.- Objetivos

General

- 1) Estudiar el perfil químico y la actividad antiradical en variedades de *Morus alba*: Boconó, Maracay, Táchira y Yu-62.

Específicos

- 1) Desarrollar el perfil químico cualitativo de cuatro variedades de morera: Yu-62, Maracay, Táchira y Boconó.
- 2) Cuantificar el contenido de fenoles totales en cuatro variedades de morera: Yu-62, Maracay, Táchira y Boconó.
- 3) Cuantificar el contenido de aminoácidos libres (L-prolina) en cuatro variedades de morera: Yu-62, Maracay, Táchira y Boconó.
- 4) Cuantificar el contenido de carbohidratos solubles (glucosa) en cuatro variedades de morera: Yu-62, Maracay, Táchira y Boconó.
- 5) Cuantificar el contenido de proteínas (albúmina) en cuatro variedades de morera: Yu-62, Maracay, Táchira y Boconó.
- 6) Cuantificar el contenido de rutina en cuatro variedades de morera: Yu-62, Maracay, Táchira y Boconó por HPTLC.
- 7) Cuantificar el contenido de saponinas (diosgenina) en cuatro variedades de morera: Yu-62, Maracay, Táchira y Boconó.
- 8) Determinar la capacidad antiradical mediante la reducción de DPPH de los extractos metanólicos de las cuatro variedades de morera: Yu-62, Maracay, Táchira y Boconó.

8.- Procedimiento experimental.

8.1- Material vegetal:

Las variedades de *Morus alba* provienen de colectas realizadas por el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), las cuales son mantenidas en el invernadero del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Se tomaron en primera instancia, hojas de plantas y se limpiaron con agua y alcohol para su traslado al laboratorio en una cava con nitrógeno líquido. Las hojas fueron maceradas con nitrógeno líquido y almacenadas en un refrigerador a una temperatura de -80 °C para su posterior utilización. Las muestras pertenecen a cuatro variedades de moreras cultivadas en el país, denotadas como Maracay, Táchira, Boconó y Yu-62. Se tomaron muestras de hojas de tres plantas por variedad, por lo que cada planta/variedad fue considerada una repetición (R1, R2 y R3). Se usó un diseño experimental completamente al azar. En una segunda instancia se tomaron un total de 10 hojas provenientes de una planta por cada variedad y se procedió secarlas al aire libre por un periodo de tiempo de 1 semana para ser trituradas y maceradas en metanol para la preparación del extracto correspondiente.

8.2- Equipos, materiales y reactivos.

Equipos:

- Espectrofotómetro UV-vis. lambda 25. Perkin Elmer.
- Centrifugadora Eppendorf. Modelos: 5417-R, 5810-R.
- Baño de María. Lab companion BW-10G
- Espectrofotómetro Nicolet evolution 300. Thermo Electrón Corporation.
- Cámara fotográfica digital Panasonic Lumix DMC-F2 de 10 MP.

- Lámpara UV a dos longitudes de onda: 254 y 365nm. Marca MINERALIGHT®, modelo UVGL-25.

Materiales y reactivos.

- Tubos: Eppendorf: (0,5; 1,5; 2) mL, Falcon.
- Balones aforados: (500, 200, 100, 50, 25,10) mL.
- Micropipetas automáticas (20, 100, 200, 1000) μ L. pipetas graduadas de (0,5;5;10)mL
- Viales de 2 mL
- Morteros. Nitrógeno líquido.
- Albúmina de suero bovino, NaCl.
- D-glucosa, L-prolina, diosgenina, rutina, sacarosa, DPPH.
- Ácidos: HCl, CH₃COOH, H₂SO₄, clorogénico, HCOOH.
- Base: NaOH. Carbonato de sodio.
- Buffer de extracción para proteínas: Tris-HCl, urea, EDTA sal disódica, tween 20, fosfato diácido de sodio, β mercapto-etanol.
- Reactivo Folin-Ciocalteu. Reactivo de Benedict.
- Metanol, etanol, acetona, cloroformo, 2-propanol, n-butanol, cloroformo, acetato de etilo.Fenol.
- Vainillina, reactivo NP/PEG, α -naftol, nihindrina, bisulfito de sodio.
- Placas de silica G₆₀f250. Soporte aluminio.

Reactivos de coloración.

- **Vainillina-ácido sulfúrico (VA)**

Preparación: Mezcla (1:1) de vainillina etanólica al 1% y ácido sulfúrico etanólico al 5 % (v/v). (La placa de CCF se rocía primero con la mezcla de vainillina luego con el ácido

sulfúrico y, finalmente, se calienta a 110 °C por 5- 10 min. Algunas saponinas presentan coloración amarilla.

- **α - Naftol en ácido sulfúrico. Prueba de Molisch**

Preparación: 0,5 g de alfa naftol en 33 mL de etanol como solución A. 1,3 mL de ácido sulfúrico concentrado, 1,1 mL de etanol y 0,8 ml de agua como solución B. Se toman 2,1 ml de la solución B y se mezcla con la totalidad de la solución B. Antes de sembrar la placa con la muestra, se rocía esta con una solución de bisulfito de sodio al 10 %, se activa la placa a 100 °C por 30 min. Se siembra la muestra, se desarrolla la placa, se seca y rocía con el reactivo preparado fresco. Se coloca la placa a 100 °C y se observa el desarrollo del color en el visible. Coloración violeta para carbohidratos.

- **Nihidrina (Ni)**

Preparación: Se disuelven 30 mg de nihidrina en 10 mL de n-Butanol, seguido de 0,3 mL de ácido acético 98%. Se rocía la placa y se calienta a 100 °C hasta desarrollo de color. Los aminoácidos son detectados como manchas de color morado y violeta.

- **Reactivo NP/PEG. Reactivo de productos naturales – polietilenglicol.**

La placa se rocía con una solución del Ester ácido- β -etilaminodifenilborico 1% en metanol seguido de una solución de polietilenglicol-4000 5% en etanol.

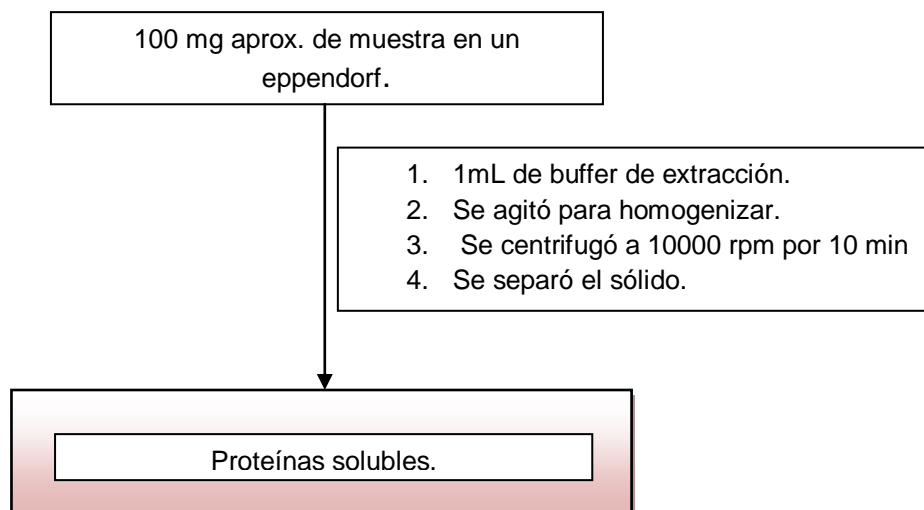
Flavonoles: quercitina, mirecitina y sus derivados glicosilados presentan coloración naranja – amarillo. Kanferol, isorhanmetin y sus derivados glicosilados presentan una coloración amarillo verde.

Flavonas: luteína y sus glicósidos presentan coloración naranja. Apigenina y sus glicósidos presentan una coloración amarillo-verde

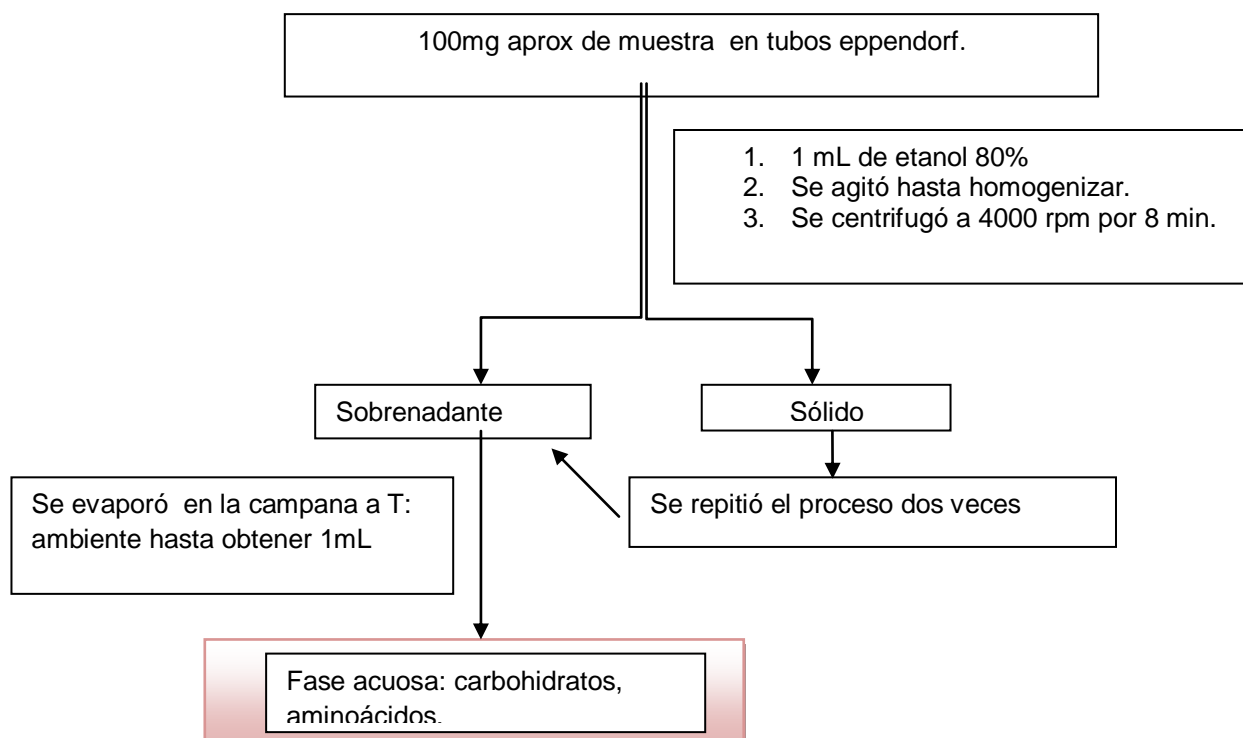
La presencia de ácidos fenólicos y cumarinas se puede observar bajo luz UV 365nm sin utilizar revelador como zonas de color azul.

8.3.- Métodos de extracción.

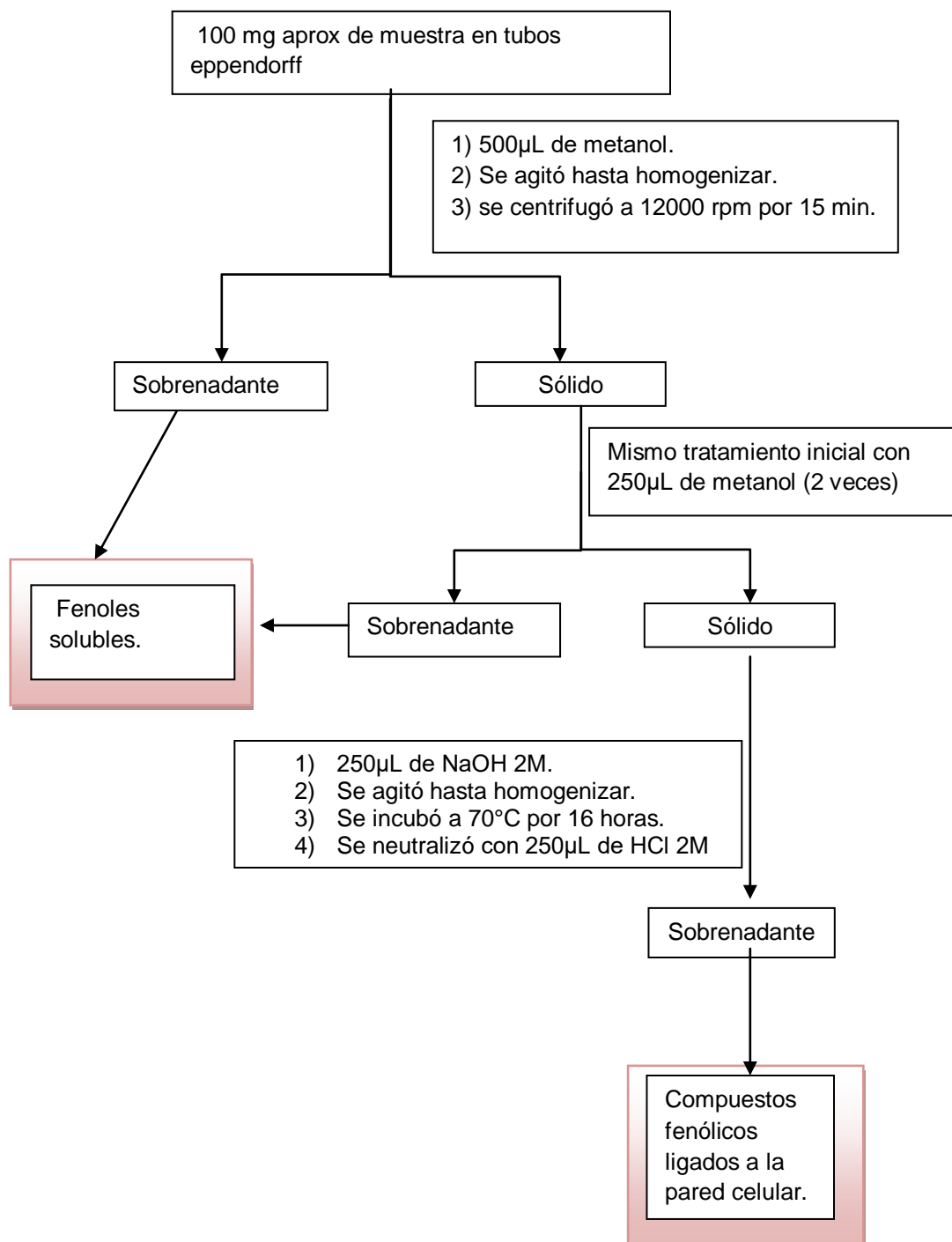
8.3.1- Esquema 1. Extracción de proteínas. (Metabolito primario)



8.3.2- Esquema 2. Extracción de carbohidratos y aminoácidos (como prolina libre). (Metabolitos primarios)



8.3.3- Esquema 3. Extracción. Fenoles (solubles y ligados a la pared celular) (metabolitos secundarios)



Nota: cantidad de muestra indicada es unica para cada ensayo.

8.4.- Cuantificación de proteínas, carbohidratos, aminoácidos y fenoles totales en cuatro variedades de *Morus alba* (Boconó, Maracay, Táchira y Yu-62)

8.4.1.- Proteínas: (metabolito primario)

Tratamiento de las muestras: Se tomó una alícuota de 100 μL provenientes de la extracción inicial y se diluyó inicialmente a un volumen de 10 mL con agua. Se tomó una alícuota de 1 mL y posteriormente se añadió 1 mL del reactivo de Bradford (azul de Coomassie en ácido sulfúrico) y se agitó hasta homogenizar. Se dejó reposar.

Patrón: Se preparó soluciones de albúmina de suero bovino de diferentes concentraciones y se aplicó el mismo tratamiento que la muestra.

Cuantificación: se realizó el análisis espectrofotométrico por el método de Bradford, ^[13] el cual se basó en la formación de un complejo entre las proteínas de la muestra problema y el reactivo azul de Coomassie brillante G-250. Dicho complejo causa un máximo de absorción a 595 nm, teniéndose como característica resaltante que la coloración inicial del reactivo es roja y cambia a azul cuando se completa la reacción.

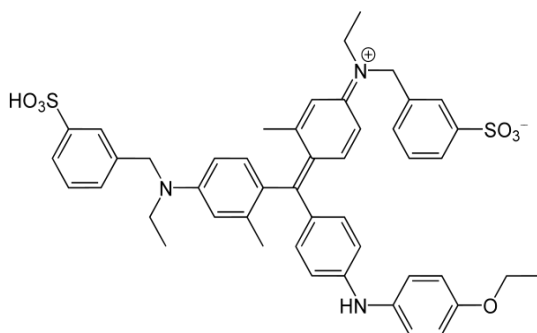


Figura 7. Estructura del reactivo azul de Coomassie brillante G-250.

Fuente: Wikipedia

http://pt.wikipedia.org/wiki/Azul_de_Coomassie

Los valores de las muestras se obtuvieron a partir de la curva de calibración correspondiente. Contemplando las diluciones realizadas los resultados se expresaron como mg/g de masa fresca equivalentes a albúmina de suero bovino.

8.4.2.- Carbohidratos totales:

Tratamiento de las muestras: se tomó una alícuota de 100 μ L de la muestra proveniente de la extracción y se diluyó con agua destilada hasta 1 mL. Se añadió 0,5 mL una solución de fenol al 5% y cuidadosamente 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se agitó hasta homogenizar y se dejó reposar por 30 min.

Patrón: Se preparó soluciones de glucosa de diferentes concentraciones y se aplicó el mismo tratamiento que la muestra.

Cuantificación: se utilizó el método de Dubois ^[14], que se fundamenta en que los carbohidratos son sensibles a ácidos fuertes a altas temperaturas. Esto produce una serie de reacciones complejas que comienza con una deshidratación simple. A medida que la reacción prosigue, se forma varios derivados del furano que se condensan consigo mismo y con otros subproductos para producir compuestos coloreados, producto de la condensación de compuestos fenólicos. ^[15] La longitud de onda máxima de absorción es de 492 nm. Los valores de las muestras se obtuvieron a partir de la curva de calibración correspondiente contemplando las diluciones realizadas. Los resultados se expresaron en mg/g de masa fresca equivalentes a glucosa.

8.5.3- Aminoácidos como prolina libre: (metabolito primario)

Tratamiento de muestra: se tomó una alícuota de 20 μ L del extracto vegetal y se diluyó a un volumen de 0,5 mL con agua destilada. Este se mezcló con 0,5 mL de ninhidrina y 0,5 mL de ácido acético. Se agitó para homogenizar y posteriormente se colocó en un baño de maría a 100°C por 1h. Se dejó enfriar. Se añadió 2 mL de tolueno y se agitó fuertemente.

Patrón: Se preparó soluciones de L-prolina de diferentes concentraciones y se aplicara

el mismo tratamiento que la muestra.

Cuantificación: se utilizó un método colorimétrico utilizando como reactivo la ninhidrina. El proceso químico se fundamenta en la descarboxilación y desaminación del aminoácido debido a su poder oxidante, para posteriormente reaccionar con otra molécula de ninhidrina no reducida y el amoníaco resultante de la desanimación para obtener un complejo con coloración violeta. La longitud de máxima absorción es de 520 nm. Sin embargo, si se analiza solo prolina se obtendrá un máximo de absorción a 440 nm y una coloración amarilla para el complejo formado. ^[16] Los valores de las muestras se obtuvieron a partir de la curva de calibración correspondiente contemplando las diluciones realizadas. Los resultados se expresaron en mg/g de masa fresca equivalentes a L-prolina.

8.4.4.- Fenoles solubles y ligados a la pared celular (fenoles totales), (metabolitos secundarios):

Tratamiento de las muestras: se tomó 100µL del extracto vegetal y se diluyó con 1mL con agua destilada. Posteriormente se añadió 100µL del reactivo Folin-Ciocalteu y se dejó reposar durante 5 min. Inmediatamente se añadió 600µL de NaOH 1M saturada con Na₂CO₃ y se dejó incubada a temperatura ambiente durante 1h.

Patrón: Se preparó soluciones de ácido clorogénico de diferentes concentraciones. Se aplicó el mismo tratamiento que la muestra.

Cuantificación: se utilizó un método espectrofotométrico que mide el complejo formado con el reactivo Folin –Cioucalteu (F-C). ^[25] El estudio se fundamentó en una reacción de oxido-reducción en donde el reactivo F-C se reduce a un óxido de molibdeno (Mo₈O₂₃) y wolframio (W₈O₂₃) observándose un cambio de amarillo a azul cuya longitud de onda máxima es medida a 765 nm. Los valores de las muestras se obtuvieron a partir de la

curva de calibración correspondiente contemplando las diluciones realizadas. Los resultados se expresaron en mg/g de masa fresca equivalentes al ácido clorogénico.

8.5.- Análisis cualitativo por TLC de las variedades de *Morus alba*: Táchira, Maracay, Boconó y Yu-62. ^[44]

Tabla 1. Condiciones para el análisis de las variedades de *Morus alba* Táchira, Maracay, Boconó y Yu-62 por cromatografía de capa fina (TLC)

Metabolitos	Extracto	Patrones	Sistema de solventes.
Flavonoides	Metanólico	Rutina.	Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:10)
Saponinas	Metanólico	Diosgenina.	Cloruro de metileno-hexano (1:1.2).
Carbohidratos [45]	Metanólico.	Sacarosa, glucosa	2-propanol-butanol-agua (12:3:4)
Aminoácido	Metanólico.	L-prolina, l- arginina	n-butanol: acetona: ácido acético glacial: agua (35:35:10:20)

Tabla 2. Reveladores y características observadas para la detección de flavonoides, saponinas, aminoácidos y carbohidratos.

Metabolitos	Reveladores
Flavonoides	Sin revelador químico: en UV 254 se observa un quenching de fluorescencia. En UV 365nm zona de color amarillo, verde o azul débil fluorescentes
Saponinas	Reactivo vainillina-ácido sulfúrico (región del espectro: visible): presencia de zonas con color azul, azul violeta y algunas veces zonas de color rojo o amarillo-marrón..

Carbohidratos	Naftol en ácido sulfúrico. Coloración violeta en el visible.
Aminoácidos	Solución de ninhidrina al 2% en etanol. Se observa una coloración de púrpura a rosado

8.6.- Determinación de saponinas y rutina (flavonoide glicósido) por el método de HPTLC (metabolitos secundarios).

Una vez desarrollada la cromatografía de capa fina aplicando las condiciones requeridas para la muestra analizada y variando la concentración del patrón necesario, manteniendo un volumen de sembrado de 3 μ L en cada caso, se procedió a tomar una foto a cada placa con la cámara respectiva a una longitud de onda de 254 nm utilizando una lámpara de radiación UV y manteniendo una misma distancia focal para cada una de ellas. Dicha foto será tratada por medio de un programa que fue desarrollado como una aplicación ejecutable en MATLAB y programa de datos suministrado por el laboratorio de láser de la Escuela de Química de la Facultad de Ciencias UCV y así obtener la información requerida para la construcción de la curva de calibración correspondiente y proceder con los cálculos de cuantificación de saponinas y flavonoides, donde la intensidad de radiación emitida por las muestras y patrones bajo la longitud de onda estudiada es traducida en un cromatograma, cuya área está directamente relacionada con la concentración de la sustancia.

8.7.- Análisis de la actividad antioxidante de los extractos de morera por vía espectrofotométrica. Reducción de DPPH. ^[46] ^[47]

Muestra: Se mezcló 0,4 mL de solución de DPPH en metanol (0,3 mmol/L) con 1 mL del extracto metanólico de la planta con diferentes concentraciones, agitando hasta homogenizar. Se dejó reposar por un tiempo de 30 min protegida de la luz.

Patrón: se utilizó un estándar de rutina y recibió el mismo tratamiento de la muestra

Condiciones: λ : 517 nm. Se midió la absorbancia transcurridos los 30 min.

Cuantificación: el % de actividad antiradical se calculó de la siguiente forma:

$$\%AA: 100 - [(Abs_{muestra} - Abs_{blanco})/Abs_{control}]*100$$

Donde:

Abs_{blanco}: 0,4mL de metanol + 1mL de extracto de la planta. Se preparó para cada concentración de extracto utilizada.

Abs_{control}: 0,4mL de DPPH (0.3mmol/L) + 1mL de metanol.

Para calcular el IC₅₀ (cantidad de muestra requerida para reducir el 50% la concentración inicial de DPPH) se realizara la grafica %AA vs [concentración] de extracto de morera por extrapolación.

8.8.- Análisis estadístico.

Se realizó análisis de varianza y prueba de medias a todas las variables en estudio con el objeto de determinar diferencias significativas entre las variedades y cada variable determinada, aplicando la prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC). Para ello se usó el programa estadístico InfoStat 2013 (Di Rienzo *et al*, 2013).^[48]

9.- Discusión de resultados.

9.1 Análisis cualitativo. Visualización del perfil químico de las variedades estudiadas de Morera (Boconó, Maracay, Táchira y Yu-62).

Los perfiles cromatográficos realizados a cada variedad estudiada permiten determinar la presencia de los metabolitos primarios y secundarios que se asocian a la supervivencia, desarrollo del organismo vivo y defensa según las condiciones de su entorno.

Los metabolitos primarios estudiados (aminoácidos, carbohidratos y proteínas) producen beneficios a otros organismos vivos que se alimentan de estos, facilitando su crecimiento y desarrollo. Estos aspectos se hacen importantes para la cría de animales, bien sea de corral o ganado, en el cual se busca un aprovechamiento sustancial en el aumento de la calidad de cada posible subproducto. Todo esto constituye un aporte nutritivo que posteriormente se transforma en energía en el sistema alimentario. La cría de animales provee a la industria nacional productos cárnicos, leche y derivados cuya calidad, y producción dependen de la alimentación del animal.

Así mismo, los metabolitos secundarios estudiados (compuestos fenólicos y saponinas), en las variedades de morera analizadas, permiten determinar y comparar los perfiles cualitativos de las variedades Boconó, Maracay, Táchira y Yu-62.

Los perfiles realizados a cada variedad estudiada corresponden a los compuestos presentes en la familia de los metabolitos estudiados y que se pueden visualizar por el método de TLC. Los patrones de referencia correspondientes a los compuestos de interés, permiten asegurar si para la concentración preparada de los extractos metanólicos de cada una de las variedades (Boconó, Maracay, Táchira y Yu-62) se

encuentran presentes en una cantidad visualmente apreciable para poder ser efectiva la determinación cuantitativa de cada metabolito de estudio.

9.1.1.- Aminoácidos: La bibliografía reporta los valores de concentración de los 20 aminoácidos esenciales en las hojas de morera. Así, es posible observar en la placa una serie de manchas de color violeta y morado asociadas a estos compuestos, así como una mancha de color amarillo naranja con R_f de 0,36 correspondiente a l-prolina. Adicionalmente se puede observar el patrón de arginina R_f 0,17, el cual no se observa en los perfiles expuestos (Fig.8). Al comparar el perfil cromatográfico de las cuatro variedades estudiadas con el patrón de L-prolina, es posible detectar la presencia de ese aminoácido, en diferentes intensidades, en todas las muestras estudiadas, aun superpuestas sobre otros compuestos que muestran para este sistema de solventes un R_f cercano a este.

FOTOS IDENTIFICADAS



Figura 8.A Visible sin rociar

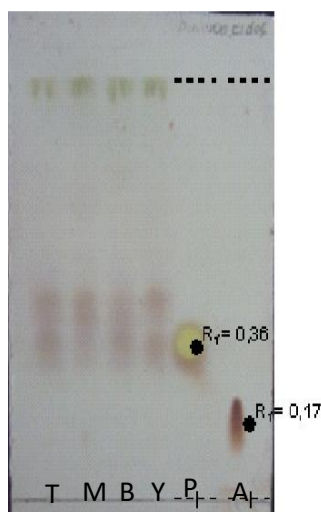


Figura 8.B Visible revelada

Análisis cualitativo por CCF de los aminoácidos presentes en los extractos.

Sistema de solventes:

n-butanol: acetona: ácido acético: agua (35:35:10:20)

Sistema de detección:

ninhidrina en n-butanol

Figura 8. Perfil de aminoácidos. Placas cromatográficas de cuatro variedades de morera (Táchira (T), Maracay (M), Boconó (B), Yu-62 (Y))y sustancia control (l-prolina (P), l-arginina (A)).

9.1.2.- Carbohidratos. El análisis cualitativo de los carbohidratos presentes en las variedades Táchira, Maracay, Boconó, Yu-62 fue obtenido al eluir las muestras con el sistema de solventes 2-propanol: n-butanol: agua (12:3:4) y revelado con el reactivo con Naftol en ácido sulfúrico. Las muestras fueron comparadas con el patrón sacarosa y de glucosa. Según la teoría estos compuestos son los más abundantes en cuanto a carbohidratos simples solubles. Adicionalmente, las plantas superiores contienen elevadas concentraciones de polícarbohidratos. Las manchas concernientes a estos patrones en los perfiles permanecen muy cercanas y con alta intensidad y se encuentran presentes en las plantas estudiadas. La variedad Yu-62 se encuentra más diluida, por ello no se observa una gran intensidad en la mancha correspondiente. (Fig.9)

FOTOS IDENTIFICADAS*:

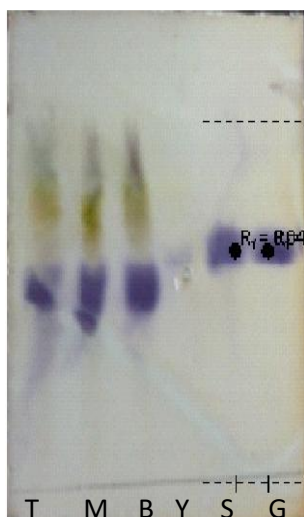


Figura 9.A. Visible revelado

Análisis cualitativo por CCF de los carbohidratos presentes en los extractos.

Sistema de solventes:

2-propanol: n-butanol: agua
(12:3:4)

Sistema de detección: α -naftol
en ácido sulfúrico.

Figura 9. Perfil de carbohidratos. Placas cromatográficas de cuatro variedades de morera (Táchira (T), Maracay (M), Boconó (B), Yu-62(Y)) y sustancia control (sacarosa (S), glucosa (G)).

9.1.3.- Compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos derivados de fenilpropanoides, ácidos cinámicos y flavonoides presentan, como característica

importante, su actividad antioxidante debido a su capacidad de estabilizar radicales libres. Esta actividad tiene efectos en el crecimiento, reproducción y protección contra agentes externos.

El análisis cromatográfico fue realizado utilizando condiciones que permiten detectar flavonoides y flavonoides glicosilados, debido a reportes previos de la detección de estos metabolitos en la especie *M. alba*.

El sistema de solventes utilizado AcOEt-HCOOH-AcOH-H₂O (100:11:11:10) junto al revelador empleado, NP/PEG, facilitan la identificación de los flavonoides, en especial de aquellos que presentan uniones a carbohidratos como es el caso de la rutina (quercetina-3-O-rutinosido), abundante en este género.

Las figuras 10-A, 10-B, 10-C, 10-D, 10-E y 10-F, muestran el perfil cromatográfico de las diferentes variedades de *Morus alba* estudiadas y su comparación con el patrón hidrato de rutina como una mancha amarilla en el visible y naranja bajo la luz UV 365 nm (Rf: 0,31), en dos de las cuatro variedades estudiadas. La diferencia con el Rf reportado (Rf: 0,4) se debe al sistema de solventes (específicamente en la proporción del agua) utilizado. Dicho valor fue corregido para el análisis de rutina en las variedades. Vale la pena destacar que no fue posible detectar la presencia de este flavonoide en las variedades Boconó y Yu-62. Sin embargo, el perfil muestra la presencia de otra mancha de posible núcleo flavonol con factor de retención de aprox. 0,91 que puede ser detectada en todas las variedades estudiadas. Esta mancha puede asociarse a la presencia de ácido gálico. Así mismo, es posible detectar en el centro de la placa, manchas intensas blancas fluorescentes, entre las cuales puede detectarse con un Rf: 0,45, la posible presencia de ácido clorogénico para todas las variedades evaluadas. La posible presencia de quercetina en las muestras analizadas está asociada a la presencia de una mancha de color amarillo (figura 10-E) con Rf de 0,74;

presente en todas las variedades estudiadas, mostrando una menor intensidad en las variedades Boconó y Yu-62

FOTOS IDENTIFICADAS*:

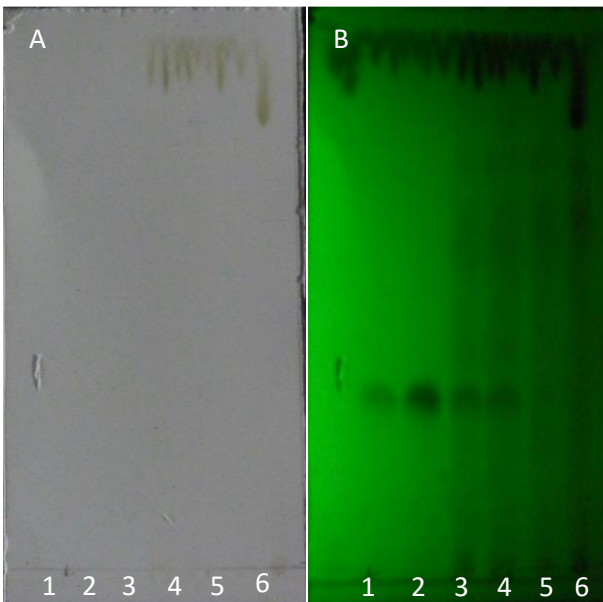


Figura 10.A Visible sin rociar

Figura 10.B 254 nm sin rociar

Análisis cualitativo por CCF de los flavonoides presentes en los extractos.

Sistema de solventes:

acetato de etilo: ácido fórmico:

ácido acético: agua

(100:11:11:10)

Sistema de detección: NP/PEG

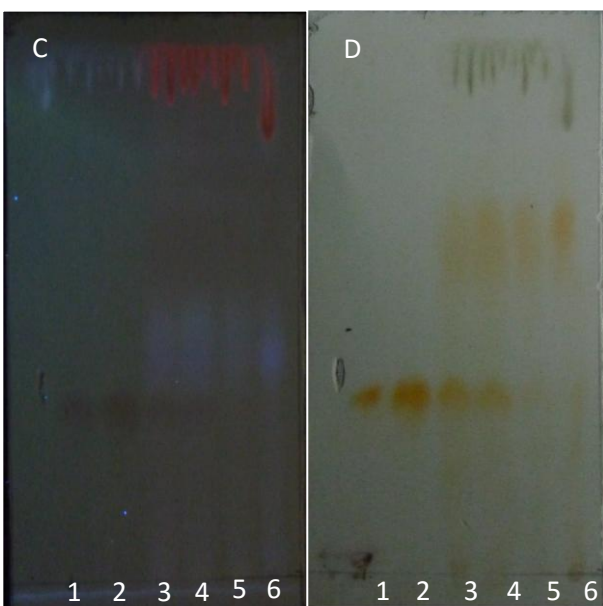


Figura 10.C. 365 nm sin rociar

Figura 10.D. visible revelado

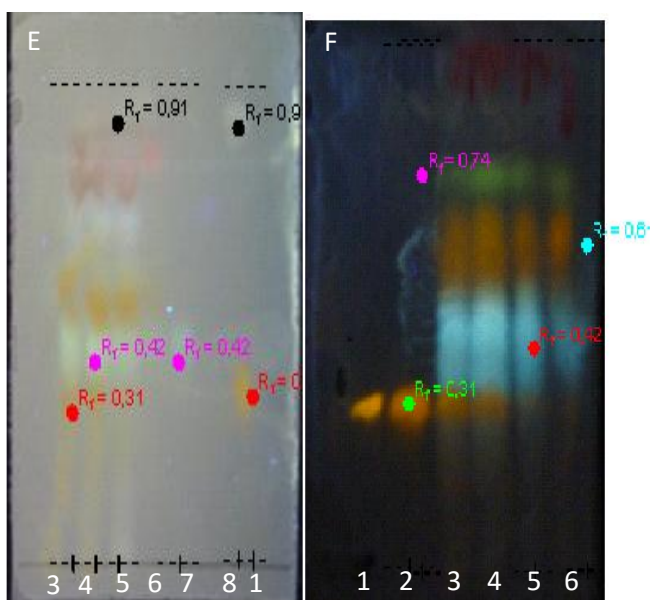


Figura 10.E. 365 nm
revelado

Figura 10.F. 365 nm
revelado

Figura 10. Placas cromatográficas de las variedades de *Morus alba*: Táchira, Maracay, Boconó, Yu-62.

Leyenda: 1 y 2: Rutina; 3: Táchira; 4: Maracay; 5: Boconó; 6: Yu-62; 7: ácido clorogénico; 8: ácido gálico.

Los r_f determinados corresponden al ácido clorogénico: $\sim 0,45$; rutina $\sim 0,31$ y ácido gálico $0,91$

9.1.4.- Saponinas: En el caso de las saponinas esteroidales, se utilizó inicialmente el sistema de solvente Cloroformo-metanol-agua reportado para el estudio de estos metabolitos obteniendo un resultado no satisfactorio no pudiendo separar la franja de interés en donde posiblemente esta el compuesto de interés. Por ello se opta por un sistema poco polar, Cloruro de metileno: hexano (1:1,2), logrando separar dicha franja. Sin embargo, no fue posible detectar la presencia de esta familia de compuestos en las variedades estudiadas, por lo cual no se pudo realizar el análisis correspondiente a su cuantificación. La literatura sugiere como reactivos de revelación vainillina-ácido sulfúrico y reactivo de Komarowsky. El patrón de diosgenina, la sapogenina de la

dioscina, utilizado para la detección de las saponinas, se torna de color amarillo, mientras que no se observa el mismo comportamiento para las muestras a la misma distancia con respecto al punto de partida. Los valores reportados para esta planta son bajos por lo cual para una determinación más precisa se necesitaría una mayor cantidad de muestra para una mejor visualización.

FOTOS IDENTIFICADAS*:

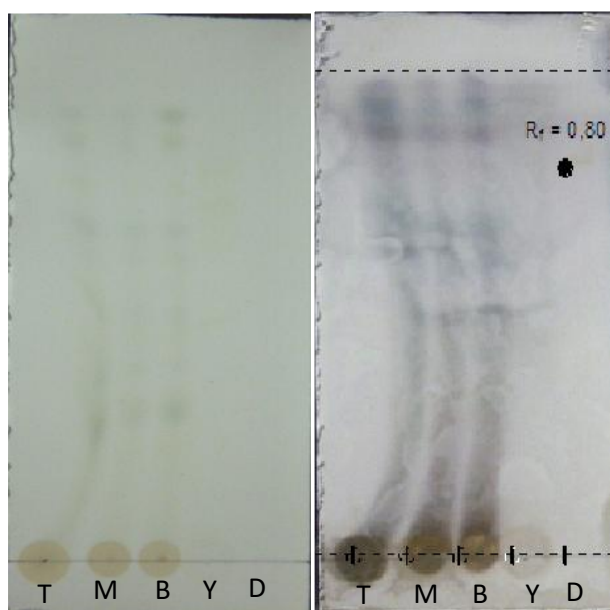


Figura 11.A Visible sin rociar

Figura 11.B Visible revelado

Análisis cualitativo por CCF de saponinas presentes en los extractos.

Sistema de solventes:

Cloruro de metileno: Hexano
(1:1,2)

Sistema de detección:

vainillina-ácido sulfúrico

Figura 11. Perfil cromatográfico para saponinas en cuatro variedades de morera (Táchira (T), Maracay (M), Boconó (B), Yu-62 (Y)) con el patrón diosgenina (D).

9.2- Cuantificación de proteínas, carbohidratos, aminoácidos y fenoles totales en las variedades de *Morus alba* (Boconó, Maracay, Táchira y Yu-62)

Las características donde se desarrollan las variedades de las plantas analizadas, pueden ser condicionantes en los resultados finales, debido a que las plantas presentan

variaciones en sus concentraciones bajo la influencia de factores bióticos y abióticos que las rodean.

En el presente caso, las plantas permanecieron protegidas de la incidencia directa de la luz solar y en condiciones de vivero (plantas sin ser transplantadas al suelo), durante un periodo seco en el cual no se efectuaron cortes o podas presumiendo una edad madura en las hojas. Las condiciones de siembra de cada una de las variedades de *Morus alba* difieren entre sí pues para los cultivares denominados Táchira, Boconó y Maracay se utilizó el método por estaca, mientras que en el cultivar Yu-62, se utilizó la reproducción por semilla sexual. Presentan una altura no mayor a 50 cm de altura y poca expresión de biomasa como resultado de la presencia de poca cantidad de hojas, en su mayor parte con una longitud de aproximadamente 8 cm, en algunos casos con decoloración y en otros se verifica la presencia de microorganismos que se alimentan de ella en forma visual por pérdida superficie foliar. La cantidad de fertilizante y frecuencia de empleo utilizada anteriormente al muestreo se desconoce. Sin embargo, todas las variedades estaban sujetas a las mismas condiciones.

Las hojas utilizadas para los análisis excluyen aquellas que fueron atacadas por microorganismos (visible) y decoloradas.

Los resultados fueron expresados en función de material fresco de la planta ya que en el presente trabajo no se realizaron determinaciones de % de materia seca (MS), base que es mayormente utilizada para expresar las concentraciones de metabolitos y/o compuestos en las plantas. Sin embargo, para poder establecer una comparación numérica directa con trabajos anteriormente publicados, se realizó una aproximación utilizando como % de materia seca, la publicada en los estudios de González y Cáceres (2002)^[50] para periodo poco lluvioso: 28,1%

9.2.1.- Metabolitos primarios.

Los metabolitos primarios están directamente relacionados con el valor nutritivo de la planta. Las especies de *Morus spp* han sido consideradas con altos valores proteicos, donde se puede constatar en varios trabajos sobre la especie alba, nigra e indica, como plantas forrajeras y para su utilización en la sericultura, siendo la variable de mayor atención en dichos estudios. La fertilización, el proceso fotosintético y la presencia de agua entre otros, son factores altamente influyentes en la síntesis de compuestos metabólicos.

9.2.1.1.- Cuantificación de L- prolina libre en las variedades de *Morus alba*: Táchira, Maracay, Boconó, Yu-62.

Algunos datos encontrados en la bibliografía sobre aminoácidos presentes en la planta de morera, mencionan valores determinados en forma total e individual de los componentes presentes de esta familia con respecto al extracto seco de hojas de la planta (MS) (Tabla 4), considerados excelentes para la alimentación animal. La planta produce los 20 aminoácidos (esenciales y no esenciales), constituyendo una especie de gran importancia para los organismos vivos ya que es el componente principal para la síntesis de las proteínas y participa directamente en la regulación del crecimiento vegetal. El compuesto de interés para este estudio es la L- prolina, el cual presenta valores de 2,13 % MS (Martín, et al. 2007), 8,2 g/Kg MS (Botero 2004), pues constituye un indicativo para evaluar el estado de estrés de la planta debido a que en estas situaciones suele acumular aminoácidos libres como mecanismo de defensa, disminuyendo la síntesis de proteínas, llevando a esta a problemas de crecimiento.

Los resultados obtenidos en base a la aproximación realizada, colocan los valores por debajo de los obtenidos con respecto a las variedades cubanas y por encima con respecto a una variedad colombiana (Tabla 3 y 4), exceptuando para la variedad

Maracay. Las lecturas son diferentes en cuanto a los datos reportados de Colombia, los valores son considerablemente altos los cuales permiten presumir la posible presencia de estrés hídrico en la planta. Esto debe sumarse a una disminución de proteínas ya que la planta reserva cantidades de aminoácidos y en específico de l- prolina como compuesto regulador de la presión osmótica a nivel celular juntamente con carbohidratos simples para mantener la mayor cantidad posible de agua en la célula vegetal. En este caso debería ser mayor en los tallos que en la misma hoja según la bibliografía. Caso contrario se presentaría en función de las variedades cubanas en las cuales dicha suposición seria correcta. La variedad Maracay se comporta más cercana a la variedad colombiana y con un valor muy bajo con respecto a la cubana, pero no se verifica en la bibliografía una concentración mínima crítica para mencionar un caso déficit.

Tabla 3. Concentración de prolina libre presentes en hojas de las variedades de *Morus alba*

Cultivares	Replicas	Prolina libre (mg/g)	Promedio (mg/g)	Cv %	Promedio %(MS)	Promedio (mg/g)(MS)
Táchira	Ta ₁	4,55	4,50±0,06	1,38	1,60	16,01
	Ta ₂	4,51				
	Ta ₃	4,43				
Maracay	Ma ₁	3,01	1,96±0,10	4,97	0,70	6,98
	Ma ₂	2,87				
	Ma ₃	3,06				
Boconó	B ₁	4,34	4,39±0,22	4,98	1,56	15,62
	B ₂	4,20				
	B ₃	4,63				

Yu-62	Y ₁	3,20	3,34±0,18	5,44	1,19	11,89
	Y ₂	3,28				
	Y ₃	3,55				

El análisis contempla las cuatro variedades de estudio (denotadas en la casilla de cultivares), las cuales contemplan tres replicas para cada caso. Los datos reportados son expresados como mg equivalentes de L-prolina/ g de hoja fresca.

Tabla 4. Datos reportados de estudios de cuantificación de aminoácidos en la especie *Morus alba*

Aminoácidos	A (g/Kg) MS	B(% MS)			
		Variedades			
		cubana	Indonesia	tigreada	acorazonada
Prolina	8,2	2,13	2,12	2,12	2,12
Total	158,7	17,77	19,07	18,5	17,54

No hay datos relacionados al método de cuantificación utilizado.

A: valores reportados por Quirama y Caicedo (2003) citado por Botero (2004)

B: valores reportados por Martín et al (2007) para cuatro variedades de *Morus alba* en Cuba.

En cuanto a la comparación entre las variedades estudiadas se tiene que el menor valor obtenido (mg/g) fue para la variedad Maracay, mientras que para Boconó y Táchira se obtuvieron valores semejantes y los más altos (tabla 3). La cantidad de fertilizante empleado es un factor influyente en la concentración de varios metabolitos especialmente aminoácidos, proteínas y carbohidratos ya que la Morera no es una planta fijadora de nitrógeno. (Este factor no fue controlado para el ensayo). La L-prolina tiene como función principal participar en el mecanismo de resistencia al estrés y la germinación del grano de polen en la planta y en este caso del fruto por lo que su variación podría indicar una mayor adaptabilidad al estrés.

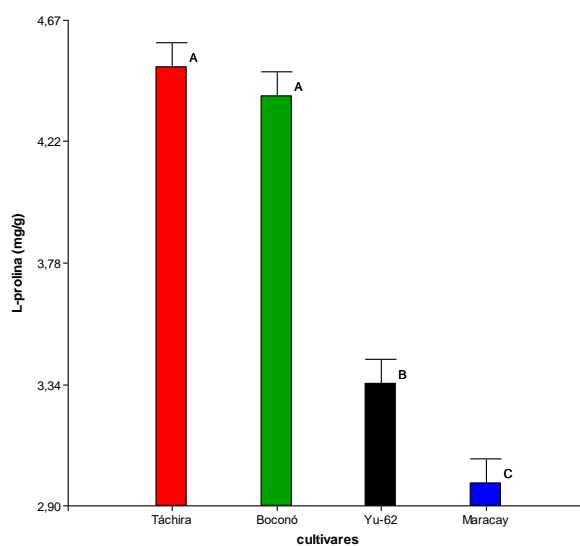
Un análisis de varianza y pruebas de medias obtenidos por el programa Infostat 2013 permitió observar diferencias significativas entre las variedades (Tabla 5 y Fig. 12). Las

variedades Táchira y Boconó presentaron los valores de concentración de prolina significativamente mayor que las variedades Yu-62 y Maracay

Tabla 5. Análisis de la varianza para aminoácidos en cuatro variedades de morera.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5,14	3	1,71	72,06	<0,0001
Cultivares	5,14	3	1,71	72,06	<0,0001
Error	0,19	8	0,02		
Total	5,33	11			

Cv: 4,06



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 12. Prueba de medias para las variedades Táchira, Maracay, Yu-62 y Boconó.

9.2.1.2.- Cuantificación de carbohidratos solubles en las variedades de *Morus alba*: Táchira, Maracay, Boconó, Yu-62.

Los carbohidratos son unos de los metabolitos que se encuentran en mayor cantidad en las plantas, siendo de vital importancia porque proporcionan el contenido energético necesario para sus funciones vitales, participan en la formación de tejidos (raíces, tallos, hojas, flores) y facilitan su crecimiento, además de ser asociada a la recuperación de la poda. La fuente de carbohidratos solubles en la planta involucra el proceso fotosintético para su metabolismo con lo cual los factores ambientales juegan un papel importante durante sus etapas: el acceso al agua, la superficie foliar (tamaño de las hojas), temperatura.

Los resultados obtenidos presentan altos valores con respecto a valores publicados en estudios de variedades de otros países los cuales presentan condiciones ambientales particulares a su zona. Ejemplo de ello tenemos la investigación de García, et al (2005) donde describen, la influencia de varios parámetros que afectan la concentración de este metabolito en las hojas y tallos en cuatro variedades cubanas de morera, estudiando las interacciones variedad – fertilizante, variedad época, llegando a la conclusión de que los mayores valores obtenidos son para el periodo lluvioso y una concentración intermedia entre las utilizadas. La razón equivale a la activación de la síntesis de carbohidratos por el aprovechamiento del agua, la incidencia solar y la presencia de fertilizantes que proveen iones potasio mineral que adicionalmente facilita el transporte celular.

Las condiciones en que se encontraban las muestras analizadas permitirían observar un comportamiento inverso al anteriormente explicado: bajos valores en la concentración de carbohidratos debido a una baja síntesis de estos o el aumento del gasto energético debido a la metabolización de glúcidos. El alto contenido de azúcares permite mantener en resguardo cantidades de agua en la planta, comportándose como

osmolitos (carbohidratos simples) para contribuir en el mantenimiento de la presión osmótica, al igual que la L-prolina en el caso de los aminoácidos.

El periodo de lluvia fue bajo, por lo cual el riego diario y las temperatura e incidencia solar junto a su estado en fase de vivero puede justificar la alta concentración de este metabolito traduciéndose en valores energéticos que permiten la adaptación y supervivencia de la planta en estas condiciones. Adicionalmente, la situación de crecimiento de la planta, brotes en crecimiento y rebrotes producto de la poda contribuyen a las variaciones de concentración de este metabolito. Sin embargo, la biomasa no es alta ni se realizó cortes, lo que permite el almacenamiento de energía en estos aspectos porque no fue necesario. Las magnitudes que obtuvieron para las variedades cubanas presentan un elevado valor con respecto a la presencia de otros metabolitos en la planta, siendo este un valor que oscila entre 11,78 – 19,85 % en materia seca. (Tabla 6)

Tabla 5. Concentración de carbohidratos presentes en hojas de las variedades de *Morus alba*.

Cultivares	Replicas	Carbohidratos (mg/g)	Promedio	Cv %	Promedio % MS
Táchira	Ta ₁	52,22	51,59±1,06	2,06	18,36
	Ta ₂	50,36			
	Ta ₃	52,19			
Maracay	Ma ₁	64,48	68,15±3,28	4,81	24,25
	Ma ₂	69,18			
	Ma ₃	70,79			
Boconó	B ₁	71,74	76,23±3,88	5,09	27,13
	B ₂	78,47			
	B ₃	78,47			

Yu-62	Y ₁	69,22	68,61±3,37	4,90	24,42
	Y ₂	64,98			
	Y ₃	71,64			

El análisis contempla las cuatro variedades de estudio (denotadas en la casilla de cultivares), las cuales contemplan tres replicas para cada caso. Los datos reportados son expresados como mg equivalentes de d-glucosa/ g de hoja fresca.

Tabla 6. Concentración (%MS) de carbohidratos presentes en hojas de variedades de *Morus alba* reportadas en la bibliografía.

Variedades cubanas	PPLL	PLL
Cubana	16,45	14,79
Indonesia	12,24	17,5
Tigreada	15,84	16,01
Acorazonada	16,7	19,85

Datos reportados por García, et al (2005)

La ubicación de las variedades en un invernadero donde la radiación incidente es la necesaria, junto a un ambiente fresco proporcionado por la interacción no directa con otras plantas y un riego constante bajo el periodo de análisis (poca lluvia) permite que los cultivares estudiados en fase de vivero realice su proceso fotosintético en forma eficiente quedando en evidencia por el tamaño de las hojas a pesar de no observar masa foliar abundante.

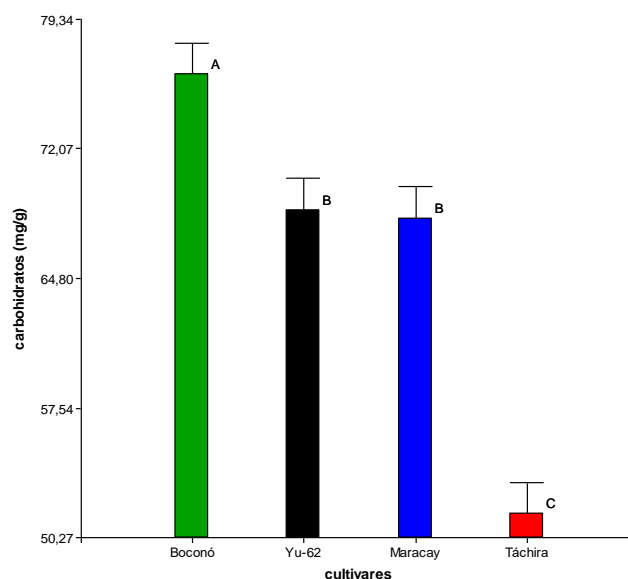
El cultivar con mayor cantidad de carbohidratos es Boconó, mientras que Táchira corresponde al menor valor determinado (tabla 5). Los carbohidratos son el principal compuesto de las especies forrajeras y constituyen las $\frac{3}{4}$ partes del peso de la materia

seca (Pirela, 2005). El análisis de varianza (Tabla 7) mostro diferencias significativas entre las variedades.

Tabla 7. Análisis de la Varianza para carbohidratos en variedades de morera.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	970,80	3	323,60	33,75	0,0001
Cultivares	970,80	3	323,60	33,75	0,0001
Error	76,69	8	9,59		
Total	1047,50	11			

Cv: 4,68



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 13 . Prueba de medias para carbohidratos en las variedades Táchira, Maracay, Yu-62 y Boconó.

En la Fig.13 se observa notoriamente las diferencias que existen en cuanto a concentración específicamente entre Táchira y las demas variedades. Táchira es la variedad con menor cantidad de carbohidratos solubles los cuales estan relacionados con el contenido energetico de la planta necesario para llevar a cabo todas sus

funciones fisiológicas y supone que necesita un menor gasto energético con respecto a los demás. Sin embargo, para indagar más en el tema, sería necesario un análisis de este parámetro (contenido energético).

9.2.1.3.- Cuantificación de proteínas en las variedades de *Morus alba*: Táchira, Maracay, Boconó, Yu-62.

Las proteínas constituyen uno de los factores importantes para los estudios relacionados con el aporte nutricional de las especies forrajeras para la alimentación animal. Las plantas del género *Morus* spp tienen como característica, un contenido elevado de proteínas [(14 - 28) % en base seca] convirtiéndola en una alternativa interesante en el área agropecuaria.

En los análisis realizados para las variedades de morera estudiadas (Táchira, Boconó, Maracay, Yu-62) se obtuvieron valores bajos de proteínas (Tabla 8) en comparación a los reportados en la bibliografía (Tabla 9) a excepción para las variedades cubanas estudiadas por González et al (2002) los cuales obtuvieron valores cercanos a las variedades Maracay, Boconó y Táchira y teniendo el valor más bajo la variedad Yu-62.

Las posibles razones que están involucradas en estos valores corresponden a la no aplicación de la poda, lo cual no incrementa la biomasa (crecimiento foliar) y el control sobre la edad de rebrote. Esto viene influenciado por la disponibilidad de agua y aporte de nitrógeno hacia la planta (fertilización) el cual disminuye su síntesis al aumentar la presencia de aminoácidos libres como mecanismo de regulación de agua en las células vegetales. La lluvia se comporta como un agente iniciador de la síntesis proteica. Este es el parámetro que le da un amplio valor a las especies forrajeras siendo sin duda el más importante para su utilización.

Tabla 8. Concentración de proteínas presentes en hojas de las variedades de *Morus alba*

Cultivares	Replicas	Proteínas (mg/g)	Promedio	Cv %	Promedio %MS
Táchira	Ta ₁	22,13	21,41±0,06	3,10	7,62
	Ta ₂	20,83			
	Ta ₃	21,26			
Maracay	Ma ₁	25,10	23,81±1,13	4,75	8,47
	Ma ₂	22,98			
	Ma ₃	23,36			
Boconó	B ₁	21,00	21,24±0,83	3,89	7,56
	B ₂	20,56			
	B ₃	22,16			
Yu-62	Y ₁	7,09	6,86±0,31	4,56	2,44
	Y ₂	6,97			
	Y ₃	6,50			

El análisis contempla las cuatro variedades de estudio (denotadas en la casilla de cultivares), las cuales contemplan tres replicas para cada caso. Los datos reportados son expresados como mg equivalentes de albúmina de suero bovino/ g de hoja fresca. El % promedio (MS) es un dato aproximado en base al % de materia seca determinada por González y Cáceres (2002)

Tabla 9. Contenido de proteínas en hojas de *Morus alba* según algunos autores.

Autores	Localidad de la variedad	Valores reportados de proteínas %MS
Hurtado, et al (2012)	Colombia	18,1
García D.E, et al (2008)	Trujillo, Venezuela	23,46
Martin et al (2007)	Cuba	20,54 – 21,20
González, et al (2002)	Cuba	Lluvia: 13,44. Seco: 9,57
Boschini, et al (2000)	Costa Rica	21,41

Sarria (1999) citado por Botero (2004)	Colombia	15 – 20
---	----------	---------

Los valores de proteína reportados son como proteína cruda.

Los factores involucrados en el resultado obtenido sugieren diversas causas influyentes en este:

- 1) La edad de la planta, desarrollo de las hojas (hojas con poco tiempo de brotación), frecuencia de corte, influye en la concentración de metabolitos, absorción de minerales. Los mayores valores de proteína bruta en plantas de morera dependen de la edad del rebrote y la época del año. (Martín, Ojeda, Cruz 2008).
- 2) Un posible estado de estrés sobre las plantas de estudio, situación que conlleva a un desequilibrio metabólico en el cual para su sobrevivencia el organismo busca adaptarse a las condiciones presentes: desde el punto de vista físico, las plantas se encuentran sembradas en un espacio reducido (sacos de tierra), periodos de sequía prolongado teniendo como consecuencia: pocas ramificaciones, tallos tiernos, poca altura de crecimiento.
- 3) La técnica de análisis mayormente utilizada en las publicaciones revisadas para la determinación de proteínas se utiliza el método Kjeldahl propio en el análisis bromatológico. Por ello se encuentran valores de proteína verdadera y proteína cruda, siendo esta la que se utiliza para las comparaciones.

Para confirmar la presencia real de los factores anteriormente mencionados, se necesitan realizar los estudios correspondientes para evaluar cada variable, los cuales escapan al presente trabajo.

El análisis estadístico permite visualizar un mismo comportamiento para las variedades Táchira y Maracay según el análisis de varianza y la prueba de medias. Los resultados completos son los siguientes:

Tabla 10. Análisis de la Varianza para proteínas en cuatro variedades de morera.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	539,14	3	179,71	287,91	<0,0001
Cultivares	539,14	3	179,71	287,91	<0,0001
Error	4,99	8	0,62		
Total	544,14	11			

Cv: 4,31

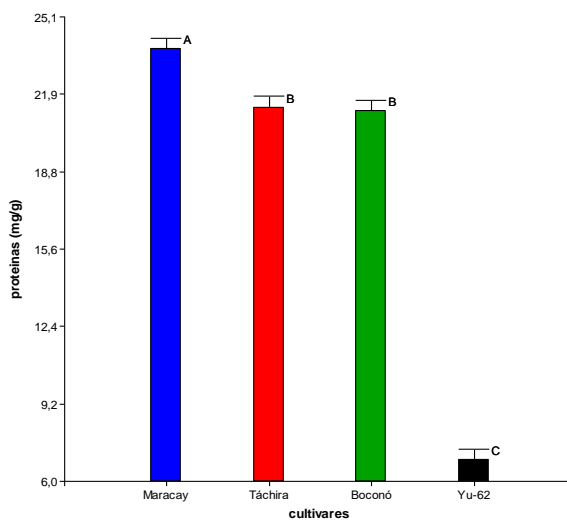


Figura 14. Prueba de medias para proteínas en las variedades Táchira, Maracay, Yu-62 y Boconó.

En la Fig. 14 se pueden observar diferencias significativas entre variedades. La variedad Maracay presentó la mayor concentración de proteínas y la variedad Yu-62 la menor cantidad. Estos resultados demuestran que hay variabilidad entre materiales genéticos para proteínas.

9.2.2.- Cuantificación de fenoles totales en las variedades de *Morus alba*: Táchira, Maracay, Boconó, Yu-62. (Metabolitos secundarios).

Los compuestos fenólicos comprenden una cantidad de sustancias cuyo grupo funcional principal es el oxidrilo. Su cuantificación es efectuada como contenido total de estos, y fue realizada en dos fases según forma de extracción: fenoles solubles (fracción metanólica) y fenoles ligadas a la pared celular (reacción ácido – base).

La importancia de estos compuestos radica en la supervivencia y desarrollo de la planta: la concentración de estos metabolitos aumenta significativamente cuando la planta experimenta periodos de estrés, producto de cambios ambientales de origen biótico y/o abiótico. Una situación común se presenta cuando la planta se encuentra sometida a periodos de sequía, describiéndola en la bibliografía como estrés hídrico, (el cual también ocurre en la situación contraria en donde se presenta inundación por exceso de lluvia). El mecanismo de protección que generan está asociado a su actuación como insecticidas o tóxicos naturales en contra de microorganismos y otros animales herbívoros, atrapan radicales libres, producto de exceso de radiación UV o provenientes de otros organismos patógenos, fortaleza en la estructura de tallos y hojas entre otras, los cuales podemos clasificar como fenoles solubles y los fenoles ligados a la pared celular según su distribución en los tejidos de la planta. El incremento en la concentración de carbohidratos solubles facilita el aumento en la cantidad de fenoles totales presentes en la planta, siendo ejemplo de ello, los flavonoides que poseen uniones glucosídicas en su estructura, además de altos niveles energéticos que puede invertir en la promoción de estas síntesis.

En los resultados obtenidos (Tabla 12), las mayores concentraciones de este metabolito, (determinadas para cada variedad estudiada) pertenecen a la categoría de fenoles ligados a la pared celular en el cual, tendrá incidencia directa y con mayor rapidez la influencia de las condiciones ambientales a la que son sometidas. Al

encontrarse bajo las mismas condiciones, la respuesta obtenida será característica de cada cultivar. Sin embargo, al prever una posible tendencia para ellos en cuanto a comportamiento, es necesario realizar estudios para verificar que se sigue cumpliendo en condiciones óptimas y/o catalogar como estados producto de adaptación al entorno donde se encuentran expuestas.

La cantidad de fenoles en menor proporción la constituye los fenoles solubles, los cuales podemos asociar a la defensa de organismos patógenos que afectan directamente el sistema interno celular, por ejemplo algunas de las hojas pertenecientes (no fueron tomadas para el análisis) a la planta en algunas de las variedades poseen evidencias de ataque de microorganismos. En la bibliografía (Tabla 11) se encuentra la cuantificación de fenoles como contenido total de estos. La síntesis de compuestos fenólicos se verá influenciada por factores ambientales asociados a la radiación UV, estrés hídrico u otros factores atmosféricos o condiciones del suelo, además de potenciar o disminuir su acción de defensa en el sistema vegetal. La variedad Paquistaní posee la mayor concentración fenólica. Se estima que los resultados obtenidos se encuentran por encima de la variedad Cubana y de la variedad Serbia.

Tabla 11. Contenido total de fenoles presentes en la especie *Morus alba*.

Fuente	Variedad	Contenido total de fenoles
[Radojkovic, et al.] ^[20]	Serbia	• Hoja: 66,766±0,749 ^a
[Memon, et al.] ^[21]	Pakistaní	• Hoja: 8,33±0,11 ^b
[García D, Ojeda f] ^[22]	Cubana	• Hoja: (2,18 – 3,20) MS. PPLL (1,26 – 3,26) MS. PLL

^a valores reportados como mg equivalentes de ácido clorogénico por g de materia seca.

^b valores reportados como mmol/100g equivalentes de ácido gálico.

Tabla 12. Resultados obtenidos de compuestos fenólicos en cuatro variedades de Morera en Venezuela, equivalentes a ácido clorogénico.

Cultivares	Replicas	Fenoles solubles (mg/g)	Promedio	Cv %	Fenoles ligados a la pared celular (mg/g)	Promedio	Cv %	Fenoles totales (mg/g)	Promedio	Cv %	Promedio % (MS)
Táchira	Ta ₁	8,26	8,48±0,35	4,17	14,40	13,71±0,60	4,38	22,66	22,19±0,49	2,21	7,90
	Ta ₂	8,29			13,39			21,68			
	Ta ₃	8,89			13,33			22,22			
Maracay	Ma ₁	5,30	5,56±0,28	4,99	8,75	8,67±0,21	2,38	14,05	14,23±0,16	1,12	5,06
	Ma ₂	5,53			8,82			14,35			
	Ma ₃	5,85			8,44			14,29			
Boconó	B ₁	5,32	5,35±0,16	3,03	17,22	17,60±0,90	5,14	22,54	22,96±0,77	3,36	8,17
	B ₂	5,53			16,96			22,49			
	B ₃	5,21			18,64			23,85			
Yu-62	Y ₁	5,27	5,12±0,26	5,02	19,80	18,89±0,92	4,89	25,07	24,01±0,95	3,97	8,54
	Y ₂	4,82			18,90			23,72			
	Y ₃	5,27			17,96			23,23			

Nota: los errores fueron tomados a partir de la variación de los resultados individuales. El contenido de fenoles totales fue calculado a partir de la suma de los parámetros cuantificados en forma individual para cada cultivar y replica

Una causa de variación en los valores del contenido fenólico total viene dado por las condiciones del experimento, que al ser un método común se produce una gran influencia, las condiciones geográficas, climáticas, tipo de estándar utilizado, analista.

El análisis de varianza y la prueba de medias mostraron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre variedades para fenoles solubles (Tabla 13 y Fig. 15) La mayor concentración se obtuvo en la variedad Táchira mientras que las demás se comportaron estadísticamente similar entre ellas. En el caso de los fenoles ligados a la pared celular hubo diferencias significativas entre cultivares (Tabla 14). Los cultivares Yu-62 y Boconó presentaron los valores más altos y superaron a Táchira y Maracay que tuvieron un comportamiento similar entre si (Fig. 16)

Tabla 13. Análisis de la Varianza para fenoles solubles en cuatro variedades de morera.

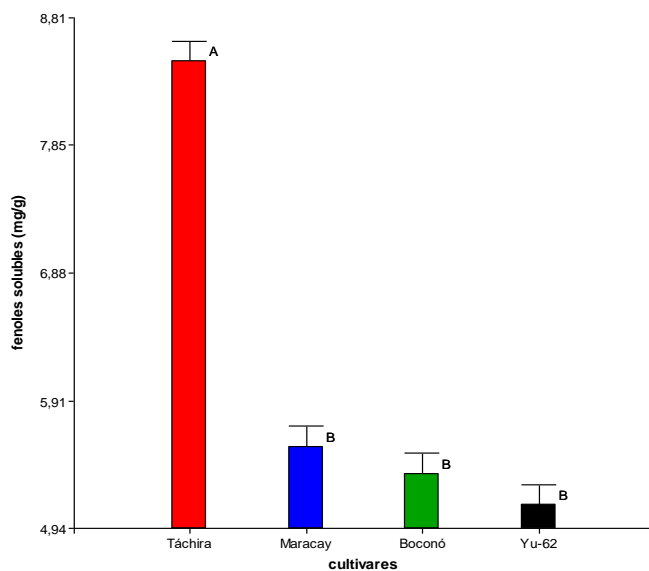
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	22,41	3	7,47	100,77	<0,0001
Cultivares	22,41	3	7,47	100,77	<0,0001
Error	0,59	8	0,07		
Total	23,01	11			

Cv: 4,44

Tabla 14. Análisis de la Varianza para fenoles ligados a la pared celular en cuatro variedades de morera.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	189,97	3	63,32	122,57	<0,0001
Cultivares	189,97	3	63,32	122,57	<0,0001
Error	4,13	8	0,52		
Total	194,10	11			

Cv: 4,88



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura 15. Prueba de medias para fenoles solubles en cuatro variedades de morera. Fenoles solubles.

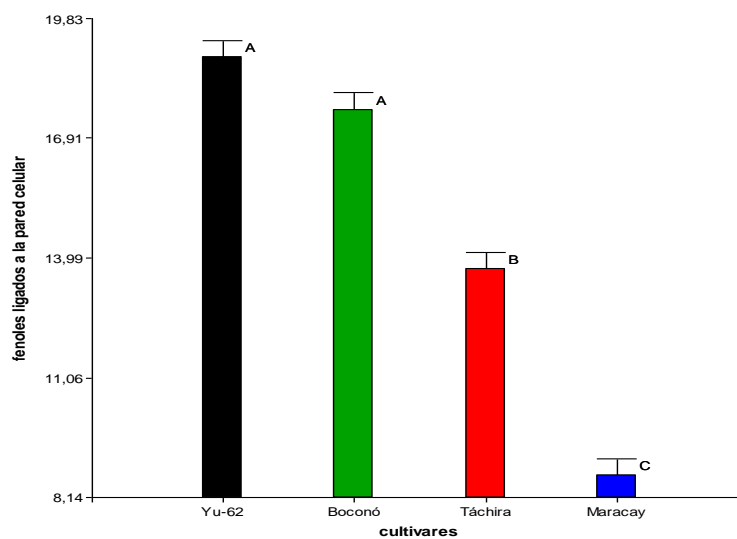


Figura 16 . Prueba de medias para fenoles ligados a la pared celular en las variedades Tachira, Maracay, Yu-62 y Boconó.

9.3.- Cuantificación de rutina por HPTLC

Cada muestra estudiada fue secada a temperatura ambiente bajo la luz solar por varios días antes de realizar el proceso de maceración con metanol por un periodo de una semana y posterior filtración. Con los extractos así obtenidos, se realizaron los análisis para la rutina y actividad antiradical. En los ensayos cualitativos realizados a las cuatro variedades estudiadas por TLC, se pudo visualizar que la presencia de rutina por medio de su coloración de acuerdo al comportamiento del patrón era demasiado débil que para la detección del programa (aplicación desarrollada en MATLAB proporcionada por el laboratorio de laser de la Facultad de Ciencias UCV) sobre la foto tomada bajo luz UV 254 nm, puede considerarse inexistente para la cuantificación en las variedades Boconó y Yu-62. Se les realizó un tratamiento aparte para concentrar alícuotas de 5 mL de cada extracto por medio de una evaporación controlada en baño de María hasta disminuir el volumen a 1 mL. Sin embargo, la matriz presente en el extracto sufrió transformaciones que tuvieron consecuencias en el desarrollo del perfil cromatográfico, sin obtener resultados satisfactorios. Una variable que debe tomarse en cuenta es la posible variación de concentraciones en el metabolito debido a la edad de las plantas.

La determinación de la concentración de este metabolito en las muestras por densitometría óptica (HPTLC), permite la visualización directa del componente en estudio en un perfil fenólico de la planta donde el sistema de solventes utilizado propuesto en la literatura, interviene en la separación de ácidos fenólicos y flavonoides presentes en ellas, aspecto que favorece de manera rápida y temprana, afirmar la factibilidad de la cuantificación de la rutina en cada una de las variedades de *Morus alba* estudiadas. Los valores reportados en la literatura así como los obtenidos para las variedades Táchira y Maracay, son mostrados en las tablas 15 y 16.

Tabla 15. Datos correspondientes a la determinación de la concentración de rutina en los extractos de morera para sus variedades Táchira y Maracay.

Cultivares	Replicas	C _{rutina} (extracto) (ppm)	M _{rutina} (extracto) (mg)	C _{rutina/hoja} (mg/g)	Promedio (mg/g)	Cv %
Táchira	1	197,03	9,8515	0,86	0,87±0,01	1,41
	2	202,67	10,1335	0,88		
	3	199,63	9,9815	0,87		
Maracay	1	342,92	17,146	1,30	1,36±0,06	4,06
	2	372,14	18,607	1,41		
	3	356,79	17,8495	1,35		

Las replicas provienen del mismo extracto metanólico de partida para cada variedad y del mismo ejemplar. Las condiciones para TLC: sistema acetato de etilo-acido fórmico-ácido acético-agua (100:11:11:26). Sistema de detección: radiación UV: 254 nm Los resultados obtenidos se encuentran expresados en función de mg equivalentes de rutina/g de hoja fresca.

Tabla 16. Concentración de Rutina en hojas de *Morus alba*

Autores	Concentración de Rutina (MS)
Zhishen et al (1996) citado por García y Ojeda (2004)	0,34 %
Katsube et al (2009)	331 mg/100 g
Radojkovic M, et al (2012)	289,30±2,04 mg/100g
Flaczyk et al (2013)	<ul style="list-style-type: none"> • 0,90 ± 0,01^a • 0,91 ± 0,01^b

^a variable determinada en planta piloto (g/100g)

^b variable determinada en laboratorio (g/100g)

Según García y Ojeda (2004) las concentraciones de flavonoides no son influenciadas por fertilización y época de año, teniendo una gran relevancia porque pasa a formar un

marcador quimitaxonómico representativo para la especie *Morus alba*, ya que la síntesis de estos son completamente independientes de los compuestos nitrogenados, a pesar que las concentraciones de varios compuestos fenólicos varían en gran manera bajo los cambios ambientales.

Los flavonoles son los que contribuyen en mayor grado a la actividad antioxidante en las hojas de la especie de *Morus alba* (Flaczyk, et al 2013), siendo el compuesto más representativo la rutina (quercitin-3-rutinosido). Este compuesto también es utilizado como patrón para la determinación de flavonoides totales en ensayos fitoquímicos. La determinación de esta familia de compuestos no se realizó en este trabajo ya que la técnica empleada, permite la cuantificación de un compuesto definido que pueda ser aislado mediante la técnica de TLC.

Las concentraciones encontradas para las variedades estudiadas, son bajas con respecto a las publicadas en la bibliografía (tabla 16) teniendo en cuenta que las variedades utilizadas como referencias, corresponden a regiones de Asia y Europa oriental destacando en ellas, la presencia del clima templado contrastado con el clima tropical presente en Venezuela, permitiendo conocer la influencia de la temperatura en la concentración de este metabolito y la tendencia a observar en cuanto al contenido de flavonoides totales y por supuesto, el contenido fenólico total.

En el estudio de Katsube, et al (2009) sobre flavonoles glicosilados en hojas de morera, mencionan que la concentración mayor encontrada de estos corresponde a los compuestos de quercitina 3-(6-malonilglucósido) y rutina.

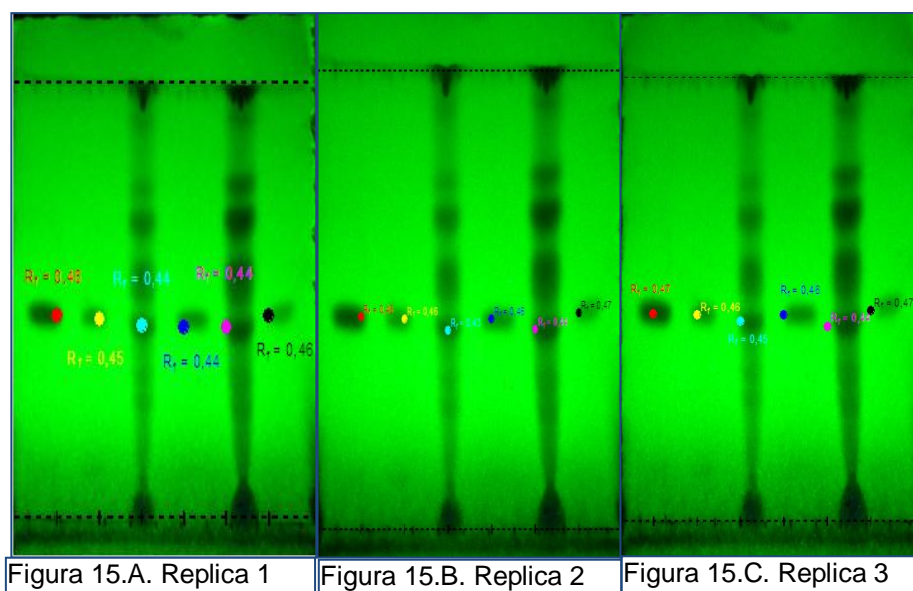


Figura 17. Placas cromatográficas para la cuantificación de rutina.

Detección a 254 nm. Sistema de solventes: Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:26). A: Táchira, B: Maracay.

9.4.- Actividad antiradical.

La determinación de la actividad antiradical con DPPH, corresponde a un método indirecto para la valoración de la actividad antioxidante de extractos de plantas en el cual se mide la relación de absorbancias correspondientes a la desaparición del radical en soluciones con diferentes concentraciones conocidas del extracto de planta, cumpliendo con la ley de Lambert-Beer. Con los datos obtenidos se obtiene la curva de calibración (después del tratamiento matemático) y por interpolación se obtiene la concentración del extracto correspondiente a la inhibición o disminución de la concentración del DPPH en un 50%, el cual equivale a su actividad antiradical. Es altamente reactiva a pesar de trabajar en concentraciones de ppm.

Tabla 17. Valores de IC₅₀ encontrados para las variedades Táchira, Maracay, Boconó, Yu-62 y para el patrón de rutina en ppm (mg/L, µg/mL)

Muestras		IC ₅₀			Promedio	S	Cv
		1	2	3			
Cultivares	Táchira	555,48	549,95	555,61	553,68	3,23	0,58
	Maracay	1052,06	1054,50	1055,47	1054,01	1,76	0,17
	Boconó	1397,81	1401,49	1397,48	1398,93	2,23	0,16
	Yu-62	3822,35	3833,33	3798,00	3817,89	18,08	0,47
Patrón	Rutina	5,20	5,27	5,29	5,25	0,05	0,90

Se utilizó como solvente metanol. Por cada variedad estudiada y patrón se realizó 3 replicas. La extracción fue realizada por maceración. El extracto fue conservado en un periodo de aprox. 6 meses antes del análisis conservado a temperatura ambiente y con poca luz (no ausente). La concentración de DPPH es de (0,339 – 0,278) mM (ver anexos)

Los resultados obtenidos parten de condiciones particulares en cuanto la concentración, solvente utilizado y tiempo de reacción con respecto a varios trabajos presentados en el área. Su influencia en el experimento puede ser clave en la variación de los datos obtenidos: según la teoría, la modificación de estas condiciones durante el ensayo, afecta la velocidad de la reacción de los compuestos antioxidantes con el DPPH y en consecuencia se presentan discrepancias significativas (sin tomar en cuenta, las diferencias posibles debido a las diversas variedades presentes de las plantas comparadas). En la tabla 18 se puede observar las distintas condiciones que se utilizaron para determinar la actividad antioxidante en donde la concentración que emplearon es menor a la utilizada en el presente ensayo: ambos reportan actividades altas para el extracto de hojas de morera. Otra característica es que el ensayo lo realizaron con extractos recientemente preparados. Adicionalmente, en cuanto a las muestra analizadas, tiene incidencia la estabilidad de los extractos ya que los ensayos fueron realizados con soluciones preparadas alrededor de 7 meses y no se puede descartar que haya ocurrido degradaciones de compuestos que puedan ser de influencia, por lo tanto, los resultados expresan la capacidad antiradical en relación a la

estabilidad de los extractos y por ello se puede considerar bajos. Los compuestos químicos involucrados con este parámetro, están conformados por la familia de compuestos fenólicos y compuestos de tipo carotenoide caracterizados por poseer dobles enlaces conjugados en su estructura. Uno de ellos son las clorofilas, además de la presencia de vitaminas. Esta actividad está sujeta al conjunto de variables que pueden afectar la concentración de los compuestos fenólicos.

Tabla 18. Capacidad antiradical reportada como IC₅₀ presentes en la especie *Morus alba* presentado por algunos autores en investigaciones recientes.

Cultivares	Investigadores	Valor reportado	Condiciones de ensayo
<i>Morus alba</i> L. (Serbia)	Radojkovic, et al (2012)	IC ₅₀ : 0,0124 mg/mL	C _{DPPH} : 0,2 mM
<i>Morus alba</i> (planta Tut, Bangladesh)	Khan, et al (2013)	IC ₅₀ : 108,69 µg/mL	C _{DPPH} : 0,1 mM, extracto metanólico
<i>Morus alba</i> L. Variedad wielkolisma zolwinska. Polonia.	Flacksyk, et al (2013)	IC ₅₀ : 214,08 µmol Trolox/ g extracto seco.	C _{DPPH} : 1 mM, extracto acuoso

El IC₅₀ más elevado (Yu-62), es el que corresponde al valor de actividad más bajo y viceversa. Se esperaba que la tendencia a observar en la actividad antioxidante sea la misma visualizada para el contenido total de fenoles (Yu>Bo>Ta>Ma), tomando en cuenta que la mayor influencia en este parámetro son proporcionadas por estos. Sin embargo, los resultados obtenidos (Ta>Ma>Bo>Yu) arrojan tendencias diferentes por lo cual deben considerarse el aporte dado por los carotenoides y las vitaminas (cuyas

concentraciones no fueron determinadas en el presente trabajo) en la actividad antioxidante de las variables estudiadas.

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre variedades (Tabla 19)

Tabla 19. Análisis de la Varianza para actividad antiradical en cuatro variedades de morera.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	19006295,05	3	6335431,68	311199,17	<0,0001
Cultivares	19006295,05	3	6335431,68	311199,17	<0,0001
Error	162,87	8	20,36		
Total	19006457,92	11			

Cv: 0,26.

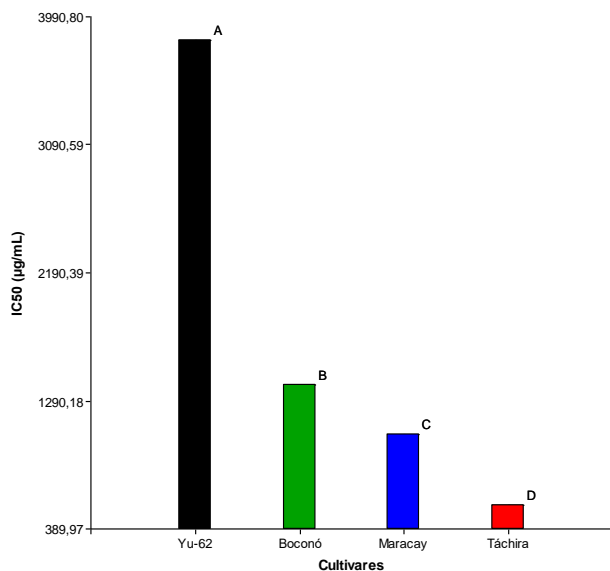


Figura 18. Prueba de medias para la actividad antiradical de las variedades Táchira, Maracay, Boconó y Yu-62.

La lectura de la Fig.18 presentada para este parámetro, debe tomar en cuenta el menor valor reportado como el de mejor actividad.

Algunos investigadores (tabla 18) reportan diferentes valores de IC_{50} para diferentes variedades locales del género *Morus* en comparación a los resultados obtenidos (Tabla 17) caracterizado por presentar condiciones de análisis relativamente diferentes en cuanto: al tipo de extracto (método de extracción, solvente utilizado), concentración de DPPH empleado, tiempo de reacción. Por lo tanto, una comparación directa entre estos no se puede realizar. Cabe de destacar que las variedades involucradas en esta comparación se esperan que difieran, por el hecho de que las condiciones agroecológicas donde son cultivadas (o por simple adaptación al ambiente al ser introducidas procedentes de otras localidades) son diferentes, dándoles características propias individuales.

9.5.- Análisis estadístico general.

El análisis estadístico mediante el uso de componentes principales y el uso de una gráfica biplot permiten visualizar las variables evaluadas en un mismo plano y apreciar sus asociaciones entre sí. Ángulos de 180 grados indica correlación negativa y ángulos estrechos permiten inferir alto grado de asociación. Variables con ángulos rectos entre sí, indica ningún tipo de asociación entre ellas. Como utilidad permite establecer tendencias bajo parámetros controlados proporcionando un panorama amplio para la toma de decisiones en el caso particular del sector agropecuario.

En la siguiente grafica:

- 1) Los datos presentados describen en un 85,1 % la fiabilidad de los resultados.
- 2) Presenta un resumen de todos los resultados obtenidos para cada parámetro estudiado en cada cultivar y las relaciones entre ellos.

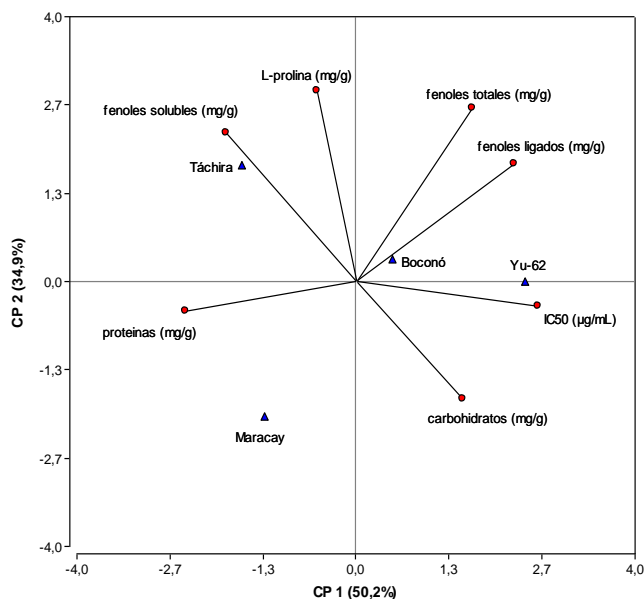


Figura 18. Gráfico-biplot para cuatro variedades de morera y los parámetros valuados

Los fenoles solubles se encuentran a 180° con respecto a carbohidratos, lo que implica que su relación es inversa: la tendencia es que a mayor concentración de fenoles soluble menor será la presencia de carbohidratos y viceversa, situación que ocurre cuando el ángulo descrito por las rectas que conforman las variables a ser comparadas en el grafico, se encuentran entre $90 > 180$ grados. Caso contrario es la relación entre L-prolina libre y fenoles solubles la cual presentan una misma tendencia ya que el ángulo que describen son menores a 90° , situación que se presentara en las demás comparaciones que cumplan con esta característica.

La variedad Táchira según el biplot está más asociada con fenoles solubles y L-Prolina y opuesta a carbohidratos; en cambio la variedad Maracay está relacionada con proteínas. La variedad Yu-62 está más asociada con la variable IC_{50} (La tendencia observada es inversa: mayor IC_{50} , menor capacidad antiradical), . La variedad Boconó se ubica hacia el centro de origen del biplot indicando que no tiene mayor interacción con las variables estudiadas.

10- Conclusiones

- Se visualiza de forma cualitativa por medio del uso de la técnica de cromatografía de capa fina (CCF), la presencia de compuestos fenólicos (utilizando rutina como patrón de comparación), carbohidratos solubles (específicamente polisacáridos utilizando sacarosa como patrón de comparación), aminoácidos (utilizando como patrón L-prolina).
- Para contenido total de fenoles (mg equivalentes de ácido clorogénico por gramo de masa fresca de material vegetal) se obtuvo los valores: Yu-62 ($24,01 \pm 0,95$) siendo el valor más alto de las cuatro variedades estudiadas; Táchira ($22,19 \pm 0,49$); Boconó ($22,96 \pm 0,77$) y Maracay ($14,23 \pm 0,16$) siendo este último cultivar el que obtuvo la menor cantidad de las cuatro variedades.
- Se obtuvo como contenido de aminoácidos (mg equivalentes de L-prolina por gramo de masa fresca de material vegetal) valores siguientes: Táchira ($4,50 \pm 0,06$), siendo el valor más alto de las cuatro variedades estudiadas; Boconó ($4,39 \pm 0,22$); Yu-62 ($3,34 \pm 0,18$) y Maracay ($1,96 \pm 0,10$) siendo este último cultivar el que obtuvo la menor cantidad de las cuatro variedades,
- Los valores del contenido de carbohidratos solubles (mg equivalentes de D-glucosa por gramo de masa fresca de material vegetal) fueron los siguientes: Boconó ($76,23 \pm 3,88$), siendo el valor más alto de las cuatro variedades estudiadas; Yu-62 ($68,61 \pm 3,37$); Maracay ($68,15 \pm 3,28$) y Táchira ($51,59 \pm 1,06$)
- El contenido de proteínas (mg equivalentes de albúmina de suero bovino (BSA) por gramo de masa fresca de material vegetal) fueron los siguientes: Maracay ($23,81 \pm 1,13$) siendo el valor más alto de las cuatro variedades estudiadas; Táchira ($21,41 \pm 0,06$); Boconó ($21,24 \pm 0,83$) y Yu-62 ($6,86 \pm 0,31$) siendo este cultivar el de menor contenido.
- No se detectó la presencia de saponinas en ninguna de las cuatro variedades estudiadas.

- Se determinó la actividad antiradical de las variedades de morera estudiadas con los siguientes resultados de IC_{50} : para la variedad Táchira, 553,68 $\mu\text{g/mL}$, siendo el valor más alto. Para las variedades Yu-62, Maracay y Boconó, 3817,89 $\mu\text{g/mL}$, 1054,01 $\mu\text{g/mL}$ y 1398,93 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Los resultados están sujetos a la estabilidad de los extractos a los 7 meses.
- Las variedades Táchira y Maracay poseen una mayor concentración de rutina en las hojas con valores de 0,87 mg/g y 1,36 mg/g, respectivamente.

11.- Recomendaciones

- Tomar las muestras directamente de las zonas en donde se encuentran los cultivos de las variedades respectivas, llevando el control de las condiciones ambientales que lo rodean, la edad de las plantas, muestreo por zonas de la planta y de forma global, para así llevar un seguimiento de estos, que permita visualizar variaciones en las concentraciones de sus metabolitos en periodos prolongados y condiciones cambiantes para un mejor aprovechamiento a largo plazo, además de controlar y observar variaciones en la fertilización, frecuencias de corte y tiempo de rebrote.
- Desarrollar una metodología y validarla utilizando la técnica de HPLC que permita determinar concentraciones de saponinas triterpénicas, esteroidales o sus respectivas agliconas en extractos de plantas.
- Realizar los ensayos bromatológicos y de contenido de humedad a las variedades estudiadas que permitan apoyar y complementar la información disponible.
- Realizar un despistaje de compuestos alcaloidales en dichas variedades.
- Determinar el contenido de ácidos fenólicos especialmente ácido clorogénico, ácido gálico en las variedades de morera estudiadas.
- Hacer estudios sobre actividad antirradical en extractos con diferentes solventes, dependencia del tiempo y estabilidad de los extractos.

12.- Referencias bibliográficas

- [1] García, Noda Y, Medina M, Martín G, Soca M. (2006). Morera: una alternativa viable para los sistemas de alimentación animal en el trópico. Rev. AIA 10(1) 55-72
- [2] Medina M, García D, Moratinos P, Cova L. (2009). La morera (*Morus Spp.*) como recurso forrajero: avances y consideraciones de investigación. Zootecnia Trop., 27(4): 343-362.
- [3] Medina M, García D, Moratinos P, Iglesias J, Clavero T. (2012). Evaluación del potencial agronómico de *Morus alba* para su inclusión en sistemas de pastoreo-ramoneo en Trujillo, Venezuela. Disponibilidad y composición química de la biomasa. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 29: 585-610.
- [4] Ccopa G, Quispe R, Fernández K. (2008). Elaboración de bebida filtrante de la hoja *Morus alba* L. con efecto hipoglucemiante. [Documento en línea] Visitado el día 10 de mayo del 2013 en http://www.uap.edu.pe/Investigaciones/Esp/Revista_09_Esp_07.pdf
- [5] Cholo F y Delgado H. (2011) Formación de callos en el cultivo de la morera (*Morus alba*. L.) [tesis en línea] Visitado el día 14 de enero del 2013 en <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/831/1/T-UTC-0602.pdf>.
- [6] Blanco M, Sierra M. (2005). Caracterización bromatológica y evaluación de diferentes niveles de inclusión de morera (*Morus alba* L.) y sauco (*Sambucus nigra* L.), en la alimentación de conejos en ceba. Universidad de la Salle. Facultad de zootecnia. Bogota. Pág. 27-29, 34-36
- [7] Benavides J. (1995). Manejo y utilización de la morera (*Morus alba*) como forraje. Agroforestería de las Américas. Año 2, n°7.
- [8] Orwa C, Mutua A, Kindt R, Jamnadass R, Simons A. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. [Documento en línea]. Visitado el día 10 de mayo del 2013 en http://www.worldagroforestry.org/treedb2/AFTPDFS/Morus_alba.pdf

- [9] Singhal B, Khan M, Dhar A, Baqual F, Bindroo M. (2010). Approaches to industrial exploitation of mulberry (*Mulberry sp.*) fruits. J. Fruit Ornament Plant Res. Vol 18(1): 83-99.
- [10] Garcia D, Medina M, Ojeda F. (2005). Carbohidratos solubles en cuatro variedades de morera (*Morus alba Linn.*). Pastos y forrajes. 28 (3): 233-239.
- [11] Inhibidores de los aminoácidos aromáticos. Importancia de las proteínas. Plant & Soil science eLibrary ^{pro} [página web en línea]. Visitado el día 13 de octubre del 2013. Disponible en: <http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformatio nmodule=1008088419&topicorder=2&maxto=7>
- [12] González E, Cáceres O. (2002). Valor nutritivo de árboles, arbustos y otras plantas forrajeras para los rumiantes. Pastos y forrajes. 25 (2): 15-20
- [13] Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the cuantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry 72, 248-254.
- [14] Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.
- [15] UNAM. (2007) Fundamentos de análisis de química de alimentos. Laboratorio de alimentos I. Departamento de alimentos y biotecnología. Facultad de Química. Pag 24
- [16] Teijon, J, Garrido A, Blanco D, Villaverde C, Mendoza C, Ramírez J. (2006). Fundamentos de bioquímica estructural. Editorial Tebar. Madrid. España. p 67-69
- [17] Ávalos A, Pérez - Uria E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (biología). Serie fisiología vegetal. 2(3): 119-145.
- [18] García D. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. Pastos y forrajes. 27 (1): 1-12.
- [19] Hernández, C. (2009). Acción y efecto de la polifenoloxidasas en alimentos. [Monografía en línea]. Visitado el día 14 de enero del 2013 Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/bistrean/123456789/32464/1/hernandezvaldez.pdf>

- [20] Radojkovic M, Zekovic Z, Vidovic S, Kocar D, Mascovic P. (2012). Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus spp. L., Moraceae*) extracts. *Hem. Ind.* 66 (4). 547-552
- [21] Memon A, Memon M, Luthria D, Bhangar M, Pitafi A. (2010). Phenolic acid profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata W., Morus nigra L., Morus alba L.*) leaves and fruits grown in Pakistan, *Pol. J. Food. Nutr. Sci.* 60(1): 25-32.
- [22] García D, Ojeda F. (2004). Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba (Linn.)*. II. Polifenoles totales. *Pastos y forrajes.* 27 (1): 59-64
- [23] Ali, A. A., and Fahad Alqurainy. (2006). "Activities of antioxidants in plants under environmental stress." *The lutein-prevention and treatment for diseases.* Transworld Research Network, India. Pág. 187-256.
- [24] Lock O. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. [Documento en línea]. Visitado el día 14 de enero del 2013. Disponible en <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap4.pdf>.
- [25] Antioxidantes. [Tesis en línea]. Visitado el día 10 de diciembre del 2012 en <http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080/rddu/bitstream/123456789/1389/1/T193.pdf>
- [26] García D, Ojeda F. (2004). Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba (Linn.)*. III. Flavonoides totales. *Pastos y forrajes.* 27 (3): 267-272.
- [27] Londoño, J. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. [Documento en línea] visitado el 13 de octubre del 2013. Disponible en: <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/133/1/9.%20129-162.pdf>.
- [28] Pérez G, Martínez G. (2001). Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farm. Bonaerence* 20(4): 297-306.
- [29] García E. (2008). Caracterización fitoquímica y cuantificación por espectrofotometría UV de saponinas y flavonoides en extractos de rizomas y frondas

de *Phlebodium pseudoaureum* [tesis en línea]. Visitado el 10 de mayo del 2013 en http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2676.pdf.

[30] García D, Medina M, Ojeda F. (2005). Efectos de los niveles de fertilización, la variedad y época sobre los contenidos de saponinas esteroidales en morera (*Morus Alba L.*) Rev. AIA 9(2): 87-96.

[31] Reddy V, Urooj A. (2013) Proximate, phytochemical profile and antioxidant activity (in vitro y ex vivo) of *Morus indica* varieties. IJPSR, Vol 4(4): 1626-1634.

[32] Aguas A, García A, Velásquez G, Casanova N, Chang V. (2012). Propuesta para el análisis de riesgo de la especie de la planta exótica *Morus alba L.* (*Moraceae*) en Venezuela. Boletín de la red latinoamericana para el estudio de las plantas invasoras. Vol 2(2): 12-22.

[33] Gutiérrez D, Ortiz C, Mendoza C. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para la alimentación animal. Simposio de metrología. Santiago de Querétaro, México 22 al 24 de octubre del 2008.

[34] Cazaña Y, Pérez Y, Díaz M. (2010) Propiedades farmacológicas de la morera (*Morus alba L.*) [documento en línea] Visitado el día 10 de diciembre del 2012 en: <http://monografias.umcc.cu/monos/2010/AGRONOMIA/mo10115.pdf>.

[35] Maisuthisakul P, Suttajit M, Pongsawatmanit R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. Food Chem. 100 (4): 1409-1418.

[36] Anusuya N, Manian S. (2012). Antioxidant and free radical scavenging potential of different solvent extracts of *Indigofera Tinctoria L.* leaves. Int. J. Pharm. Sci, vol 5(1): 142-147.

[37] Coba, P., L. Mayacu Tivi y G. Vidari. 2010. Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus*. La Granja. Vol. 11 (1). Pág. 22-30.

[38] Chandra H, Kant V. (2010). High performance thin layer chromatography (HPTLC): a modern analytical tool for biological analysis. Natural and science. 8(10).

- [39] Srivastava M. (2011). High-Performance Thin- Layer Chromatography (HPTLC). New York, Springer. Págs. 9, 10, 43
- [40] Guevara, Villagomez A. Efectos inhibitorios de los extractos de hojas de *Morus sp.* en la actividad de alfa-glucosidasa. [Documento en línea]. Visitado el 13 de octubre del 2013. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/2205>
- [41] García D, Medina M, Domínguez C, Baldizán A, Humbría J, Cova L. (2006). Evaluación química de especies no leguminosas con potencial forrajero en el estado Trujillo, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 24(4): 401-415.
- [42] Martín G, Noda Y, Pentón G, García G, García F, González E, Ojeda F, Milera M, López O, Ly J, Leiva L, Arece J. (2007). La morera (*Morus alba*, Linn.): una especie de interés para la alimentación animal. *Pastos y forrajes*. 3: 3-19.
- [43] Radojkovic M, Zekovic Z, Jokic S, Vidovic S. (2012) Determination of optimal extraction parameters of mulberry leaves using response surface methodology (RSM). *Romanian Biotechnology Letters*, 17 (3) :7295-7308.
- [44] Wagner H. and Bladt. S. (2009). *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. Second edition, Germany, Springer. Págs. 305, 306, 353
- [45] Vizcaino L, Rodriguez M, Mancilla N, Avila M, Osuna J, Arias C. (2012). Biosíntesis in vitro de oligofructanos: inulinas y neoinulinas por fructosiltransferasas de *Agave tequilana* Weber var. Azul y *A. inaequidens* subsp. *Inaequidens* Koch. *Gayana Bot.* (Número especial): 66-74.
- [46] Aliyu A, Ibrahim M, Ibrahim H, Musa A, Lawal A, Oshanimi J, Usman M, Abdulkadir I, Oyewale A, Amupitan J. (2012). Free radical scavenging and total antioxidant capacity of methanol extract of *Ethulia conyzoides* growing in Nigeria. *Rom. Biotechnol. Lett* 17 (4): 7458-7465
- [47] Ghasemzadeh A, Jaafar H, Rahmat A. (2010). Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia Young Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, 15: 4324-4333.

[48] Di Rienzo, Casanoves F, Balzarini M, González L, Tablada M, Robledo C. InfoStat versión 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>

[49] Katsube T, Tsurumaga Y, Sugiyama M, Furuno, T, Yamasaki Y. (2009). Effect of air – drying temperature on antioxidant capacity and stability of poliphenolic compounds in mulberry leaves. (*Morus alba*)

[50] González, E y Cáceres, O. (2002). Valor nutritivo de árboles, arbustos y otras plantas forrajeras para los rumiantes. *Revista pastos y forrajes*. Vol. 25, N° 1.

Anexos.

Cuantificación de Rutina por HPTLC

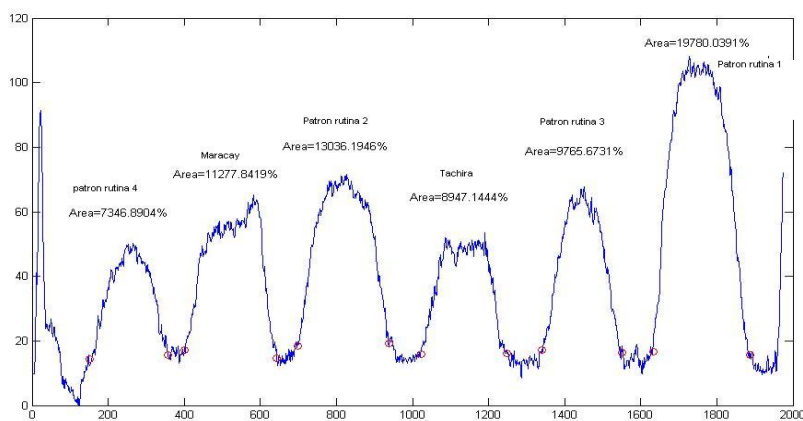


Figura 19. Densitograma de la réplica n°1 de la muestra analizada para la determinación de rutina de extractos metanólicos de las variedades Táchira y Maracay.

Cuantificación de rutina en extractos metanólicos de variedades de *Morus alba* (Táchira, Maracay). Réplica 1.

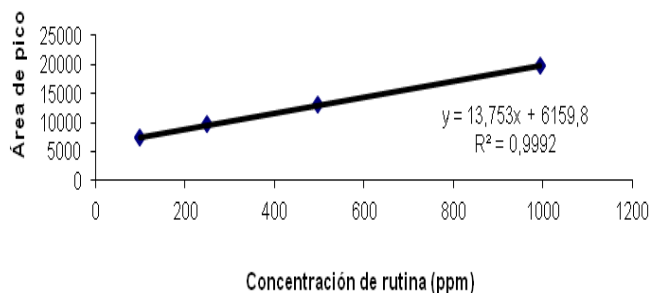


Figura 20. Curva de calibración para la determinación de la concentración de rutina en los extractos de Táchira y Maracay de la réplica n°1.

Concentraciones de los patrones de rutina.

Masa de rutina:

Patrón 1: 994, patrón 2 (497), patrón 3 (248,5) patrón 4(99,4)

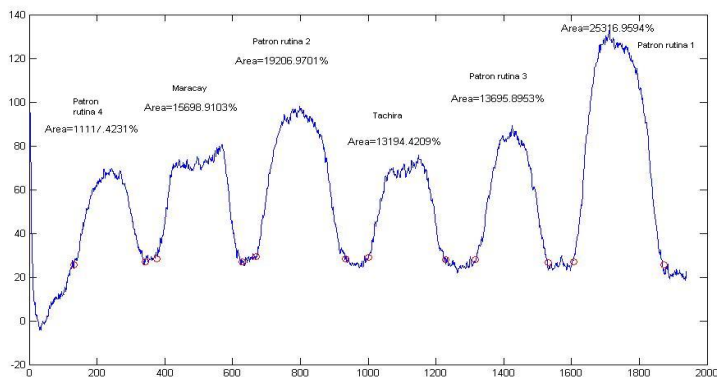


Figura 21. Densitograma de la réplica n°2 de la muestra analizada para la determinación de rutina de extractos metanólicos de las variedades Táchira y Maracay.

Quantificación de rutina en extractos metanólicos de variedades de *Morus alba* (Táchira, Maracay) Réplica 2

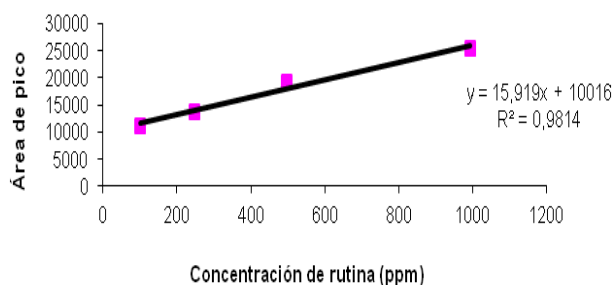


Figura 22. Curva de calibración para la determinación de la concentración de rutina en los extractos de Táchira y Maracay de la réplica n°2.

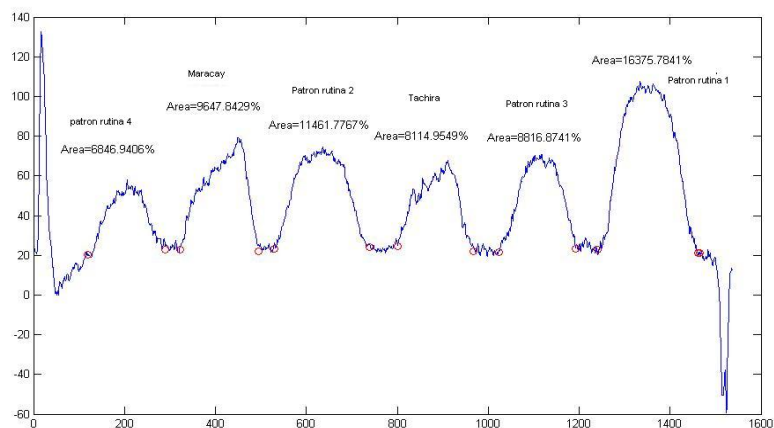


Figura 23. Densitograma de la réplica n°3 de la muestra analizada para la determinación de rutina de extractos metanólicos de las variedades Táchira y Maracay.

Quantificación de rutina en extractos metanólicos de variedades de *Morus alba* (Táchira, Maracay). Réplica 3.

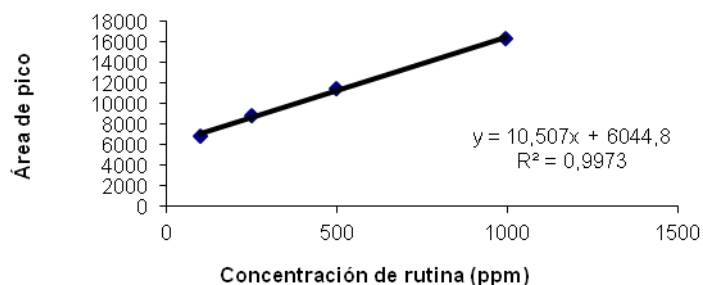


Figura 24. Curva de calibración para la determinación de la concentración de rutina en los extractos de Táchira y Maracay de la réplica n°3.

Actividad antiradical.

Tabla 20. Datos para la curva de calibración para la determinación del IC₅₀ para el extracto de la variedad de morera (Boconó) en su réplica n°1

Concentración de ext. Boconó	A _b	A _m	$p:(a_c-a_m+a_b)/a_c$	100-(p*100)
3480,1	0,039	0,074 ^b	0,936	6,43
1740,05	0,027	0,200 ^d	0,599	40,14
348,01	0,02	0,405 ^b	0,292	70,77
34,48	0,02	0,463 ^b	0,186	81,43

A_c: absorbancia control, A_b: absorbancia blanco, A_m: absorbancia muestra.



Figura 25. Curva de calibración para determinar la capacidad antiradical de la morera, variedad Boconó.

Tabla 21. Datos de la curva de calibración para la determinación del IC₅₀ para el extracto de la variedad de morera (Maracay) en su réplica n°1

Concentración del ext. Maracay	Abs blanco	abs muestra	$P:(a_c-a_m+a_b)/a_c$	100-(p*100)
1318,51	0,04	0,215 ^d	0,593967517	40,60
1054,08	0,058	0,423 ^a	0,494459834	50,55
263,52	0,05	0,585 ^a	0,25900277	74,10
26,35	0,018	0,522 ^b	0,073529412	92,65

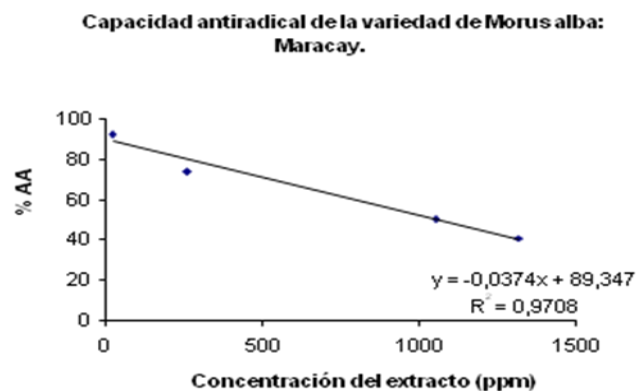


Figura 26. Curva de calibración para determinar la capacidad antirradical de la morera, variedad Maracay. Replica n°1

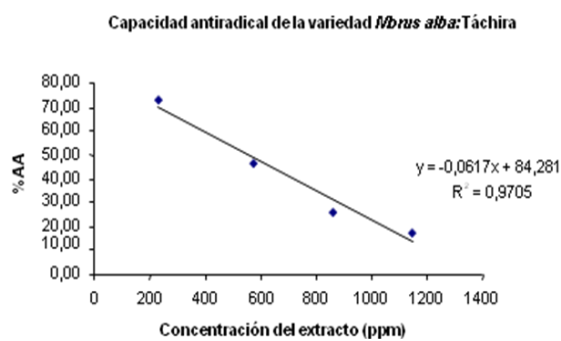


Figura 27. Curva de calibración para determinar la capacidad antirradical de la morera, variedad Táchira replica n°3.

Tabla 22. Datos de la curva de calibración para la determinación del IC₅₀ para el extracto de la variedad de morera (Táchira) en su réplica n°3.

Concentración del ext. Táchira	Abs blanco	abs muestra	$p:(ac-am+ab)/ac$	$100-(p*100)$
1147,32	0,056	0,183 ^a	0,824099723	17,59
860,49	0,043	0,233 ^a	0,736842105	26,32
573,66	0,04	0,377 ^a	0,533240997	46,68
229,464	0,021	0,548 ^a	0,270083102	72,99

Tabla 23. Datos de la curva de calibración para la determinación del IC₅₀ para el extracto de la variedad de morera (Yu-62) en su réplica n°3.

Concentración del ext. Yu-62	abs blanco	abs muestra	$p:(ac-am+ab)/ac$	$100-(p*100)$
5909,05	0,138	0,305 ^c	0,720	27,97
3283,08	0,076	0,386 ^b	0,481	51,93
1969,85	0,026	0,424 ^b	0,268	73,16
196,985	0,017	0,520 ^c	0,075	92,46



Figura 28. Curva de calibración para determinar la capacidad antirradical de la morera, variedad Yu-62 repica n°3

Tabla 24. Datos de la curva de calibración para la determinación del IC₅₀ para rutina en su réplica n°3.

Concentración del rutina (ppm)	abs blanco	abs muestra	$p:(ac-am+ab)/ac$	$100-(p*100)$
10	0,018	0,162 ^b	0,735294118	26,47
7	0,02	0,246 ^c	0,621440536	37,86
5	0,018	0,295 ^c	0,5360134	46,40
1	0	0,339 ^d	0,213457077	78,65

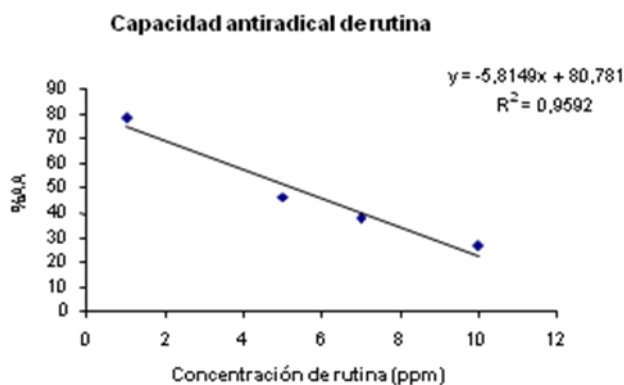


Figura 29. Curva de calibración para determinar la capacidad antirradical de Rutina réplica n°3.

Nota: A_c: absorbancia control (DPPH)

1. ^a A_c: 0,722. Concentración de DPPH: 0,339 mM
2. ^b A_c: 0,544. Concentración de DPPH: 0,281 mM
3. ^c A_c: 0,597. Concentración de DPPH: 0,289 mM
4. ^d A_c: 0,431. Concentración de DPPH: 0,278 mM Temp.: 20⁰C

Tabla 25. Datos de los extractos de plantas preparados para los análisis de TLC, HPTLC y actividad antiradical.

Cultivares	Masa ($\pm 0,0001$ g)	Volumen (mL)	concentración de extracto (ppm)
Táchira	11,4732	50	229464
Maracay	13,1851	50	263702
Boconó	17,4005	50	348010
Yu-62	3,9397	20	196985

Metabolitos primarios.

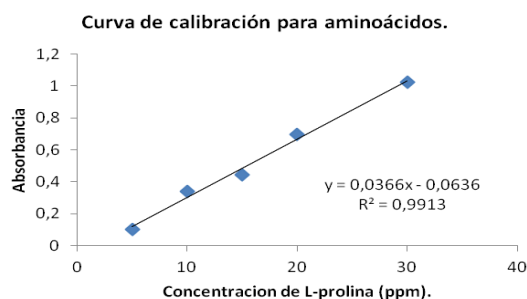


Figura 30. Curva de calibración para la determinación de aminoácidos como equivalentes de l-prolina.

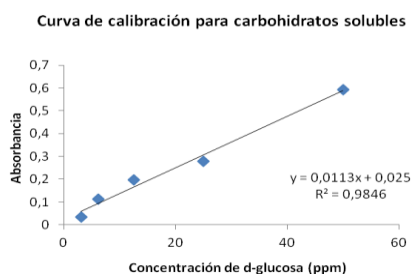


Figura 31. Curva de calibración para la determinación de la concentración de carbohidratos solubles como equivalentes de d-glucosa.

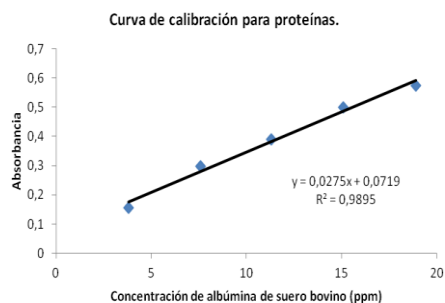


Figura 32. Curva de calibración para la determinación de proteínas como equivalentes de albúmina de suero bovino.

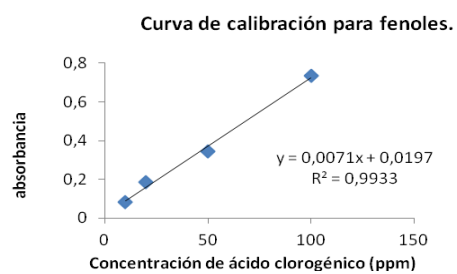


Figura 33. Curva de calibración para la determinación de fenoles como equivalentes de ácido clorogénico.

