

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUIMICA**



**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

**EVALUACION CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS  
EN VARIEDADES DE MORERA.**

**Presentado por:**

Br. Rojas, Yeifre

**Tutores:**

Dra. Rodríguez, María

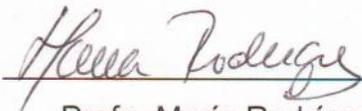
Caracas, Febrero 2016.

Yo, Profesora María Rodríguez, Investigadora del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, y el Doctor Ramón Rea, Investigador del Instituto de Estudios Avanzados IDEA. Certificamos que, el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

**“EVALUACION CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN VARIEDADES DE MORERA”.**

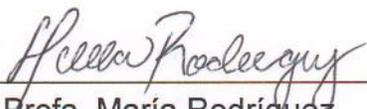
Que presenta el Br. Yeifre J. Rojas A., para aspirar al título de Licenciado en Química, ha sido realizado en conjunto entre el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela y el Instituto de Estudios Avanzados IDEA, bajo nuestra dirección, durante los años 2012 y 2015, y con esta fecha autorizamos su presentación.

Caracas, 8 de Marzo de 2016

  
Prof. María Rodríguez

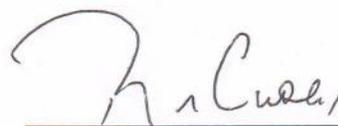
  
Dr. Ramón Rea

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "EVALUACION CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN VARIETADES DE MORERA". Presentado por el Br. Yeifre José Rojas Alvear, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química.



Profa. María Rodríguez

(Director)



Dr. Ramón Rea

(Director)



Dra. Katuska Chávez

(Jurado)



Dra. Mingrelia España

(Jurado)

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
1.1 Reseña histórica.....	2
1.2 Ubicación y germoplasma existente.....	3
1.3 Uso de la morera en la industria y para el hombre.....	5
1.4 Morera en Venezuela.....	6
1.5 Metabolitos primarios.....	7
1.6 Metabolitos secundarios.....	14
1.7 Función de los metabolitos secundarios en <i>Morus alba</i> .....	18
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>20</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos específicos .....	23

<b>4. Metodología Experimental.....</b>	<b>25</b>
4.1. Diseño experimental.....	25
4.1.1 Material vegetal.....	25
4.2. Materiales y reactivos.....	27
4.3. Equipos.....	28
<b>4.4. Métodos.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4.1. Perfil químico cualitativo.....</b>	<b>28</b>
<b>4.4.2. Compuestos fenólicos.....</b>	<b>29</b>
4.4.2.1. Extracción de fenoles.....	29
4.4.2.3 Cuantificación de fenoles.....	30
<b>4.4.3. Proteínas.....</b>	<b>31</b>
4.4.3.1. Extracción de proteínas.....	31
4.4.3.2. Determinación de proteínas.....	31
4.4.3.3 Cuantificación de proteínas.....	32
<b>4.4.4. Aminoácidos.....</b>	<b>32</b>

4.4.4.1. Extracción de aminoácidos (prolina libre).....	32
4.4.4.2. Determinación de aminoácidos.....	33
4.4.4.3 Cuantificación de aminoácidos.....	33
<b>4.4.5. Carbohidratos.....</b>	<b>34</b>
4.4.5.1. Extracción de carbohidratos.....	34
4.4.5.2. Determinación de carbohidratos.....	35
4.4.5.3 Cuantificación de aminoácidos.....	35
<b>4.4.6. Flavonoides.....</b>	<b>36</b>
4.4.6.1. Determinación de flavonoides.....	36
4.4.6.2 Cuantificación de flavonoides.....	36
<b>4.4.7. Saponinas.....</b>	<b>37</b>
4.4.7.1. Extracción de saponinas.....	37

4.4.7.2. Determinación de saponinas.....	37
4.4.4.3 Cuantificación de saponinas.....	37
<b>4.4.8. Actividad antirradical.....</b>	<b>38</b>
<b>4.4.9. Análisis estadístico.....</b>	<b>39</b>
<b>5. Resultados y Discusiones.....</b>	<b>40</b>
<b>5.1. Análisis Cualitativo: Cromatografía de Capa Fina (TLC).....</b>	<b>40</b>
5.1.1. Fenoles y flavonoides.....	40
5.1.2. Aminoácidos y proteínas.....	43
5.1.3. Saponinas.....	44
<b>5.2. Análisis cuantitativo.....</b>	<b>46</b>
5.2.1. Cuantificación de Fenoles totales.....	46
5.2.2. Cuantificación de Carbohidratos.....	53
5.2.3. Cuantificación de Aminoácidos.....	56

5.2.4. Cuantificación de Proteínas.....	60
5.2.5. Cuantificación de Flavonoides.....	63
5.2.6. Cuantificación de Saponinas.....	67
5.2.7. Actividad antirradical.....	71
<b>5.3. Análisis de asociación de metabolitos entre variedades.....</b>	<b>76</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>80</b>
<b>7. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>82</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>84</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>94</b>

## RESUMEN

La morera, también conocida como mora blanca, es una planta ampliamente usada en diversos campos (medicina, alimento, etc), esto debido a su composición fitoquímica. En este trabajo se realizó un estudio de los metabolitos secundarios de la *Morus alba* y determinar comparativamente 4 variedades de esta. Se encontró en cada metabolito a una variedad sobresaliente de las demás en cuanto a su concentración. Para los fenoles totales se halló a la variedad CGT (Criolla/Guatemalteca/Tailandesa); para los carbohidratos se destacó la variedad Acorazonada/Criolla; en los aminoácidos la variedad con mayor concentración se destaca la CGT; las proteínas por su parte tienen como variedad de mayor concentración a la Murcia; para los flavonoides la Española; en el caso de las saponinas, los valores no mostraron resultados concluyentes, aunque se destaca la variedad Murcia. Finalmente, se estudió la actividad antirradical de estas variedades, destacándose de entre todas a la Variedad Murcia como la de mayor actividad.

Todos estos resultados permiten concluir que la morera es una especie de interés para diversas actividades humanas, y dependiendo del uso que quiera darle, se debe tener en consideración la variedad más apropiada. Se recomienda realizar estudios individuales de cada metabolito analizado de esta planta.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Reseña histórica

*Morus alba*, mejor conocida en países de habla hispana como morera o mora blanca, es una planta perenne de gran adaptabilidad, lo cual le permite ser cultivada en diversas partes del mundo con una variación amplia de climas y condiciones ambientales. Su uso principal, es como alimento del gusano de seda; sin embargo, gracias a su excelente adaptación y grado de selección, tiene múltiples usos en el mundo, diversificándose en: 60% como recurso para actividades agrícolas; 48% en la fabricación de seda y como forraje; 26% en actividades de jardinería, paisajismo y preparación de infusiones; 31% como alimento y 14% frutal.<sup>[1]</sup>

Se sabe desde tiempo ancestrales que la morera es una planta que crece en forma individual y silvestre, comenzándose a sembrar para su uso en la sericultura (cría del gusano de seda) hace poco más de 4500 años, siendo usado (según los reportes más antiguos) en el año 1123 a.C.; hace aproximadamente 3130 años en Corea, y de la dinastía Ming en China, considerándose por estas razones una de las plantas más antiguas cultivadas del mundo<sup>[1]</sup>. Como recurso en los sistemas de pastoreo, la morera fue integrada por primera vez en Italia asociándola con trébol subterráneo (*Trifolium subterraneum*)<sup>[2]</sup>.

En relación a *Morus*, existe una gran diversidad de especies y variedades que constituyen un valioso recurso genético, destacándose las especies *M. alba*, *M. nigra*, *M. indica*, *M. laevigata* y *M. bombycis*, de las cuales se derivan muchas variedades e híbridos; aunque la especie más extendida es *M. alba*.

Existen variedades de morera para muchos ambientes, considerándose como una planta “cosmopolita” debido a que su cultivo se ha extendido desde Asia a todo el mundo debido a su amplia adaptación a climas diversos. Por otro lado, en Venezuela, las investigaciones de la morera se han dado principalmente en los

estados andinos (Trujillo, Mérida, y Táchira) dirigidos hacia la siembra de esta planta en diversas condiciones <sup>[3]</sup>. Sin embargo, un estudio fitoquímico de esta planta no se ha hecho en Venezuela.

## 1.2. Ubicación taxonómica y germoplasma existente

La taxonomía de la planta es (ITIS 2012):

**REINO:** Plantae

**DIVISION:** Tracheofita

**CLASE:** Magnoliopsida

**ORDEN:** Rosales

**FAMILIA:** Moraceae

**GENERO:** *Morus*

**ESPECIE:** *alba*

**Figura 1.-** imagen de *Morus alba* (morera)



Las variedades e híbridos de morera no son oriundas de América, continente en el que solamente se conoce una especie nativa, *Morus rubra*. Se sabe además que Australia es el único continente que no cuenta con una sola especie de morera en la actualidad <sup>[4]</sup>. A continuación se presenta la distribución mundial de *Morus alba* en algunas zonas representativas (Tabla 1).

**Tabla 1.-** distribución mundial de *Morus alba* en algunas zonas representativas

Zona geográfica	País	Especies del genero <i>Morus</i>	Variedades del genero <i>Morus</i>	Referencia
Asia	China	5	10	Yongkang (2002)
	Indonesia	6	2	
	Vietnam	3	100	Sánchez (2002)
	Japón	6	19?	Machii (2002)
	India	4	17?	Ravindran (1997)
América	Brasil	1	90	De Almeida y Fonseca (2002)
Europa	Italia	5	25	Cappelozza (2002)
África	Tanzania	1	?	Shayo (2002)

?: No se conoce con exactitud

En Venezuela existen diversas variedades de morera que son cultivadas en diferentes regiones, con características diferenciales en cada una. Sin embargo, no existe un estudio detallado de la variabilidad genética presente en el país; desconociéndose estas caracterizaciones en Venezuela, e igualmente se desconoce la forma de introducción de la morera tradicional y el método de diseminación de la misma en el territorio <sup>[5]</sup>. Tal es el caso, que una de las variedades que han de estudiarse se desconoce su origen y el estudio lo redujo a tres zonas posibles, la cual se denominara Criolla/Guatemalteca/Tailandesa, la cual abreviaremos como CTG.

### 1.3. Uso de la morera en la industria y para el hombre

*Morus alba* es, como se dijo anteriormente, una de las plantas más antiguas del mundo en ser cultivada por el hombre. En Asia que se encuentran reportes diversos sobre la utilidad de esta planta como recurso alimenticio para el gusano de seda (*Bombyx mori*) desde hace más de 5000 años, siendo una producción que se renueva constantemente, a pesar de ser una porción minúscula del mercado mundial de dicha industria (menos del 0,2%) [6]. También destaca su uso en el ámbito de la medicina natural, describiéndose la elevada efectividad de los extractos de morera en los tratamientos de diversas afecciones, principalmente su uso para regular la presión arterial, la diabetes y elevados niveles de colesterol [7].

Existen otros usos de la morera, las cuales consideran el uso de la planta completa. Se destaca el uso como alimento humano dado su contenido de compuestos nitrogenados, usándose en Asia menor como ingrediente de cocina y de forma similar al repollo rellenándolo con carne y arroz; el tronco y las ramas de este se usan como un excelente recurso para obtener carbón o muebles rústicos y piezas agrícolas, marcos de puertas y ventanas, duelas de barriles de vino, en la ebanistería fina, fabricación de papel de alta calidad, así como construcciones navales, dada su alta resistencia al agua y durabilidad; la corteza es usada para curtir el cuero; de la raíz se extrae un tinte amarillo que es comúnmente usado en tintorería, así como medicina dado sus principios purgativos y vermífugos; como comestible se incluye al fruto de la planta, vulgarmente conocido como mora, teniendo un sabor agradable y refrescante, extendiendo su uso en múltiples formas (fruta fresca o seca, mermeladas, jugos, compotas, etc.) [8].

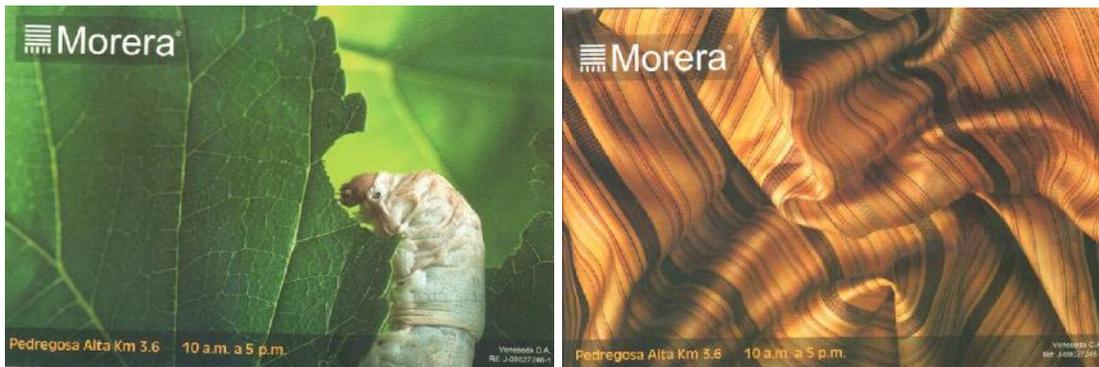
En cuanto a la actividad antirradical de la morera, existen reportes que indican a la *Morus alba* como una planta con excelente actividad antirradical a partir de estudios con ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y DPPH (2-difenil-1-picryl hidra-ra-zil) [9].

## 1.4. Morera en Venezuela

En Latinoamérica, el uso de la morera ya está impuesto como planta forrajera en varios países. En México, Perú y Cuba, por ejemplo, la *M. alba* ha sido ampliamente estudiada para uso forrajero y medicinal, sin embargo, para uso como materia prima en la producción de seda no se ha desarrollado <sup>[10]</sup>.

En la actualidad, solo se tiene registro de una empresa textil en Venezuela que produce hilos de seda; esta empresa se denomina VENESEDA y está ubicada en el estado Mérida (Figura 2). Esta empresa se dedica al proceso entero de producción de la seda, desde la plantación de la morera hasta la producción de la tela en los telares Morera. No se tiene registro de la variedad de morera que la empresa usa como materia prima para la alimentación del gusano de seda; aun cuando sí se conoce que han realizado estudios de adaptabilidad de la especie para la escogencia de la mejor morera adaptada a la zona y su posterior masificación <sup>[11]</sup>.

**Figura 2:** Diseño promocional de Veneseda C.A.



El uso de la morera como alternativa forrajera en Venezuela no fue registrada sino hasta el XIII Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal (2006), en donde se presentaron investigaciones relacionadas con la morera y su implementación como alternativa forrajera, dada su facilidad de cultivo, su corto periodo de maduración, su gran adaptabilidad a diferentes climas, entre otros. <sup>[10]</sup>.

## 1.5. Metabolitos primarios

Se conoce en las plantas que los compuestos producidos por estas que se dividen según su importancia para el desarrollo de la planta. Cuando el compuesto es necesario para el desarrollo de la planta *per se*, se conocen como metabolitos primarios, y cuando son innecesarios para su desarrollo y se usan solo para la supervivencia y adaptación de la planta se conoce como metabolitos secundarios.

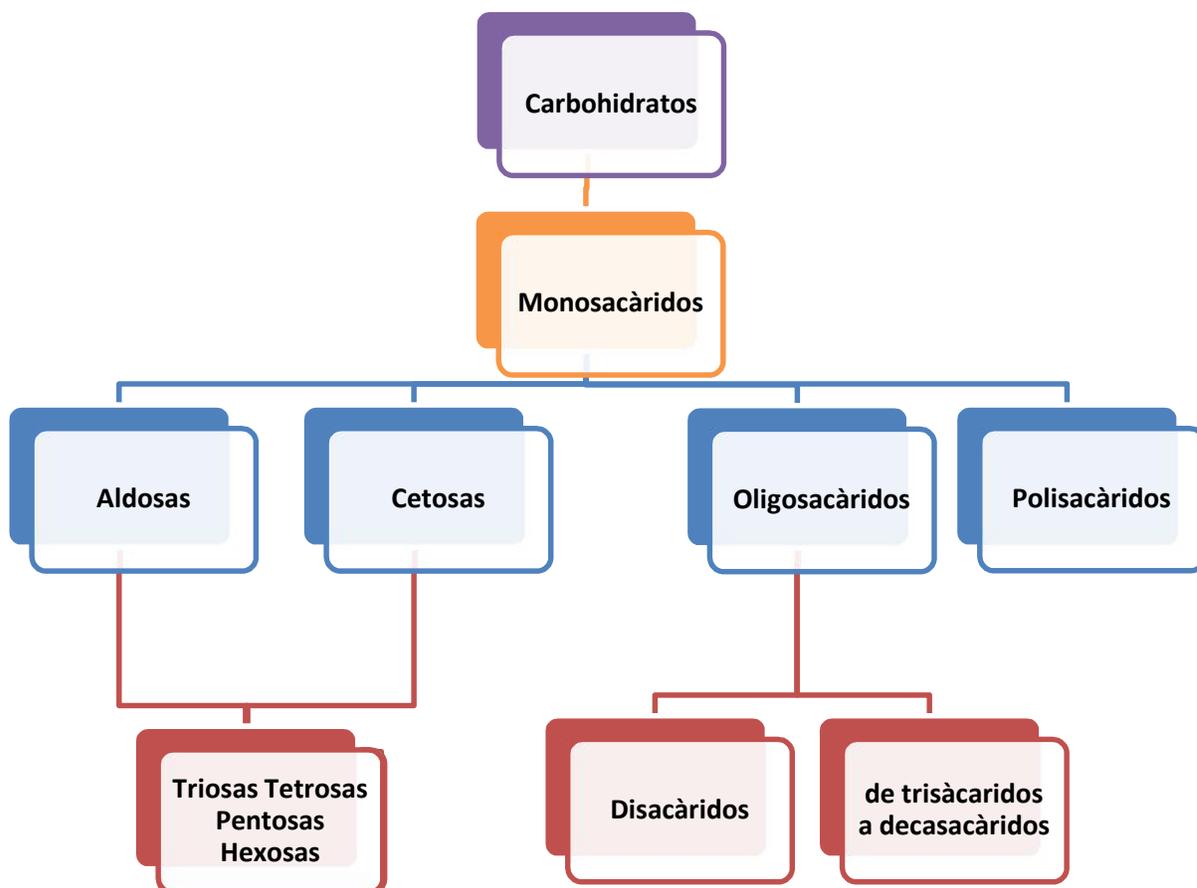
Los metabolitos primarios en las plantas se clasifican en: carbohidratos, aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos. Por su parte, los metabolitos secundarios son los flavonoides, fenoles, ligninas, cumarinas, alcaloides, entre otros.

**1. CARBOHIDRATOS:** también llamados glúcidos, hidratos de carbono o sacáridos, son (estructuralmente hablando) polihidroxialdehidos, polihidroxiacetonas o sustancias provenientes de la hidrolización de sustancias más complejas.

Estos son los compuestos más abundantes en el reino vegetal, encontrándose que una planta posee entre un 60 y 90% de su masa seca compuesta por carbohidratos (en el tejido animal, el contenido es comparativamente pequeño, siendo hasta menos del 1% como es el caso del hombre). Esto se debe a la abundancia y distribución de dos polímeros de la glucosa: la celulosa y el almidón.

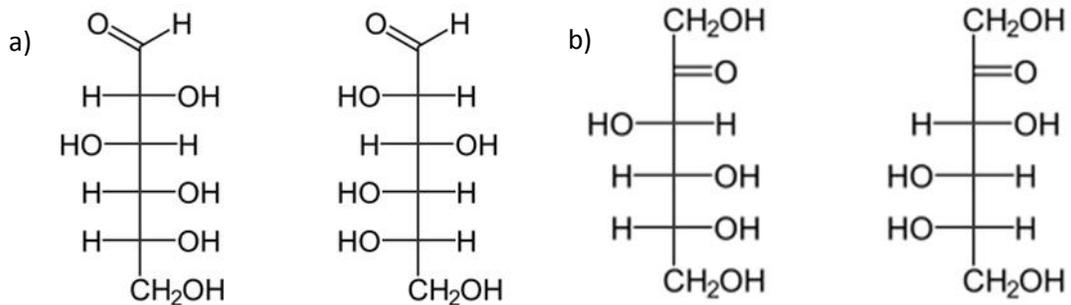
Los carbohidratos se clasifican en monosacáridos, disacáridos, trisacáridos y polisacáridos.

Figura 3: estructura bioquímica de los carbohidratos



a. **Monosacàridos o azúcares simples:** Son alcoholes con 3 hasta 7 átomos de carbono que contienen un grupo aldehído o cetónico, por lo que pueden considerarse como productos de oxidación de alcoholes polivalentes en los que una función alcohólica primaria o secundaria se transforma en un grupo carbonilo (CO). Si este grupo carbonilo es terminal en la cadena, el monosacàrido es una aldosa, si no se encuentra en posición terminal, el monosacàrido es una cetosa (figura 4). Uno de los monosacàridos más importantes es la glucosa, la cual es una aldosa (figura 4a).

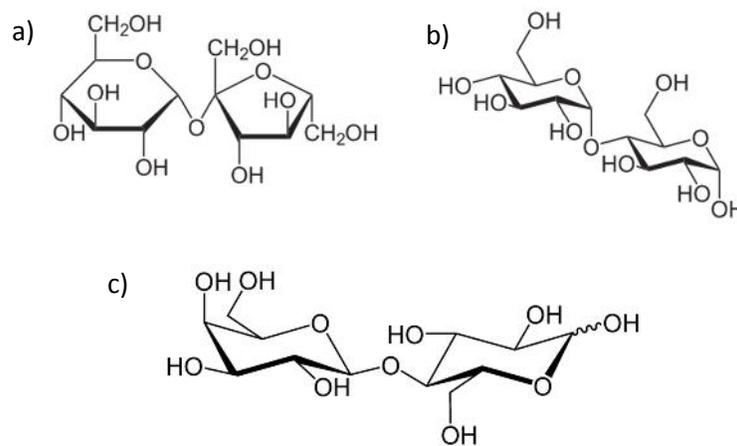
**Figura 4:** estructura de una aldosa (a) y una cetosa (b) y sus isómeros: a) D-glucosa y L-glucosa. b) D-fructosa y L-fructosa.



b. **Disacáridos:** Son glúcidos formados por dos moléculas de monosacáridos unidas entre sí por el denominado enlace glucosídico. Por esta razón al hidrolizarse se producen dos unidades monosacáridos.

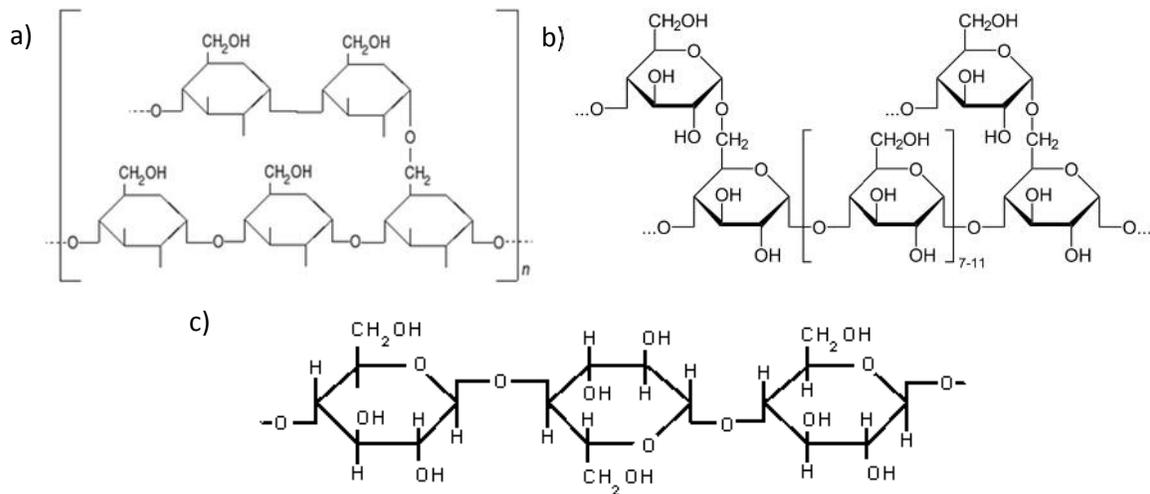
Tienen sabor dulce, cristalizan bien y son solubles en agua. El término glucosídico se refiere al enlace carbono-oxígeno-carbono que une a los dos componentes del acetal. Los disacáridos naturales más importantes son: la sacarosa, la maltosa y la lactosa (figura 5).

**Figura 5:** estructuras de a) glucosa, b) maltosa y c) lactosa



c. **Polisacáridos:** Son los carbohidratos más abundantes que existen en la naturaleza. Sirven como sustancias alimenticias de reserva y como componentes estructurales de las células. Bioquímicamente los tres polisacáridos más importantes son: almidón, glucogeno y celulosa (figura 6) [12].

**Figura 6:** estructuras de a) almidón, b) glicógeno y c) celulosa



**2. AMINOACIDOS:** los aminoácidos son sintetizados por las plantas a partir del nitrógeno absorbido en forma de nitratos o amonios obtenidos del suelo y, en el caso de las leguminosas, el nitrógeno atmosférico. Entre sus funciones en las plantas:

**a.** Los aminoácidos se unen para formar proteínas

**b.** Se activan en momentos de estrés para la planta (variaciones bruscas de temperatura, enfermedades, etc.). determinados aminoácidos como la prolina (figura 7) juegan un papel esencial en el equilibrio hídrico de la planta, especialmente en momentos climáticos desfavorables, fortaleciendo las paredes celulares.

c. Aumentan la concentración de clorofila en las plantas, incrementando entonces la fotosíntesis. La glicina (figura 7) es un metabolito fundamental para la formación de hojas, siendo el primer eslabón de la ruta biosintética de la clorofila.

d. Efecto quelante reteniendo cationes positivos (como la glicina y el ácido L-glutanico que poseen carga negativa)

e. Actúan sobre la germinación del grano de polen, aumentando la polinización. Ha sido demostrado que la prolina influye sobre la fecundidad del polen al incrementar su porcentaje de germinación. De igual forma la metionina, ornitina, arginina y lisina (figura 7) juegan un importante papel como precursores de la síntesis de poliaminas, las cuales intervienen en procesos fundamentales, desde la germinación y esencia floral hasta la maduración del fruto

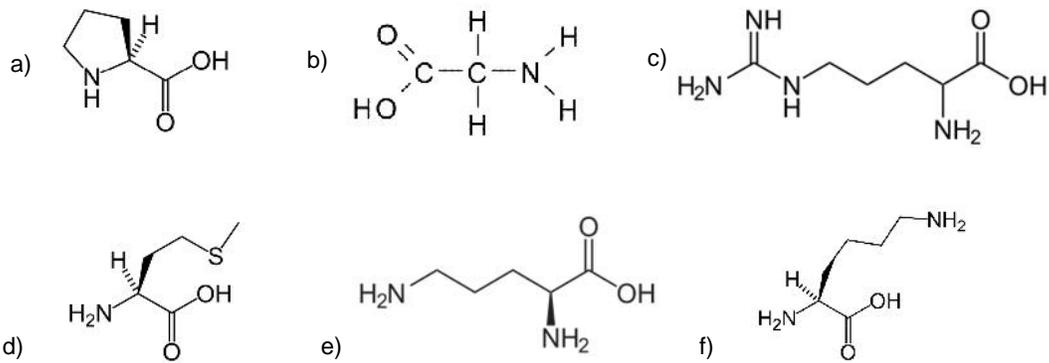
El siguiente cuadro representa los porcentajes relativos de aminoácidos en plantas. Este porcentaje es en promedio de las variedades de plantas superiores <sup>[13][14]</sup>:

**Tabla 2:** porcentajes relativos de aminoácidos en plantas.

<b>Aminoácido</b>	<b>Forma libre</b>	<b>Forma peptídica</b>	<b>Aminoácido</b>	<b>Forma libre</b>	<b>Forma peptídica</b>
<b>Lisina</b>	0,3-1	2-4	<b>Isoleucina</b>	0,1-0,3	1-2,5
<b>Alanina</b>	2-5	4-8	<b>Treonina</b>	0,02-0,2	0,5-1
<b>Histidina</b>	0,05-0,6	0,2-0,4	<b>Leucina</b>	0,1-0,5	2-4
<b>Ornitina</b>	0,1-0,5	0,9-2,6	<b>Serina</b>	0,1-0,2	1-3
<b>Arginina</b>	0,1-0,3	4-6	<b>Tirosina</b>	0,01-0,5	0,01-0,5

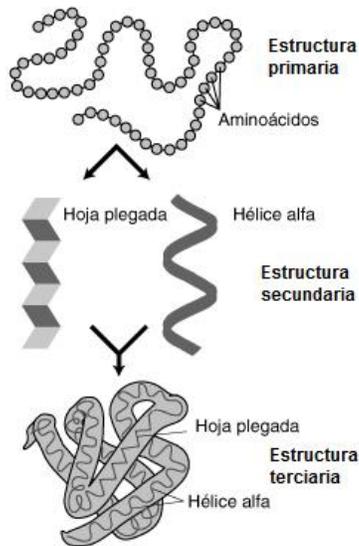
<b>Valina</b>	0,05-0,2	2-4	<b>Ácido glutámico</b>	0,6-0,9	7-11
<b>Hidroxiprolina</b>	0,2-0,4	8-12	<b>Fenilalanina</b>	0,1-0,3	1-2,5
<b>Metionina</b>	0,1-0,2	0,5-1,5	<b>Prolina</b>	0,6-2	10-15
<b>-Aminobutírico</b>	0,01-1	0,01-0,6	<b>Glicina</b>	3,5-6	16-25
<b>Ácido Aspártico</b>	0,3-0,9	2-7			

**Figura 7:** estructura de algunos aminoácidos: a) prolina, b) glicina, c) arginina d) metionina, e) ornitina y f) lisina



**3. PROTEINAS:** como se mencionó anteriormente, las proteínas tienen su origen en los aminoácidos y el arreglo que obtengan al unirse entre ellas. Existen tres niveles de arreglos entre aminoácidos para la formación de proteínas: estructura primaria, cuando se unen los aminoácidos y forman una cadena, la estructura secundaria que se da cuando

**Figura 8:** niveles estructurales de las proteínas: a) primarias, b) secundarias y c) terciarias



los aminoácidos en la secuencia interactúan a través de puentes de hidrogeno, y estructura terciaria cuando se dan ciertas interacciones entre hélices alfa y hojas plegadas (figura 8) [15].

**Figura 9:** estructura de la proteína albumina presente en la sangre.



Entre las funciones de las proteínas están: conservar el código genético en la reproducción de la especie, del funcionamiento a nivel celular de la planta, la formación de tejidos y el hacer frente a agentes patógenos que ataquen a la planta. Se ha demostrado incluso la existencia de una proteína específica contra el ataque de hongos patógenos [16].

En contraste con las grasas y carbohidratos, las proteínas varían en su composición tanto entre las especies como dentro de un mismo organismo en los diferentes tejidos y en los variados fluidos celulares. La albumina (figura 9), por ejemplo, varía en composición en dependencia de su fuente de obtención [17].

## 1.6. Metabolitos secundarios

En todos los seres vivos, existen reacciones orgánicas que producen un sinnúmero de compuestos químicos, muchos de ellos son comúnmente encontrados dependiendo del reino al que pertenezcan. Sin embargo, existen compuestos particulares que las especies sintetizan como defensa y son los metabolitos secundarios o productos naturales.

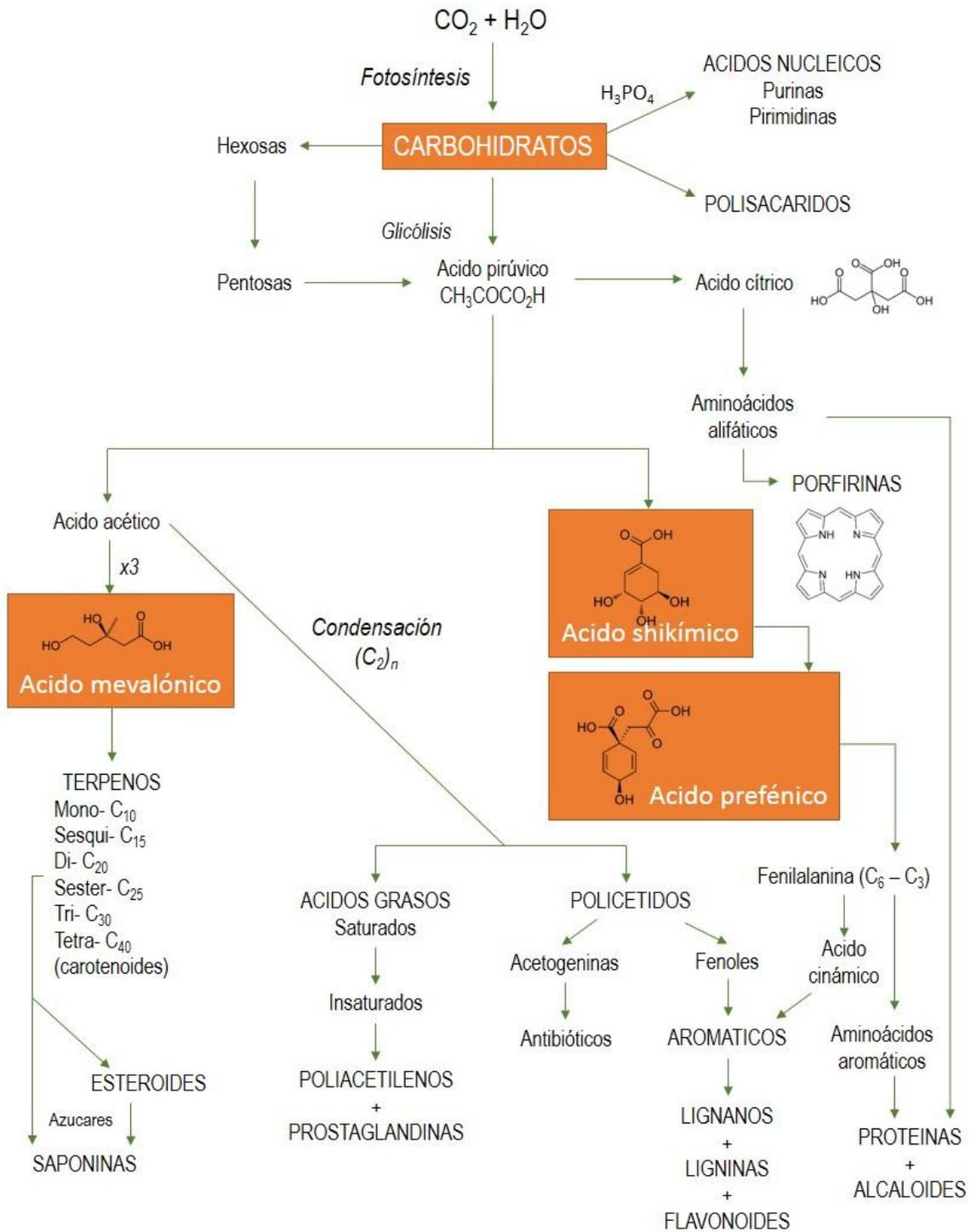
Podemos definir a los metabolitos secundarios como aquellos compuestos químicos sintetizados por una especie, animal o vegetal, que en la mayoría de los casos no le es de utilidad aparente. <sup>[18]</sup>

Es interesante mencionar la diferencia significativa entre los metabolitos secundarios y los primarios, particularmente en su distribución limitada al reino vegetal y a que se presentan típicamente en solo una especie o un grupo de especies relacionadas taxonómicamente <sup>[19]</sup>.

Según la definición, se clasifica como metabolito secundario a todo sub-producto que se origine de un producto que provenga de una ruta biosintética para la formación de un metabolito primario.

Por lo tanto, los metabolitos secundarios se clasifican según su molécula de origen en (Figura 10).

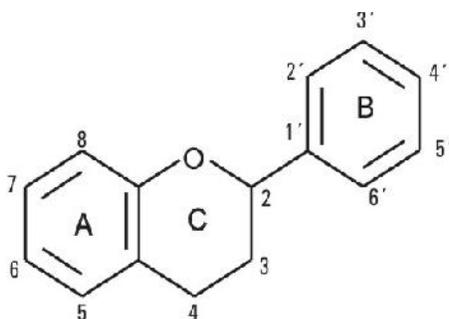
**Figura 10.-** Vías de síntesis de los principales grupos de metabolitos y su relación con la fotosíntesis [18]



**1. COMPUESTOS FENÓLICOS:** en la actualidad, los científicos conocen más de 8000 compuestos fenólicos sintetizados por plantas, los cuales se sabe que provienen de dos vías: la del ácido shikímico y la vía del acetato/malonato.

De este grupo, se destacan grandes subfamilias: las cumarinas, ácidos cinámicos, benzoicos y derivados, entre otros. Sin embargo, son de especial atención el grupo conocido como flavonoides, las cuales son sustancias con un esqueleto de 15 átomos de carbono unidos en un anillo aromático asociado a un ciclo de cinco carbonos y un oxígeno y el carbono 2 tiene una sustitución con otro anillo aromático, tal como se observa en la figura 1. El anillo A proviene del policetido, un anillo B que se origina del ácido shikímico sustituido en posición *orto*, y 3 átomos de carbono que unen a ambos anillos a la parte alquílica del fenilpropano.

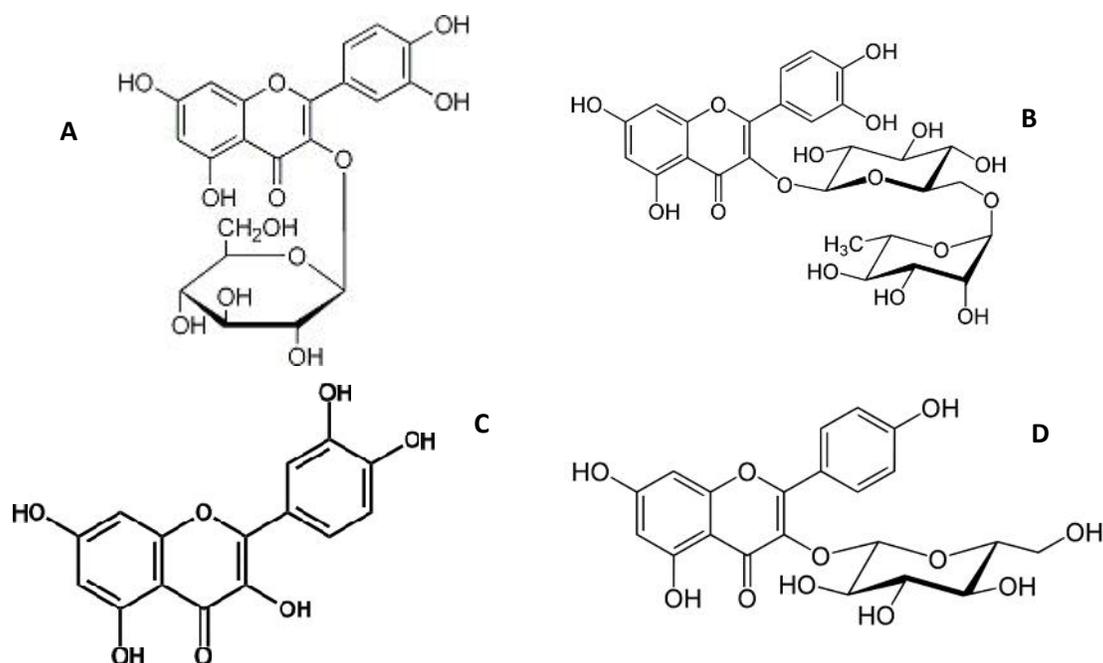
**Figura 11.-** Estructura básica de los flavonoides



La gran variedad de los flavonoides en las plantas superiores, así como sus funciones, hace que puedan considerarse como antioxidantes, agentes antimicrobiales y antinutricionales, fotoreceptores y protectores contra la luz UV, quelantes de metales, etc. Su diversidad es debida a la cantidad de sustituciones que el esqueleto central puede sufrir: OH, OMe, dioximetileno y hasta glicosidos. También es común la formación de polímeros como los taninos, de colores rojos, y a medida que la polimerización se hace mayor, el color también se incrementa. El estado de oxidación del anillo central también es determinante en la formación de

derivados de flavonoides. Caso muy común es la hidroxilación en los anillos aromáticos en las posiciones 7 y 4', frecuente en 5 y 3', a veces en 5' y 8, y rara vez en 6 y 2'. Los grupos de flavonoides formados son denominados flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles (dihidroflavonoles), antocianidinas (sales de flavilio), leucoantocianidinas (flavandioles), catequinas (flavanoles), chalconas, auronas e isoflavonas (figura 9).<sup>[21]</sup>

**Figura 12.-** estructuras de (A) isoquercetrina, (B) rutina, (C) quercetina, (D) astragalina



### **1.7. Función de los metabolitos secundarios en *Morus alba***

La aparición de metabolitos secundarios en plantas se origina principalmente gracias a factores de estrés que la misma padece. Situaciones abióticas como inundaciones, cambios bruscos de temperatura, o bióticas como enfermedades y plagas, causan que la planta responda de forma química produciendo componentes con la finalidad de adaptarse y sobrevivir.

Metabolitos como las saponinas le permiten a la planta de morera una rápida recuperación ante la poda, brotes abundantes y un rápido desarrollo, debido a que las saponinas presentes están en su mayoría en forma glicosilada, forma imprescindible para los procesos reguladores del crecimiento en plantas.<sup>[25]</sup>

En casos de extrema sequía o cambios en la salinidad del medio de cultivo de la morera, se aumenta la concentración de prolina. Este aminoácido es el responsable del control interno de humedad y salinidad, y se le es considerado un osmoprotector. Su origen parece ser la ruta del glutamato y del cetoglutarato.

Existen reportes de que la planta alcanza concentraciones entre 10-100 veces más de lo normal de prolina en condiciones de estrés que cuando la planta esta turgente, y el aumento se ha probado que proviene de la síntesis más que del rompimiento de proteínas.<sup>[26]</sup>

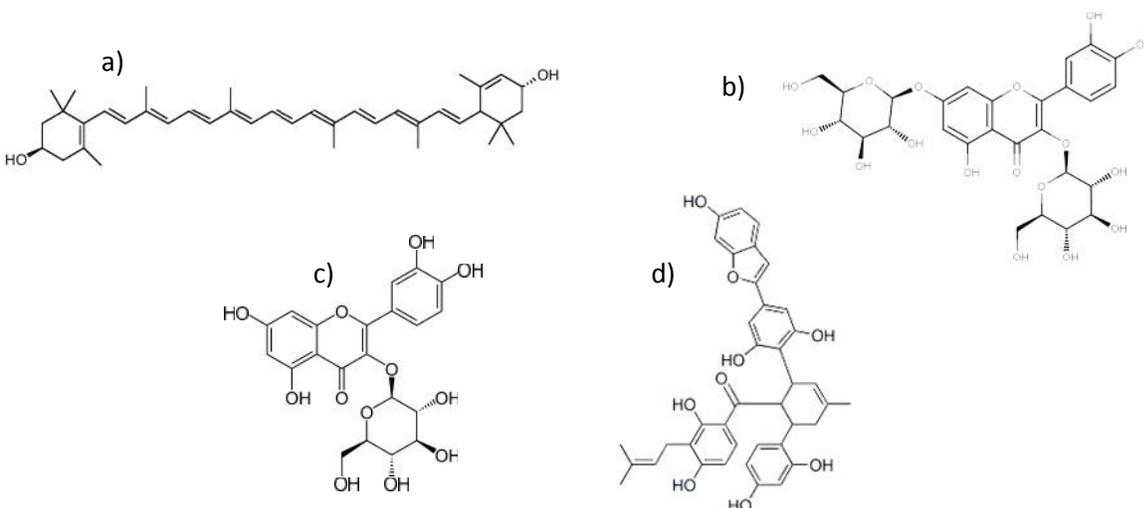
La presencia de fenoles en esta planta también le da propiedades desparasitantes en caso de larvas que invadan a la misma. Tras la ingesta de la misma, polifenoles como reverastrol o quercetina inducen a la mortalidad sobre la larva, eliminando a la plaga de la planta.<sup>[27]</sup>

Finalmente, se ha demostrado que los flavonoides en las plantas son importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas en contra de agentes agresores externos, como la radiación UV al retenerlas en la epidermis de las hojas, las radiaciones excesivas de UV-B (280-320 nm), animales herbívoros y otros factores del medio ambiente. Se incluye también como señalizadores químicos entre las funciones de los flavonoides, indicando a los insectos que la planta es apropiada para su alimentación, ovoposición o simplemente de guías para una polinización más efectiva.<sup>[28]</sup>

## 2. ANTECEDENTES

En *Morus alba* fueron determinadas diversas propiedades asociadas a los flavonoides. Ho-Zoo y Won-Chu (2001) han afirmado que las propiedades antioncogénicas y antisenescentes de la morera son atribuidas, en parte, a los flavonoides isoquercetina y luteína. La actividad diurética y la reacción antialérgica son causadas por los flavonoides Rutina, Quercetina, Astragalina, Quercetina 3,7-diglucósido y Quercetina 3- glucósido; mientras que la acción antibacteriana es provocada, en buena medida, por la Chalcomoracina (figura 13). [29]

**Figura 13.-** estructuras químicas de: a) luteína, b) quercetina 3,7-diglucósido, c) quercetina-3-glucósido y d) chalcomoracina



En 2005, García, Medina y Ojeda [30], determinaron las concentraciones de carbohidratos solubles de cuatro variedades de morera. Encontraron que en las variedades indonesa y Acorazonada se encuentran las menores concentraciones de carbohidratos solubles y como la lluvia y fertilizantes alteraban la variabilidad de estas concentraciones, teniendo que la variedad Acorazonada presenta una mayor variabilidad respecto a la concentración de fertilizante. Además, se concluyó que

hay diferencias significativas de concentraciones de carbohidratos solubles en zonas diferentes de las variedades, teniendo como resultado que la mayor concentración se haya en las hojas antes que los tallos tiernos.

En el 2010, Radojkovi a M., et. al., (Serbia y Slovenia) determinaron las condiciones más óptimas para la extracción máxima de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante mediante el método de respuesta de superficie, obteniéndose lo siguiente: el solvente idóneo es etanol-agua en un intervalo de 40-80% v/v, una temperatura de 40 a 80°C, y un radio liquido-solido de 10-30 ml/g, volumen de solvente por cada gramo de materia cruda. <sup>[31]</sup>

En el 2010, Maykelis, Yanet, Perez, Marlene, Hilda y Yudit <sup>[32]</sup>, estudiaron los antioxidantes presentes en variedades de morera, teniendo como resultado que la mayor actividad para todas las variedades se presentó en las hojas, y las variedades de mayor actividad fueron tigreada, Criolla, IZ 15-9 e IZ 64.

En el 2012, Radojkovi a M., et. al., determinaron las concentraciones de fenoles totales, flavonoides y actividad antirradical de *Morus alba spp.* Obteniendo como resultado que las mayores concentraciones de fenoles totales fueron en las especies *M. nigra* (186,30 mg por cada g de muestra) y *M. alba* (170,20 mg por cada g de muestra). Asimismo, la especie *M. nigra* presentó la mayor concentración de flavonoides totales en hojas y raíces (67,369 mg/g de muestra fresca). Finalmente, en la actividad antirradical, se obtuvo en orden decreciente la capacidad antirradical de las variedades: hojas (*M. nigra*)> hojas (*M. alba*)> raíz (*M. nigra*)> raíz (*M. alba*)> frutas (*M. nigra*)> frutas (*M. alba*). <sup>[33]</sup>

Ese mismo año, Vanitha Reddy y Asna Urooj (Karmataka- India) realizaron un perfil fitoquímico y actividad antioxidante de variedades de *M. indica in vitro* y *ex vivo*. Las variedades de *Morus indica* fueron M5, V1 y S36, obteniendo concentraciones de metabolitos y minerales (magnesio, manganeso, calcio, hierro, sodio, etc.) similares entre las tres especies, siendo la variedad S36 la de mayor concentración de polifenoles y la actividad antioxidante más óptima la presento también la variedad S36 <sup>[34]</sup>.

En lo que compete a la investigación de *M. alba* en Venezuela no se tiene registros de trabajos de cualquier índole referente a morera y su Fitoquímica. La mayoría de trabajos realizados fueron hechos en cuba.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Estudiar las variaciones del perfil químico y la actividad antirradical en cuatro variedades de *Morus alba*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Desarrollar el perfil químico cualitativo de cuatro variedades de morera: Acorazonada y Criolla, Española, Murcia y CTG.
2. Cuantificar el contenido de fenoles totales en cuatro variedades de morera: Acorazonada y Criolla, Española, Murcia y CTG.
3. Cuantificar el contenido de aminoácidos en cuatro variedades de morera: Acorazonada y Criolla, Española, Murcia y CTG como L-prolina.
4. Cuantificar el contenido de carbohidratos en cuatro variedades de morera: Acorazonada y Criolla, Española, Murcia y CTG como glucosa.
5. Cuantificar el contenido de proteínas en cuatro variedades de morera: Acorazonada y Criolla, Española, Murcia y CTG como albumina.

6. Cuantificar el contenido de flavonoides totales en cuatro variedades de morera: Acorazonada y Criolla, Española, Murcia y CTG como rutina.
  
7. Cuantificar el contenido de saponinas totales en cuatro variedades de morera: Acorazonada y Criolla, Española, Murcia y CTG como rutina.
  
8. Determinar la actividad antirradical en cuatro variedades de morera: Acorazonada y Criolla, Española, Murcia y CTG mediante la reducción de DPPH.

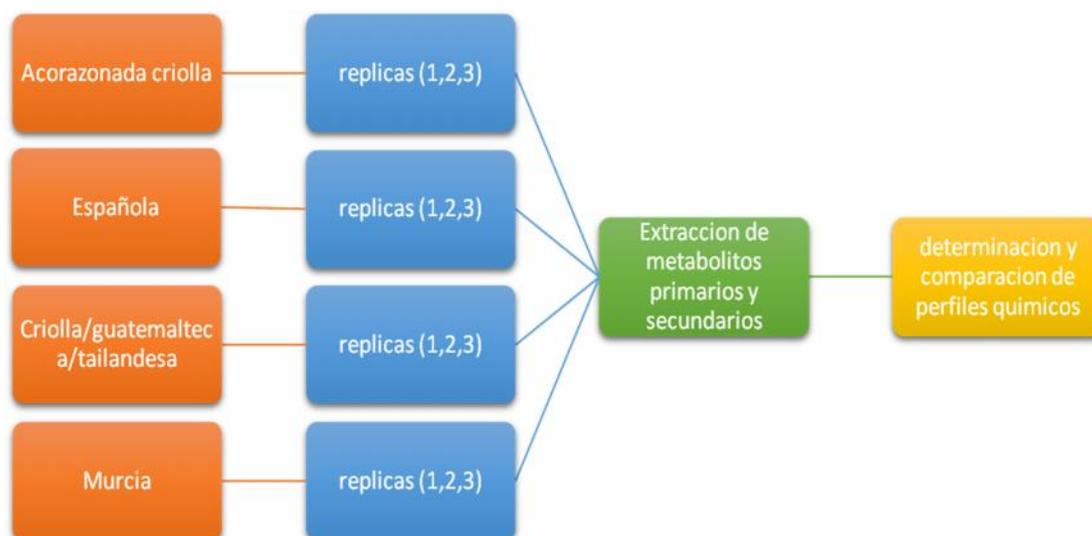
## 4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 4.1. Diseño experimental

#### 4.1.1. 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). Para la determinación de fenoles totales, carbohidratos y aminoácidos, se tomaron hojas de las plantas y se limpiaron con agua y etanol 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  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización. Las muestras pertenecen a cuatro especies distintas de moreras cultivadas en el país, denotadas como Acorazonada y Criolla (AC), Criolla/Tailandesa/Guatemalteca (la cual se abreviará CTG), Española y Murcia (su nombre deriva de la región de origen). Se tomaron muestras de hojas de tres plantas por variedad, por lo que cada planta/variedad es considerada una repetición (R1, R2 y R3). Se usará un diseño experimental completamente al azar.

Figura 13.- Esquema general del diseño experimental.



Posteriormente, para la determinación de proteínas, saponinas, flavonoides y actividad antirradical, las hojas de las plantas fueron desecadas al sol de forma indirecta por 6 días hasta su desecación total, para luego ser maceradas y almacenadas hasta su utilización.

**Figura 14.-** hojas en proceso de desecado con luz solar indirecta o no incidente.



**Figura 15.-** plantas origen de las muestras: A) acorazonada y criolla; B) española C) Murcia y D) CGT.



## 4.2. Materiales y reactivos

- ✓ Etanol al 70% y 80%
- ✓ Metanol
- ✓ NaOH 2M
- ✓ HCl 2M
- ✓ Ácido clorogénico
- ✓ Eppendorf de 1,5 mL de uso común
- ✓ Tubos falcon de 10 mL
- ✓ Buffer de extracción de proteínas: urea 6 mmol/L; EDTA 10 mmol/L; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 mmol/L; -mercapto etanol 140 mmol/L; Tween-20 0,05%; tris-HCl 10 mmol/L a pH 8.
- ✓ Reactivo de Folin-Ciocalteu
- ✓ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado
- ✓ Tolueno
- ✓ Ninhidrina
- ✓ Ácido acético
- ✓ Fenol
- ✓ Glucosa
- ✓ Albumina en suero bovino
- ✓ L-prolina

- ✓ Placas para cromatografía de capa fina compuesta por aluminio de superficie y cubierta con silica como fase estacionaria.

### **4.3. Equipos**

- ✓ Mortero
- ✓ Pipetas de diferentes volúmenes
- ✓ Pipetas de 100 y 1000  $\mu\text{L}$
- ✓ Agitador Vortex
- ✓ Centrifugadora eppendorf
- ✓ Tubos eppendorf 1,5 mL, 2 mL uso común
- ✓ Tubos falcón 10 mL
- ✓ Balanza
- ✓ Espectrofotómetro (Marca TECAN modelo InfiniteM200)

### **4.4. Métodos**

#### **4.4.1. Perfil químico cualitativo: cromatografía de capa fina (CCF)**

Para la determinación de los compuestos de forma cualitativa se siguió la extracción por cromatografía de capa fina (abreviada CCF o TLC).

Para la elución de fenoles y flavonoides se usó una mezcla de solventes de **acetato de etilo : ácido fórmico : ácido acético glacial : agua** en proporción 100:10:10:10. El revelador de la placa utilizado fue anisaldehído en ácido sulfúrico.

En la determinación de saponinas se utilizó como mezcla de solventes **tolueno : acetato de etilo : ácido fórmico** en una proporción 70:30:1 respectivamente, y el revelador utilizado fue anisaldehído en ácido sulfúrico.

La determinación de aminoácidos fue realizada usando como fase móvil una mezcla de **n-butanol : acetona : ácido acético glacial : agua** en una proporción 35:35:10:20 y como revelador se usó el reactivo de Komarovsky (4-hidroxibenzaldehído en metanol). Por descarte, la presencia de aminoácidos indica la presencia de proteínas, pues estas últimas serán sintetizadas a partir de las primeras.

#### **4.4.2. Compuestos fenólicos**

##### **4.4.2.1. Extracción de fenoles**

Los compuestos fenólicos, tanto solubles como ligados a la pared celular se extrajeron tomando 100 mg de extracto vegetal macerado en eppendorf de 1,5 mL de uso común, se adicionaron 500 µL de metanol, se homogenizó en vortex, luego se centrifugó a 15000 rpm durante 15 minutos. Se separó el sobrenadante (**fenoles solubles**) y el pellet (**fenoles ligados a la pared celular**). El sobrenadante se reservó para la medición de fenoles solubles. El pellet fue tratado con 250 µL de metanol y homogenizado en vortex, para luego centrifugar por 15 minutos a 15000 rpm. El sobrenadante fue unido al anterior para la cuantificación de fenoles. El proceso se repitió una tercera vez y el sobrenadante también se adicionó a los dos anteriores. El pellet final se trató con 250 µL de NaOH 2M, se homogenizó en vortex y luego se incubó a 70°C por un plazo de 16 horas. La mezcla fue neutralizada con

250  $\mu\text{L}$  de una solución HCl 2M (con un pH de 7 aproximadamente). El pellet final fue decantado y descartado.

#### 4.4.2.2. Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles totales se realizó bajo el siguiente procedimiento: 150 $\mu\text{L}$  del extracto vegetal fueron diluidos en 850 $\mu\text{L}$  de agua destilada y se les añadió 100 $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu para dejarle un periodo de reposo de 5 minutos. Posteriormente se añadieron 600 $\mu\text{L}$  de una solución NaOH 1M saturada con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Se dejó reposar a 25°C durante una hora, evitando la incidencia de luz solar.

Las soluciones finales se les midió las absorbancias en un espectrofotómetro UV-visible a una longitud de onda constante de 725 nm y la concentración total es la suma de los fenoles ligados a la pared celular y los solubles, expresados en mg/g.

La curva de calibración de los compuestos fenólicos totales se hizo usando un patrón de ácido clorogénico sometido a las mismas condiciones. La tabla siguiente muestra los valores necesarios para los patrones a partir de una solución de ácido clorogénico de concentración 70 ppm:

**Tabla 4.** Concentración de ácido clorogénico utilizados en la cuantificación de fenoles

Patrón	V ácido clorogénico ( $\mu\text{L}$ ) 50 $\mu\text{L}$ en 1000 $\mu\text{L}$	V metanol ( $\mu\text{L}$ )
1	300	200
2	200	300
3	100	400
4	50	450
5	30	470

Para luego construir la tabla con el siguiente formato:

Tabla 5. Concentraciones de ácido clorogénico, agua y reactivos para la preparación de la curva de calibración de fenoles

	V ácido ( $\mu\text{L}$ )	V agua ( $\mu\text{L}$ )	V base ( $\mu\text{L}$ )	V reactivo de Folin-Ciocalteu ( $\mu\text{L}$ )
	100	900	600	100
blanco	0	1000	600	100

#### 4.4.3. Proteínas

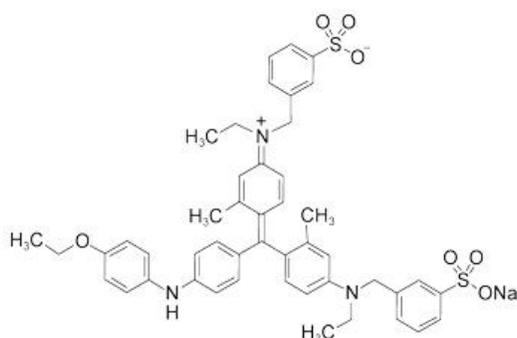
##### 4.4.3.1. Extracción de proteínas

Se maceró el tejido vegetal en nitrógeno líquido y se tomaron 0,1 g de muestra de cada planta (3 plantas por cada especie) y se extrajeron las proteínas usando 1 mL de un buffer de extracción de proteínas y se homogenizaron en frío y centrifugado a 10000 rpm en vortex durante 10 minutos, tomando el sobrenadante final para la medición de proteínas.

##### 4.4.3.2. Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (1976), el cual consiste en la determinación colorimétrica de proteínas mediante el uso del reactivo de Bradford (figura 16) y determinar la absorbancia del complejo azul formado a 595nm. El patrón de determinación de proteínas se realizó mediante el uso de una curva patrón de albumina de suero bovino (BSA).

Figura 16.- estructura del reactivo de Bradford.



#### 4.4.3.3. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante una curva patrón de albumina de suero bovino. Para ello se hizo una madre de 1000 ppm de albumina y luego una serie de patrones de concentraciones 3, 17, 33 y 50 ppm:

Tabla 6. Concentración de diosgenina utilizados en la cuantificación de saponinas.

Patrón (ppm)	V albumina (μL)	V agua (μL)	V Bradford (mL)
3	1	299	1
17	5	295	1
33	10	290	1
50	15	285	1
0	0	300	1

#### 4.4.4. Aminoácidos

##### 4.4.4.1. Extracción de aminoácidos

Se maceraron las hojas de morera con nitrógeno líquido y se recolectaron 1 g de muestra por cada hoja. Para la estadística se realizó la medición de 3 muestras de cada una de las cuatro variedades de morera estudiadas. Se colocó el gramo de hoja macerada en un tubo Falcón y se añadió 10 mL de etanol al 80%, se agitó en vortéx y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Se dejó reposar y se repitió el proceso de centrifugación por 10 minutos adicionales para eliminar los sobrenadantes en suspensión. Se filtró y eliminó el etanol mediante el uso de un rotovaporador a vacío y la fase acuosa se colectó para la cuantificación de aminoácidos. Esta sola extracción se usó para la determinación de aminoácidos y carbohidratos.

#### **4.4.4.2. Determinación de aminoácidos en forma de L-prolina.**

La determinación de prolina libre se basó en el método de Bates (1973), en el cual 0,25 mL del extracto vegetal se adiciono 0,5 mL de una solución de nihidrina (1%p/v de nihidrina en una solución 60% ácido acético, 20% etanol, 20% agua) y 0,5 mL de ácido acético. Posteriormente se agito y coloco en baño de maría a 100 °C por 1 hora. Se agregó 1 mL de tolueno y se agito fuertemente.

#### **4.4.4.3. Cuantificación de aminoácidos.**

Los aminoácidos de morera fueron evaluados usando una curva de calibración de L-prolina, usando una madre de 2 mM (230ppm) para formar una serie de patrones de 30, 15, 10 y 5 ppm:

**Tabla 7.** Concentración de L-prolina utilizados en la cuantificación de aminoácidos

<b>Patrón (ppm)</b>	<b>V L-prolina (mL)</b>	<b>V enrase (mL)</b>
<b>5</b>	0,54	25
<b>10</b>	1,08	25
<b>15</b>	1,63	25
<b>30</b>	3,26	25

El tratamiento de los patrones se trató de la misma manera que las muestras. La absorbancia se determinó en la fase acuosa final a 520nm.

#### **4.4.5. Carbohidratos**

##### **4.4.5.1. Extracción de carbohidratos**

Se procedió a macerar las hojas de morera con nitrógeno líquido y recolectar 1 g de muestra. Para la estadística se realizó la medición de 3 muestras de cada una de las cuatro variedades de morera estudiadas. Se colocó el gramo de hoja macerada en un tubo Falcon y se añadió 10 mL de etanol al 80%, se agitó en vórtex y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos. Se dejó reposar y se repitió el proceso de centrifugación por 10 minutos adicionales para eliminar los sobrenadantes en suspensión. Se filtró y eliminó el etanol mediante el uso de un rotovaporador a vacío y la fase acuosa se colecta para la cuantificación de aminoácidos.

#### 4.4.5.2. Determinación de carbohidratos

Para determinar la presencia de carbohidratos se usó el método de Dubois (1956). A 1 mL del extracto vegetal se adicionó 0,5 mL de solución de fenol 5%. Posteriormente se adicionó de forma rápida 2,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se homogenizara en vortéx. Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente por 30 minutos y se realizó una dilución de 0,125 mL en 10 mL, para determinar la absorbancia a 492 nm. Para las muestras Acorazonada y Criolla se realizó otra dilución de 7mL de muestra en 25mL de agua. En el caso de Murcia, la muestra se diluyo 6,3mL en 25mL de agua.

#### 4.4.5.3. Cuantificación de carbohidratos

La cuantificación de carbohidratos se hizo usando como patrón glucosa, haciendo una curva de calibración de glucosa a partir de una madre de 100ppm, siguiendo el cuadro siguiente:

**Tabla 8.** Concentración de glucosa utilizada en la cuantificación de carbohidratos

Patrón (ppm)	V glucosa (mL)	V enrase (mL)
3,125	0,313	10
6,25	0,625	10
12,5	1,25	10
25	2,5	10
50	5	10

#### 4.4.6. Flavonoides

##### 4.4.6.1. Determinación de flavonoides

Se pesaron 0,1 g de muestra y se reflujo por 2 horas con 4 mL de ácido sulfúrico 10% y 4 mL de etanol 50%. Posterior al reflujo, se filtró al vacío y se lavó con 6 mL de etanol. La solución se reduce su volumen a la mitad mediante baño de agua y se enfrió para generar la precipitación. Se filtró y lavo con 2 mL de agua fría para desechar el filtrado y los lavados. El sólido se disolvió en 14 mL de etanol concentrado previamente calentado a 50°C y se enraso a 20 mL. La solución se midió en un espectrofotómetro usando una longitud de onda de 258 nm.

##### 4.4.6.2. Cuantificación de flavonoides

La cuantificación de flavonoides se realizó con una curva de calibración usando como patrón rutina en las determinaciones. Se preparó una madre de 400 ppm y a partir de allí se realizó el siguiente cuadro:

**Tabla 9.** Concentración de rutina utilizada en la cuantificación de flavonoides

Patrón (ppm)	V rutina (mL)	V enrase (mL)
20	0,5	10
40	1	10
60	1,5	10
80	2	10
100	2,5	10

#### **4.4.7. Saponinas**

##### **4.4.7.1. Extracción de saponinas**

Las saponinas presentes en morera fueron determinadas pesando 0,1 de hoja maceradas en 1mL de etanol 50% y se dejó reposar por 30min.

##### **4.4.7.2. Determinación de saponinas**

Para la determinación de saponinas se tomó 0,05mL de la muestra macerada y se adiciono 1 mL del reactivo de color. Se dejó reposar entre 30 y 50 minutos para luego determinar su absorbancia en un espectrofotómetro UV-visible a 528nm.

El reactivo color consiste en una mezcla de ácido sulfúrico y anhídrido acético en proporciones de 5:1 (16.66%) recientemente preparado. Esta mezcla tiene un color amarillo suave. Se trabajará a una longitud de onda de 528nm. <sup>[35]</sup>

##### **4.4.7.3. Cuantificación de saponinas**

Las saponinas fueron analizadas mediante una curva de calibración usando como patrón la diosgenina, a partir de una madre de 331ppm y se realizó el siguiente cuadro. <sup>[36]</sup>

**Tabla 10.** Concentración de diosgenina utilizada en la cuantificación de saponinas

Patrón (ppm)	V Diosgenina (mL)	V enrase (mL)
100	3	10
150	4,5	10
200	6	10
270	8,2	10

#### 4.4.8. Actividad antirradical

La actividad antirradical fue determinada pesando 1g de muestra y se hierve en 10mL de agua por 5 minutos. Al extracto acuoso se filtró y centrifugo por 10min a temperatura ambiente a una velocidad de 3500rpm. Se tomó entonces 50 $\mu$ L y se añadió el reactivo de DPPH 0,1mM en metanol. Se dejó reposar a 10 min y se midió la absorbancia de las muestras a 515nm.

La curva de calibración se realizó usando como patrón una muestra de rutina, preparando una madre de 1mM (610 ppm) siguiendo el cuadro anexo: <sup>[37]</sup>

**Tabla 11.** Concentración de rutina utilizada para la determinación de actividad antirradical

Patrón (ppm)	V rutina 1mM ( $\mu$ L)	V DPPH 0,1mM ( $\mu$ L)	V metanol 80% ( $\mu$ L)
5	12,5	1450	37,5
10	25	1450	25
15	37,5	1450	12,5
20	50	1450	-

La cuantificación de la actividad antirradical se determinó de forma indirecta, a partir de la concentración de DPPH que reaccionó frente a la concentración de rutina. Cuanto más muestra con capacidad antirradical se encuentre en el medio, menor

será la absorbancia debido a una decoloración del DPPH, lo que concluye en una mayor actividad antirradical.

#### **4.5. Análisis estadístico.**

Se realizó el 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. Para ello se usó el programa estadístico InfoStat 2013 (Di Rienzo *et al*, 2013).<sup>[38]</sup>

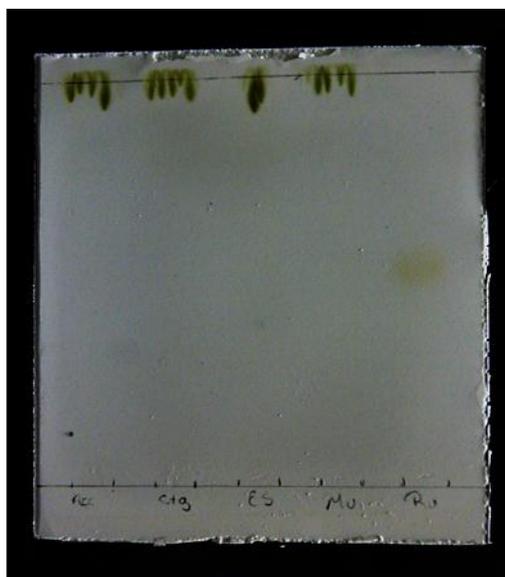
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1. Análisis Cualitativo: Cromatografía de Capa Fina (TLC)

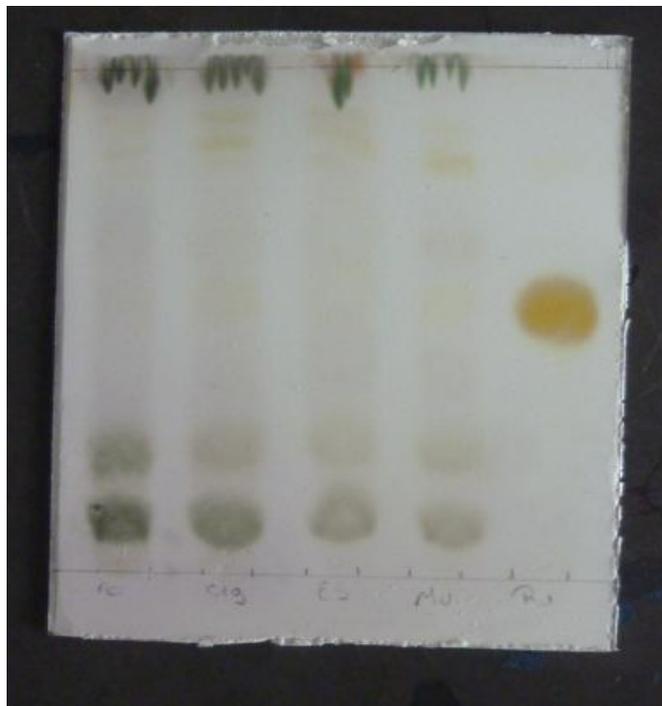
#### 5.1.1. Fenoles y Flavonoides

El desarrollo del perfil cromatográfico de las muestras evaluadas se puede observar en las figuras 17 y 18, donde se encuentran señaladas de izquierda a derecha las muestras Acorazonada y Criolla (ACC), Criolla/Guatemalteca/Tailandesa (CGT), Española (Es) y Murcia (Mu) dispuestas de izquierda a derecha, y al final una muestra patrón de un metabolito representativo del grupo, que en el caso de los fenoles es rutina (Ru) (figura 17). Los fenoles, donde se incluyen flavonoide, fueron sometidos a una mezcla de solventes de acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua en proporciones (100:10:10:10), y una vez terminado el proceso se aplicó el revelador (figura 18).

**Figura 17.** Placa cromatográfica para detección de fenoles sin revelador. De izquierda a derecha: Acorazonada y criolla (Acc), Criolla/Guatemalteca/Tailandesa (CGT), Española (Es), Murcia (Mu) y un patrón de Rutina (Ru)



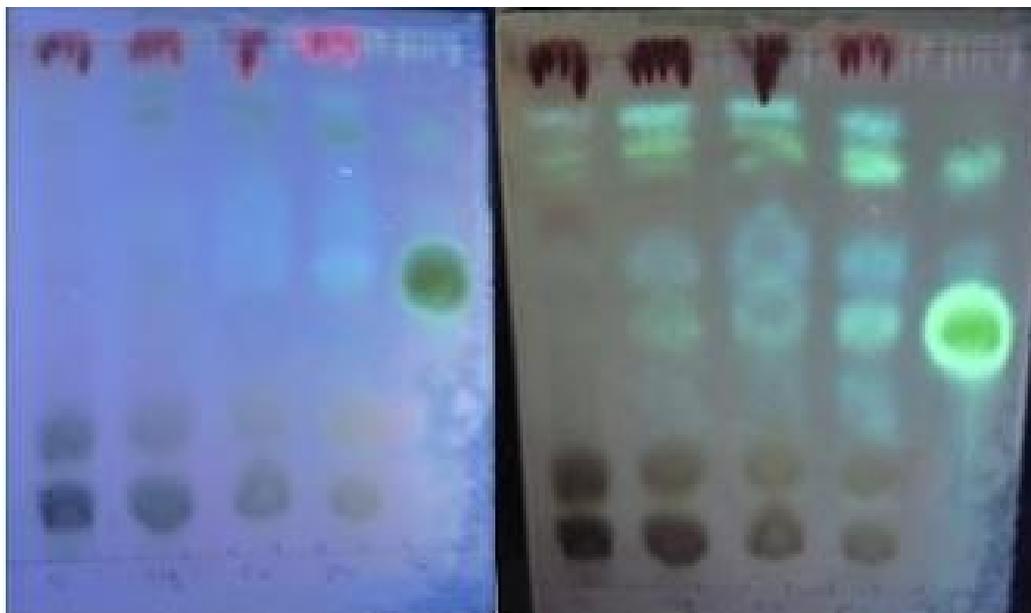
**Figura 18.** Placa cromatográfica para detección de fenoles revelado. Sistema de solventes acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua en proporciones (100:10:10:10). Orden de los extractos de izquierda a derecha: ACC, CTG, ES y MU



Luego de rociada la placa con AS (anisaldehído etanólico), se observa un perfil cromatográfico que muestra manchas a lo largo de toda la placa indicando la presencia de posibles compuestos del tipo flavonoidal con diferentes polaridades. En cada una de las muestras se observa claramente la presencia de diferentes metabolitos cuya coloración frente al revelador es amarillenta, sobre todo, los que se observan en la parte superior de la placa, cercanos al punto Rf (aprox. 0,70 y 0,80).

Posteriormente, la placa se colocó bajo la lámpara de luz ultravioleta a 254 y 365nm. Mostrando el siguiente perfil cromatográfico (figuras 19 y 20).

**Figuras 19 y 20.** Sistema de solventes acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua en proporciones (100:10:10:10) revelada con anisaldehído etanólico; foto de la izquierda tomada bajo luz UV de onda corta (254nm) y foto de la derecha tomada bajo luz UV de onda larga (365nm). Orden de los extractos de izquierda a derecha: ACC, CTG, ES, MU y patrón de Rutina.



Como se observa en la figura 20, la rutina se observa como una mancha verde fluorescente característica que sirve como punto de referencia para la identificación de posibles flavonoides glicosilados de polaridad similar. En el caso de las variedades evaluadas, todas muestran una mancha con Rf similar al de rutina siendo la Acorazonada y Criolla la que presenta una menor intensidad, indicando la posible presencia de este metabolito secundario. Adicionalmente, es posible observar la similitud en el perfil fitoquímico de las variedades estudiadas a través de la evaluación de las manchas fluorescentes a lo largo de toda la placa asociadas a flavonoides no glicosilados ( $R_f > 0,7$ ) y glicosilados ( $R_f < 0,7$ ) (tabla 12).

**Tabla 12.** Tabla de los Rf de las manchas representativas de los flavonoides

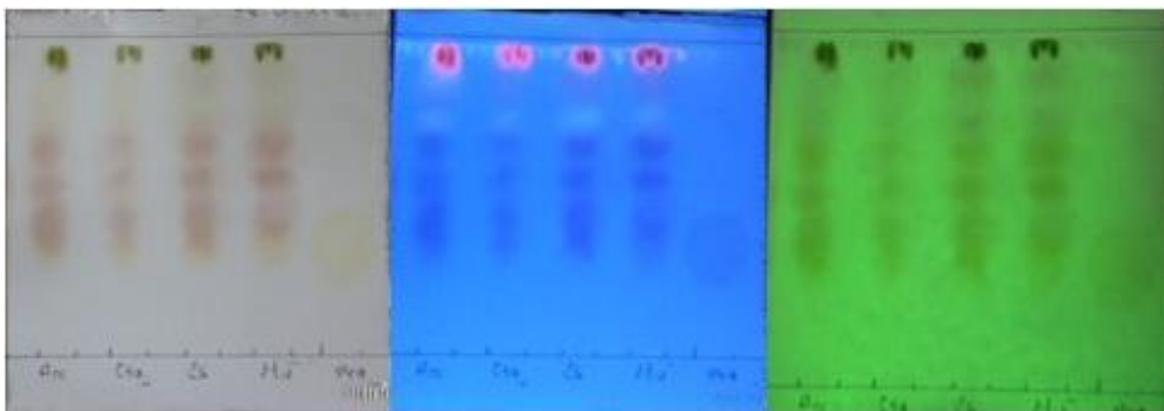
Tipo de Flavonoide	Rf aproximado	Imagen referencial
No Glicosilados	0,7 – 0,9	

Glicosilados	0,5 – 0,7	
--------------	-----------	---

### 5.1.2. Aminoácidos y proteínas

Para los aminoácidos y proteínas, se desarrolló una placa de silica como fase estacionaria y L-prolina como patrón. Los resultados se muestran a continuación.

**Figura 21.** Sistema de solventes n-butanol: acetona: ácido acético glacial: agua, en proporción (35:35:10:20) revelada con Ninhidrina; foto de la izquierda tomada una vez aplicado el revelador a luz natural; la foto del centro tomada bajo luz UV de onda corta (254nm) y foto de la derecha tomada bajo luz UV de onda larga (365nm). Orden de los extractos de izquierda a derecha: ACC, CTG, ES, MU y patrón de L-Prolina.



Como se observa, la placa cromatográfica corrida con el sistema de solventes n-butanol: acetona: ácido acético glacial: agua, en proporción (35:35:10:20) y revelada con Ninhidrina (figura 21), revela al patrón de prolina como una mancha de coloración amarilla y Rf de 0,4. Al estudiar el perfil cromatográfico de las variedades estudiadas es posible observar una mancha de idéntico Rf y coloración similar para las cuatro muestras evaluadas, revelando así la presencia de este aminoácido en las variedades analizadas. Adicionalmente, se sabe que la Ninhidrina al ser rociada sobre aminoácidos presenta una coloración que va desde el azul-verde hasta el púrpura. En la figura se muestra una serie de manchas con coloraciones lila suave, que indican la presencia de este tipo de compuestos.

**Tabla 13.** Tabla de los Rf de las manchas representativas de los flavonoides

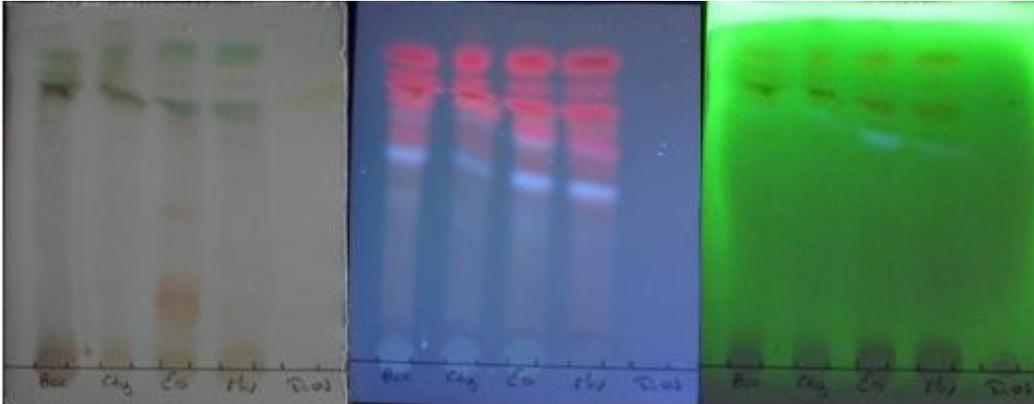
<b>Tipo de Flavonoide</b>	<b>Rf aproximado</b>	<b>Imagen referencial</b>
Proteínas similares a L-prolina	0,4	
Proteínas	0,5 – 0,7	
Otros aminoácidos con menor afinidad	0,7 – 0,8	

### **5.1.3. Saponinas**

En la figura 22 puede observarse el análisis cromatográfico para la identificación de saponinas de forma cualitativa. El sistema de solventes utilizado fue tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico en una proporción (70:30:10), utilizando como revelador el reactivo de Komarowsky. Como se observa, la placa tuvo dificultades en el desarrollo con el sistema de solventes, por lo que se repitió la placa con la muestra Acorazonada Criolla y CGT junto al patrón de diosgenina.

En la placa de la figura se observa un perfil con diferentes bandas correspondientes a los metabolitos presentes en las muestras. Un resultado positivo de la presencia de saponinas es una coloración amarilla, azul-purpura o roja, como los observados en las muestras Española y Murcia.

**Figura 22.** Sistema de solventes tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico en una proporción (70:30:10) revelada con el reactivo de Komarowsky; foto de la izquierda tomada una vez aplicado el revelador a luz natural; la foto del centro tomada bajo luz UV de onda corta (254nm) y foto de la derecha tomada bajo luz UV de onda larga (365nm). Orden de los extractos de izquierda a derecha: ACC, CTG, ES, MU y patrón de diosgenina.



Al colocar la placa bajo la longitud de onda de 254 nm (figura 22, centro) se aprecian barras de color rojo intenso, asociadas a la clorofila, muy cercanas a las manchas correspondientes a saponinas.

Adicionalmente, es posible observar en la imagen izquierda la presencia de otras saponinas con coloraciones azules y purpuras, y la característica coloración amarilla del patrón de diosgenina. Sin embargo, el desarrollo irregular de las muestras de Acorazonada y Criolla y CTG, motivo al desarrollo de una segunda placa cromatográfica con estas dos muestras y dos siembras del patrón de diosgenina para hacer una evaluación comparativa (figura 23).

**Figura 23.** Placa cromatográfica de las muestras ACC y CGT. Sistema de solventes tolueno: acetato de etilo: ácido fórmico en una proporción (70:30:10) revelada con el reactivo de Komarowsky; foto de la izquierda tomada una vez aplicado el revelador a luz natural; la foto del centro tomada bajo luz UV de onda corta (254nm) y foto de la derecha tomada bajo luz UV de onda larga (365nm). Orden de los extractos de izquierda a derecha: ACC, Diosgenina, CTG y Diosgenina



Como puede observarse en la figura 23, es posible observar el desarrollo cromatográfico para las variedades ACC y CGT, observándose algunas manchas de color azul verdoso a lo largo de toda la placa con coincidencia de Rf entre estas manchas y las asociadas a clorofila. Así mismo, es posible observar a la altura del patrón de diosgenina, manchas coincidentes de color azul verdoso, que pudiese ser asociado a alguna saponina de comportamiento similar. Sin embargo, este análisis no es concluyente respecto a la identidad de las saponinas en las muestras estudiadas.

Vale la pena destacar, que esta placa no presenta información de relevancia en longitudes de onda 254 o 365 nm que sean de interés en la determinación cualitativa de saponinas, esto por la presencia de las coloraciones rojas intensas a la longitud de 254 nm, las cuales son, como se mencionó anteriormente, asociadas a la presencia de clorofilas.

## **5.2. Perfil cuantitativo**

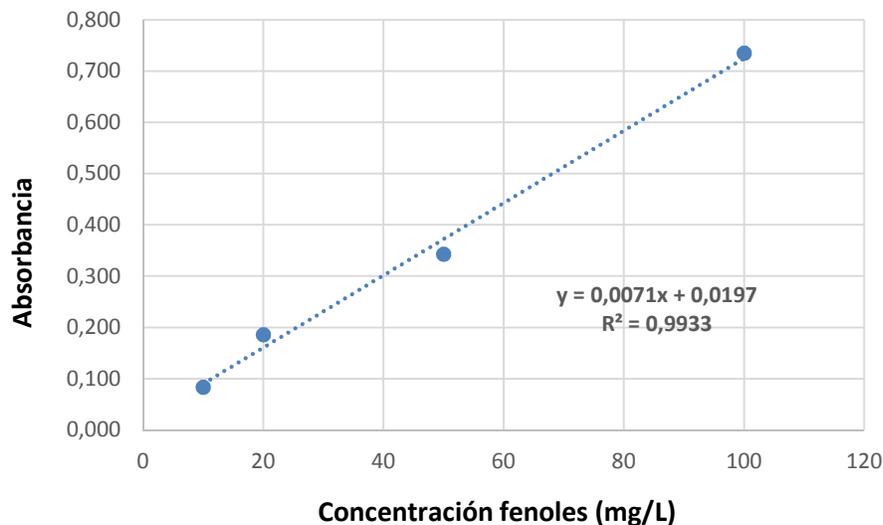
### **5.2.1. Cuantificación de Fenoles totales**

La cuantificación de fenoles totales se realizó mediante la suma de los fenoles ligados a la pared celular y los fenoles solubles, obtenidos ambos bajo el mismo procedimiento de extracción donde los ácidos y bases agregados extraen los fenoles ligados a la pared celular mientras que el medio etanólico extrae los fenoles solubles.

Mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu en medio básico se obtiene un complejo coloreado azul oscuro, inestable en el tiempo, que luego de una hora de reposo

permite acomplejar los fenoles presentes. Mediante el procedimiento explicado en la parte experimental se obtuvo inicialmente la siguiente curva de calibración externa, usando como patrón una solución de ácido clorogénico:

**Figura 24.** Curva de calibración de ácido clorogénico para la cuantificación de fenoles solubles y ligados a la pared celular en cuatro variedades de Morera.



Mediante esta curva se realizó el cálculo de la concentración de fenoles solubles y fenoles ligados a la pared celular, y mediante el programa Infostat se hizo el análisis de los datos crudos (sin tratamiento):

**Tabla 13.** Análisis de la varianza de los datos de concentración de fenoles solubles en las variedades.

### Análisis de la varianza

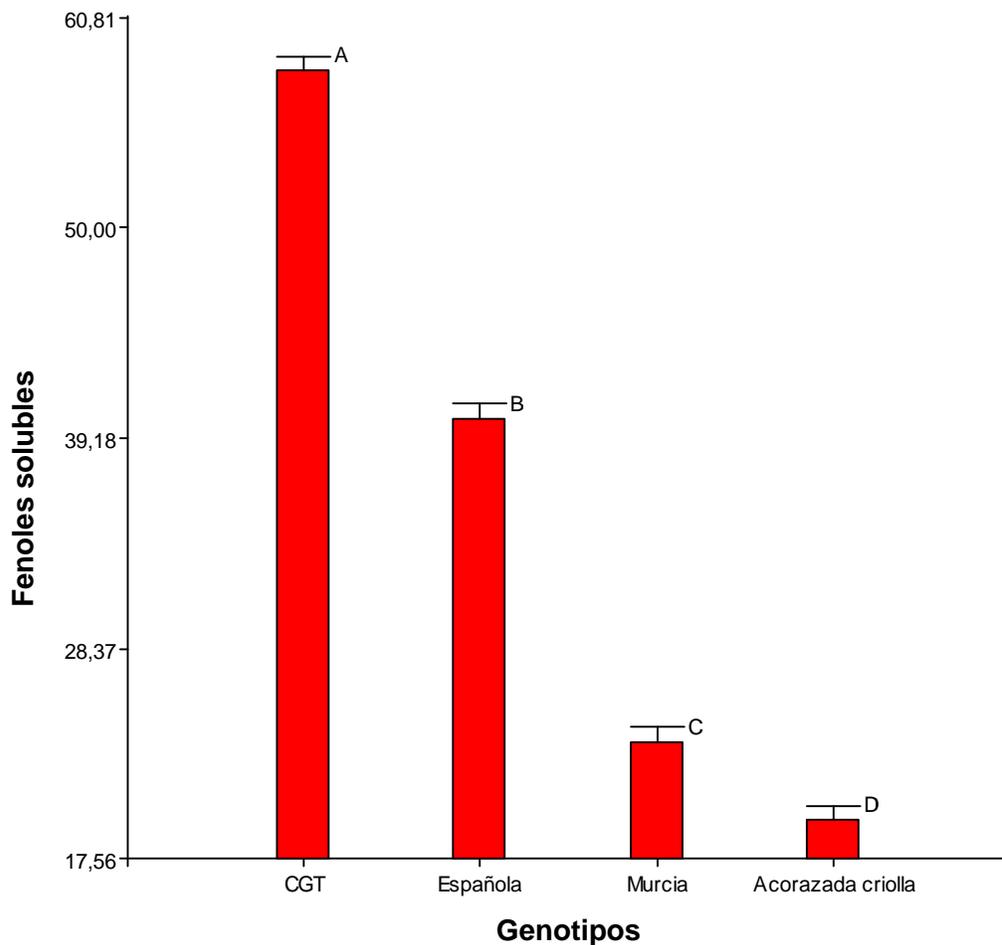
<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R<sup>2</sup></u>	<u>R<sup>2</sup> Aj</u>	<u>CV</u>
Fenoles solubles	12	1,00	0,99	3,78

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2800,51	5	560,10	313,04	<0,0001
Genotipos	2788,08	3	929,36	519,42	<0,0001
Repetición	12,42	2	6,21	3,47	0,0996
Error	10,74	6	1,79		
<b>Total</b>	<b>2811,24</b>	<b>11</b>			

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

**Figura 25.** Gráfico de barras comparativo de las concentraciones de fenoles solubles en las variedades Acc, CGT, Es y Mu



Nótese como la variedad Criolla/Guatemalteca/Tailandesa posee la mayor concentración de fenoles solubles en comparación a las otras variedades, teniendo entonces, un orden decreciente de concentración CGT>Española>Murcia>Acorazonada y Criolla. Por otro lado, desde el punto de vista estadístico, las variedades presentan entre sí diferencias significativas, siendo la de mayor separación la variedad CGT con la variedad Acorazonada y Criolla.

Posterior al análisis de los datos crudos (sin el tratamiento analítico correspondiente), se procede a calcular la concentración de fenoles solubles en mg/g de hoja seca en las hojas de las 4 variedades de morera (*Morus alba*), obteniéndose así los siguientes valores:

**Tabla 12.** Concentración de fenoles solubles (mg/g) contenidos en las hojas de las variedades de morera.

Variedad	mg/g hoja	%CV
Acorazonada/Criolla	17,9±0,6	3,4
Murcia	21±1	6,3
Española	37±2	5,6
CGT	53±1	2,2

Del mismo modo, se realizó el estudio de la concentración de fenoles ligados a la pared celular, tras haber sido determinadas por la curva de calibración externa de fenoles (figura 24).

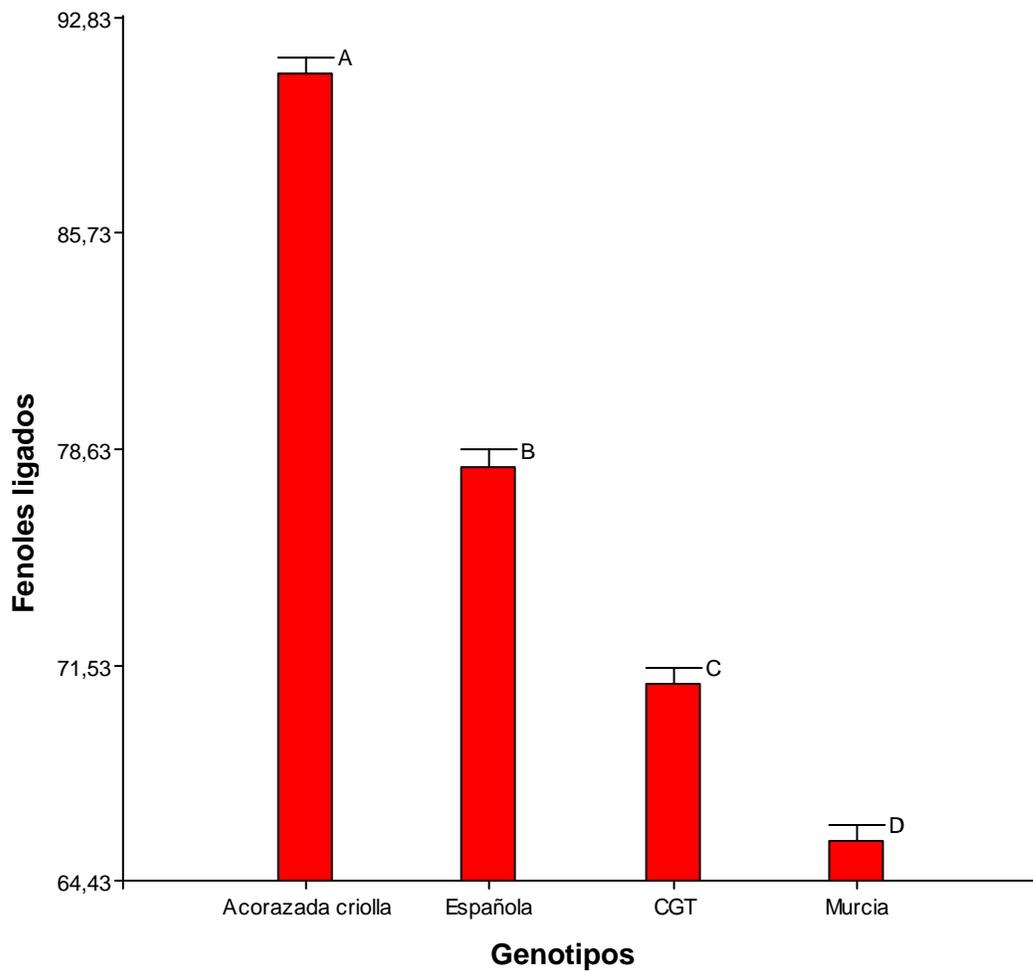
**Tabla 13.** Análisis de la varianza de los datos de concentración de fenoles ligados a la pared celular en las variedades.

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Fenoles ligados	12	0,99	0,99	1,26

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1080,45	5	216,09	234,40	<0,0001
Genotipos	1079,37	3	359,79	390,28	<0,0001
Repetición	1,08	2	0,54	0,59	0,5853
Error	5,53	6	0,92		
Total	1085,98	11			



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

Igual que en el caso de fenoles solubles, la diferencia entre las 4 variedades es significativa, puesto que se observa una variación importante en las concentraciones entre cada genotipo de morera, siendo inversamente proporcional a la concentración de fenoles solubles que se observó en el gráfico 25 en comparación a la de fenoles ligados. La variedad Acorazonada y Criolla posee la mayor concentración de fenoles ligados a la pared celular, mientras que en fenoles solubles, la variedad CGT la que presentaba la mayor concentración. El orden decreciente de concentración de fenoles ligados a la pared celular es la siguiente: Acorazonada/Criolla>Española>CGT>Murcia.

Finalmente, la concentración de fenoles obtenida mediante la curva de calibración, permite determinar la concentración en mg/g de hoja seca de fenoles ligados a la pared celular:

**Tabla 14.** Concentración de fenoles ligados a la pared celular (mg/g) contenidos en las hojas de las variedades de morera.

Muestra	mg/g hoja	%CV
Acorazonada/criolla	84±2	2,1
Murcia	60±2	3,5
Española	72±2	2,9
CGT	65±1	2,0

Se puede observar como la concentración de fenoles ligados a la pared celular es mayor a la concentración de fenoles solubles en la hoja.

La concentración entonces de fenoles totales es una suma algebraica de ambos resultados en cada variedad, siendo reportados como cantidad en mg/g de hoja seca:

**Tabla 15.** Concentración de fenoles totales (mg/g) contenidos en las hojas de las variedades de morera.

Muestra	mg/g hoja	%CV
Acorazonada/criolla	105±2	2,2
Murcia	83±2	2,0
Española	113±4	4,0
CGT	128±4	3,2

Como se desprende del análisis de la tabla 15, la concentración de fenoles totales es, en orden decreciente: CGT>Española>Acorazonada/Criolla>Murcia.

La exposición a diferentes cambios en el ambiente (lluvia, rayos ultravioleta, humedad, temperatura, depredadores, etc.) son factores determinantes en la variación de la concentración del contenido fenólico en las plantas, esto como respuesta al estrés al cual están siendo sometidas. Dependiendo del tipo de estrés, un tipo particular de fenoles se verá beneficiado en su concentración, sin embargo, puede conllevar a efectos positivos o negativos en cuanto a otros valores nutricionales se refiera. Véase el caso de los ácidos fenólicos, que al aumentar su concentración en la planta motivado a la presencia de agentes oxidativos (estrés oxidativo), esta posee mayores propiedades antioxidantes y anticancerígenas [39].

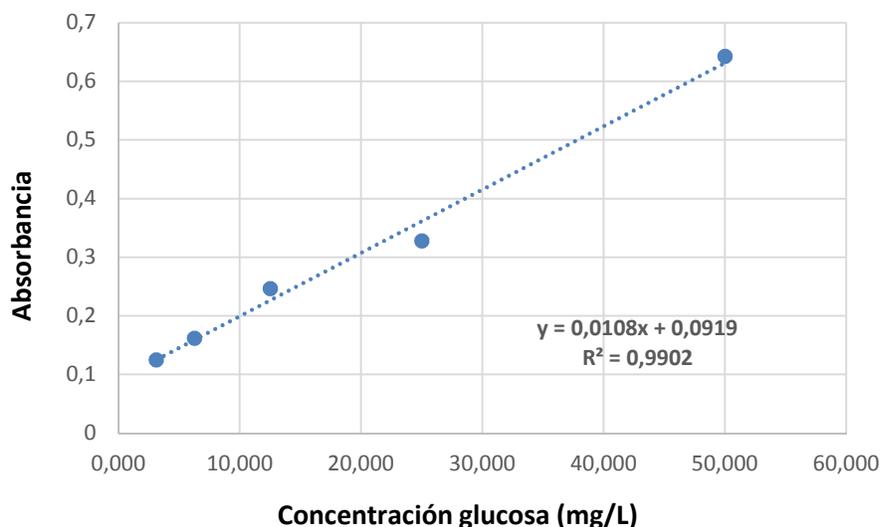
Trabajos previos [33] muestran que los valores de fenoles totales en raíces y hojas de morera están cerca de 170,2 mg/g de materia orgánica, haciendo comparaciones con la especie *Morus nigra*, sin mencionar diferencias de variedades de alguna de estas. García y Ojeda, [40] reportan valores de fenoles totales de aproximadamente 30 mg/g hoja seca en hojas maduras y a diferentes periodos entre diferentes

variedades, siendo la variedad acorazonada la segunda variedad de menor concentración de fenoles totales en hojas (25,2 mg/g MS), concluyendo que la variedad tienen influencia en la concentración de fenoles. Así mismo, se han reportado valores de concentración de fenoles totales de desde un 89% en hojas jóvenes hasta un 21% en hojas maduras [39]. Lo anterior indica entonces que los valores obtenidos corresponden a valores comunes para el tipo de muestra analizada sin que sea posible definir una correlación con el fenotipo.

### 5.2.2. Cuantificación de Carbohidratos

La determinación de carbohidratos se realizó mediante la cuantificación a través de espectrofometría de absorción UV-visible, usando como método de determinación el descrito por Dubois (1956). La curva de calibración se realizó a partir de un patrón de glucosa (figura 23).

**Figura 27.** Curva de calibración externa de la concentración de carbohidratos (mg/L), usando como patrón glucosa.



Al igual que la cuantificación de fenoles totales, los resultados de absorbancia, fueron analizados mediante el software infostat para determinar si existe alguna diferencia significativa entre los valores de concentración obtenidos.

**Tabla 16.** Análisis de la varianza de concentración de carbohidratos en las variedades de morera.

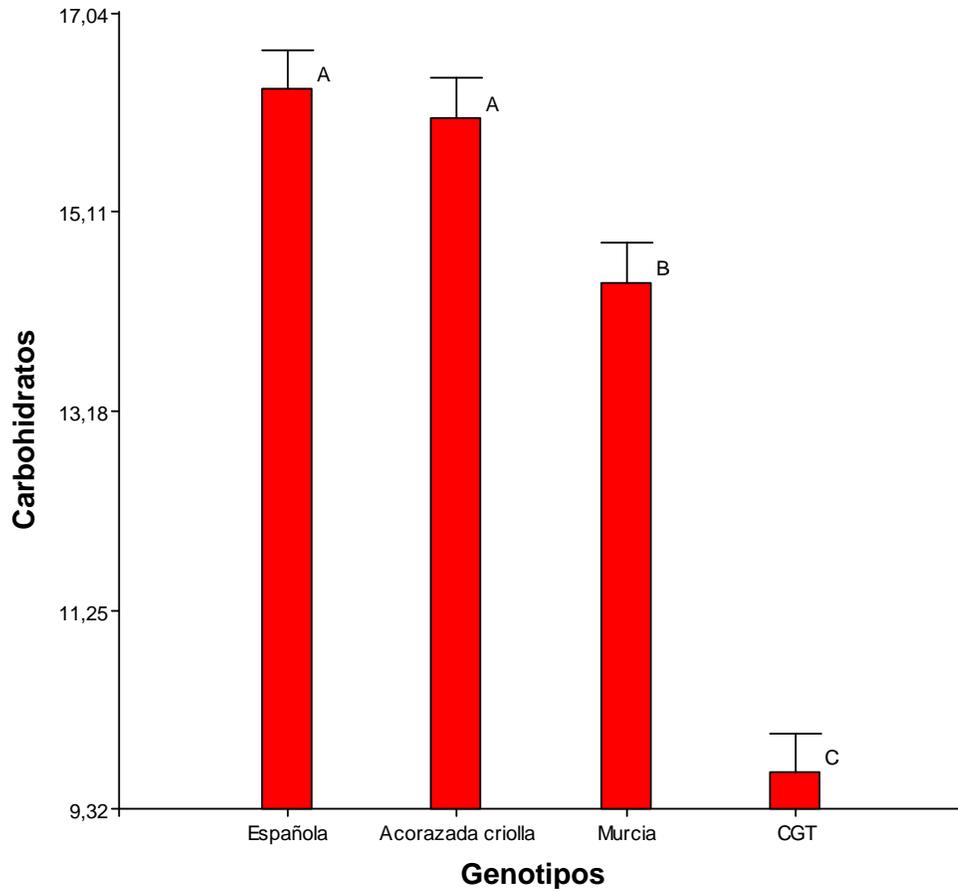
### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Carbohidratos	12	0,97	0,94	4,75

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	85,76	5	17,15	38,13	0,0002
Genotipos	84,94	3	28,31	62,93	0,0001
Repetición	0,83	2	0,41	0,92	0,4484
Error	2,70	6	0,45		
Total	88,46	11			

**Figura 28.** Gráfico de barras comparativo de las concentraciones de carbohidratos en las variedades



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

Según la Tabla 16, el análisis de varianza muestra diferencias significativas entre variedades ( $p > 0,05$ ). La figura 28 muestra que las variedades Española y Acorazonada Criolla presentaron la mayor concentración de carbohidratos y difieren significativamente con Murcia y CGT.

La tabla 18 muestra las concentraciones en mg/g de hoja seca de los carbohidratos presentes en las cuatro variedades de morera. Para las variedades Murcia y Acorazonada/Criolla, se realizaron diluciones adicionales.

Se observa que las variedades de mayor concentración de carbohidratos son las variedades Acorazonada/ Criolla y Murcia con valores de 180 y 178 mg/g, respectivamente. Así pues, el orden decreciente de contenido de carbohidratos en hojas de morera es: Acc>Mu>Es>CGT. Al mismo tiempo, y para efecto de su utilidad como alimento, este valor se analiza en conjunto al contenido de aminoácidos y proteínas presentes para la elección de la variedad más idónea para uso de forraje para ganado.

**Tabla 18.** Concentración de carbohidratos (mg/g) contenidos en las hojas de las variedades de morera.

Muestra	mg/g hoja	%CV
Acorazonada/criolla	180±4	2,4
Murcia	178±7	4,1
Española	52±4	6,8
CGT	30,3±0,2	0,6

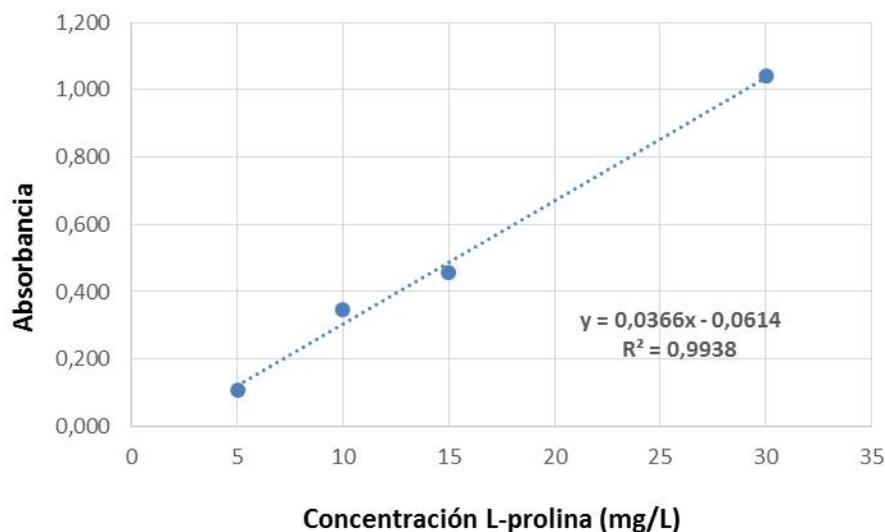
García y Ojeda, <sup>[30]</sup> reportan valores de carbohidratos solubles de 198,5 mg/g de hoja seca para las especies de *Morus alba*, entre las cuales analizaron la variedad Acorazonada bajo condiciones controladas, como el periodo, la cantidad de fertilizante y la poda periódica. A pesar de que las condiciones de ambos estudios no son las mismas, el resultado obtenido concuerda con el máximo valor de carbohidratos presentes en la variedad Acorazonada y Criolla. Hasta ahora los estudios de morera no han realizado análisis con las variedades Española o Murcia, solo la variedad acorazonada ha sido estudiada que tenga relación con el presente trabajo de investigación.

### 5.2.3. Cuantificación de Aminoácidos

El contenido de aminoácidos se determinó por una curva de calibración externa, usando como patrón L-prolina, por medio de espectrofotometría de absorción UV-

visible, usando el mismo método de extracción que el utilizado para la extracción de carbohidratos y el análisis por medio del esquema de Bates (1973). El patrón de prolina arrojo los resultados siguientes:

**Figura 29.** Curva de calibración externa de la concentración de aminoácidos (mg/L), usando como patrón L-prolina.



El análisis de las variedades por el software infostat reveló lo siguiente:

**Tabla 19.** . Análisis de la varianza de los datos de concentración de aminoácidos contenidos en las hojas de las variedades de morera.

### Análisis de la varianza

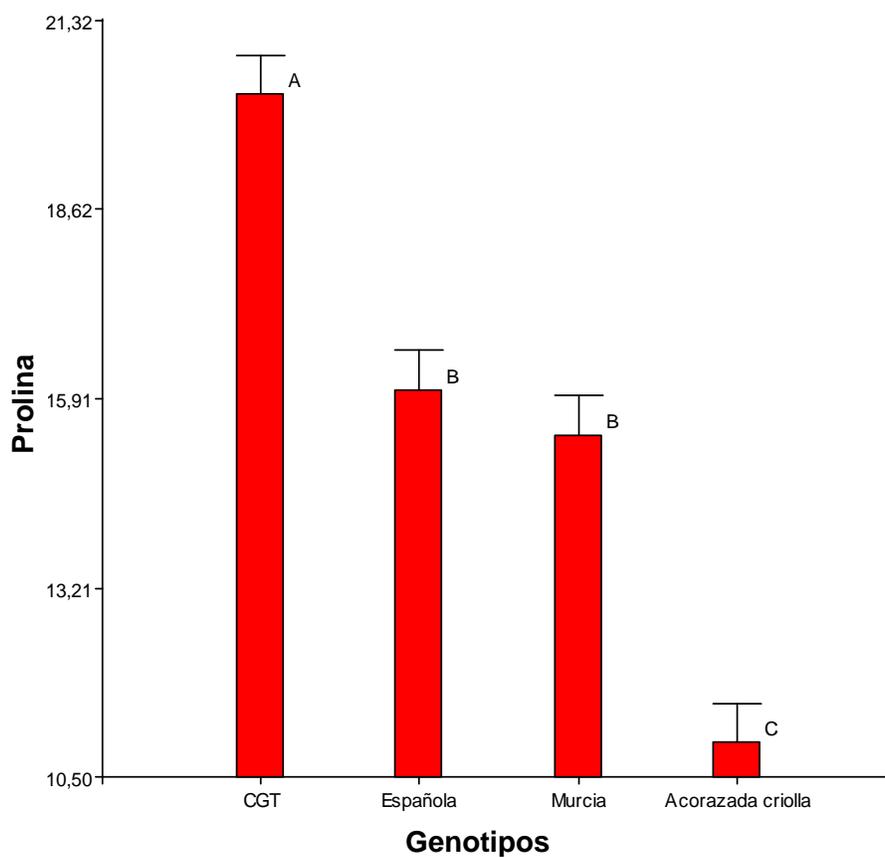
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Prolina	12	0,96	0,92	6,23

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	130,12	5	26,02	27,27	0,0005
Genotipos	129,61	3	43,20	45,27	0,0002

Repetición	0,51	2	0,25	0,27	0,7753
Error	5,73	6	0,95		
Total	135,84	11			

**Figura 30.** Gráfico de barras comparativo de las concentraciones de aminoácidos como prolina en las variedades



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

Como se puede observar en la figura 30, los valores de concentración de aminoácidos en las variedades Española y Murcia no presentan diferencias significativas entre sí, pero si entre las variedades CGT y Acorazonada/ Criolla, que a su vez son diferentes significativamente entre ellas.

El tratamiento de los resultados arrojo el siguiente contenido de aminoácidos en mg/g de hoja seca de morera.

**Tabla 20.** Concentración de aminoácidos (mg/g) contenidos en las hojas de las variedades de morera.

Muestra	mg/g hoja	%CV
Acorazonada/criolla	0,54±0,03	4,8
Murcia	0,74±0,04	5,6
Española	0,80±0,01	1,7
CGT	0,99±0,05	4,9

Observando la tabla se puede establecer un orden decreciente de concentración, siendo este: CGT>Es>Mu>Acc. Como es de esperarse, la concentración de aminoácidos en hojas jóvenes es menor que en maduras y se encuentran por debajo de 1 mg/g de hoja para todas las variedades estudiadas. Tomando en cuenta el resultado obtenido en la cuantificación de carbohidratos, se puede apreciar que la concentración de aminoácidos es totalmente opuesta a la concentración de carbohidratos. Yamashita <sup>[42]</sup> demuestra este comportamiento con su investigación, donde analizan la variación de los carbohidratos y los aminoácidos en las hojas y tallos de morera en diferentes fases de crecimiento, encontrando que a medida que la planta se desarrolla, el contenido de aminoácidos aumenta y la de carbohidratos disminuye de forma inversamente proporcional a los aminoácidos en cada estación y periodo de vida de la planta.

Los resultados de concentración de prolina de Yamashita reporta que en los meses de octubre, las hojas y tallos de moreras jóvenes poseen una concentración aproximada de 0,5 mg/g hoja seca, los cuales son valores muy similares y obtenidos con las hojas recolectadas aproximadamente por el mismo periodo de meses (octubre-diciembre). Indica además que la presencia de la prolina en la morera es

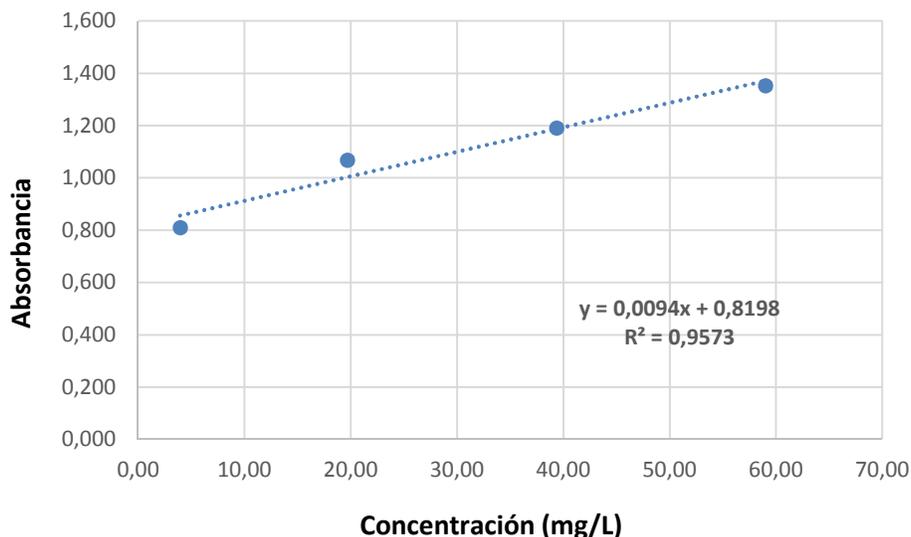
un indicador de estrés en la planta, concluyendo que este aminoácido libre se presenta en momentos de bajas temperaturas, poda de las hojas y en retoños recolectados.

#### 5.2.4. Cuantificación de Proteínas

Las proteínas, fueron analizadas cuando las variedades ya eran adultas, por las dificultades en la adquisición de reactivos para el análisis.

En el análisis de proteínas se usó el método descrito por Bradford (1976) por UV-visible usando el reactivo que lleva su nombre, de coloración azul/marrón oscuro que al acomplejar a las proteínas adquiere una coloración azul cristalino. El patrón usado fue albumina de suero bovino para la curva de calibración que fue el siguiente:

**Figura 31.** Curva de calibración externa de la concentración de proteínas (mg/L), usando como patrón albumina de suero bovino.



Posterior al tratamiento mediante la curva de calibración de los datos arrojados en absorbancia de las muestras, se analizaron por medio del software infostat y se obtuvo el siguiente resultado:

**Tabla 21.** . Análisis de la varianza de los datos de concentración de proteínas en las variedades de hojas de morera

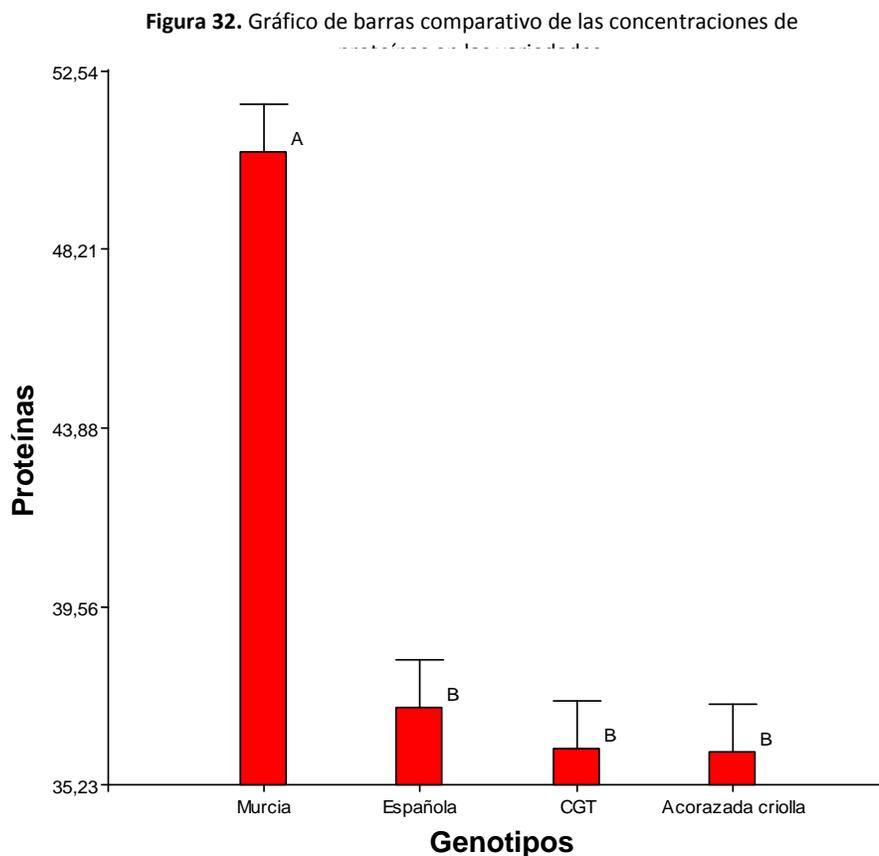
### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Proteínas	12	0,95	0,91	5,05

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	479,51	5	95,90	23,59	0,0007
Genotipos	454,96	3	151,65	37,30	0,0003
Repetición	24,54	2	12,27	3,02	0,1238
Error	24,39	6	4,07		
Total	503,90	11			

En la figura 32 se observa como la variedad de Murcia presenta diferencias significativas con respecto a las otras variedades que entre si no presentan diferencias significativas.



En el tratamiento de los datos para el cálculo del contenido de proteína presente en forma de mg/g de hoja seca de morera se obtuvo lo siguiente:

**Tabla 21.** Concentración de proteínas (mg/g) contenidos en las hojas de las variedades de morera.

Muestra	mg/g hoja	%CV
Acorazonada/criolla	137±10	7,3
Murcia	194±4	2,0
Española	142±2	1,7
CGT	141±9	6,4

Se observa entonces como el orden decreciente es el siguiente: Mu>Es>CGT>Acc siendo Murcia la variedad con mayor concentración de proteínas con un 194 mg/g por hoja seca. Dado que las proteínas fueron analizadas en la edad adulta de la planta y no en fase joven como en el caso de los aminoácidos, no es posible determinar la relación entre ambos metabolitos.

Sin embargo, al saber que las proteínas provienen de la unión de aminoácidos, se puede suponer que la concentración de proteínas tiene una relación directa con la concentración de aminoácidos en la edad temprana. Nótese como esta suposición coincide con la variedad Acorazonada y Criolla, que al ser la última variedad con la menor concentración de aminoácidos en la etapa joven, es la última en concentración de proteínas en la edad adulta. En el caso de CGT que en la etapa joven fue la de mayor contenido de aminoácidos, y en la adulta es la penúltima en el contenido de proteínas, pudo deberse a que durante su crecimiento no se desarrolló de la misma forma que las demás variedades, porque en el caso de Murcia y Española están en el mismo orden decreciente en relación entre ellas y Acorazonada y Criolla. Por ende, podemos suponer que efectivamente en tres variedades, la relación de contenido de aminoácidos en etapa joven de la morera coincide con el contenido de proteínas en sus etapas maduras.

Trabajos previos sobre el contenido de proteínas, reportan un valor máximo de 239,9 mg/g materia seca (hoja + tallos) en proteínas <sup>[43]</sup>, valor más alto que el obtenido, debido tal vez a que en este caso solo se analizó las hojas. Por otro lado, existen reportes de un máximo de 200 mg/g de masa seca de proteínas en morera, un valor cercano a los reportados <sup>[44]</sup>, sin embargo no se especifican las variedades utilizadas en su investigación.

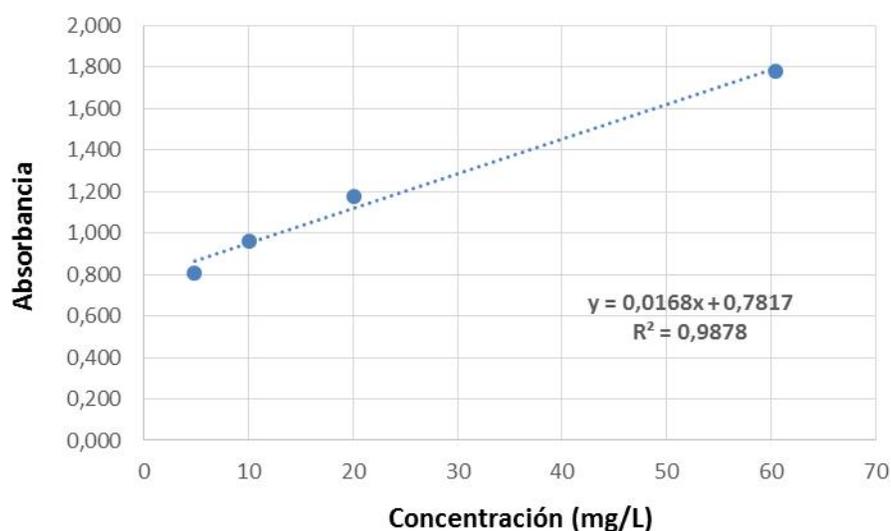
### **5.2.5. Cuantificación de Flavonoides**

Para el análisis de las flavonoides se realizó el método de Gutiérrez et al., (2000), usando en vez de quercetina como describe el método, rutina, pues el perfil cromatográfico por CCF reveló que todas las variedades poseían una cantidad

importante de rutina. El método está basado en espectrofotometría de absorción UV-vis donde el flavonoide (de color amarillo pálido) fue medido directamente a 258nm. La curva de calibración resultante se muestra en la figura 33.

Posteriormente, los datos de absorbancia, convertidos en concentración (ppm) fueron analizados por el software de infostat para la determinación de diferencias significativas entre los valores.

**Figura 33.** Curva de calibración externa de la concentración de flavonoides (mg/L), usando como patrón rutina.



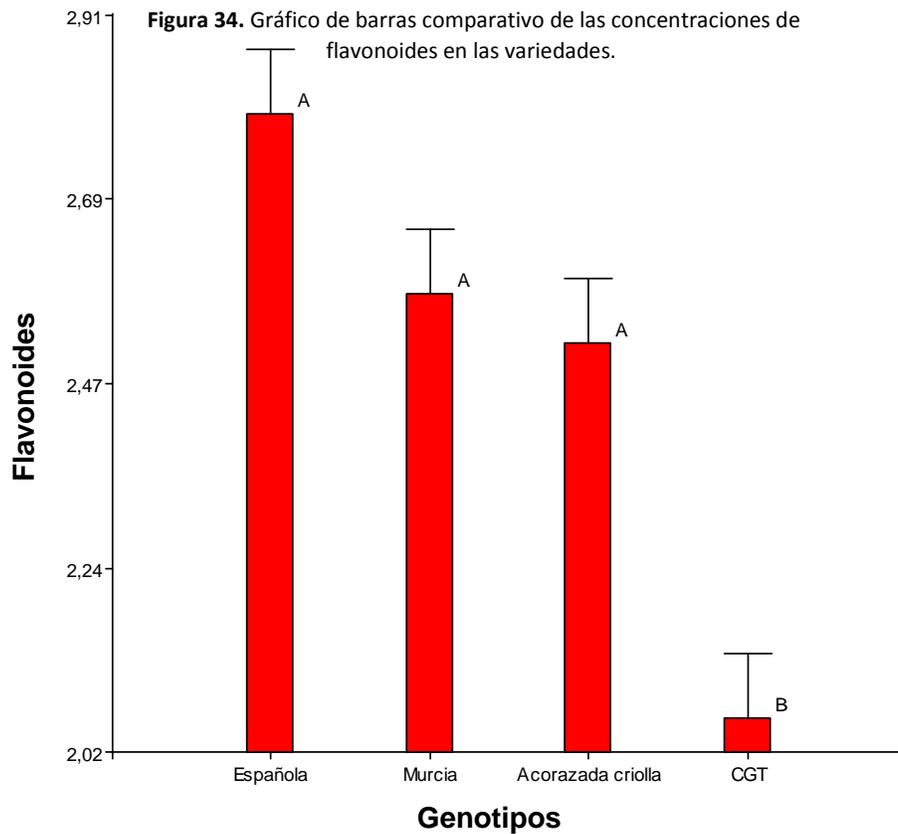
**Tabla 22.** Análisis de la varianza de los datos de concentración de flavonoides contenidos en las hojas de las variedades de morera.

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Flavonoides	12	0,89	0,80	5,47

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,88	5	0,18	9,56	0,0080
Genotipos	0,86	3	0,29	15,43	0,0032
Repetición	0,03	2	0,01	0,77	0,5055
Error	0,11	6	0,02		
Total	1,00	11			



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

Se observa en estos resultados como las variedades Española, Murcia y Acorazonada y Criolla presentan la mayor concentración de flavonoides, siendo la española la variedad de mayor concentración.

Sin embargo, el software indica que las variedades no presentan diferencias significativas entre las variedades, lo cual como se puede observar no es estadísticamente posible dada la diferencia de los valores entre las variedades Española en comparación a Murcia y Acorazonada y Criolla. Esto pudo deberse a inconvenientes en el método de preparación, dado que este se alteró para adaptarlo a las cantidades de reactivo que se disponían. Cabe destacar que el coeficiente de varianza arrojado por el sistema muestra como los valores son mayores al límite de valores de CV (de 5% a 5,47%) que se considera para tomar los datos como reproducibles, por lo cual se tomaron como valores aceptables tomando como premisa principal que las concentraciones de metabolitos entre las hojas de una misma planta varían significativamente.

Luego de la evaluación se procedió al tratamiento de los valores para obtener el contenido de flavonoides en mg/g de hoja seca de las variedades, dando el siguiente resultado:

**Tabla 23.** Concentración de flavonoides (mg/g) contenidos en las hojas de las variedades de morera.

Muestra	mg/g hoja	%CV
Acorazonada/criolla	14,0±0,9	6,1
Murcia	14,4±0,6	4,1
Española	15,6±0,8	5,1
CGT	11,4±0,4	3,9

Como se observa, el contenido de flavonoides, en orden decreciente es Es>Mu>Acc>CGT. En la bibliografía se ha descrito que la morera posee entre el 10

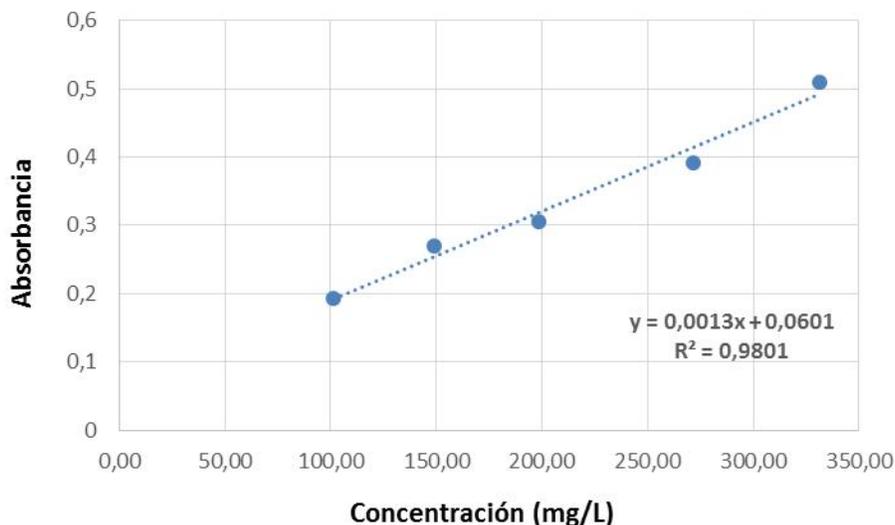
y 20 mg/g hoja de flavonoides totales, valores que coinciden con los encontrados en este trabajo [33].

Por su parte, Garcia et. al [29] reportaron un valor promedio de flavonoides de 16 mg/g hoja seca sin variaciones con respecto a la condición de la biomasa y el suelo en cuanto a nivel de compuestos nitrogenados (fertilizantes), concluyendo que la síntesis de estos metabolitos puede ser independiente respecto al nivel de nitrógeno de la biomasa y el suelo. Resultados similares fueron obtenidos por dichos autores respecto al periodo de recolección (lluvioso o poco lluvioso) permitiéndoles afirmar con estos datos que los flavonoides juegan un papel protagónico como marcadores quimiotaxonómicos en el metabolismo del genero *Morus*.

### 5.2.6. Cuantificación de Saponinas

El contenido de saponinas en las variedades estudiadas fue determinado por el método de Galindo (1989), el cual describe el método de Liebermann-Burchard con ligeras modificaciones. Se usó como patrón la saponina esteroidal diosgenina. El resultado de la curva de calibración de la solución color entre azul oscuro y rojo oscuro (prueba indicativa de saponinas) fue el siguiente:

**Figura 35.** Curva de calibración externa de la concentración de saponinas (mg/L), usando como patrón diosgenina.



Las muestras fueron analizadas por el programa infostat el cual muestra las posibles diferencias significativas entre las variedades. El resultado mostrado por el programa fue el siguiente:

**Tabla 22.** Análisis de la varianza de los datos de concentración de flavonoides contenidos en las hojas de las variedades de morera.

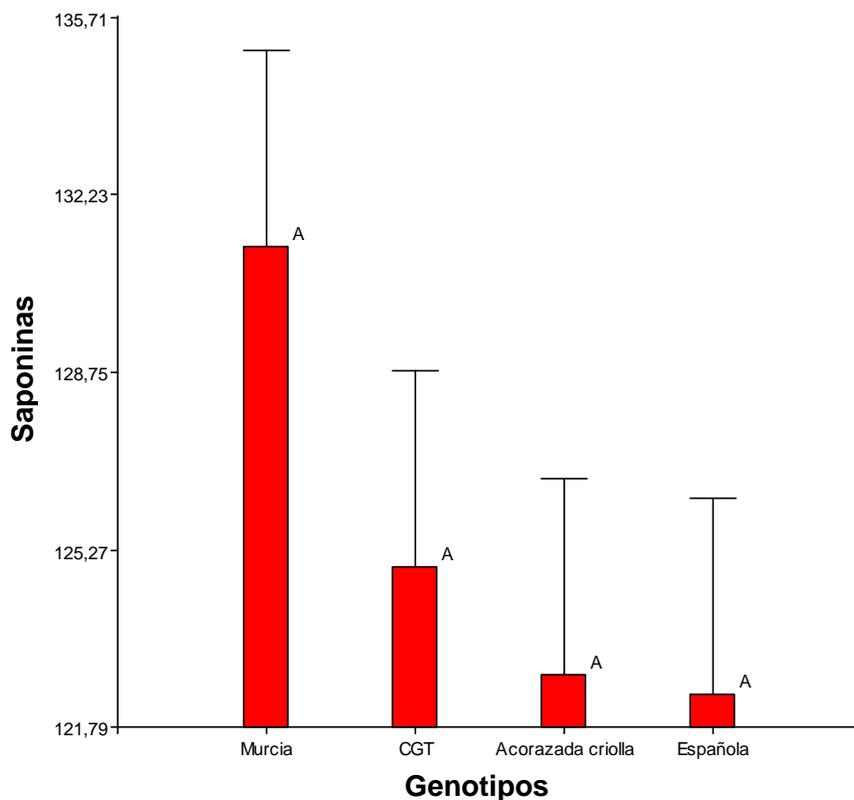
### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Saponinas	12	0,36	0,00	5,35

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	148,90	5	29,78	0,66	0,6665
Genotipos	148,48	3	49,49	1,10	0,4193
Repeticion	0,41	2	0,21	4,6E-03	0,9954
Error	270,10	6	45,02		
Total	419,00	11			

Figura 36. Gráfico de barras comparativo de las concentraciones de



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

Como se puede ver, las variedades presentaron una desviación estándar muy alta, dando como resultado que el programa concluyese que las cuatro variedades, a pesar de estar notablemente diferenciadas en concentración, no poseen diferencias significativas. Esto puede deberse principalmente a la adición del reactivo de color, el cual no pudo ser estandarizado, y resultó extremadamente sensible a los cambios de temperatura pues la preparación, al hacerse en frío, puede presentar una reactividad diferente si se realiza en agua fría, como fue este caso, lo que ocasiona que se obtuviese resultados tan variantes entre sí.

Posterior a la evaluación, se realizó el tratamiento de las muestras para obtener la cantidad de saponinas presentes en morera expresadas en mg/g de hoja seca. Los resultados fueron:

**Tabla 23.** Concentración de saponinas (mg/g) contenidos en las hojas de las variedades de morera.

Muestra	mg/g hoja	%CV
Acorazonada/criolla	25,7±0,7	2,9
Murcia	27±2	5,3
Española	25±1	5,0
CGT	26,0±0,9	3,6

Se observó que el orden decreciente de concentración de saponinas en las variedades de morera fue Mu>CGT>Acc>Es. La bibliografía muestra resultados de concentración alrededor de 11,57 mg/g de hoja seca en saponinas [25], valores menores a los resultados obtenidos para las variedades estudiadas. Trabajos sobre el género *Morus* indican que las saponinas representan cerca del 2,8% de la hoja [45], dato similar a los obtenidos (2,5-2,7%) para las variedades objeto de estudio.

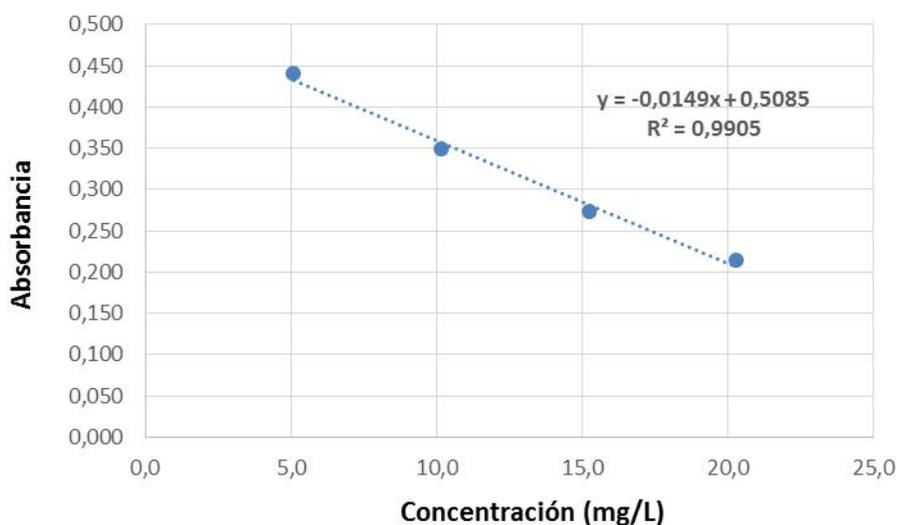
Vale la pena destacar que en investigaciones realizada por Bashir et. al., [46], no se encontraron saponinas en la variedad de *M. alba* estudiada. No hace mención de la variedad analizada, dado que su análisis fue comparativo con otras especies.

Finalmente, los resultados obtenidos en este estudio para la cuantificación de saponinas deben repetirse debido a los errores obtenidos en el análisis, por lo que no serán tomados en cuenta en los datos comparativos finales.

### 5.2.7. Actividad antirradical

La actividad antirradical se estimó por medio del método del DPPH descrito por Ozgen et al., (2010), donde se estiman los mg equivalentes de rutina por cada g de hoja seca relacionados directamente con el porcentaje de actividad antirradical de la morera. La curva de calibración se realiza por medio de la desaparición del color purpura del radical DPPH, y la rutina como patrón; con el aumento de antioxidantes desaparece el color morado característico del DPPH.

**Figura 37.** Curva de calibración externa de la actividad antioxidante de la rutina.



Analizando los resultados obtenidos el programa infostat arrojó los siguientes resultados para las muestras de morera analizadas.

**Tabla 24.** Análisis de la varianza de los datos de concentración equivalente de rutina.

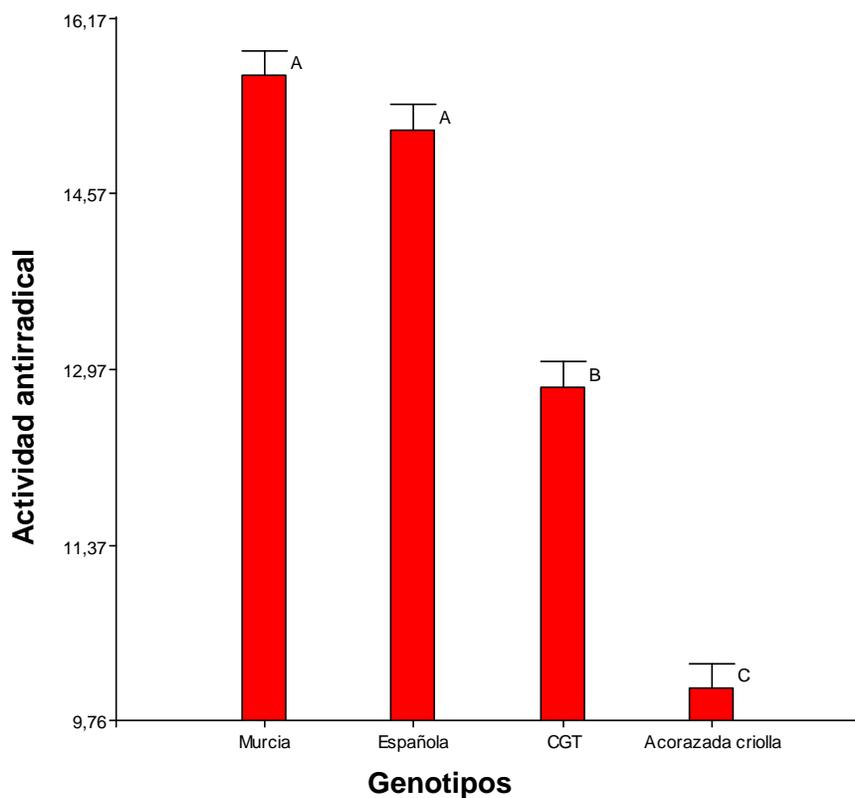
#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Actividad Antirradical	12	0,98	0,97	2,95

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	59,47	5	11,89	75,99	<0,0001
Genotipos	59,03	3	19,68	125,70	<0,0001
Repetición	0,44	2	0,22	1,41	0,3143
Error	0,94	6	0,16		
Total	60,41	11			

**Figura 38.** Gráfico de barras comparativo de las concentraciones equivalentes de nitro en las variedades de morera



En la gráfica se observa que entre las variedades Murcia y Española no existen diferencias significativas entre las concentraciones equivalentes de rutina, pero si son diferentes significativamente respecto a las variedades CGT y Acorazonada y Criolla. Del mismo modo estas últimas variedades son diferentes significativamente entre ellas.

Los resultados de la actividad antirradical asociada a mg equivalentes/g hoja seca de rutina para las cuatro variedades evaluadas se muestra en la tabla 25.

**Tabla 25.** Cantidad equivalente de rutina por g de hoja fresca de las variedades de morera

Muestra	Mg eq./g hoja	%CV
Acorazonada/criolla	2,9±0,2	5,8
Murcia	4,5±0,2	5,0
Española	4,47±0,03	0,8
CGT	3,7±0,1	3,0

Es posible determinar la relación en el cambio de la absorbancia de la muestra + DPPH en comparación a la absorbancia de una muestra control que solo contiene el radical DPPH. El resultado se expresa como porcentaje de actividad antirradical:

**Tabla 26.** Porcentaje de actividad antirradical en hojas de morera.

Muestra	% actividad antirradical	%CV
Acorazonada/criolla	29,1±1,5	5,1
Murcia	45,6±1,2	2,6
Española	44,1±0,6	1,4
CGT	37,2±1,4	3,8

La variedad con mayor porcentaje de actividad antirradical es Murcia, con un porcentaje de 45,6%. Estudios de evaluación de la actividad antirradical en el género *Morus* reportan valores 45,5% actividad antirradical en hojas [47]. De tal manera que es posible relacionar los datos obtenidos con el contenido de antioxidantes (relacionados con la actividad antirradical) en las cuatro variedades de morera estudiadas.

Se ha relacionado la actividad antirradical frente al difenilpicrilhidracilo con una posible actividad antioxidante [49]. Rodríguez et. al. Proponen que parte de la actividad antioxidante puede deberse a la presencia de metabolitos con un hidrogeno lábil, tales como los compuestos fenólicos.

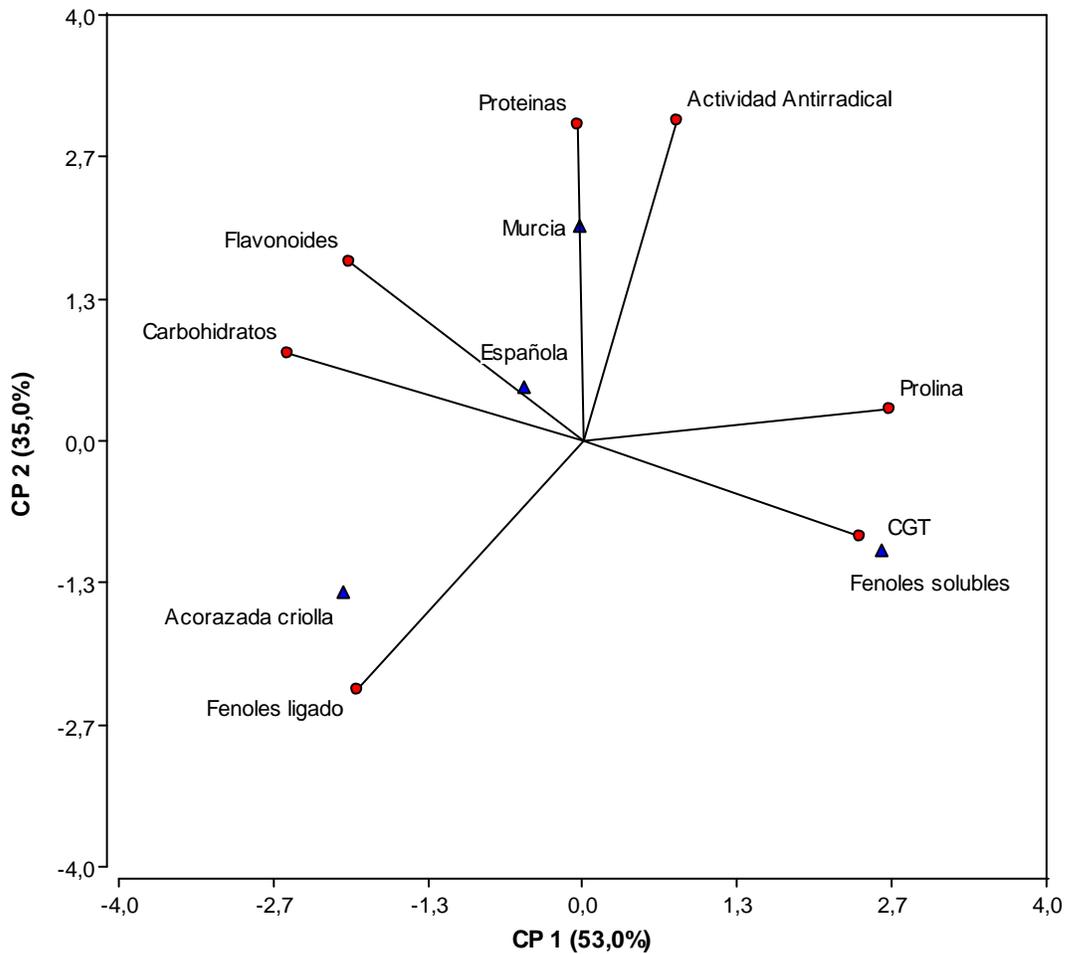
Por otro lado, en una gran variedad de estudios se relaciona la actividad antirradical con la actividad antioxidante [50]. Cao et. al. encontraron como los flavonoides, en presencia de radicales libres, muestran una determinada actividad antioxidante al interrumpir la reacción en cadena de los radicales libres. Adicionalmente, Huang et. al. muestran como a partir de la inhibición de la reacción en cadena de los radicales libres en su fase de propagación, se relaciona directamente con una actividad antioxidante [54]. Mencionan además como la actividad antioxidante no se puede explicar por un solo método, esto porque la capacidad antioxidante total está relacionada a diversos factores y diferentes agentes oxidantes presentes. Existen

antioxidantes de tipo enzimático y no enzimático, y estos a su vez se dividen en otros grupos que poseen capacidades antioxidantes por diferentes vías de reacción, entre incluida (en el grupo no enzimático) la capacidad de barrido de radicales libres (capacidad antirradical). Por ende estos resultados solamente se relacionan con una fracción de la actividad antioxidante total de la morera. Sin embargo, trabajos hechos por Solanilla <sup>[51]</sup>, expresan como valores de capacidad antirradical pueden verse afectados gracias a la presencia de interferencias como el caso de la clorofila, esto debido a la longitud de onda que absorbe (entre 400 y 700nm), y dado que el radical DPPH tiene una longitud de onda entre 515 y 528 nm, al hacer el estudio de la capacidad antirradical por medio del método DPPH, es posible que la interferencia por la presencia de clorofila afecte los resultados obtenidos en la capacidad total antirradical de los compuestos presentes en las variedades de *Morus*.

Díaz <sup>[52]</sup>, describe como la actividad antioxidante de la morera se debe no solo a compuestos de naturaleza no proteínica como los fenoles los cuales se encargan de eliminar las especies reactivas del oxígeno capturado por la planta en su proceso metabólico (radicales libres, es decir, actividad antirradical), sino también a enzimas las cuales degradan los agentes oxidantes de forma específica, como la peroxidasa y la superóxido dismutasa y que en esta especie la actividad antioxidante general de la planta se debe a la acción sinérgica de los compuestos antioxidantes contribuyentes, es decir, que el efecto antioxidante de estos en conjunto es superior a la suma de los efectos individuales, todo esto con el objeto de proteger a la planta de agentes que puedan de alguna manera degradar la integridad de la planta mediante procesos oxidativos.

### 5.3. Análisis de asociación del perfil de metabolitos entre las variedades Acorazonada y Criolla, Criolla/Guatemalteca/Tailandesa, Española y Murcia.

Figura 39. Gráfico de análisis multivariados de los metabolitos en las cuatro variedades de morera



Finalmente, mediante el programa infostat se realizó el análisis de la relación de las variedades de morera estudiadas con los metabolitos analizados, lo que permite observar la asociación que poseen las variedades a determinados metabolitos. Los triángulos azules representan las variedades y su disposición refleja la relación de estas variedades con determinados metabolitos, teniendo así lo siguiente: la

variedad Acorazonada y Criolla posee una fuerte asociación a los fenoles ligados a la pared celular, esto significa que esta variedad poseerá la mayor concentración de fenoles ligados a la pared celular por encima de las otras tres. Para la variedad CGT existe más asociación hacia la concentración de aminoácidos y fenoles solubles, siendo en específico, la asociación más cercana a los fenoles solubles.

Por otra parte, la variedad Murcia presenta asociación a las proteínas y actividad antirradical que las demás variedades, siendo esta la de mayor concentración y actividad en dos análisis diferentes. Como menciona Díaz <sup>[52]</sup>, la actividad antirradical no solo se debe a la presencia de fenoles, sino también a la acción enzimática que poseen las variedades, lo cual explica cómo esta variedad en particular tiene la tendencia asociada a la actividad antirradical a pesar de no tener una tendencia similar en la concentración de fenoles totales. La variedad Española fue la variedad más equilibrada, posicionándose en el centro de la gráfica, indicando que las cantidades de todos los metabolitos presentes en ella representan un valor medio en comparación a las demás variedades, teniendo además una ligera asociación a los flavonoides y carbohidratos.

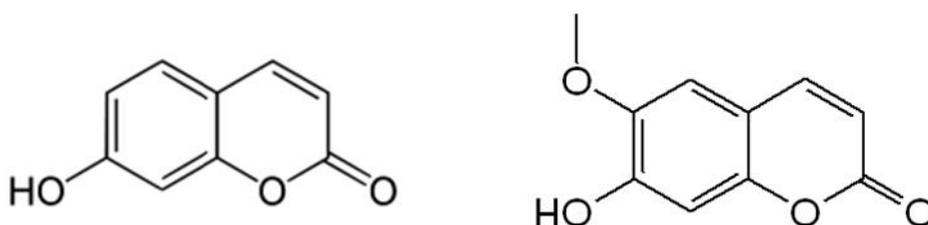
Esta gráfica también indica el porcentaje de confianza de los resultados, pues los ejes CP1 Y CP2 señalan valores de porcentajes que, sumados, revelan el porcentaje de confianza en que los resultados son precisos, que para este caso el porcentaje es de 86,2%.

Como punto final, en el uso de esta planta para fines de forraje o de alimento, se debe tomar en consideración como el estrés del entorno va a afectar las concentraciones de metabolitos para cada variedad y de las concentraciones intrínsecas de dichas variedades. Así pues, en el caso de tener que seleccionar una hoja idónea como forraje para alimento bovino se debe tomar en cuenta que se desea administrar con mayor urgencia al ganado, o si se desea una ingesta equilibrada de carbohidratos y aminoácidos esenciales se puede optar por las variedades Española y Murcia dada su concentración media en ambos casos, según los resultados obtenidos.

Por otro lado, si el destino de dicha planta es medicinal o de consumo humano, lo ideal sería controlar que la variedad con mayor concentración de fenoles totales (CGT o Acorazonada/Criolla) sufra periodos de estrés para aumentar sus valores normales y mejorar las propiedades antioxidantes de esta planta.

En lo relacionado a la importancia de la morera como especie, García y Ojeda <sup>[53]</sup> describen el especial interés que posee esta por su amplia diversidad de metabolitos secundarios con una potente actividad biológica, mencionando especialmente de entre los fenoles a las Cumarinas por sus características antinutricionales (obstaculizador de la absorción de nutrientes) en monogástricos (organismos con un solo estómago) y sus propiedades en la biomedicina, así como su actividad antiflogística por la umbeliferona y antidiabética gracias a la presencia de escopoletina y sus derivados glicosilados (figura 40). Como punto importante, estos investigadores hallaron que, contrariamente a la clásica tendencia de los fenoles en la mayoría de las especies vegetales, los fenoles (específicamente las Cumarinas) no sufren diferencias marcadas en valores de concentración dada la época (si es lluviosa o seca). Asimismo, la planta no posee diferencias marcadas en las concentraciones de este tipo de fenoles en diferentes zonas de ella.

**Figura 40.** Moléculas de Umbeliferona (izquierda) y Escopoletina (derecha).



Dada la naturaleza colerética y astringente de las saponinas, el estudio de este metabolito en morera es de especial interés en el área de propiedades para tratamiento de hígados grasos o sobrepeso.

Es de especial interés acotar que esta planta posee, como ya se habría mencionado, propiedades antibacterianas, diuréticas, antialérgicas debido a la

presencia de flavonoides como la rutina, quercetina, astragalina, quercetina 3,7-diglucósido, quercetina 3-glucósido y chalconoracina, por lo que es un grupo de metabolitos de especial interés para su uso como material forrajero o como planta medicinal.

En cuanto a la actividad antirradical y antioxidante de la morera, puede compararse esta con la manzana, siendo este un buen representante de las plantas con esta propiedad. Se tiene conocimiento que la manzana posee un valor de capacidad antioxidante entre 30 y 90% <sup>[48]</sup>, por lo cual, se puede decir que la hoja de morera posee una buena capacidad antioxidante.

## 6. CONCLUSIONES

La concentración de fenoles solubles y ligados a la pared celular en las variedades de morera analizadas posee diferencias significativas. Por otro lado, se determinó por cromatografía de capa fina la presencia de fenoles en las cuatro variedades, sin una caracterización detallada de los fenoles presentes. El mayor contenido de fenoles totales lo contiene la variedad CGT.

La concentración de carbohidratos varía significativamente según la variedad, a excepción de las variedades Murcia y Acorazonada y Criolla, las cuales presentan en etapas tempranas concentraciones similares de carbohidratos.

El contenido de aminoácidos varía significativamente con el tiempo de maduración de la planta, por lo cual se recomienda su análisis en relación al tiempo en que se recolecte la muestra, y su relación con la concentración de proteínas, las cuales se encuentran mayoritariamente en las hojas más que en los tallos, esto al evaluar dos datos reportados, uno con el contenido en hojas y tallos, y otro solo en hojas, y comparados con el contenido calculado en este trabajo de investigación.

Según la placa de determinación de aminoácidos y proteínas, el contenido mayor no es la L-prolina, a pesar de su presencia en las variedades de morera.

La determinación de flavonoides en las cuatro variedades de morera indicó una diferencia significativa entre las variedades CGT respecto a las otras tres.

Finalmente, la evaluación de la actividad antirradical indica que la morera posee cierto carácter antirradical de interés debido a su porcentaje cercano al 50% en algunas variedades, haciéndolo un importante recurso como antioxidante en presencia de radicales libres, al nivel de la manzana como un exponente importante de alimentos con esta propiedad tan marcada.

## 7. RECOMENDACIONES

El análisis de cuatro variedades de morera fue realizado con el objeto de dar un perfil general global de los principales metabolitos de interés. Este estudio preliminar podría ser utilizado en futuros trabajos de investigación que permitan el control de variables externas como temperatura de invernadero, humedad relativa, época de corte de hoja, tiempo de maduración, fertilizantes utilizados, horas de riego, entre otros.

Un estudio a fondo de la variación del contenido de carbohidratos en el tiempo de maduración de la planta es recomendado. Asimismo, se sugiere un análisis detallado de las proteínas, y un análisis detallado de los fenoles principales presentes en las variedades

Para la determinación de saponinas por medio del reactivo de Liebermann-Burchard se recomienda la preparación del reactivo en hielo más que los reactivos enfriados previamente. Las variaciones ligeras de temperatura alteran fuertemente la reactividad/estabilidad del agente y conduce a errores crasos en la determinación.

La determinación de la capacidad antioxidante se sugiere abarcar el tema en un trabajo de investigación dirigido completamente a este campo, para así poder determinar la capacidad total desde diversas áreas, tratando de englobar todas las capacidades de esta planta, distinto de como se explica en este trabajo que muestra una parte de esta capacidad que se relaciona con la capacidad de barrido de radicales libres.

Referente a la concentración de saponinas, el reactivo de color es un componente en extremo delicado el cual debe manejarse bajo condiciones estrictamente

controladas para su exitoso uso. Sin embargo se concluye que las variedades no poseen diferencias significativas en el contenido de saponinas por gramo de hojas secas.

Las condiciones de cultivo en el Instituto de Estudios Avanzados IDEA son los idóneos para obtener el máximo de concentración de flavonoides en la morera. El uso de este ambiente para futuras investigaciones sería lo más adecuado.

## 8. BIBLIOGRAFIA

[1] GARCÍA, D.; NODA, Y.; MEDINA, M.; MARTIN, G.; SOCA, M. **LA MORERA: UNA ALTERNATIVA VIABLE PARA LOS SISTEMAS DE ALIMENTACION ANIMAL EN EL TROPICO.** *Avances en Investigación Agropecuaria, enero-abril, año/vol. 10, numero 001.* Universidad de Colima, Colima, México 2006.

[2] MEDINA, M.; LAMELA, L.; GARCÍA, D. **SUPERVIVENCIA DE LA MORERA (*Morus alba*) EN UNA ASOCIACION SOMETIDA AL PASTOREO Y AL CORTE.** Estación Experimental De Pastos y Forrajes Indio Hatuey, Matanzas, Cuba.

[3] MEDINA, M.; GARCÍA, D.; MORATINOS, P.; COVA, L. **LA MORERA (*Morus spp.*) COMO RECURSO FORRAJERO: AVANCES Y CONSIDERACIONES DE INVESTIGACION.** Instituto Nacional De Investigaciones Agrícolas (INIA) del estado Trujillo. Pamparito, Trujillo, Venezuela. 2009.

[4] GARCÍA, D.; NODA, Y.; MEDINA, M.; MARTIN, G.; SOCA, M. **LA MORERA: UNA ALTERNATIVA VIABLE PARA LOS SISTEMAS DE ALIMENTACION ANIMAL EN EL TROPICO.** *Avances en Investigación Agropecuaria, enero-abril, año/vol. 10, numero 001.* Universidad de Colima, Colima, México 2006.

[5] DÍAZ, M.; GARCÍA, D. **USOS MEDICINALES DE LA MORERA.** Estación Experimental De Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”, Matanzas, Cuba.

[6] **ESTUDIO DE MERCADO: SEDA CRUDA SIN TORCER.** Intercambio mundial 2008, registro mundial de intercambio. Estudio y seguimiento de los mercados de

exportación.

[http://www.smartexport.com/es/Seda\\_cruda\\_sin\\_torcer.500200.html#pageProduitEchange\\_titre](http://www.smartexport.com/es/Seda_cruda_sin_torcer.500200.html#pageProduitEchange_titre)

[7] CRUZ, C. **CULTIVO DE LA MORERA**. Manual N° 14-93. Instituto Nacional de Investigación Agraria. Dirección General de Investigación Agraria. Lima, Perú 1993.

[8] HYVÄRINEN, A. **LA SEDA EN EL MERCADO MUNDIAL**. *Fórum de comercio internacional*. <http://www.forumdecomercio.org/La-seda-en-el-mercado-mundial/>.

[9] ARFAN, M.; KHAN, R.; RYBARCZYK, A.; AMAROWICZ, R. **ANTIOXIDANT ACTIVITY OF MULBERRY FRUIT EXTRACTS**. *International Journal of Molecular Sciences Vols. 9 to 14; 2008 to 2013*. Volume 13(2); 2012, article PMC3292034. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). 2012.

[10] MEDINA, M.; GARCÍA, D.; MORATINOS, P.; COVA, L. **LA MORERA (MORUS SPP.) COMO RECURSO FORRAJERO: AVANCES Y CONSIDERACIONES DE INVESTIGACION**. Instituto Nacional De Investigaciones Agrícolas (INIA) del estado Trujillo. Pamparito, Trujillo, Venezuela. 2009.

[11] GARCÉS M. **VENESEDA: UNICA EMPRESA DEL PAIS DEDICADA A LA PRODUCCION DE HILOS DE SEDA**. Sector La Pedregosa Alta, ciudad de Mérida. Diario Los Andes. Venezuela, noviembre 10, 2007.

[12] ESPINOZA, P.; FRANCISCO, L. **METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS**. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Católica Agropecuaria del Tropicó Seco, departamento de Estelí, Nicaragua. 2012.

[13] Empresa AGRARES Iberia SL. **AMINOACIDOS AGRARES 7%**. <http://www.agrares.com/es/aminoacidos-uso-agricola/aminoacidos-de-hidrolisis-enzimatica/Aminoacidos%20agrare%207%20hidrolisis%20enzimatica.pdf>. Madrid, España.

[14] FRANCO, J. **AMINOACIDOS**. Dpto. Producción Agraria. Área Producción Vegetal ETSIA. Universidad Politécnica de Cartagena, Colombia. 1994.

[15] **INHIBITORS OF AROMATIC AMINO ACID BIOSYNTHESIS**. Plant & Soil Sciences Elibrary  
<http://passel.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=959117477&topicorder=2&maxto=7>.

[16] MELLER, Y. **PROTEINAS QUE DEFIENDEN A LAS PLANTAS**. Ciencias genómicas, mundo científico No. 147 Vol. 14 Pag 582-583. 1994

[17] **LAS PROTEINAS: DEFINICION Y CARACTERISTICAS DE LAS PROTEINAS.FUNCIONES. PRESENCIA EN LA NATURALEZA. METODOS DE EXTRACCION Y AISLAMIENTO**. Temas de farmacognosia – Plantas medicinales. <http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/proteinas/>

[18] MARCANO, D. HASSEGAWA. M. **FITOQUÍMICA ORGÁNICA**. Universidad Central de Venezuela, Concejo de Desarrollo científico y Humanístico, Caracas, Venezuela. 1991.

[19] GARCIA, D. **LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS ESPECIES VEGETALES**. Pastos y forrajes, Vol. 21, N° 1, 2004. Estación Experimental De Pastos Y Forrajes “Indio Hatuey”, Central España Republicana, CP 44280, matanzas, cuba.

[20] GARCIA, D. **EFFECTO DE LOS PRINCIPALES FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICION FITOQUIMICA DE *Morus alba* (Linn.)**. Estación Experimental De Pastos Y Forrajes “Indio Hatuey”. Universidad de Matanzas “camino Cienfuegos”, matanzas, cuba. 2003.

[21] MARCANO, D. HASSEGAWA. M. **FITOQUÍMICA ORGÁNICA**. Universidad Central de Venezuela, Concejo de Desarrollo científico y Humanístico, Caracas, Venezuela. 1991.

[22] GARCIA, D.; MEDINA, M.; OJEDA, F. **EFFECTO DE LOS NIVELES DE FERTILIZACIÓN, LA VARIEDAD Y LA ÉPOCA EN LOS CONTENIDOS DE SAPONINAS ESTEROIDALES EN MORERA (*MORUS ALBA* L.)**. *Avances en Investigación Agropecuaria*, mayo-agosto, año/vol9, número 002. Universidad de Colima, Colima, México. 2005.

[23] QUINTERO, D. **EVALUACION DE COMPUESTOS FENOLICOS, LIGNINAS, AMINOÁCIDOS Y CARBOHIDRATOS EN *Theobroma cacao* L. PROCEDENTES**

**DE TRES AMBIENTES DISTINTOS: BOSQUE HÚMEDO TROPICAL, BOSQUE SEMI-HÚMEDO TROPICAL Y BOSQUE SECO.** Escuela de química, facultad de ciencias, universidad central de Venezuela. Caracas. Abril 2012.

[24] GARCIA, D., SOCA, M.; MEDINA, M. **ACCION ANTIHELMINTICA DE MORERA EN LA VIABILIDAD DE LARVAS INFESNTANTES DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES.** Pastos y forrajes, Vol. 28, N° 4, 2005.

[25] GARCIA, D.; MEDINA, M.; OJEDA, F. **EFFECTO DE LOS NIVELES DE FERTILIZACIÓN, LA VARIEDAD Y LA ÉPOCA EN LOS CONTENIDOS DE SAPONINAS ESTEROIDALES EN MORERA (MORUS ALBA L.).** *Avances en Investigación Agropecuaria*, mayo-agosto, año/vol9, número 002. Universidad de Colima, Colima, México. 2005.

[26] QUINTERO, D. **EVALUACION DE COMPUESTOS FENOLICOS, LIGNINAS, AMINOÁCIDOS Y CARBOHIDRATOS EN Theobroma cacao L. PROCEDENTES DE TRES AMBIENTES DISTINTOS: BOSQUE HÚMEDO TROPICAL, BOSQUE SEMI-HÚMEDO TROPICAL Y BOSQUE SECO.** Escuela de química, facultad de ciencias, universidad central de Venezuela. Caracas. Abril 2012.

[27] GARCIA, D., SOCA, M.; MEDINA, M. **ACCION ANTIHELMINTICA DE MORERA EN LA VIABILIDAD DE LARVAS INFESNTANTES DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES.** Pastos y forrajes, Vol. 28, N° 4, 2005.

[28] NAVA, G.; ALEJANDRO, M. **CUANTIFICACION DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES EN EXTRACTOS NATURALES**. Universidad autónoma de Querétaro. 2007.

[29] GARCIA, D.; OJEDA, F. **EVALUACIÓN DE LOS PRINCIPALES FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA DE MORUS ALBA (LINN.). III. FLAVONOIDES TOTALES**. Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey” Central España Republicana, Matanzas, Cuba, 2004.

[30] GARCIA, D.; MEDINA, M.; OJEDA, F. **CARBOHIDRATOS SOLUBLES EN CUATRO VARIEDADES DE MORERA (*Morus alba linn.*)**. Pastos y forrajes, vol. 28 N° 3, julio-septiembre, 2005, pp. 233-239. Estación experimental de pastos y forrajes “Indio Hatuey”, matanzas, cuba.

[31] RADOJKOVIC M, ET AL. **DETERMINATION OF OPTIMAL EXTRACTION PARAMETERS OF MULBERRY LEAVES USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY (RSM)**. Romanian Biotechnological Letters. Vol. 17, No. 3, 2012. University of Bucharest. Romania. 2010.

[32] DÍAZ, M.; PÉREZ, Y.; CAZAÑA, Y.; PRIETO, M.; WENCOMO, H.; LUGO, Y. **DETERMINACION DE ANTIOXIDANTES ENZIMATICOS EN VARIEDADES E HIBRIDOS DE MORUS ALBA**. Estación Experimental “Indio Hatuey”. Central España Republicana, Matanzas, Cuba.

[33] RADOJKOVIC M, ET AL. **FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY AND TOTAL PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENTS OF MULBERRY (MORUS SPP. L., MORACEAE) EXTRACTS**. Hem. Ind. 66 (4). 547-552. 2012

[34] REDDY, V.; UROOJ, A. **PROXIMATE, PHYTOCHEMICAL PROFILE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY (IN VITRO AND EX VIVO) OF MORUS INDICA VARIETIES**. IJPSR. Volume 4, Issue 4. Department of Studies in Food Science and Nutrition, University of Mysore, Mysore 570006, India.

[35] MONJE C. YARKO, RAFFAILLAC J. **DETERMINACIÓN DE SAPONINA TOTAL EN QUINUA (Chenopodium quinua Willd) MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO**. Barrientos, E., et.al. (eds.) 2006. Memoria IV Congreso Nacional de la Asociación Boliviana de Protección Vegetal. Oruro, 5 al 7 de abril de 2006. C.E.A.C. – Dpto. Fitotecnia-FCAPV-UTO. ABPV. Oruro, Bolivia. 217 P. 2006.

[36] GARCIA, D.; MEDINA, M.; OJEDA, F. **EFFECTO DE LOS NIVELES DE FERTILIZACION, LA VARIEDAD Y LA EPOCA EN LOS CONTENIDOS DE SAPONINAS ESTEROIDALES EN MORERA (Morus alba LINN.)**. MORERA, un nuevo forraje para la alimentación del ganado. Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey”. Matanzas, Cuba. 2011.

[37] JIMENEZ, P.; GRBES, T. **METODO DEL RADICAL DPPH. 2,2-DIFENIL –1-PICRYLHYDRAZYL. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS DE MANZANA, BRÓCOLI Y ALCACHOFA**. Prácticas de Fundamentos de Alimentación y Nutrición. Grado de Nutrición Humana y Dietética.

Curso 2012-2013. Nutrición y bromatología; Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid. 2013.

[38] RIENZO, ET AL. **INFOSTAT VERSIÓN 2013**. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>.

[39] OJEDA, H. **LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA UVA**. Revista Enología N°4. Año IV. Septiembre-October 2007. Argentina.

[40] GARCÍA, D.; OJEDA, F. **EVALUACIÓN DE LOS PRINCIPALES FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA DE MORUS ALBA (LINN.). II. POLIFENOLES TOTALES**. Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey” Central España Republicana, Matanzas, Cuba, 2004.

[41] PÉREZ-PÉREZ, E. **DETERMINACION DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES EN HOJAS DE GUAYABO (Psidium guajava L.)**. Centro Socialista de Investigación y Desarrollo Frutícola (CESID-frutícola y avícola) de CORPOZULIA. Venezuela. 2013.

[42] YAMASHITA, T. **VARIATIONS IN AMOUNTS OF CARBOHYDRATES, AMINOACIDS AND ADENINE NUCLEOTIDES IN MULBERRY TREE (Morus alba L.) STEMS DURING TRANSITIONAL PHASES OF GROWTH**. National Institute of Sericultural and Entomological Science. Tsukuba, Ibaraki, 305. Japan. 1988. Published by Tree Physiology 6, p. 191-200.

[43] MATEI, A. et. al. **CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF THE LEAF PROTEIN VALUE IN DIFFERENT MULBERRY VARIETIES**. Archiva Zootechnica vol. 9, 2006.

[44] **USO DE LA MORERA PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL**. Centro de Recursos para la Transferencia Tecnológica ITACAB. Ficha Tecnológica categoría ITACAB 112. Costa Rica. [www.itacab.org/adminpub/web/index.php?mod=ficha&ficha\\_id=211](http://www.itacab.org/adminpub/web/index.php?mod=ficha&ficha_id=211)

[45] ANANTH, D. **NUTRITIONAL UPGRADATION OF RICE STRAW THROUGH RUMEN FERMENTATION MANIPULATION**. Department Of Animal Nutrition Veterinary College, Bangalore Karnataka Veterinary, Animal And Fisheries Sciences University, Bidar 2007.

[46] BASHIR, U.; IQBAL, J.; JAVAID, A. **CHEMICAL COMPOSITION, MINERAL PROFILE AND *IN SITU* DIGESTION KINETICS OF FODDER LEAVES OF SOUR NATIVE TREES**. Pakistan Journal of Botany. Pak. J. Bot., 43(1): 397-404, 2011.

[47] YILIT, D. et al. **ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF BLACK MULBERRY (*Morus nigra*)**. EÜFBED: Diario del Instituto de Ciencia y Tecnología. Volumen-Edición: 1-2. Turquía. 2008.

[48] SAVATOVIĆ, S. et al. **ANTIOXIDANT ACTIVITY OF POLYPHENOL-ENRICHED APPLE JUICE**. University of Novi Sad, Faculty of Technology, Serbia. 2009.

[49] RODRÍGUEZ, M.; HASEGAWA, M.; GONZÁLEZ-MÚJICA, F.; MOTTA, N.; CASTILLO, A.; CASTILLO, J.; ZEA, E.; MORA, K.; SOUSA, L.; GONZÁLEZ, A.; CAMEJO, D.;. **ANTIDIABETIC AND ANTIRADICAL ACTIVITIES OF PLANTS**

**FROM VENEZUELAN AMAZON.** Revista Brasileira de Farmacognosia. 18(3): 331-338. Jul./Set 2008.

[50] CAO, G.; SOFIC, E.; L. PRIOR, R. **ANTIOXIDANT AND PROOXIDANT BEHAVIOR OF FLAVONOIDS: STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS.** Free Radican Biology & Medicine, Vol 22, No. 5, pp. 749-760, 1997.

[51] SOLANILLA, J.; LOMBO, O.; MURILLO, E.; MENDEZ, J. **VALORACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE *Mollinedia Racemosa* (ROMADIZO).** Revista Cubana Plant Med v.16 n.2. Ciudad de La Habana abr.-jun. 2011. Cuba.

[52] DÍAZ, M.; PÉREZ, Y.; CAZAÑA, Y.; PRIETO, M.; WENCOMO, H.; LUGO, Y. **DETERMINACION DE ANTIOXIDANTES ENZIMATICOS EN VARIEDADES E HIBRIDOS DE *Morus alba*.** Pastos y Forrajes. Vol. 33, No. 3. 2010.

[53] GARCÍA, D.; OJEDA, F. **EVALUACIÓN DE LOS PRINCIPALES FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA DE MORUS ALBA (LINN.). IV. CUMARINAS TOTALES.** Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey" Central España Republicana, Matanzas, Cuba, 2004.

[54] HUANG, D.; OU, B.; L. PRIOR, R. **THE CHEMISTRY BEHIND ANTIOXIDANT CAPACITY ASSAYS.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 53, pp. 1841-1856. 2005.

## 9. ANEXOS

**Tabla 27.** Valores para la fabricación de la curva de calibración de fenoles totales a partir de ácido clorogénico como patrón.

<b>patrón (ppm)</b>	<b>Absorbancia</b>
100	0,735
50	0,343
20	0,186
10	0,084

**Tabla 28.** Valores para la fabricación de la curva de calibración de carbohidratos a partir de glucosa como patrón.

<b>patrón (ppm)</b>	<b>Absorbancia</b>
50,000	0,643
25,000	0,328
12,500	0,247
6,250	0,162
3,125	0,125

**Tabla 29.** Valores para la fabricación de la curva de calibración de aminoácidos a partir de L-prolina como patrón.

patrón (ppm)	Absorbancia
30	1,042
15	0,456
10	0,346
5	0,108

**Tabla 30.** Valores para la fabricación de la curva de calibración de proteínas a partir de albumina como patrón.

patrón (ppm)	Absorbancia
3,93	0,810
19,67	1,068
39,33	1,190
59,00	1,352

**Tabla 31.** Valores para la fabricación de la curva de calibración de flavonoides a partir de rutina como patrón.

patrón (ppm)	Absorbancia
60,42	1,781
20,14	1,179
10,07	0,963
4,834	0,810

**Tabla 32.** Valores para la fabricación de la curva de calibración de saponinas a partir de diosgenina como patrón.

patrón (ppm)	Absorbancia
331,00	0,509
271,42	0,392
198,60	0,306
148,95	0,269
101,40	0,193

**Tabla 33.** Valores para la fabricación de la curva de calibración de actividad antirradical a partir de rutina como patrón.

patrón (ppm)	Absorbancia
20,3	0,215
15,2	0,273
10,2	0,350
5,1	0,441

Formula algebraica utilizada en la determinación de concentraciones a partir de la absorbancia a partir de la ecuación de la recta de cada curva de calibración:

$$y = mx + b$$

$$X = \frac{y - b}{m}$$

**Fenoles  
ligados**

$$y = 0,0071x + 0,0197$$

**Tabla 34.** Tratamiento de datos de absorbancia de las réplicas de variedades de morera para el análisis de fenoles ligados.

Muestra	Absorbancia	concentración (ppm)	muestra (mg)	hoja (g)	fenoles/g hoja	promedio		CV
ACC1	0,674	92,155	8,61649	0,1014	84,97521	84	2	2,1
ACC2	0,670	91,592	8,56381	0,1016	84,28947			
ACC3	0,653	89,197	8,33994	0,1022	81,60408			
MU1	0,481	64,972	6,07487	0,0974	62,37029	60	2	3,5
MU2	0,490	66,239	6,19339	0,1064	58,20853			
MU3	0,488	65,958	6,16705	0,1019	60,52060			
ER1	0,577	78,493	7,33909	0,1003	73,17140	72	2	2,9
ER2	0,575	78,211	7,31275	0,1014	72,11788			
ER3	0,570	77,507	7,24691	0,1047	69,21594			
CGT1	0,522	70,746	6,61480	0,1028	64,34626	65	1	2,0
CGT2	0,521	70,606	6,60163	0,1032	63,96925			
CGT3	0,526	71,310	6,66747	0,1005	66,34300			

**Tabla 35.** Tratamiento de datos de absorbancia de las réplicas de variedades de morera para el análisis de fenoles solubles.

Fenoles solubles		$y = 0,0071x + 0,0197$						
Muestra	Absorbancia	concentración (ppm)	peso muestra (mg)	masa hoja (g)	mg fenoles/g hoja	promedio		CV
ACC1	0,163	20,183	1,88712	0,1014	18,61065	17,9	0,6	3,4
ACC2	0,154	18,915	1,76860	0,1016	17,40747			
ACC3	0,158	19,479	1,82127	0,1022	17,82069			
MU1	0,180	22,577	2,11099	0,0974	21,67344	21	1	6,3
MU2	0,205	26,099	2,44022	0,1064	22,93438			
MU3	0,176	22,014	2,05832	0,1019	20,19938			
ER1	0,312	41,169	3,84930	0,1003	38,37789	37	2	5,6
ER2	0,310	40,887	3,82296	0,1014	37,70182			
ER3	0,294	38,634	3,61226	0,1047	34,50106			
CGT1	0,439	59,056	5,52177	0,1028	53,71369	53	1	2,2
CGT2	0,442	59,479	5,56127	0,1032	53,88832			
CGT3	0,415	55,676	5,20571	0,1005	51,79812			

**Tabla 36.** Tratamiento de datos de fenoles solubles y fenoles ligados para el cálculo de fenoles totales en las variedades de morera.

<b>fenoles totales</b>								
<b>muestra</b>	<b>solubles (mg)</b>	<b>ligados a la pared (mg)</b>	<b>total (mg)</b>	<b>masa hoja (g)</b>	<b>mg fenoles/g hoja</b>	<b>promedio</b>		<b>CV</b>
ACC1	9,29269	1,58648	10,87918	0,1014	107,28972	105	2	2,2
ACC2	9,23237	1,45076	10,68313	0,1016	105,14891			
ACC3	8,97600	1,51108	10,48708	0,1022	102,61331			
MU1	6,38213	1,84285	8,22498	0,0974	84,44542	83	2	2,0
MU2	6,51785	2,21987	8,73773	0,1064	82,12148			
MU3	6,48769	1,78253	8,27023	0,1019	81,16021			
ER1	7,82987	3,83350	11,66337	0,1003	116,28486	113	4	4,0
ER2	7,79971	3,80334	11,60305	0,1014	114,42849			
ER3	7,72431	3,56205	11,28635	0,1047	107,79709			
CGT1	7,00044	6,54802	13,54845	0,1028	131,79428	128	4	3,2
CGT2	6,98535	5,79398	12,77934	0,1032	123,83080			
CGT3	7,06076	5,91463	12,97539	0,1005	129,10833			

**Tabla 37.** Tratamiento de datos de absorbancia de las réplicas de variedades de morera para el análisis de carbohidratos.

Carbohidratos		$y = 0,0108x + 0,0919$						
Muestra	Absorbancia	concentración (ppm)	masa (mg)	masa hoja (g)	mg carbohidratos/g hoja	promedio		CV
ACC1	0,269	16,398	187,40741	1,0213	183,49888	180	4	2,4
ACC2	0,258	15,380	175,76720	1,0017	175,47065			
ACC3	0,268	16,306	186,34921	1,0235	182,07055			
MU1	0,243	13,991	179,08148	1,0504	170,49534	178	7	4,1
MU2	0,252	14,824	189,74815	1,0266	184,83163			
MU3	0,248	14,454	185,00741	1,0289	179,81087			
ER1	0,275	16,954	54,25185	1,0019	54,14735	52	4	6,8
ER2	0,254	15,009	48,02963	1,0023	47,91941			
ER3	0,275	16,954	54,25185	1,0055	53,95510			
CGT1	0,197	9,731	31,14074	1,0298	30,23960	30,3	0,2	0,6
CGT2	0,197	9,731	31,14074	1,0335	30,13134			
CGT3	0,195	9,546	30,54815	1,0018	30,49387			

**Tabla 38.** Tratamiento de datos de absorbancia de las réplicas de variedades de morera para el análisis de aminoácidos.

Aminoácidos		$y = 0,0366x - 0,0614$						
Muestra	Absorbancia	concentración (ppm)	masa (mg)	masa hoja (g)	mg aminoácidos/g hoja	promedio		CV
ACC1	0,350	11,240	0,56202	1,0213	0,55030	0,54	0,03	4,8
ACC2	0,314	10,257	0,51284	1,0017	0,51198			
ACC3	0,359	11,486	0,57432	1,0235	0,56113			
MU1	0,547	16,623	0,83115	1,0504	0,79130	0,74	0,04	5,6
MU2	0,477	14,710	0,73552	1,0266	0,71646			
MU3	0,482	14,847	0,74235	1,0289	0,72150			
ER1	0,532	16,213	0,81066	1,0019	0,80909	0,80	0,01	1,7
ER2	0,514	15,721	0,78607	1,0023	0,78426			
ER3	0,532	16,213	0,81066	1,0055	0,80622			
CGT1	0,662	19,765	0,98825	1,0298	0,95965	0,99	0,05	4,9
CGT2	0,731	21,650	1,08251	1,0335	1,04742			
CGT3	0,648	19,383	0,96913	1,0018	0,96740			

**Tabla 39.** Tratamiento de datos de absorbancia de las réplicas de variedades de morera para el análisis de proteínas.

Proteínas		$y = 0,0094x + 0,8198$						
Muestra	Absorbancia	concentración (ppm)	masa (mg)	masa hoja (g)	mg proteína/g hoja	promedio		CV
ACC1	1,183	38,638	0,15455	0,1070	144,44224	137	10	7,3
ACC2	1,170	37,255	0,14902	0,1054	141,38641			
ACC3	1,122	32,149	0,12860	0,1023	125,70454			
MU1	1,301	51,191	0,20477	0,1053	194,45960	194	4	2,0
MU2	1,307	51,830	0,20732	0,1050	197,44681			
MU3	1,278	48,745	0,19498	0,1027	189,85270			
ER1	1,176	37,894	0,15157	0,1082	140,08731	142	2	1,7
ER2	1,153	35,447	0,14179	0,1010	140,38340			
ER3	1,177	38,000	0,15200	0,1053	144,34948			
CGT1	1,168	37,043	0,14817	0,1015	145,98051	141	9	6,4
CGT2	1,180	38,319	0,15328	0,1045	146,67617			
CGT3	1,129	32,894	0,13157	0,1007	130,65985			

**Tabla 40.** Tratamiento de datos de absorbancia de las réplicas de variedades de morera para el análisis de flavonoides.

Flavonoides		$y = 0,0168x + 0,7817$						
Muestra	Absorbancia	concentración (ppm)	masa (mg)	masa hoja (g)	mg flavonoides /g hoja	promedio		CV
ACC1	0,821	2,339	1,31000	0,10037	13,05171	14,03	0,86	6,1
ACC2	0,825	2,577	1,44333	0,10060	14,34725			
ACC3	0,826	2,637	1,47667	0,10060	14,67860			
MU1	0,827	2,696	1,51000	0,10128	14,90916	14,35	0,59	4,1
MU2	0,823	2,458	1,37667	0,10019	13,74056			
MU3	0,825	2,577	1,44333	0,10021	14,40309			
ER1	0,831	2,935	1,64333	0,10063	16,33045	15,59	0,80	5,1
ER2	0,826	2,637	1,47667	0,10014	14,74602			
ER3	0,829	2,815	1,57667	0,10043	15,69916			
CGT1	0,815	1,982	1,11000	0,10074	11,01846	11,41	0,44	3,9
CGT2	0,816	2,042	1,14333	0,10100	11,32013			
CGT3	0,818	2,161	1,21000	0,10173	11,89423			

**Tabla 41.** Tratamiento de datos de absorbancia de las réplicas de variedades de morera para el análisis de saponinas.

Saponinas		$y = 0,0013x + 0,0601$						
Muestra	Absorbancia	concentración (ppm)	masa (mg)	masa hoja (g)	mg saponinas/ g hoja	promedio		CV
ACC1	0,218	121,46154	2,55069	0,10066	25,33968	25,7	0,7	2,9
ACC2	0,225	126,46154	2,65569	0,10007	26,53835			
ACC3	0,217	120,50000	2,53050	0,10049	25,18161			
MU1	0,221	123,76923	2,59915	0,10037	25,89572	27,4	1,5	5,3
MU2	0,240	138,38462	2,90608	0,10085	28,81583			
MU3	0,231	131,46154	2,76069	0,10071	27,41230			
ER1	0,229	129,92308	2,72838	0,10152	26,87534	25,4	1,3	5,0
ER2	0,212	116,65385	2,44973	0,10040	24,39971			
ER3	0,217	120,69231	2,53454	0,10117	25,05227			
CGT1	0,226	127,23077	2,67185	0,10070	26,53273	26,0	0,9	3,6
CGT2	0,215	119,15385	2,50223	0,10043	24,91517			
CGT3	0,227	128,38462	2,69608	0,10166	26,52053			

**Tabla 42.** Tratamiento de datos de absorbancia de las réplicas de variedades de morera para el análisis de la actividad antirradical como mg equivalentes.

Actividad antirradical		$y = -0,0149x + 0,5085$						
Muestra	Absorbancia	concentración (ppm)	masa equivalente (mg)	masa hoja (g)	mg eq./g hoja	promedio		CV
ACC1	0,359	10,034	3,010	1,07420	2,80215	2,9	0,2	5,8
ACC2	0,366	9,564	2,869	1,04862	2,73610			
ACC3	0,351	10,570	3,171	1,03930	3,05123			
MU1	0,276	15,604	4,681	1,01189	4,62620	4,5	0,2	5,0
MU2	0,281	15,268	4,581	1,07007	4,28060			
MU3	0,269	16,074	4,822	1,02366	4,71069			
ER1	0,285	15,000	4,500	1,01370	4,43918	4,47	0,03	0,8
ER2	0,284	15,067	4,520	1,01243	4,46464			
ER3	0,279	15,403	4,621	1,02526	4,50696			
CGT1	0,310	13,322	3,997	1,03519	3,86078	3,7	0,1	3,0
CGT2	0,319	12,718	3,815	1,02085	3,73751			
CGT3	0,324	12,383	3,715	1,02070	3,63943			

**Tabla 43.** Tratamiento de datos de absorbancia de las réplicas de variedades de morera para el análisis de la actividad antirradical como %de actividad.

Actividad antirradical	$y = -0,0149x + 0,5085$					
Muestra	Absorbancia	Abs blanco - Abs muestra	% actividad antirradical	promedio		CV
ACC1	0,359	0,147	29,051	29,1	1,5	5,1
ACC2	0,366	0,140	27,668			
ACC3	0,351	0,155	30,632			
MU1	0,276	0,230	45,455	45,6	1,2	2,6
MU2	0,281	0,225	44,466			
MU3	0,269	0,237	46,838			
ER1	0,285	0,221	43,676	44,1	0,6	1,4
ER2	0,284	0,222	43,874			
ER3	0,279	0,227	44,862			
CGT1	0,310	0,196	38,735	37,2	1,4	3,8
CGT2	0,319	0,187	36,957			
CGT3	0,324	0,182	35,968			
blanco	0,506					