



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE
MANGO (*Mangifera indica* L.) CV. 'ATAULFO' COMO
INHIBIDORES DE LA LIPASA PANCREÁTICA Y SU
MECANISMO DE INHIBICIÓN**

Por:

Elena Nohelí Moreno Córdova

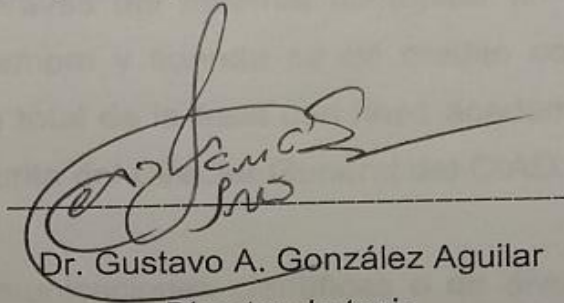
TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

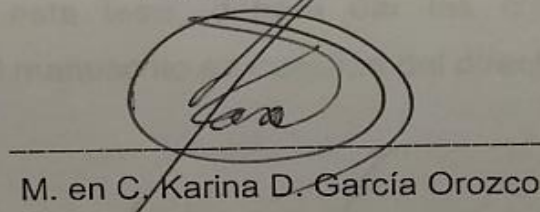
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Elena Nohelí Moreno Córdova, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



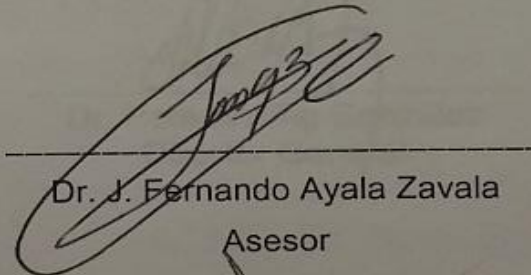
Dr. Gustavo A. González Aguilar

Director de tesis



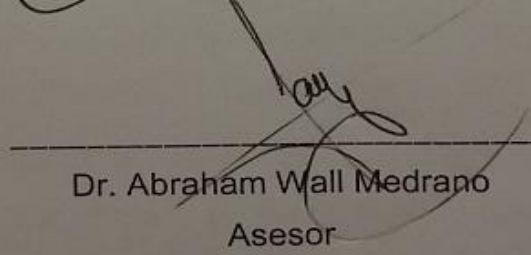
M. en C. Karina D. García Orozco

Asesora



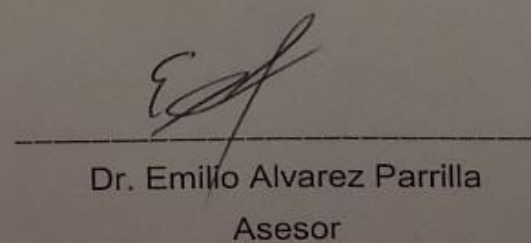
Dr. J. Fernando Ayala Zavala

Asesor



Dr. Abraham Wall Medrano

Asesor



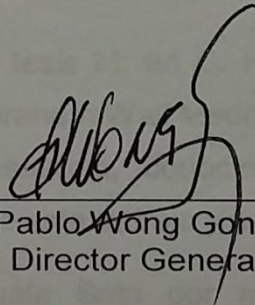
Dr. Emilio Alvarez Parrilla

Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por la beca otorgada para los estudios de Maestría en Ciencias.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.) y a la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV), por el apoyo brindado en la infraestructura y asesoría académica.

A CONACYT, por el proyecto 179574CB2012-01, que hizo posible la realización de este trabajo.

A mi Director de Tesis Dr. Gustavo A. González Aguilar, por abrirme las puertas de su laboratorio y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por su confianza, paciencia, apoyo, enseñanzas y aportaciones a mi formación académica y personal.

A mis asesores de comité de tesis M. en C. Karina D. García Orozco, Dr. J. Fernando Ayala Zavala, Dr. Abraham Wall Medrano y Dr. Emilio Alvarez Parrilla, por su apoyo académico, asesoría, conocimiento impartido, dedicación y paciencia para la realización de este trabajo y mi formación profesional.

A la Dra. Elisa M. Valenzuela Soto por su asesoría, apoyo, paciencia, conocimiento y experiencia compartida en el área de bioquímica de enzimas, así como por su valiosa colaboración en la planeación, realización y análisis de las cinéticas enzimáticas y estudios de fluorescencia.

Al Dr. Aldo A. Arvizu Flores por su apoyo, asesoría, y conocimiento compartido en el área de bioquímica estructural de proteínas y enzimas, así como por su valiosa colaboración en los estudios de anclaje molecular.

A la Dra. Carmen A. Contreras Vergara por su asesoría, apoyo, paciencia y conocimiento compartido en el área de bioquímica de proteínas y enzimas.

A la Q.B. Mónica A. Villegas Ochoa por su amabilidad, apoyo, conocimiento compartido, paciencia e incansable asesoría en el laboratorio y por su amistad.

A la Dra. Maribel Ovando Martínez por su apoyo académico, paciencia y amistad.

A la M. en C. Brenda Silva, por su amistad, apoyo, sonrisa y su actitud positiva siempre.

Al M. en C. Reynaldo Cruz, por su amistad, apoyo, tiempo y su actitud positiva y de servicio.

Al laboratorio de Bioquímica de Proteínas Recombinantes del Dr. Rogerio R. Sotelo Mundo por su asesoría técnica, colaboración y préstamo de material y equipos.

A mis compañeros de laboratorio Maribel, Ana, Ale, Ceci, Tavo, Ramón y Marcos por su apoyo académico, amistad y gratas experiencias compartidas.

A mis compañeros del Laboratorio de Tecnologías Emergentes Meli, Thalia, Melvin, Pancho y Luis por su apoyo y amistad.

A mis amigos y compañeros de generación Lucia, Sinaí, Idaly, Armida, Chema y Eliezer, por su amistad y por hacer mi estancia más amena.

A mis amigos Lucia, Leo, Nitzia, Ignacio y Jaqueline, porque en ustedes he encontrado una amistad sincera y valiosa, por su apoyo y aportaciones en lo académico y personal.

A mis amigos Thalia, Mara, Emanuel, Moha y Madi, por su valiosa amistad y apoyo.

A mis amigas y hermanas Sinaí, Ana Karenth y Cynthia porque han sido mis compañeras de batalla y parte muy importante en este logro, por inspirarme y animarme a ser mejor y a seguir adelante.

A mi familia, en especial a mis tías Carmen y Cande, por su cariño y por estar siempre conmigo.

A mi Madre, por su amor, cuidado, dedicación y ejemplo, sin ti no lo hubiera logrado.

DEDICATORIA

A DIOS, el Creador, el Científico por excelencia, el único Grande. Gracias por permitirme llegar hasta aquí, por darme la gracia, sabiduría y fortaleza para realizar este trabajo, por guiarme y enseñarme a vencer obstáculos y miedos, por sostenerme en mis alegrías y en mis momentos de duda, por creer en mí y ser mi mayor impulsor. Gracias por tu fidelidad, amor y cuidados, no hubiera llegado hasta aquí sin ti, este logro es para ti.

A mi Madre, por ser mi gran ejemplo e inspiración, por enseñarme a ser valiente y luchar por mis sueños, por animarme, por estar conmigo en cada etapa de la realización de este trabajo, por creer en mí. Gracias por tu amor y cuidados, sin ti no lo hubiera logrado, este logro también es tuyo.

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras	ix
Lista de Cuadros	x
Resumen	xii
Abstract	xiv
Introducción	1
Antecedentes	4
Obesidad y Terapias Actuales para su Tratamiento.....	4
Compuestos Fenólicos como Potenciales Agentes Antiobesogénicos: Inhibición de Enzimas Digestivas.....	6
Proceso de Digestión y Absorción de Lípidos.....	12
Estructura y Función de la Lipasa Pancreática.....	16
Mecanismo Catalítico de la Lipasa Pancreática.....	21
Compuestos Fenólicos como Potenciales Inhibidores de la Lipasa Pancreática.....	24
Compuestos Fenólicos de Mango como Modelo de Estudio para la Inhibición de la Lipasa Pancreática.....	27
Hipótesis	30
Objetivo General	31
Objetivos Específicos	31
Materiales y Métodos	32
Preparación del Extracto Enzimático de la Lipasa Pancreática Porcina.....	32
Preparación del Sustrato para la Actividad de Lipasa Pancreática.....	33
Preparación de Soluciones de Compuestos Inhibidores	33

CONTENIDO (Continuación)

	Página
Determinación de la Actividad de Lipasa Pancreática.....	33
Ensayo de Inhibición de la Actividad de Lipasa Pancreática por Compuestos Fenólicos.....	34
Cinética de Inhibición de la Lipasa por Compuestos Fenólicos.....	35
Titulación por Fluorescencia.....	37
Anclaje Molecular <i>In Silico</i> (Docking) de la Lipasa Pancreática Porcina con Compuestos Fenólicos Inhibidores.....	38
Resultados y Discusión	41
Inhibición de la Actividad de Lipasa Pancreática por Compuestos Fenólicos.....	41
Cinética de Inhibición de la Lipasa Pancreática por Compuestos Fenólicos.....	47
Análisis de la Interacción entre Compuestos Fenólicos y la Lipasa Pancreática por Espectroscopía de Fluorescencia.....	54
Anclaje Molecular <i>In Silico</i> (Docking) de la Lipasa Pancreática Porcina con Ácido Tánico y Penta-O-galoil- β -D-glucosa.....	61
Conclusiones	72
Recomendaciones	74
Referencias	75

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Principales clases de compuestos fenólicos.....	9
2	Proceso de digestión y absorción de TAG en el tracto gastrointestinal.....	14
3	Estructura tridimensional en representación de listón del complejo lipasa pancreática-colipasa en dos diferentes conformaciones.....	19
4	Mecanismo de hidrólisis del enlace éster de triglicéridos por la lipasa pancreática.....	23
5	Estructuras químicas de los principales compuestos fenólicos identificados en pulpa y cáscara de mango cv. 'Ataulfo'.....	29
6	Inhibición de la actividad de lipasa pancreática por compuestos fenólicos presentes en pulpa de mango cv. 'Ataulfo'.....	42
7	Inhibición de la actividad de lipasa pancreática porcina por compuestos fenólicos presentes en cáscara de mango cv. 'Ataulfo' y orlistat®.....	45
8	Gráfico de Michaelis-Menten de la cinética de inhibición de la lipasa pancreática porcina en presencia de ácido tánico y penta- <i>O</i> -galoil- β -D-glucosa.....	48
9	Gráfico de Lineweaver-Burk de la cinética de inhibición de la lipasa pancreática porcina en presencia de ácido tánico y gráfico secundario de dobles recíprocos para el cálculo de K_i	51

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
10	Gráfico de Lineweaver-Burk de la cinética de inhibición de la lipasa pancreática porcina en presencia de penta-O-galoil- β -D-glucosa y gráfico secundario de dobles recíprocos para el cálculo de K_i	52
11	Espectros de emisión de fluorescencia de la lipasa pancreática porcina en presencia de compuestos fenólicos.....	56
12	Análisis del centro espectral de fluorescencia de la lipasa pancreática porcina en presencia de compuestos fenólicos.....	57
13	Representación en superficie de la interacción por anclaje molecular <i>in silico</i> entre ácido tánico y la lipasa pancreática porcina.....	64
14	Representación en listón de la interacción por anclaje molecular <i>in silico</i> entre ácido tánico y la lipasa pancreática porcina.....	65
15	Representación en superficie de la interacción por anclaje molecular <i>in silico</i> entre penta-O-galoil- β -D-glucosa y la lipasa pancreática porcina.....	69
16	Representación en dos dimensiones de la interacción por anclaje molecular <i>in silico</i> entre penta-O-galoil- β -D-glucosa y la lipasa pancreática porcina.....	70

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Medicamentos para el tratamiento de la obesidad actualmente aprobados para su uso por la FDA.....	7
2	Concentración inhibitoria media (IC ₅₀) de la actividad de lipasa pancreática porcina por compuestos fenólicos de mango cv. 'Ataulfo' y orlistat®.....	43
3	Parámetros cinéticos de la lipasa pancreática porcina en presencia de ácido tánico y penta-O-galoil-β-D-glucosa.....	49
4	Resumen de residuos de la lipasa y la colipasa en proximidad con ácido tánico (AT) de acuerdo al análisis de anclaje molecular <i>in silico</i>	66
5	Resumen de residuos de la lipasa y colipasa en proximidad con penta-O-galoil-β-D-glucosa (PGG) de acuerdo al análisis de anclaje molecular <i>in silico</i>	71

RESUMEN

El consumo de alimentos ricos en compuestos fenólicos (CF) ha sido asociado con beneficios a la salud debido a su capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana. Además se ha reportado que los CF tienen la capacidad de inhibir enzimas digestivas como la lipasa pancreática (LP), lo cual sugiere su potencial como agentes antiobesogénicos naturales. En este contexto, el mango (*Mangifera indica* L.) cv. 'Ataulfo' por su alto contenido en CF, representa un modelo de estudio para evaluar la capacidad de los mismos como inhibidores de la LP. El objetivo del estudio fue evaluar el potencial de CF identificados en pulpa [ácido gálico (AG), clorogénico (AC), protocatéico (AP) y vanílico (AV)] y cáscara [ácido tánico (AT), penta-O-galoil- β -D-glucosa (PGG) y mangiferina (MG)] de mango, como inhibidores de la LP porcina, su mecanismo cinético y posibles interacciones, mediante ensayos de inhibición enzimática, espectroscopia de fluorescencia y anclaje molecular *in silico* (docking). Los resultados indican que AT, PGG y MG inhibieron la actividad de la LP, mostrando un IC_{50} de 22.40 μ M, 64.6 μ M y 144.3 μ M, respectivamente; mientras que AG, AC, AP y AV mostraron menor efectividad para inhibir a la LP con un $IC_{50} > 500 \mu$ M. Los ensayos cinéticos de inhibición mostraron que AT y PGG disminuyeron V_{max} y K_m de la LP, sugiriendo que ambos compuestos muestran un mecanismo de inhibición acompetitivo. Además se encontró que AT y PGG presentaron alta afinidad por la LP, de acuerdo a sus valores de K_i (AT: 0.018 μ M y PGG: 0.0094 μ M). Asimismo, el patrón de emisión de fluorescencia de la LP cambió en presencia de los CF, presentándose opacamiento en todos los casos, y desplazamiento batocrómico e hipsocrómico en el caso de AT, PGG y MG. Respecto al docking, se observó que AT y PGG podrían unirse en la cavidad formada por la interface dominio C-terminal y lid de la LP, en su conformación abierta, y colipasa, lo que puede apoyar el mecanismo cinético de inhibición determinado. Además, los CF mostraron interactuar con residuos de naturaleza polar expuestos en dicha cavidad. Por lo tanto, se concluye que AT y PGG mostraron interacción específica

con la LP; lo cual sugiere que CF de alto peso molecular presentes en cáscara de mango, un subproducto de la industria agroalimentaria, podrían ser aprovechados para la formulación de nutracéuticos dirigidos a la prevención y tratamiento de la obesidad.

Palabras clave: Compuestos fenólicos, lipasa pancreática, inhibición, interacción, cambios conformacionales

ABSTRACT

Consumption of foods rich in phenolic compounds (PC) has been associated with various positive health effects, which have been attributed mainly to their antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory capacity. Recently, studies have indicated that PC are able to inhibit digestive enzymes such as pancreatic lipase (PL), which suggests the potential of PC as natural antiobesity agents. In this context, mango (*Mangifera indica* L.) cv. 'Ataulfo', due to its high PC content, represents a model study to evaluate the ability of these compounds as PL inhibitors. The aim of this study was to evaluate the potential of PC identified in mango pulp [gallic (GA), chlorogenic (CA), protocatechuic (PA) and vanillic (VA) acids] and peel [tannic acid (TA), penta-O-galloyl - β -D-glucose (PGG) and mangiferin (MG)] as LP inhibitors, as well as their kinetic inhibition mechanism and possible interactions. Enzyme inhibition assays, fluorescence spectroscopy and molecular docking were carried out. Enzyme inhibition assays indicated that TA, PGG and MG effectively inhibited the PL activity, showing IC_{50} values of 22.40 μ M, 64.6 μ M and 144.3 μ M, respectively. Furthermore, GA, CA, PA and VA showed less effectiveness to inhibit this enzyme ($IC_{50} > 500 \mu$ M). LP kinetic inhibition assays were performed in the presence of TA and PGG (more effective compounds). It was found that these compounds decreased both LP V_{max} and K_m values, indicating that TA and PGG followed uncompetitive inhibition mechanism. The calculated K_i values (TA 0.018 μ M and PGG 0.0094 μ M) revealed that both compounds exhibited high PL affinity. It was also noted that, the PL fluorescence emission pattern changed in the presence of PC, showing in all cases a quenching effect. In some other cases (TA, PGG and MG), large displacements in the PL center of spectral mass (bathochromic and hypsochromic shift) were also observed. Results for TA and PGG docking to PL showed that both compounds could bind in the cavity formed by the PL C-terminal and lid domain interface (in its open conformation), and colipase, supporting kinetic inhibition mechanism

determined experimentally. Moreover, the compounds interact mainly with exposed polar residues in the cavity. The results in this study suggest the existence of a close relationship between PC structure and PL inhibition, and regarding to TA and PGG the interaction was found to be specific. Furthermore, high molecular weight PC present in mango peel, which is a food industry byproduct, could be exploited for the development of nutraceuticals for obesity prevention and treatment.

Keywords: Phenolic compounds, pancreatic lipase, inhibition, interaction, conformational changes.

INTRODUCCIÓN

Las frutas y verduras son la principal fuente de compuestos fenólicos (CF) en la dieta, por lo que su consumo frecuente puede brindar un beneficio integral a la salud, no sólo por disminuir la ingesta de azúcares refinados y lípidos, sino por aportar una buena cantidad de CF al organismo (Liu, 2013a, 2013b). El consumo de alimentos ricos en CF se ha asociado a diversos efectos benéficos a la salud, lo cuales se han atribuido principalmente a la capacidad de estos compuestos para actuar como antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, entre otros (Balsano y Alisi, 2009; Carocho y Ferreira, 2013; Sergent *et al.*, 2010). Además, estudios recientes han reportado que los CF podrían desempeñar un papel importante en la prevención y tratamiento de la obesidad (Lai *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2013; Yun, 2010a), por lo que estudios a mayor profundidad en este aspecto son necesarios.

La obesidad es una creciente pandemia que se ha elevado a niveles alarmantes en el mundo desarrollado, e incluso se ha difundido en el mundo en desarrollo debido a la occidentalización de los hábitos alimenticios y el estilo de vida (George *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2013b). Diversos factores de riesgo constituyen las causas de la obesidad, entre los que se encuentran la insuficiente actividad física, el consumo de alimentos hipercalóricos y ricos en lípidos, y predisposición genética (Colagiuri, 2010; Robinson y Niswender, 2009). En 2013, la Asociación Americana de Medicina reconoció oficialmente a la obesidad como una enfermedad (Kim *et al.*, 2013a). Sin embargo, el hecho más inquietante respecto a esta enfermedad es que predispone al desarrollo de padecimientos graves

como enfermedades cardiovasculares (ECV), diabetes, dislipidemia y algunos tipos de cáncer (Wang *et al.*, 2011).

Claramente la mejor manera de abordar esta enfermedad es a través de la modificación del estilo de vida, sin embargo, en los últimos años han surgido diversas estrategias terapéuticas para combatirla, tales como el uso de fármacos (Sergent *et al.*, 2012). Entre los fármacos utilizados actualmente se encuentran orlistat, lorcaserina y fentermina/topiramato, los cuales han sido permitidos por la FDA (Food and Drug Administration). Aunque se ha demostrado la efectividad de dichos fármacos, los efectos adversos a la salud que han sido reportados tras su uso no deben ser ignorados (Fidler *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013a; O'Neil *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2010). Debido a lo anterior, existe la necesidad de explorar nuevos compuestos que sean efectivos y seguros (Chakrabarti, 2009; Robinson y Niswender, 2009).

Actualmente, el uso de compuestos bioactivos de fuentes naturales, en especial los compuestos fenólicos (CF), puede ser una estrategia alternativa para la prevención y tratamiento de la obesidad (George *et al.*, 2014; Hsu y Yen, 2008; Sergent *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014b; Williams *et al.*, 2013). Se han propuesto diferentes mecanismos a través de los cuales los CF pueden actuar como agentes antiobesogénicos (Williams *et al.*, 2013; Yun, 2010a), siendo de gran interés el efecto que éstos pueden tener a nivel gastrointestinal (Williamson y Clifford, 2010). Estudios recientes han indicado que los CF tienen la habilidad de inhibir enzimas digestivas como la α -amilasa pancreática, la α -glucosidasa intestinal y las lipasas pancreáticas (Fei *et al.*, 2014; Gondi y Prasada Rao, 2015; Liu *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014a; Worsztynowicz *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014). De estas enzimas, la lipasa pancreática (LP) es una de las de mayor interés debido a su función clave en el proceso de digestión y absorción de lípidos dietarios (Shi y Burn, 2004a; Whitcomb y Lowe, 2007). De acuerdo a lo anterior, los CF podrían actuar como reguladores del consumo de energía proveniente de los lípidos y así podrían representar una

alternativa natural para reemplazar a orlistat ®, fármaco comercial que actúa sobre esta misma vía metabólica.

El mango (*Mangifera indica* L.) es un fruto tropical cultivado en todo el mundo con excelente valor nutricional y es reconocido por sus propiedades benéficas a la salud (Yahia, 2010), siendo de particular interés las altas concentraciones de CF presentes en este fruto (Manthey y Perkins-Veazie, 2009). Entre los principales compuestos de esta clase se encuentran los ácidos fenólicos, galotaninos y mangiferina (Manthey y Perkins-Veazie, 2009; Palafox-Carlos *et al.*, 2012; Sáyago-Ayerdi *et al.*, 2013), los cuales, por su estructura, pueden actuar como potenciales inhibidores de la LP, sin embargo, el estudio y conocimiento en este campo es escaso. Por lo que el propósito de este trabajo es evaluar el potencial de los principales CF identificados en pulpa y cáscara de mango cv. 'Ataulfo' y determinar su mecanismo cinético de inhibición y posibles interacciones con la enzima.

ANTECEDENTES

Obesidad y Terapias Actuales para su Tratamiento

La obesidad se ha convertido en un grave problema de salud pública a nivel mundial (Haslam y James, 2005). Este padecimiento se define y caracteriza por la acumulación anormal o excesiva de grasa corporal, lo cual puede afectar negativamente la salud. En 2013 la Asociación Americana de Medicina reconoció a la obesidad como una enfermedad (Kim *et al.*, 2013a). La causa de este padecimiento implica una compleja interacción entre factores ambientales, biológicos y de conducta, tales como insuficiente actividad física aunada a una dieta hipercalórica o rica en lípidos, así como predisposición genética (Colagiuri, 2010; Farooqi, 2015; Marti *et al.*, 2008; Robinson y Niswender, 2009). Actualmente, se considera que la prevalencia de la obesidad ha alcanzado proporciones epidémicas alrededor del mundo (Kit *et al.*, 2014; Morgen y Sorensen, 2014). Sin embargo, la principal preocupación dado este padecimiento es la alta propensión a enfermedades más graves como la diabetes, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares y diversos tipos de cáncer (Iyengar *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2013a). En este contexto, es imprescindible mejorar las estrategias utilizadas para el control de peso en personas que padecen sobrepeso u obesidad.

Si bien, la prevención mediante un cambio en el estilo de vida es la mejor estrategia para controlar y vencer la obesidad, el uso de terapias alternativas como cirugía y el uso de ciertos fármacos ha ganado popularidad recientemente (Sergent *et al.*, 2012). Por un lado, existen diversos tipos de cirugías bariátricas

para el tratamiento de la obesidad, las cuales incluyen bypass gástrico, gastrectomía vertical, banda gástrica, entre otras (Arterburn y Courcoulas, 2014; Buchwald *et al.*, 2004; DeMaria, 2007). No obstante, a pesar de su efectividad, este tipo de intervenciones conllevan serios riesgos como complicaciones postquirúrgicas y metabólicas. Debido al acelerado ritmo de vida de las personas y por ende, el fracaso en la modificación de hábitos de vida saludables, y a las evidentes limitaciones de las intervenciones quirúrgicas, el uso de fármacos como coadyuvantes en la terapia contra la obesidad ha ganado popularidad en los últimos años.

Los fármacos antiobesidad se introdujeron al mercado a finales del siglo XIX, como agentes capaces de modificar el metabolismo de nutrientes, regular el apetito o favorecer la termogénesis, por lo cual actualmente son conocidos como agentes antiobesogénicos (Colon-Gonzalez *et al.*, 2013). En este sentido, un agente antiobesogénico se define como “cualquier compuesto químico capaz reducir la ingesta de alimentos, incrementar el gasto energético, limitar la absorción intestinal o modificar la digestión de nutrientes en el cuerpo humano” (Hainer y Hainerová, 2012; Manning *et al.*, 2014; Medeiros-Neto *et al.*, 2003). Según Bray (1995) y Rodgers *et al.* (2012), un fármaco o agente antiobesogénico adecuado es aquel que es activo vía oral, que reduce grasa corporal a manera dosis dependiente, que ayuda a la pérdida de peso de manera continua y que presenta efectos adversos mínimos. En este contexto, el desarrollo, aprobación y uso de estos fármacos debe ser regulado por un balance entre efectividad y seguridad.

Actualmente se han desarrollado diferentes tipos de fármacos antiobesidad, los cuales han sido diseñados para actuar en rutas metabólicas específicas, ya sea en el sistema nervioso central o en tejidos periféricos como músculo, tejido adiposo, hígado o tracto gastrointestinal (Barja-Fernandez *et al.*, 2014; Morton *et al.*, 2006; Valentino *et al.*, 2010). En este contexto, los principales mecanismos de acción de los fármacos antiobesidad son: 1) reducción del apetito o inducción de la saciedad; 2) incremento del gasto energético y oxidación de lípidos, y 3)

reducción de la absorción de lípidos dietarios en el tracto gastrointestinal (Hainer y Hainerová, 2012). Hasta el 2014, sólo orlistat[®], lorcaserina[®] y fentermina/topiramato[®] han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos de América (FDA) como medicamentos de uso a largo plazo para reducir de peso (Kakkar y Dahiya, 2015; Kim *et al.*, 2013a) (Cuadro 1). A pesar de que los fármacos actuales han demostrado ser efectivos, los potenciales efectos adversos tras su uso no pueden ser ignorados. Los efectos adversos generalmente reportados incluyen ciertos tipos de toxicidad, desórdenes cognitivos y riesgos cardiovasculares (Comerma-Steffensen *et al.*, 2014; Cheung *et al.*, 2013; Nathan *et al.*, 2011). En este sentido, surge la necesidad de buscar y estudiar nuevas alternativas para el desarrollo de agentes antiobesogénicos efectivos y seguros, donde el potencial de los compuestos de origen natural aún sigue siendo un campo poco explorado (González-Castejón y Rodríguez-Casado, 2011; Yun, 2010a).

Compuestos Fenólicos como Potenciales Agentes Antiobesogénicos: Inhibición de Enzimas Digestivas

Los compuestos bioactivos naturales se definen como aquellos compuestos de origen natural que pueden afectar procesos biológicos y por tanto, tener un impacto positivo en las funciones del organismo humano y finalmente en la salud (Biesalski *et al.*, 2009; Möller *et al.*, 2008). Este tipo de compuestos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, encontrándose en fuentes de origen vegetal, animal y microbiano (Tang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015b; Zhao *et al.*, 2015). Existe una gran variedad de compuestos bioactivos, los cuales varían

Cuadro 1. Fármacos para el tratamiento de la obesidad actualmente aprobados para su uso por la FDA.

Medicamento	Mecanismo de Acción	Efectos Adversos	Referencias
Orlistat	Inhibidor reversible de las lipasas intestinales	Esteatorrea, daño al hígado, pancreatitis aguda, lesiones precancerosas de colon	(Filippatos <i>et al.</i> , 2008; Sumithran y Proietto, 2014)
Lorcaserina	Inhibidor de la re-captación de serotonina, dopamina y norepinefrina que potencia la actividad neurotransmisora en el sistema nervioso central	Posible riesgo de cáncer, dolor de cabeza, infección, sinusitis, náusea, depresión, ansiedad, pensamientos de suicidio	(Fidler <i>et al.</i> , 2011; Smith <i>et al.</i> , 2010)
Fentermina/Topiramato	Aumenta la señalización de ácido γ -aminobutírico para promover la señalización anorexigénica. Suprime el apetito	Fatiga, náusea, vómito, pérdida de coordinación, diarrea. Problemas mentales como confusión, lento procesamiento de ideas, falta de concentración, problemas en la memoria y/o lenguaje; depresión, pensamientos de suicidio	(Allison <i>et al.</i> , 2012; Gadde <i>et al.</i> , 2011)

Adaptado de Kim *et al.* (2013a)

en su estructura química y función, e incluyen vitaminas, proteínas o péptidos bioactivos, oligosacáridos, ácidos grasos y compuestos fenólicos (CF) (Baboota *et al.*, 2013). Diversos estudios señalan que estos compuestos pueden ejercer funciones biológicas como antioxidantes, anti-inflamatorios, anti-cancerígenos, hipocolesterolémicos, antimicrobianos, anti-hipertensivos, inmunomoduladores, entre otras (Balsano y Alisi, 2009; D’Orazio *et al.*, 2012; Liu, 2013a; Mozaffarian y Wu, 2011; Phelan y Kerins, 2011; Shirakami *et al.*, 2015). Además, estudios recientes han sugerido que los compuestos bioactivos naturales podrían jugar un papel importante en la prevención y tratamiento de la obesidad (González-Castejón y Rodríguez-Casado, 2011; Lai *et al.*, 2015; Scapagnini *et al.*, 2014). El potencial de estas sustancias naturales radica en que son más seguras para el organismo humano, ya que se encuentran en diversos alimentos, y por ello podrían ser más aceptadas para el tratamiento de padecimientos como la obesidad en comparación con compuestos de origen sintético.

Se ha reportado que alimentos de origen vegetal tales como frutas, verduras, granos, semillas, nueces y legumbres contienen diferentes compuestos bioactivos (Zhao *et al.*, 2015). Entre estos compuestos se encuentran la fibra dietaria, vitamina C, carotenoides, tocoferoles y CF, siendo estos últimos de especial interés (Liu, 2013b). Los CF son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en todas las plantas y son los compuestos bioactivos más abundantes en la dieta humana (Zhao *et al.*, 2015). Químicamente, los CF están constituidos por uno o más grupos hidroxilo unidos directamente a un anillo aromático y se dividen en 15 clases principales de acuerdo a su estructura (Xiao y Kai, 2012). Las principales clases de CF se muestran en la Figura 1. Estudios recientes indican que los CF pueden brindar distintos beneficios a la salud humana, además de su ya conocido potencial antioxidante, tales como la prevención y tratamiento de la obesidad (Torres-Fuentes *et al.*, 2015). En este sentido, se ha propuesto que los CF pueden actuar como agentes antiobesogénicos mediante distintos mecanismos. Los principales son: 1) Supresión del apetito, 2) estimulación del gasto energético, 3) regulación del metabolismo de lípidos y 4) disminución de la ingesta de energía proveniente de



Figura 1. Principales clases de compuestos fenólicos. Adaptado de Zhao *et al.* (2015) y González-Castejón y Rodríguez-Casado (2011)

carbohidratos y lípidos (Wang *et al.*, 2014c; Yun, 2010b). Sin embargo, se ha visto que el mecanismo de acción de los CF depende de factores como su tipo y biodisponibilidad.

Diversos factores, tales como la estructura de los CF, influyen de manera directa en su biodisponibilidad, lo que se piensa puede determinar su sitio y mecanismo de acción (Velderrain-Rodriguez *et al.*, 2014). Se ha reportado que, tras su ingestión, parte de los CF permanecen en el tracto gastrointestinal (TGI), en donde podrían llevar a cabo diversos efectos benéficos a la salud (Gee y Johnson, 2001). En este contexto, estudios recientes sugieren que los CF son capaces de disminuir la ingesta de energía mediante la regulación de la digestión y absorción de carbohidratos y lípidos (Buchholz y Melzig, 2015; Hanhineva *et al.*, 2010). La condición para que estos nutrientes puedan ser absorbidos en el intestino delgado, es que primero deben ser sometidos a la acción de las enzimas que llevan a cabo su proceso de digestión (Sanders, 2016). Las enzimas que participan en el complejo proceso de digestión de carbohidratos y lípidos son α -amilasas, α -glucosidasas y lipasas, respectivamente. Por lo tanto, la inhibición de estas enzimas representa un mecanismo por el cual los CF podrían actuar como agentes antiobesogénicos (Buchholz y Melzig, 2015; Xiao *et al.*, 2013a; Xiao *et al.*, 2013b).

La digestión de carbohidratos dietarios se lleva a cabo principalmente por la α -glucosidasa intestinal (E.C. 3.2.1.20) y la α -amilasa pancreática (E.C. 3.2.1.1). Por ello, el control de la absorción de glucosa en el intestino delgado mediante la inhibición de estas enzimas se considera una manera de prevenir el desarrollo o la exacerbación de la obesidad (Samaha *et al.*, 2003). Diversos estudios han reportado la capacidad de los CF para inhibir la actividad de estas enzimas. Fei *et al.* (2014) estudiaron la inhibición de α -amilasa pancreática por galato de epigallocatequina (EGCG) y epigallocatequina-O- (3-O-metil) galato (EGCG"Me), CF provenientes del té oolong. Los autores reportaron que ambos compuestos fueron capaces de inhibir la actividad de esta enzima (IC_{50} 0.35 mg/mL y 0.57 mg/mL, respectivamente), siendo EGCG el compuesto que mostró mayor

efectividad. Asimismo, Worsztynowicz *et al.* (2014) estudiaron el efecto del extracto de *Aronia melanocarpa* L. (chokeberry negro) y sus compuestos mayoritarios (ácido clorogénico y cianidina-3-glucósido) en la actividad de α -amilasa pancreática, encontrando que ambos compuestos fueron capaces de inhibir su actividad (IC_{50} 0.57 mg/mL y 1.74 mg/mL, respectivamente), siendo ácido clorogénico el compuesto más efectivo. Por otro lado, se ha reportado que compuestos identificados en fresa como kaempferol 3-(6-metilglucurónido) mostró inhibir a baja concentración (65.22 μ M) el 50% de la actividad de α -glucosidasa intestinal (Yang *et al.*, 2016). Así mismo, se ha reportado que ácido tánico fue capaz de inhibir la actividad de esta enzima con un IC_{50} de 0.44 μ g/mL, mostrando ser más efectivo que acarbosa ($IC_{50} > 0.60$ μ g/mL), el cual es un inhibidor sintético de la α -glucosidasa intestinal y la α -amilasa pancreática (Xiao *et al.*, 2015).

Asimismo, es bien conocido que los lípidos dietarios representan la principal fuente de calorías indeseadas y que el metabolismo de estos nutrientes está estrechamente relacionado al desarrollo de la obesidad. A la fecha se conoce un gran número de enzimas involucradas en las diferentes etapas del metabolismo de lípidos, las cuales son blancos terapéuticos para la prevención y tratamiento de la obesidad (Loli *et al.*, 2015; Shi y Burn, 2004b). Entre estas enzimas destaca la LP, que juega un papel fundamental en la digestión de lípidos dietarios para su posterior absorción en el intestino delgado (Whitcomb y Lowe, 2007). Actualmente, la LP es el blanco de orlistat [®], un inhibidor específico de esta enzima, el cual se ha reportado reduce la absorción de lípidos dietarios hasta un ~30% (Sumithran y Proietto, 2014). Se ha descrito que este fármaco es el más utilizado para el tratamiento de la obesidad dada su facilidad de adquisición sin receta médica, sin embargo, los efectos adversos tras su uso no deben ignorarse (Beyea *et al.*, 2012). En este sentido, al igual que como se ha visto con otras enzimas digestivas, los CF podrían representar una alternativa prometedora para actuar como agentes antiobesogénicos naturales al inhibir la actividad de la LP (Birari y Bhutani, 2007; Buchholz y Melzig, 2015). Más adelante en esta revisión

se describirá el conocimiento actual acerca de los CF como inhibidores de la LP y las posibles interacciones que sustentan este efecto. Sin embargo, para el mejor entendimiento de lo anterior, a continuación se describirá el rol de esta enzima en el proceso de digestión de lípidos, así como los componentes clave en su estructura que determinan su función.

Proceso de Digestión y Absorción de Lípidos

Los lípidos desempeñan diversas funciones esenciales dentro del cuerpo humano, incluyendo la provisión de energía, funciones estructurales y específicas en las membranas celulares y actividades hormonales (Yaqoob, 2013). Las principales clases de lípidos dietarios son los triacilglicéridos (TAG), lípidos más consumidos en la dieta (90-95%), así como los ésteres de colesterol, fosfolípidos y vitaminas liposolubles (Yaqoob, 2013). Los TAG dietarios constan de una estructura química formada por tres moléculas ácidos grasos de diversos pesos moleculares ($C_6 - C_{22}$) y saturaciones unidos mediante un enlace éster a una molécula de glicerol. Diversos estudios han tratado de entender los mecanismos de digestión y absorción de TAG, dada su importancia en un estado normal de nutrición y/o de enfermedad en el organismo humano (Sitrin, 2014). El esclarecimiento y entendimiento de los pasos clave involucrados en el metabolismo de TAG, representa una herramienta importante para el estudio y desarrollo de agentes antiobesogénicos naturales.

La digestión de lípidos es un proceso complejo que ocurre en tres regiones del tracto gastrointestinal, boca, estómago y duodeno, previo a su absorción en la mucosa intestinal (Figura 2). Sin embargo, este proceso varía dependiendo del tipo de lípidos debido a la acción de enzimas específicas necesarias para hidrolizarlos de su forma compleja a una más sencilla. Todo proceso de digestión de los alimentos comienza en la boca, la cual representa la primera estación de disrupción de la matriz alimentaria, donde la masticación y la saliva comienzan

su rompimiento. En el caso de alimentos ricos en lípidos, especialmente en TAG, a pesar de que en esta etapa no hay liberación de éstas moléculas, la masticación y la saliva ayudan a disminuir el tamaño de partícula de las gotas de lípidos y asimismo incrementar el área de superficie de contacto para facilitar la subsecuente acción de las enzimas. Se ha reportado que pequeñas cantidades de lipasa lingual están presentes en la saliva, lo que facilita la digestión de una pequeña cantidad de TAG. Después de la masticación, las gotas de lípidos que contienen TAG junto con el bolo alimenticio y saliva pasan al estómago para continuar su digestión.

Hasta aquí, debido al corto tiempo de residencia en la boca, no se observan cambios significativos en la estructura química de los TAG. Sin embargo, después de que el bolo alimenticio ha migrado a través del esófago hacia el estómago, éste es mezclado con los jugos digestivos ácidos bajo un pH entre 1-3, lo que facilita la activación de las enzimas digestivas en esta región y la hidrólisis de los componentes en el alimento (Ekmekcioglu, 2002; Kalantzi *et al.*, 2006; McClements y Li, 2010). En esta etapa, la lipasa gástrica y la lipasa lingual son responsables de la hidrólisis de un 10-30% de TAG en el estómago (Hamosh, 1990). Estas enzimas se unen a la superficie de las gotas de lípidos para convertir TAG en diacilglicéridos (DAG) y ácidos grasos libres (AGL) (Armand, 2007; Jurado *et al.*, 2006), teniendo preferencia de hidrólisis de ácidos grasos en la posición *sn*-3 del esqueleto de glicerol (Carriere *et al.*, 1993). Después, los productos de hidrólisis son incorporados en la superficie de las gotas de lípidos, deteniendo la actividad de ambas lipasas pero a su vez propiciando la subsecuente formación de las emulsiones lipídicas y por ende, la completa digestión de TAG en el duodeno (Pafumi *et al.*, 2002).

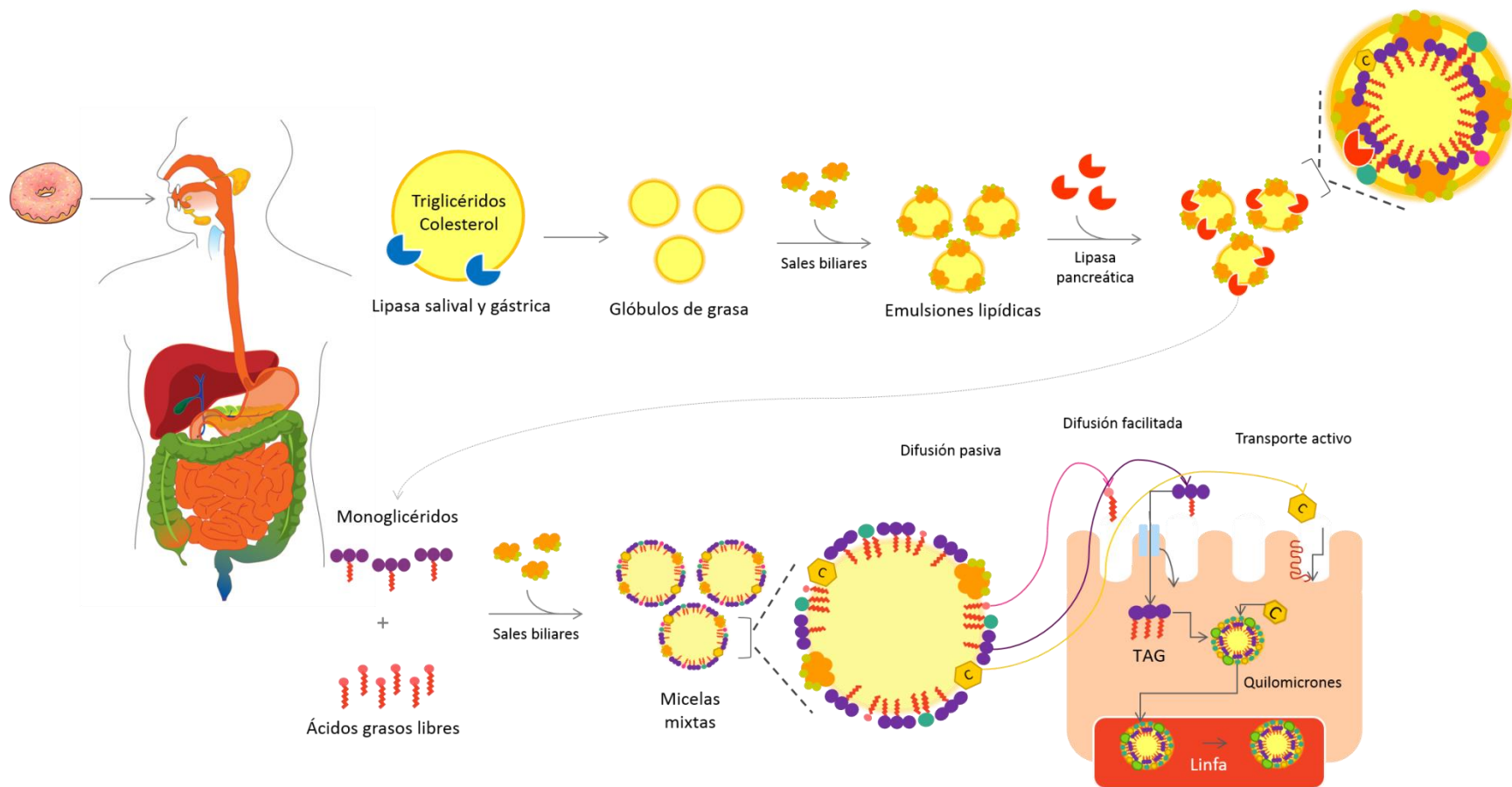


Figura 2. Proceso de digestión y absorción de TAG en el tracto gastrointestinal.

Hasta este momento, las condiciones fisicoquímicas y enzimáticas del estómago han propiciado la hidrólisis parcial de TAG y un aumento en el área de superficie de las gotas de lípidos, lo cual favorecerá su digestión total y final absorción en el intestino delgado. Al entrar al duodeno, el quimo es mezclado con bicarbonato de sodio, sales biliares y fosfolípidos, provocando un incremento en el pH del medio (5.8-6.5) y ayudando a la formación de emulsiones lipídicas, respectivamente (Tso, 2006). Estas condiciones son necesarias para que las lipasas pancreáticas trabajen de manera eficiente sobre su sustrato. En esta etapa y particularmente para el caso de TAG, la digestión continúa hasta completarse gracias a la acción de la LP específica de triglicéridos (LP), enzima responsable de la hidrólisis de 50-70% de éstas moléculas (Armand, 2007; Mukherjee, 2003; Whitcomb y Lowe, 2007). Para catalizar esta reacción, LP en complejo con colipasa, debe adsorberse en la interface agua – aceite de las emulsiones que contienen a las moléculas de TAG y DAG (Reis *et al.*, 2009), para dar como producto monoacilgliceroles (MAG) y AGL, mostrando preferencia por las cadenas acilo en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 (Lowe, 2002).

Una vez obtenidos los productos de digestión de TAG (MAG y AGL), estos son solubilizados en micelas mixtas para su absorción en las células epiteliales. Las micelas mixtas atraviesan la mucosa que recubre las paredes del epitelio y de esta región subsecuentemente son absorbidos por los enterocitos (Roger *et al.*, 2010). Por un lado, los ácidos grasos de cadena larga tienden a ser reensamblados en TAG dentro de las células epiteliales, empaquetados en lipoproteínas y después transportados hacia otros tejidos por medio del sistema linfático (Abia *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2005; Fave *et al.*, 2004). Por otro lado, los ácidos grasos de cadena corta y de cadena media tienden a ser absorbidos directamente en la vena porta y pasan al hígado antes de entrar en la circulación sistémica (Porter *et al.*, 2007). A pesar de su complejidad estructural, la digestión de TAG es un proceso altamente eficiente y >95% de éstos lípidos son normalmente absorbidos gracias a la acción de las lipasas (Lowe, 2002; Whitcomb y Lowe, 2007). Estas enzimas representan un punto clave en la

regulación de la digestión y absorción de TAG, por lo que cualquier alteración en su actividad y/o eficiencia puede afectar este proceso.

Estructura y Función de la Lipasa Pancreática

Como se ha mencionado en la sección anterior, las lipasas son esencialmente importantes para que se lleve a cabo el proceso de digestión, absorción y metabolismo de lípidos dietarios de manera eficiente. Para ello, diversas lipasas participan en este complejo proceso, siendo de gran importancia aquellas que están involucradas en las etapas de digestión de lípidos a lo largo del tracto gastrointestinal (Whitcomb y Lowe, 2007). La mayor parte de la hidrólisis de lípidos se lleva a cabo en el duodeno, por lo que las lipasas que actúan a este nivel son de especial interés (Lowe, 2002). El páncreas exocrino secreta distintas lipasas que han vencido el reto cinético que representa la inclusión de su sustrato insoluble en el medio acuoso dentro de una interface aceite-agua o emulsiones lipídicas (Keller y Layer, 2005; Lowe, 2002).

Entre estas enzimas se encuentra la lipasa pancreática específica de triglicéridos (LP), la cual predomina sobre el resto de las lipasas secretadas por el páncreas (Lowe, 2002). La LP pertenece a la familia génica de las lipasas y está estrechamente relacionada con otras dos proteínas exocrinas, llamadas proteínas relacionadas a la lipasa pancreática 1 y 2 (PLRP1 y PLRP2) (De Caro *et al.*, 1998; Wong y Schotz, 2002; Xiao *et al.*, 2011b). Por su función, particularmente la LP ha sido el blanco de fármacos como orlistat[®] para el tratamiento de la obesidad (Tiss *et al.*, 2009). En este contexto, resulta importante conocer la relación estructura-función de la LP, para evaluar el potencial de compuestos naturales como inhibidores de su actividad y su posible mecanismo desde el punto de vista cinético.

La LP (triacilglicerol acil hidrolasa, E.C. 3.1.1.3) presenta una marcada preferencia por acilglicéridos sobre fosfolípidos, ésteres de colesterol y

galactolípidos (Fojan *et al.*, 2000). Esta enzima se ha adaptado para trabajar en interfaces aceite-agua, por lo que muestra mucha mayor actividad frente a sustratos insolubles en agua como TAG de cadena larga (C₁₄-C₂₂) (Brockman, 2000; Miled *et al.*, 2000). Sin embargo, para llevar a cabo eficientemente su función, la LP requiere la presencia sales biliares (Brockman, 2000; Lowe, 1997b). Por un lado, las sales biliares pueden modificar la superficie de las emulsiones lipídicas, despejando proteínas y oligosacáridos dietarios. Esta acción remueve potenciales inhibidores de la LP de la interface aceite-agua de las emulsiones lipídicas (Maldonado-Valderrama *et al.*, 2011; Wilde y Chu, 2011). A pesar de ello, la misma presencia de sales biliares impide que la LP se una a la interface, inhibiendo su actividad (Reis *et al.*, 2009). Para vencer dicha inhibición, la LP se une a la interface de las emulsiones en complejo con otra proteína exocrina, colipasa, la cual se ha demostrado restaura la actividad de la LP en este medio tan complejo (Brockman, 2000; van Tilbeurgh *et al.*, 1999).

El entendimiento de la estructura y función de lipasa pancreática es posible gracias al conocimiento de su estructura tridimensional. La LP humana es una proteína N-glicosilada que consta de 449 aminoácidos y presenta una masa molecular de 48 kDa (De Caro *et al.*, 1977; Winkler *et al.*, 1990). Está conformada por dos dominios distintos, un dominio N-terminal que comprende los residuos 1 al 336, y un dominio C-terminal que incluye los residuos 337 al 449 (van Tilbeurgh *et al.*, 1992). El dominio N-terminal presenta una estructura de plegamiento α/β hidrolasa, la cual también está presente en otras lipasas y esterases (Ollis *et al.*, 1992; van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Este dominio contiene al sitio catalítico formado por los residuos Ser153, Asp177 e His263 y es similar al presentado por las serina proteasas (Lowe, 1992; Winkler *et al.*, 1990). Dichos residuos están conservados en todas las LP conocidas, incluyendo la porcina (Akoh *et al.*, 2004; Hermoso *et al.*, 1996; van Tilbeurgh *et al.*, 1993). En la estructura de la LP, un lazo o bucle de superficie (residuos 240-260), definido por un puente disulfuro entre Cys238 y Cys262, cubre el sitio catalítico (Lowe, 2002; Secundo *et al.*, 2006; van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Este lazo, llamado dominio lid, forma interacciones de van der Waals con el lazo β 5 (residuos 76-85) y el lazo β 9

(residuos 204-224). Juntos, el dominio lid y los dos lazos, impiden estéricamente el acceso del sustrato al sitio activo (van Tilbeurgh *et al.*, 1992; Winkler *et al.*, 1990). En esta conformación, a la cual se le llama cerrada, la LP es catalíticamente inactiva (Figura 3A), por lo que es necesaria una segunda conformación con el sitio activo expuesto (Secundo *et al.*, 2006; Yang y Lowe, 2000).

En presencia de una interface aceite-agua, el dominio lid y el lazo $\beta 5$ adoptan una nueva conformación, mientras que la posición del lazo $\beta 9$ permanece sin cambios (van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Este fenómeno es conocido como activación interfacial (Jennens y Lowe, 1994; Miled *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2009). Por un lado, el dominio lid se aparta del sitio activo, moviéndose en dirección al dominio C-terminal, mientras que el lazo $\beta 5$ se pliega hacia afuera del sitio catalítico. En conjunto, estos movimientos abren el sitio catalítico y reconfiguran la región para crear el agujero o cavidad oxianión, una región electrofílica formada por Phe78 y Leu154, cuya función es estabilizar a los intermediarios de la catálisis en el estado de transición (Lowe, 2002; van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Además, dichos movimientos organizan los sitios de unión de la cadena acilo de los TAG, los cuales han sido identificados en el lazo $\beta 9$ y en el dominio lid (Secundo *et al.*, 2006; Yang y Lowe, 2000). Una segunda consecuencia de estos movimientos es la formación, junto con colipasa, de una superficie hidrofóbica extensa y continua. Esta superficie facilita la interacción de la LP con la interface aceite-agua para formar el complejo ternario LP-colipasa-emulsión e iniciar la catálisis (Thomas *et al.*, 2005). En esta conformación, a la cual se le llama abierta, la LP es catalíticamente activa (Figura 3B) (Belle *et al.*, 2007; Lowe, 2002; Neves Petersen *et al.*, 2001).

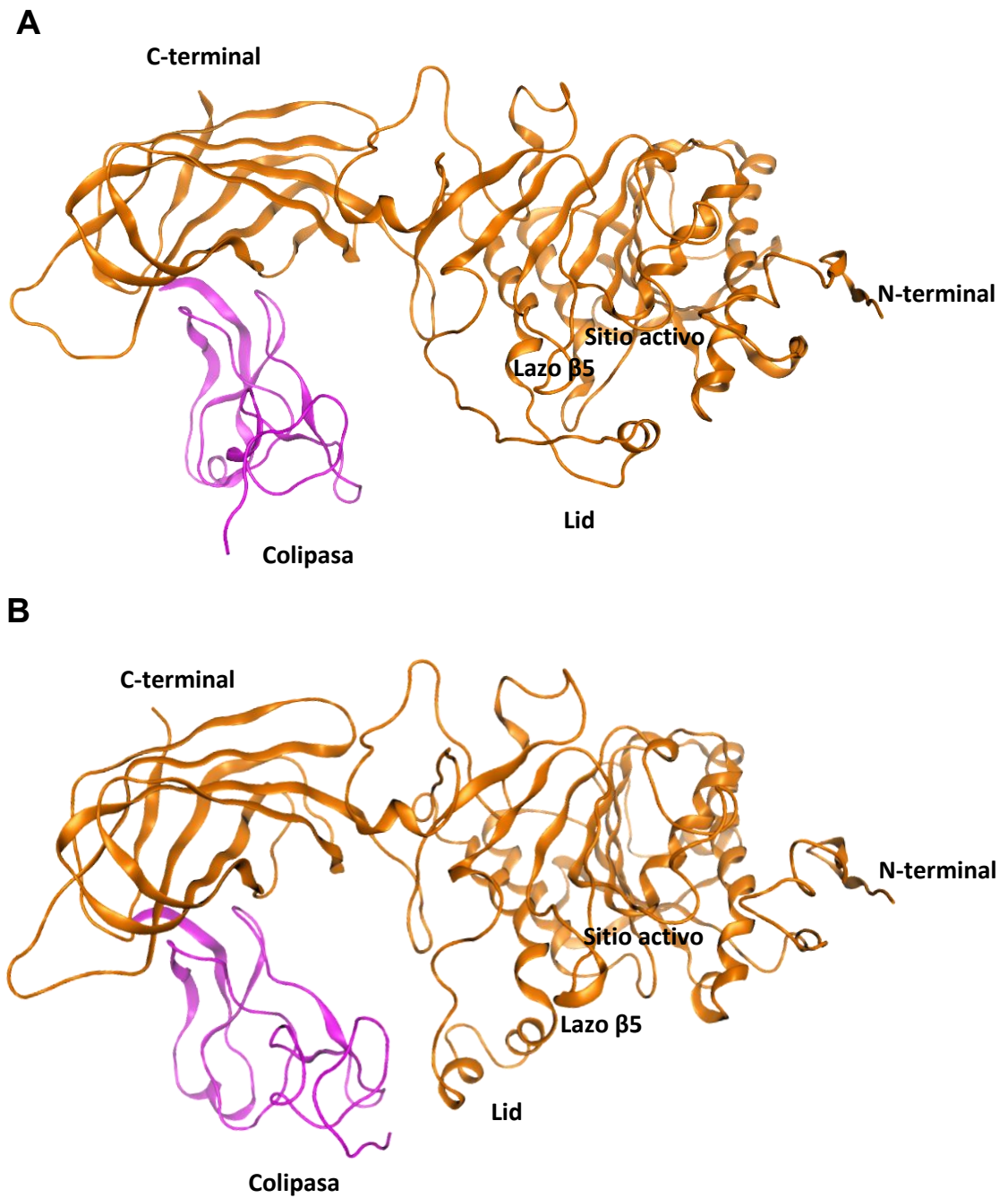


Figura 3. Estructura tridimensional en representación de listón del complejo lipasa pancreática-colipasa en dos diferentes conformaciones. A) Complejo lipasa pancreática-colipasa en conformación cerrada (PDB 1N8S). B) Complejo lipasa pancreática-colipasa en conformación abierta o catalíticamente activa (PDB 1ETH). Estructura de lipasa pancreática representada en amarillo y colipasa en magenta. Las coordenadas se tomaron del Banco de Datos de Proteínas (PDB) y las figuras se prepararon en el software MOE.

Como se ha mencionado hasta aquí, la apertura del sitio activo a través de la reorganización del dominio lid representa el cambio conformacional más importante en la LP, lo cual es fundamental para que se lleve a cabo el proceso de catálisis. Una vez que el dominio lid se abre, diversas interacciones nuevas estabilizan esta conformación (Lowe, 1997a; van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Entre estas interacciones se encuentran dos puentes de hidrógeno, formados entre

Glu15 de la colipasa y Asn241 de la LP, y entre Arg38 de la colipasa y Val246 de la LP (van Tilbeurgh *et al.*, 1999; van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Se ha comprobado que dichas interacciones son imprescindibles para mantener la actividad catalítica de la LP. En particular, se ha reportado que la sustitución de Glu15 en colipasa provoca la disminución de la actividad de la LP, sin afectar la habilidad de la colipasa para anclar a la LP a la interface aceite-agua (Lowe, 1997a). Esto sugiere que la colipasa es capaz de estabilizar al dominio lid en su conformación abierta y catalíticamente activa, facilitando el proceso de lipólisis (Lowe, 1997a; Yang y Lowe, 2000). Además, se conoce que otro conjunto de interacciones ocurren entre residuos del dominio lid y residuos ubicados en el centro de la LP. Los residuos Arg257 y Asp258 del dominio lid en su conformación abierta forman puentes salinos con Tyr268 y Lys269, ubicadas en el centro de la LP (van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Estudios han reportado que estas interacciones son también fundamentales para lograr mantener a la LP en su conformación catalíticamente activa (Bezzine *et al.*, 1999; Yang y Lowe, 2000). Por tanto, cualquier ruptura de las interacciones antes mencionadas impedirá que el dominio lid mantenga una conformación óptima, lo cual es crítico para el proceso catalítico de la LP (Lowe, 2002).

El dominio C-terminal de la LP presenta una estructura tipo β -sándwich y presenta dos funciones notables. Por un lado, representa el sitio de unión de la colipasa, y por otro lado, participa en la interacción del complejo LP-colipasa con la interface aceite-agua, como lo han revelado las estructuras tridimensionales del complejo LP-colipasa (Hermoso *et al.*, 1996; van Tilbeurgh *et al.*, 1993; van

Tilbeurgh *et al.*, 1992). Existe una estrecha relación entre el dominio C-terminal y la colipasa, y su rol en el proceso catalítico de la LP, por lo que es necesario comprender algunos puntos importantes. La colipasa es una proteína pancreática exocrina de bajo peso molecular (10 kDa) y no presenta actividad enzimática por sí misma (Erlanson-Albertsson, 1992). Esta proteína forma un complejo con la LP en relación 1:1 para mantener a la LP activa. En este sentido, la colipasa desempeña dos funciones importantes: primeramente, funciona como ancla entre la LP y su sustrato, y segundo, estabiliza a la LP en su conformación activa o abierta (Lowe, 1997a; Ross *et al.*, 2013).

Estructuralmente, la colipasa es una molécula aplanada compuesta por tres regiones en forma de dedos, definidas por puentes disulfuro. Dos lazos en forma de horquilla, formados por los residuos 44-46 y 65-87 y Asp89 interactúan con aminoácidos en varias hojas β del dominio C-terminal de la LP (van Tilbeurgh *et al.*, 1999; van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Particularmente, las interacciones polares entre la colipasa y el dominio C-terminal de la LP juegan un papel importante (Egloff *et al.*, 1995; Lowe, 2002). En este contexto, se ha visto que la interacción iónica entre Glu45 de la colipasa y Lys400 de la LP, son críticas para la formación del complejo funcional LP-colipasa. De esta manera, al afectar alguna de estas interacciones, se ha visto que la afinidad de la colipasa por la LP disminuye, lo que finalmente repercute en la actividad de la LP (Ayvazian *et al.*, 1998; Crandall y Lowe, 2001).

Mecanismo Catalítico de la Lipasa Pancreática

La catálisis de las lipasas sigue el mecanismo clásico de las serina hidrolasas (Long y Cravatt, 2011). En general, la descripción más acertada y aceptada de la acción catalítica de las lipasas es un mecanismo secuencial Bi Bi al azar (también conocido como Ping Pong Bi Bi) (Paiva *et al.*, 2000). La hidrólisis del sustrato comienza con la unión de TAG al sitio activo, donde la serina catalítica

Ser153 ataca al átomo de carbono del grupo carbonilo que forma el enlace éster con el glicerol. Esto genera un intermediario tetraédrico (oxianión), el cual se caracteriza por la formación de una carga negativa en el átomo de oxígeno del grupo carbonilo, y el enlace de cuatro átomos al carbono del grupo carbonilo. El intermediario es estabilizado por dos puentes de hidrógeno entre el átomo de oxígeno del grupo carbonilo (el cual está cargado negativamente) y el grupo amino ($-NH$) de la cadena principal de Phe78 y Leu154 (residuos que forman el agujero oxianión). La nucleofilicidad de Ser153 aumenta gracias a la histidina catalítica His263, a la cual se le ha transferido un protón del grupo hidroxilo de la serina. Esta transferencia es facilitada por el residuo catalítico ácido Asp177, el cual orienta el anillo imidazol de His263 de tal manera que neutraliza la carga generada. Subsecuentemente, el protón es donado al átomo de oxígeno del enlace éster, el cual es hidrolizado, con la posterior liberación de una molécula de alcohol, mientras que la cadena acilo se encuentra esterificada a Ser153. El paso final es la desacilación, en donde una molécula de agua hidroliza el enlace covalente, con la subsecuente liberación de un ácido graso y la regeneración de la LP (Anobom *et al.*, 2014; Borrelli y Trono, 2015) (Figura 4).

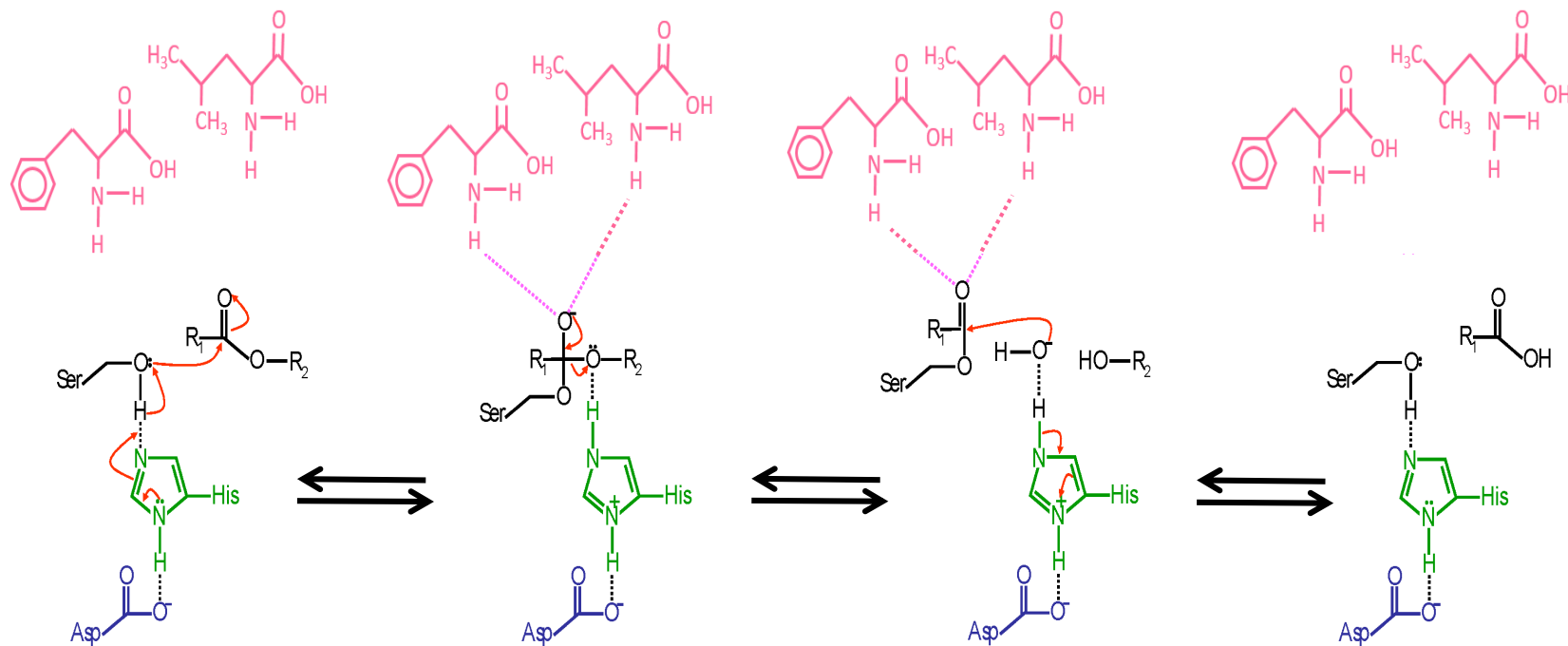


Figura 4. Mecanismo de hidrólisis del enlace éster de triglicéridos por lipasa pancreática. 1) Ataque nucleofílico del grupo hidroxilo de serina al átomo de carbono del grupo carbonilo que forma el enlace éster en TAG; 2) Formación del intermediario tetraédrico; 3) Intermediario enzima-acilo, liberación de un alcohol y ataque nucleofílico por una molécula de agua; 4) Enzima libre y ácido graso liberado. Triada catalítica Ser153, His177 y Asp263 se muestra en color negro, verde y azul, respectivamente; Residuos que forman cavidad oxianión (Phe78 y Leu174) se muestran en magenta; Molécula de sustrato y agua se presentan en negro. Modificado de Borrelli y Trono (2015).

Compuestos Fenólicos como Potenciales Inhibidores de la Lipasa Pancreática

Estudios recientes se han enfocado en destacar la capacidad de los CF para inhibir a la LP *in vitro*. McDougall *et al.* (2009) y Boath *et al.* (2012) han reportado que extractos de bayas como fresa y arándano inhibieron el 80-85% de la actividad de la LP, atribuyendo dicho efecto a CF de alto peso molecular como los elagitaninos. Sergent *et al.* (2012) en su estudio con estándares de CF, reportaron que los compuestos que mostraron ser más efectivos en la inhibición de la LP fueron EGCG, kaempferol y quercetina (IC_{50} 0.8 μ M, 13.4 μ M y 21.5 μ M, respectivamente) en comparación con orlistat[®] (IC_{50} 32 μ M). Asimismo, se ha encontrado que polímeros de floroglucinol (florotaninos) (como 7-floroeckol) y flavonas C-glicosiladas (como orientina) inhibieron la actividad de la LP a bajas concentraciones (IC_{50} 31.6 μ M y 12.7 μ M, respectivamente) (Eom *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2010). Por otro lado, Rahim *et al.* (2015) y Hu *et al.* (2015) han reportado que ácido gálico y algunos ácidos cafeoil-quínicos (como ácido 3,4-dicafeoil-quínico) inhibieron a la LP a concentraciones mayores (IC_{50} 387.2 μ M y 252 μ M, respectivamente). Aunque los estudios reportados sugieren el potencial de diferentes CF como inhibidores de la LP, los resultados no proporcionan conocimiento acerca del mecanismo de inhibición enzimática de estos compuestos.

Recientemente ha crecido el interés por explicar, desde el punto de vista cinético y molecular, el posible mecanismo de acción e interacciones que sustentan el efecto de inhibición de la LP por los CF. Por un lado, estudios cinéticos de inhibición de la LP han reportado que compuestos como EGCG, epicatequina, algunas proantocianidinas y taninos condensados actúan como inhibidores no competitivos (Oliveira *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014a; Wang *et al.*, 2014d; Wu *et al.*, 2013). También se ha visto que compuestos como cianidina-3-glucósido y ácido clorogénico inhiben de manera competitiva la actividad de la LP (Hu *et al.*, 2015; You *et al.*, 2011), mientras que compuestos como procianidinas de alto peso molecular (pentámeros) actúan como inhibidores mixtos (González-Castejón y Rodríguez-Casado, 2011). Dichos estudios sugieren que los CF

pueden inhibir la actividad de la LP mediante diferentes mecanismos cinéticos, lo cual indicaría que dichos compuestos son capaces de interactuar con esta enzima de manera específica y que dicha interacción depende en gran medida de la estructura química de cada CF.

El estudio de las interacciones entre CF y enzimas digestivas, como la LP, podría contribuir al esclarecimiento del mecanismo de inhibición y su posible significancia *in vivo*. Evidencias científicas han demostrado que los CF son capaces de interactuar con proteínas (enzimas) y que dicha interacción puede ocasionar cambios en la estructura y función de las mismas (Le Bourvellec y Renard, 2012; Ozdal *et al.*, 2013; Papadopoulou y Frazier, 2004). Estudios *in vitro* indican que los CF pueden unirse con proteínas principalmente mediante enlaces no covalentes, como interacciones hidrofóbicas que subsecuentemente son estabilizadas por puentes de hidrógeno (Frazier *et al.*, 2010; Nagy *et al.*, 2012; Yuksel *et al.*, 2010). Los enlaces no covalentes incluyen puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones iónicas e hidrofóbicas (Johnson *et al.*, 2010). Una característica de este tipo de enlaces es que son débiles en comparación con los enlaces covalentes y además son siempre reversibles (Nagy *et al.*, 2012). Sin embargo, es necesario considerar que diversos factores fisicoquímicos y estructurales afectan la afinidad, tipo, fuerza y estabilidad de dichas interacciones (Ozidal *et al.*, 2013).

En este sentido, factores como temperatura, pH, tipo, estructura y concentración de proteína en el medio de reacción, así como el tipo y estructura de los CF afectan las interacciones entre estos compuestos y las proteínas (Le Bourvellec y Renard, 2012; Ozdal *et al.*, 2013). De manera general la temperatura puede afectar los enlaces por puentes de hidrógeno y causar la formación de enlaces hidrofóbicos (Rawel *et al.*, 2005). Mientras que en algunas ocasiones el aumento de temperatura afecta tanto la cantidad máxima de sitios de unión como la afinidad de interacción CF-proteína, en otras ocasiones la temperatura puede favorecerla (Rawel *et al.*, 2005). Respecto al pH, por un lado, se ha visto que existe una interacción más fuerte a valores de pH cercanos al punto isoeléctrico

de las proteínas, ya que su disociación promueve un mayor número de puntos de unión a estas condiciones (Le Bourvellec y Renard, 2012). Por otro lado, las posibles interacciones también dependen del pH al que los CF sean estables, lo cual determinará el tipo de enlaces que se formarán entre estas moléculas. De igual manera, las características particulares de cada proteína como hidrofobicidad, punto isoeléctrico, estructura y composición de aminoácidos determina la afinidad y por tanto el tipo de asociaciones que los CF puedan tener hacia estas macromoléculas (Papadopoulou y Frazier, 2004). Asimismo, la concentración molar proteína/CF afecta las interacciones, puesto que generalmente, a mayor concentración de proteína, las interacciones son menores (Ozidal *et al.*, 2013).

De igual forma, el tipo y estructura de los CF juegan un papel importante en las interacciones CF-proteína (Jakobek, 2015). Algunos de los elementos estructurales que influyen en la afinidad de los CF por las proteínas son: 1) peso molecular (Frazier *et al.*, 2010), el cual se ha descrito debe ser lo suficientemente pequeño para penetrar las regiones interfibrilares de las proteínas, pero a su vez lo suficientemente grandes como para entrecruzar cadenas peptídicas en más de un punto (Mulaudzi *et al.*, 2012); 2) el número y posición de los grupos hidroxilo en la estructura de los CF favorece su interacción con las proteínas, no siendo así cuando dichos grupos funcionales se encuentran metilados o glicosilados (Hasni *et al.*, 2011) y, 3) la presencia de grupos galactosil en los CF favorece la afinidad de interacción (Xiao *et al.*, 2013a).

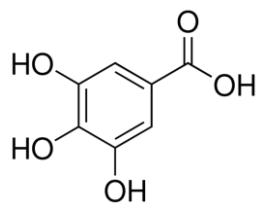
En este contexto, dada la diversidad y complejidad de factores que afectan las interacciones CF-proteína y por tanto su mecanismo de inhibición, es importante investigar a mayor profundidad cómo se da dicha interacción. Esto constituye un paso importante para elucidar el efecto de los CF en la digestión de lípidos (inhibición de la LP) y su posible significancia *in vivo*, para su uso como terapia natural en la prevención y tratamiento de la obesidad.

Compuestos Fenólicos de Mango como Modelo de Estudio para la Inhibición de la Lipasa Pancreática

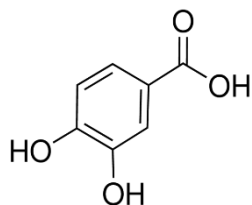
El mango (*Mangifera indica* L.) es un fruto tropical cultivado en todo el mundo con excelente valor nutricional. Es una fuente rica de fibra dietaria, vitamina C y compuestos bioactivos, entre los que destacan los CF (Wall-Medrano *et al.*, 2014). Se ha reportado que la pulpa de este fruto presenta altas concentraciones de ácidos fenólicos, galotaninos y mangiferina. Por un lado, en la cáscara y semilla del fruto se han identificado compuestos tales como xantona-C-glucósidos, galotaninos, benzofenonas, glucósidos de flavonol y 5-alquenilresorcinoles (Manthey y Perkins-Veazie, 2009). El mango cultivar 'Ataulfo' es una de las principales variedades cultivadas en México y se ha reportado que éste presenta el más alto contenido de CF y capacidad antioxidante respecto a otras variedades tales como Kent, Tommy Atkins, Keitt y Heiden (Manthey y Perkins-Veazie, 2009).

Estudios recientes reportan la composición de CF de pulpa y cáscara de mango cv. 'Ataulfo'. Manthey y Perkins-Veazie (2009) encontraron que en pulpa existe una concentración de fenoles totales de hasta 107 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de peso fresco, una concentración de galotaninos hasta de 708 mg/100 g de peso fresco, mangiferina hasta 996.1 µg/g de peso fresco y ácido elágico hasta 187.1 µg/g de peso fresco. Asimismo, Palafox-Carlos *et al.* (2012) identificaron y cuantificaron los CF mayoritarios en pulpa de mango, los cuales son ácidos fenólicos clorogénico, gálico, vanílico y protocateico. Las concentraciones reportadas por cada 100 g de peso seco de pulpa de mango en el estado de madurez 4 fueron: 301 mg (ácido clorogénico), 98.7 mg (ácido gálico), 24.4 mg (ácido vanílico) y 1.1 mg (ácido protocateico). Por otro lado, Sáyago-Ayerdi *et al.* (2013) en su estudio con cáscara de mango de la misma variedad, identificaron galotaninos de alto peso molecular que van desde unidades penta hasta trideca-O-galoilglucosa.

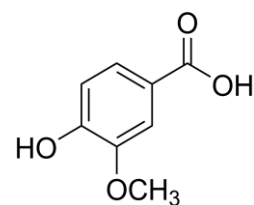
Diversos efectos benéficos a la salud se han asociado al consumo de CF encontrados en mango. Estudios *in vivo* hechos recientemente han demostrado que el consumo de mango tiene un efecto en la reducción de la concentración de lípidos en sangre, así como en la reducción de la grasa corporal. Robles-Sánchez *et al.* (2011) estudiaron el efecto de la suplementación con mango entero y fresco cortado a individuos normolipidémicos por 30 días. Encontraron que los triglicéridos séricos fueron significativamente reducidos, un 37% debido al efecto del mango entero y un 38% al mango fresco cortado. Lucas *et al.* (2011) en su estudio con ratones suplementados con una dieta rica en lípidos encontró que al incluir pulpa de mango en la dieta (1-10%) redujo la grasa corporal. Estos estudios sugieren que el consumo de mango podría tener un efecto en la prevención y tratamiento de la obesidad, lo cual puede deberse a los CF presentes en el mismo. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de los CF mayoritarios identificados en pulpa y cáscara de mango 'Ataulfo' como inhibidores de la actividad de la lipasa pancreática (Figura 5).



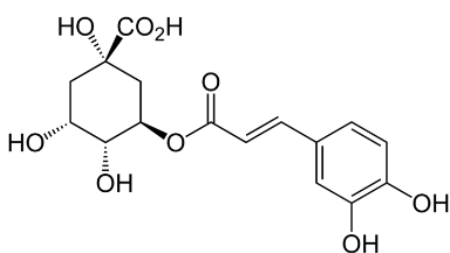
Ácido gálico



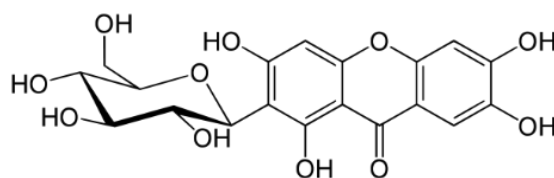
Ácido protocateico



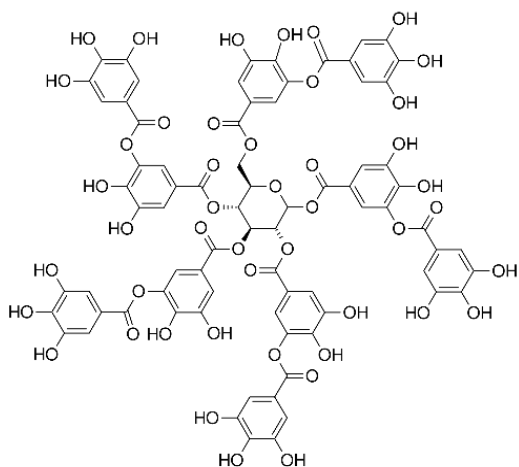
Ácido vanílico



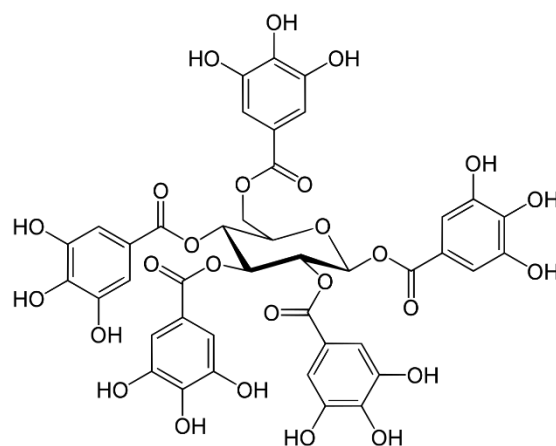
Ácido clorogénico



Mangiferina



Ácido tánico



Penta-O-galoil-β-D-glucosa

Figura 5. Estructuras químicas de los principales compuestos fenólicos identificados en pulpa y cáscara de mango cv. 'Ataulfo'.

HIPÓTESIS

Los compuestos fenólicos de mango cv. 'Ataulfo' inhiben la actividad de la lipasa pancreática porcina, al interaccionar con la enzima y ocasionar un cambio en su conformación.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de los compuestos fenólicos de mango cv. 'Ataulfo', sobre la inhibición de la lipasa pancreática porcina y el mecanismo mediante el cual su actividad disminuye.

Objetivos Específicos

1. Evaluar el potencial de los compuestos fenólicos de pulpa y cáscara de mango cv. 'Ataulfo', como inhibidores de la actividad de la lipasa pancreática porcina.
2. Determinar el mecanismo cinético de los compuestos fenólicos con mayor inhibición de la actividad de la lipasa pancreática porcina.
3. Determinar el efecto de los compuestos fenólicos de pulpa y cáscara de mango cv. 'Ataulfo', sobre la estructura terciaria (conformación) de la lipasa pancreática porcina.
4. Modelar las posibles interacciones entre la lipasa pancreática porcina y los compuestos fenólicos de mango cv. 'Ataulfo', que presentaron la mayor inhibición de la actividad enzimática, de acuerdo a su mecanismo cinético de inhibición.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Los reactivos lipasa pancreática porcina Tipo II (L3126), *p*-nitrofenil laurato (*p*-NFL), ácido tánico (AT), penta-1,2,3,4,6-*O*-galoil- β -D-glucosa (PGG), 1,3,6,7-Tetrahidroxixantona C₂- β -D-glucocósido (mangiferina, MG), ácido gálico (AG), ácido clorogénico (AC), ácido protocateico (AP), ácido vanílico (AV), tetrahidrolipstatina (orlistat[®]), dimetilsulfóxido (DMSO), base Tris, clorhidrato Tris y albúmina de suero bovino (BSA) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MI, EUA). El reactivo de Bradford (azul de Coomassie) fue adquirido en Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). Alcohol etílico absoluto anhidro fue adquirido en J.T. Baker. La preparación del buffer se realizó con agua ultrapura Milli-Q (Merk Millipore, Billerica, MA, EUA).

Preparación del Extracto Enzimático de Lipasa Pancreática Porcina

El extracto enzimático se preparó a partir de lipasa pancreática porcina tipo II de acuerdo al método de Mohammad *et al.* (2013) con algunas modificaciones. Se pesaron 110 mg de lipasa pancreática porcina comercial, se dispersaron en 10

mL de buffer Tris-HCl 2.5 mM, pH 7.5, con NaCl 2.5 mM y se colocaron en una placa magnética con agitación suave durante 15 min a 4°C. La solución resultante se centrifugó a 15,000 x *g* por 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Dicho sobrenadante representa el extracto enzimático que contiene a la lipasa pancreática, el cual fue utilizado para los ensayos subsecuentes. Cada extracto enzimático se preparó en fresco para cada ensayo y se le determinó el contenido de proteína total por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando BSA (1 mg mL⁻¹) como proteína estándar.

Preparación del Sustrato para la Actividad de Lipasa Pancreática

El sustrato *p*-nitrofenil laurato se disolvió en alcohol etílico absoluto anhidro. El porcentaje en volumen de sustrato presente en la mezcla de reacción fue de 0.5%.

Preparación de las Soluciones de los Compuestos Inhibidores

Los estándares de los compuestos fenólicos y orlistat[®] (control positivo) se disolvieron en DMSO. El porcentaje en volumen de la solución del compuesto inhibidor presente en la mezcla de reacción fue de 2%.

Determinación de la Actividad de Lipasa Pancreática

La actividad de lipasa se midió por el método espectrofotométrico que monitorea la formación de *p*-nitrofenol ($\epsilon_{410 \text{ nm}} = 11.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como producto de la hidrólisis del sustrato *p*-nitrofenil laurato, por acción de la lipasa (Kademi *et al.*, 2000; Mohammad *et al.*, 2013). Para ello, se montaron reacciones de 1 mL de

volumen final, en donde 100 μL del extracto enzimático ($125 \mu\text{g mL}^{-1}$ en la mezcla de reacción) y 20 μL de DMSO se pre-incubaron en buffer Tris-HCl (2.5 mM, pH 7.5, con NaCl 2.5 mM), por 5 min en un baño de agua a 37°C . Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 5 μL de *p*-nitrofenil laurato ($50 \mu\text{M}$ en la mezcla de reacción) para iniciar la reacción. La actividad de lipasa se midió a 410 nm durante 7 min a 37°C , contra un blanco sin enzima para monitorear la auto-hidrólisis del sustrato. Las reacciones se realizaron en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud de paso de luz con un espectrofotómetro de UV Cary-50 (Varian) equipado con un sistema Peltier para el control de temperatura. La actividad total de lipasa se calculó mediante la ecuación 1, donde una unidad de actividad de lipasa se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol de *p*-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de ensayo.

Ensayo de Inhibición de la Actividad de Lipasa Pancreática por Compuestos Fenólicos

Se utilizó como base el ensayo enzimático para la determinación de la actividad de lipasa descrito anteriormente. El volumen de reacción total fue de 1 mL, en donde 100 μL del extracto enzimático ($125 \mu\text{g mL}^{-1}$ en la mezcla de reacción) y 20 μL de la solución del compuesto fenólico se pre-incubaron en buffer Tris-HCl (2.5 mM, pH 7.5, con NaCl 2.5 mM), por 5 min en un baño de agua a 37°C . Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 5 μL de *p*-nitrofenil laurato ($50 \mu\text{M}$ en la mezcla de reacción) para iniciar la reacción. Los compuestos fenólicos AT, PGG y MG se evaluaron en un rango de concentración de 10 a 200 μM ; mientras que AG, AC, AP y AV se evaluaron en un rango de 50 a 500 μM . Como control positivo se evaluó orlistat[®], en un rango de concentración de 0.005 a 0.4 μM . De cada reacción se calculó la actividad total de lipasa mediante la ecuación 1. Posteriormente, el porcentaje de actividad residual de lipasa se determinó considerando la actividad total de lipasa sin inhibidor como 100%, y se le restó la actividad total del ensayo con compuesto fenólico u orlistat[®] a cada

concentración evaluada. Los datos experimentales se midieron por triplicado y en los casos donde el comportamiento de éstos lo permitió, se calculó la concentración inhibitoria media (IC₅₀) mediante el ajuste de los datos a un modelo de dosis-respuesta por regresión no lineal utilizando el software GraFit Versión 7.0.3 (Erithacus Software, Ltd. Horley U.K.) (Leatherbarrow, 2010).

$$Actividad\ total = m \left[\frac{volúmen\ total\ en\ reacción}{(\epsilon)(volúmen\ de\ sustrato\ en\ reacción)(longitud\ de\ paso\ de\ luz\ en\ celda)} \right] \quad (1)$$

Donde:

Actividad enzimática total está dada en $\mu\text{mol de } p\text{-nitrofenol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$

m es la pendiente del segmento lineal de absorbancia vs tiempo a los 5 min

Volumen total en reacción es 1 mL

ϵ es el coeficiente de extinción molar de *p*-nitrofenol $11.8 \mu\text{mol mL}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Volumen de sustrato en reacción es 5×10^{-3} mL

Longitud de paso de luz en celda es 1 cm

Cinética de Inhibición de la Lipasa por Compuestos Fenólicos

Como etapa subsecuente, se realizaron ensayos cinéticos en presencia de los dos compuestos fenólicos que resultaron ser los mejores inhibidores, con el fin de determinar su mecanismo de inhibición. Los parámetros cinéticos (K_m y V_{max}) de la lipasa en ausencia y presencia de los compuestos fenólicos se obtuvieron midiendo la actividad enzimática de la lipasa como se describió anteriormente. Se variaron las concentraciones de sustrato y se utilizaron dos concentraciones fijas de los compuestos fenólicos a evaluar. Las concentraciones de sustrato utilizadas fueron 5 μM , 10 μM , 30 μM y 50 μM en la mezcla de reacción. Los compuestos fenólicos evaluados fueron AT y PGG. Ambos fueron ensayados

individualmente a dos concentraciones fijas, seleccionando aquellas que presentaron el 40% y 60% de inhibición de actividad de lipasa, de acuerdo al ajuste al modelo de dosis-respuesta (Copeland, 2000). Dichas concentraciones fueron 25 μM y 50 μM para AT, y 60 μM y 100 μM para PGG. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, teniendo un blanco para cada concentración de sustrato utilizada.

Para su análisis, los datos experimentales se ajustaron a un modelo no lineal aplicando la ecuación básica de cinética enzimática de Michaelis-Menten (ecuación 2) para el cálculo de K_m , $K_{m\text{ ap}}$, V_{max} , $V_{\text{max ap}}$, y posteriormente éstos se transformaron mediante el ajuste a la ecuación de Lineweaver-Burk (ecuación 3). El tipo de inhibición se determinó mediante el análisis del gráfico de Lineweaver-Burk (dobles recíprocos) y observando el patrón y punto de intersección de las líneas. Para el cálculo de K_i , se graficaron los interceptos en el eje y ($1/V_{\text{max } i}$) del gráfico de dobles recíprocos versus la concentración del compuesto fenólico. Los análisis fueron hechos mediante el software GraFit Versión 7.0.3 (Erithacus Software Ltd., Horley U.K) (Leatherbarrow, 2010).

$$v = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\text{max}}} \quad (3)$$

Donde:

v representa la velocidad inicial de reacción, la cual fue calculada de acuerdo a la ecuación 1

V_{max} es la velocidad máxima de reacción enzimática

K_m representa la constante de Michaelis-Menten y a su vez es la constante de afinidad por el sustrato

S es la concentración de sustrato en reacción

Titulación por Fluorescencia

Con el propósito de evaluar las posibles interacciones CF-lipasa y su efecto en la conformación de la enzima se realizaron experimentos de fluorescencia. En dichos ensayos se monitoreó el opacamiento de la fluorescencia intrínseca y el cambio en el centro espectral de masas de lipasa o corrimiento de su espectro de emisión en presencia de compuestos fenólicos como ligandos. La metodología utilizada fue la descrita por Wu *et al.* (2014) con algunas modificaciones y tomando como base la mezcla de reacción establecida en los ensayos de inhibición.

Para ello, se utilizó lipasa pancreática porcina (125 $\mu\text{g/mL}$) en complejo con 50 μM de *p*-nitrofenil laurato en buffer de trabajo (Tris-HCl 2.5 mM, pH 7.5, con NaCl 2.5 mM). La fluorescencia se monitoreó en ausencia y presencia de los compuestos fenólicos como ligandos. Los compuestos se ensayaron en un rango de concentración de 2 a 100 μM para AT y PGG; 10 a 200 μM para MG y AC; y de 50 a 500 μM para AG y AP. Cada muestra se preparó de forma independiente en microtubos, en un volumen final de 1 mL y se incubó por 1 h en un baño de agua a 37 °C y en oscuridad. De la misma forma, se colectó el espectro de los componentes sin la enzima para corregir la línea base. Las muestras se excitaron a 295 nm y la emisión se colectó desde 300 a 500 nm. Las titulaciones se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro QM-2003 (Photon Technology Int.) con una celda de cuarzo cuadrada de paso de luz de 10 mm tanto en la orientación de

excitación como de emisión. Cada espectro se colectó con una repetición, con un tiempo de integración de 0.25 s cada 1 nm.

Para su análisis, los espectros colectados se ordenaron en una hoja de cálculo y se sustrajo la línea base correspondiente para cada uno. Posteriormente se suavizaron por el método de Savitzky y Golay (1964) a nueve puntos vecinos en el software GraphPad Prism versión 5.0.0 (La Jolla, CA, EUA). Para analizar los posibles cambios en la estructura terciaria de la enzima por efecto de interacción con los compuestos fenólicos evaluados, se realizó el cálculo de los centros espectrales de masa de fluorescencia (longitud de onda de emisión promedio) aplicando la ecuación 4 (Ayala-Castro y Valenzuela-Soto, 2007; Dev *et al.*, 2006). Un cambio en el centro espectral de masa de la proteína mayor a 3 nm indica una modificación en la estructura terciaria de la misma, mientras que la dirección de dicho cambio indica el estado de plegamiento de la proteína.

$$\text{Centro espectral de masas } (\lambda \text{ promedio}) = \frac{\sum \lambda I}{\sum I} \quad (4)$$

Donde:

λ es cada longitud de onda de emisión en ausencia y presencia de cada concentración de ligando (300 a 500 nm)

I es la intensidad de fluorescencia a cada longitud de onda de emisión

Anclaje Molecular *In Silico* (Docking) de la Lipasa Pancreática Porcina con Compuestos Fenólicos Inhibidores

En este trabajo se utilizó anclaje molecular *in silico* (*docking*) para analizar los posibles sitios de interacción lipasa-compuestos fenólicos y dar un acercamiento a la explicación molecular del mecanismo cinético de inhibición determinado

experimentalmente. Como receptor se utilizó la estructura cristalográfica del complejo triacilglicerol lipasa-colipasa porcina en su conformación catalíticamente activa, o abierta (PDB 1ETH) (Hermoso *et al.*, 1996) y como ligandos se ensayaron ácido tánico (PubChem CID 16129778) y penta-1, 2, 3, 4, 6-O-galoil- β -D-glucosa (PubChem CID 65238). El proceso de *docking* fue llevado a cabo en el software MOE (Molecular Operating Environment) versión 2013.08 (Chemical Computing Group, Inc., Montreal, QC, Canada), ejecutado en el sistema operativo Mac OSX.

Previo al análisis se prepararon el receptor y los ligandos. Para ello, se definió como receptor al complejo lipasa-colipasa (heterodímero) y éste se optimizó para determinar el más bajo potencial de energía global para los diferentes grupos químicos ionizables de sus cadenas laterales. Posteriormente, se identificaron las cavidades y posibles sitios de unión de los ligandos en la proteína. La cavidad para el *docking* fue determinada después de analizar las dimensiones, carga electrostática y sitios de contacto comprendidos acordes con el mecanismo cinético de inhibición determinado experimentalmente. El sitio utilizado para el anclaje molecular fue la región de la interface entre dominios C, N y lid de la lipasa en contacto con la colipasa. La cavidad se definió seleccionando manualmente los residuos de aminoácidos cuyas cadenas laterales se encontraron expuestas al solvente en dicha cavidad. Por otro lado, la preparación de los ligandos consistió en la asignación de cargas parciales por el método PEOE (Gómez-Zaleta *et al.*, 2008) y la generación sistemática de conformaciones distintas de baja energía para cada molécula (confórmeros).

El *docking* se llevó a cabo bajo el protocolo de ajuste inducido, en donde las cadenas del receptor pueden moverse durante el refinamiento de las poses del ligando. La colección de poses u orientaciones en el sitio para cada uno de los confórmeros de cada molécula fue por el método del triángulo alfa. En esta etapa se seleccionaron las mejores 30 poses en base al puntaje (en kcal/mol) obtenido por la función de London ΔG , donde un puntaje más bajo indica una pose más favorable. La función London ΔG hace una estimación de la energía libre de

unión del ligando dada una pose. Cada una de las poses resultantes de la primera etapa se sometieron a un refinamiento a través de una minimización de energía de la pose del ligando en el sitio, bajo el esquema de campo de fuerza. Durante esta minimización el sitio de unión del receptor se mantuvo rígido, permitiendo el movimiento exclusivamente a los átomos de ligando. Para el refinamiento se seleccionaron 30 poses en base a los puntajes menores obtenidos por la función del ΔG de afinidad, que estima la contribución entálpica de la energía libre de unión de los contactos del ligando en la cavidad. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada ligando y posteriormente los resultados se analizaron de acuerdo al puntaje obtenido, al ajuste del ligando dentro de la cavidad, y a la redundancia de poses entre repeticiones experimentales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inhibición de Actividad de Lipasa Pancreática por Compuestos Fenólicos

Los estudios de inhibición de la actividad de lipasa pancreática fueron hechos con el fin de evaluar la capacidad de estándares de CF identificados en pulpa y cáscara de mango cv. 'Ataulfo' como inhibidores de esta enzima. También, estos estudios fueron utilizados para identificar y seleccionar a los mejores compuestos inhibidores y proseguir con su evaluación en las etapas subsecuentes de este trabajo. Los compuestos fenólicos evaluados fueron AG, AC, AP y AV, identificados en pulpa, y AT, PGG y MG, identificados en cáscara de mango cv. 'Ataulfo'.

La Figura 6 muestra el efecto de los compuestos fenólicos presentes en pulpa de mango en la actividad de LP porcina. En general, se observó que estos compuestos inhibieron mínimamente la actividad enzimática al aumentar su concentración en el medio de reacción. AG y AC redujeron el 60% de la actividad de lipasa a su máxima concentración ensayada (500 μM), mientras que a las mismas condiciones, AP y AV redujeron el 30% de la actividad enzimática. Es por ello que, en el intervalo de concentraciones evaluadas, no fue posible determinar la concentración inhibitoria media de ninguno de estos compuestos, por lo que se estima que esta podría ser mayor a 500 μM (Cuadro 2). Resultados similares fueron encontrados por Hu *et al.* (2015), Kwon *et al.* (2013), Lee *et al.* (2010) y Rahim *et al.* (2015), quienes evaluaron el efecto de compuestos fenólicos de bajo peso molecular en la actividad de LP. Dentro de los resultados

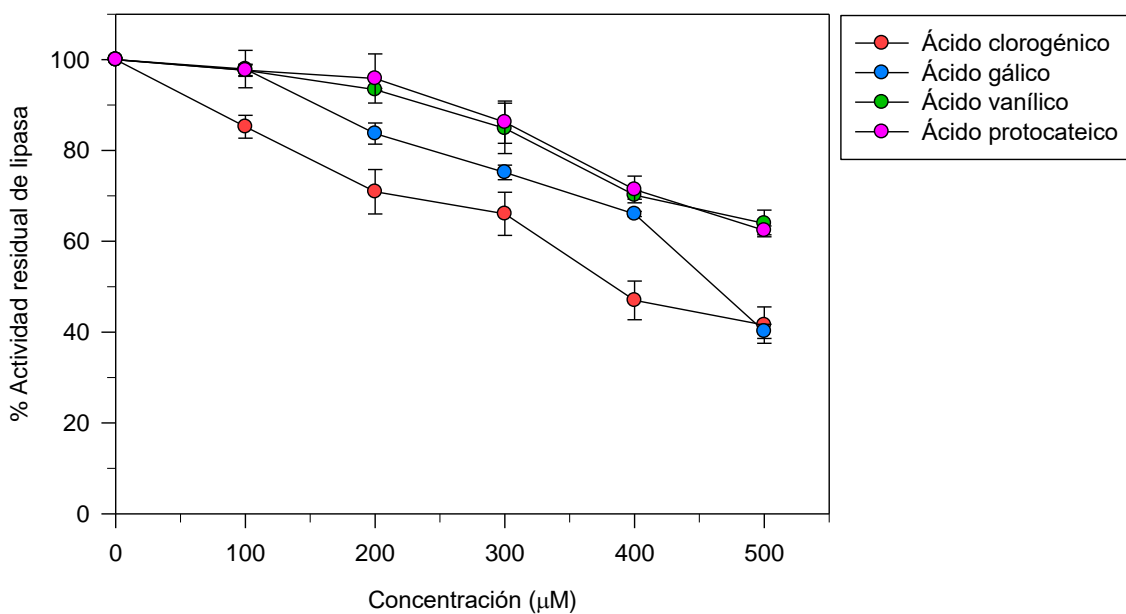


Figura 6. Inhibición de la actividad de lipasa pancreática porcina en presencia de compuestos fenólicos de pulpa de mango cv. 'Ataulfo'. Los resultados se representan como el promedio \pm desviación estándar (DE) de 3 ensayos independientes, teniendo cada uno tres réplicas por concentración evaluada.

Cuadro 2. Concentración inhibitoria media (IC₅₀) de la actividad de lipasa pancreática porcina por compuestos fenólicos de mango cv. Ataulfo y orlistat[®].

Compuesto	IC₅₀ (μM)
Ácido tánico	22.40 ± 2.03
Penta-O-galoil-β-D-glucosa	64.59 ± 2.03
Mangiferina	144.33 ± 4.90
Ácido clorogénico	> 400 ND
Ácido gálico	> 400 ND
Ácido protocateico	> 500 ND
Ácido vanílico	> 500 ND
Orlistat [®]	0.028 ± 0.002

Las concentraciones inhibitorias medias fueron calculadas a partir del ajuste de los datos al modelo de dosis-respuesta. Los resultados se representan como el promedio ± DE de 3 ensayos independientes, teniendo cada uno 3 réplicas por concentración evaluada.

ND IC₅₀ no determinado por falta de ajuste de los datos al modelo de dosis-respuesta.

más relevantes, dichos autores encontraron que ácidos fenólicos como gálico, clorogénico y ferúlico inhibieron el 50% de la actividad de LP a concentraciones altas de 414.5 μM , 1100 μM y 5030 μM , respectivamente.

La Figura 7 muestra el efecto de los compuestos fenólicos de cáscara de mango y el control positivo orlistat[®] en la actividad de LP. En general, se observó que AT, PGG y MG inhibieron la actividad de LP a manera dosis dependiente. Estos compuestos llegaron a disminuir la actividad enzimática en un 90%, 80% y 60%, respectivamente, a su máxima concentración en el medio de reacción (200 μM). Con ello, fue posible determinar la concentración inhibitoria media de cada uno mediante el ajuste al modelo de dosis-respuesta (Cuadro 2). Los IC_{50} calculados indican que AT y PGG fueron los compuestos fenólicos más efectivos como inhibidores de la actividad de LP, con IC_{50} 22.40 \pm 2.03 μM y de 64.59 \pm 2.03 μM , respectivamente, seguidos de MG (144.33 \pm 4.90 μM). Comparado con orlistat[®] (IC_{50} 0.028 \pm 0.002 μM), estos compuestos mostraron menor efectividad, pudiendo deberse a diferencias en estructura, especificidad y afinidad hacia la enzima. Sin embargo, dado que AT y PGG actúan como inhibidores de la LP a baja concentración micromolar, esto sugiere que su acción inhibitoria podría deberse a interacciones moleculares específicas con esta enzima (Danielson, 2015; Gyémánt *et al.*, 2009).

Los reportes en la literatura respecto a la inhibición de lipasa por este tipo de compuestos son escasos. Kwon *et al.* (2013), en su trabajo con los galotaninos 2-O-Digaloil-1,3,4,6-tetra-O-galoil- β -D-glucosa y 1,2,3,4,6-Penta-O-galoil- β -D-glucosa inhibieron eficazmente la actividad de LP, mostrando valores de IC_{50} de 3.5 \pm 0.5 μM y 15.9 \pm 1.0 μM , respectivamente. Por otro lado, Lei *et al.* (2007) reportaron que ácido tánico aislado de extracto de granada fue capaz de inhibir la actividad de LP a manera dosis dependiente, mostrando 99% de inhibición a 58.7 μM . Aunado a lo anterior, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que AT y PGG podrían ser más efectivos en la inhibición de la LP que

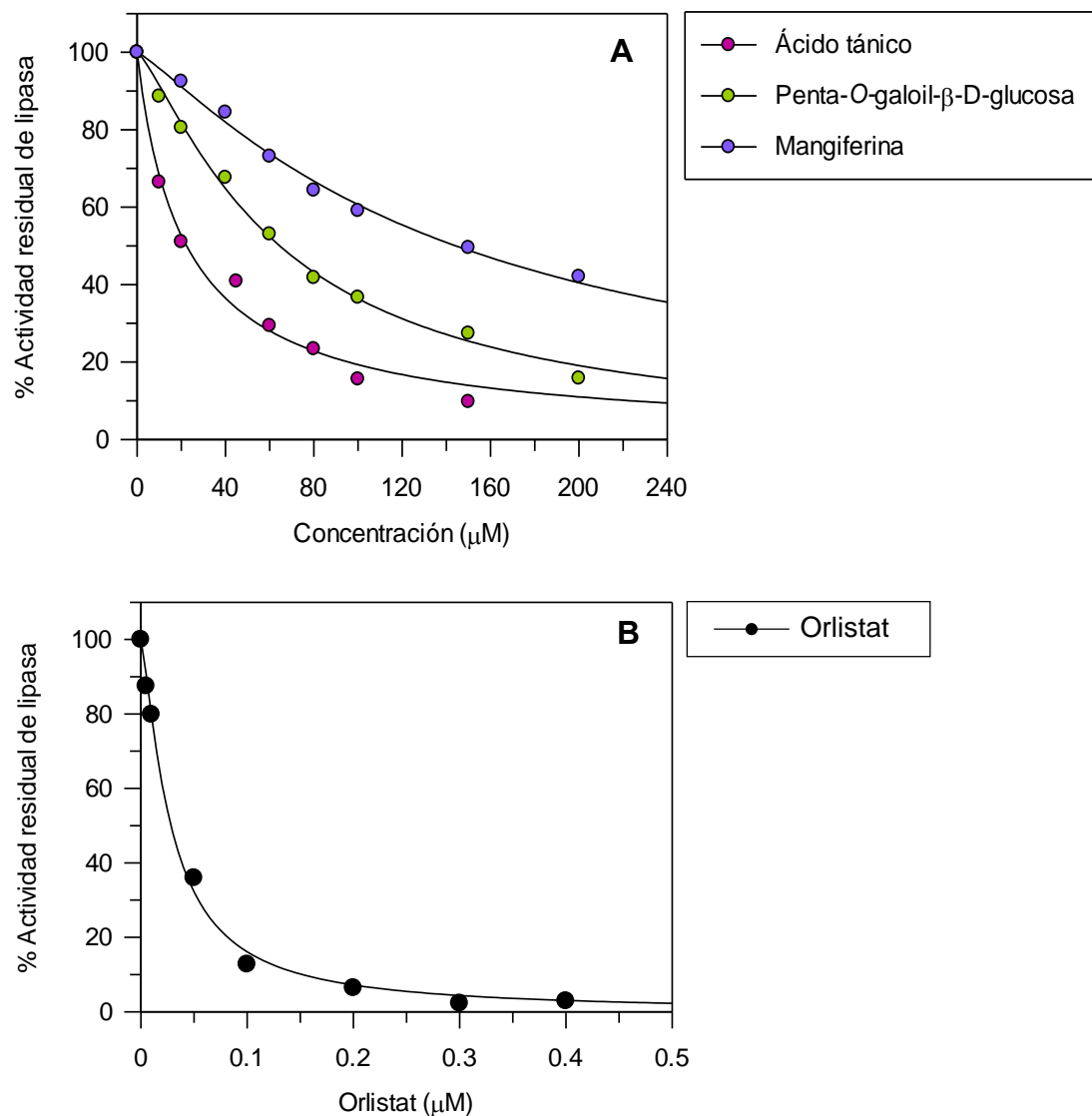


Figura 7. Inhibición de la actividad de la lipasa pancreática porcina en presencia de (A) compuestos fenólicos de cáscara de mango cv. ‘Ataulfo’ y (B) orlistat[®]. Diagramas de dosis-respuesta para el cálculo de la concentración inhibitoria media (IC₅₀). Los resultados se representan como el promedio ± DE de 3 ensayos independientes, teniendo cada uno 3 réplicas por concentración evaluada.

compuestos fenólicos presentes en té verde, como galato de epigalocatequina, el cual se ha reportado que llega a inhibir hasta un 33% la actividad de LP a 1.75 mM (Wu *et al.*, 2013). Tanto lo observado en el presente trabajo, como lo reportado por los autores citados, sugiere el potencial de CF de alto peso molecular, tales como galotaninos, como inhibidores eficaces de la LP.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que existe una relación entre la estructura de los CF y la capacidad de inhibir la actividad de LP. Ozdal *et al.* (2013) y Jakobek (2015) han reportado que la estructura y peso molecular de los CF juega un papel importante en las interacciones entre estos y proteínas, lo cual podría correlacionarse con su capacidad para inhibir la actividad de algunas enzimas. En este contexto, los autores han señalado que elementos estructurales de los CF como: 1) peso molecular; 2) flexibilidad estructural; 3) la presencia del grupo galoil y, 4) el número y posición de sus grupos hidroxilo en su estructura, son importantes para su interacción con proteínas.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad de compuestos fenólicos de diferentes clases, tales como taninos hidrolizables, ácidos fenólicos y xantona para inhibir la actividad de LP. De acuerdo a su efectividad como inhibidores de la LP, los compuestos evaluados se ordenan de manera descendente AT > PGG > MG > AC > AG > AP > AV. Los resultados sugieren que la inhibición de la LP fue favorecida por CF de alto peso molecular, con mayor flexibilidad estructural y que contienen un mayor número de grupos galoil e hidroxilo en su estructura, características presentes en AT y PGG (Dobrevá *et al.*, 2014; Frazier *et al.*, 2010; Hasni *et al.*, 2011; Mulaudzi *et al.*, 2012).

Por el contrario, se observó que los compuestos de menor peso y flexibilidad molecular, menor número de grupos hidroxilo, glicosilación o metoxilación en su estructura son características que influyeron de manera negativa en su capacidad para inhibir la actividad de LP, como se observó en MG, AC, AG, AP y AV (Xiao *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2011a). Aunado a lo anterior, es necesario considerar que otros elementos como el tipo y estructura de la proteína, así como temperatura y pH del medio de reacción influyen de manera importante en la

inhibición enzimática (Le Bourvellec y Renard, 2012). De esta manera, los compuestos fenólicos aquí evaluados podrían presentar diferente afinidad hacia otras proteínas dependiendo de los factores descritos, es decir, para unas proteínas podrían actuar como inhibidores efectivos, mientras que para otras no.

Cinética de Inhibición de la Lipasa Pancreática por Compuestos Fenólicos

Se realizaron ensayos cinéticos de inhibición de la LP en presencia de AT y PGG, compuestos fenólicos que mostraron inhibir eficazmente la actividad enzimática, a fin de determinar su mecanismo de inhibición. Los ensayos cinéticos de inhibición de la LP se realizaron variando la concentración de sustrato y CF a evaluar, respectivamente, teniendo como control la cinética de la LP en ausencia de inhibidor. La Figura 8 muestra el ajuste no lineal de las velocidades iniciales (v_0) *versus* [*p*-nitrofenil laurato], en ausencia y presencia de AT y PGG, respectivamente, donde se observó que la LP porcina siguió el comportamiento de una cinética de Michaelis-Menten. A partir del ajuste de los datos al modelo no lineal, se calcularon las constantes cinéticas K_m , $K_{m\ ap}$, V_{max} y $V_{max\ i}$ de la LP porcina en ausencia y presencia de AT y PGG a cada concentración ensayada. La determinación de los parámetros cinéticos de estado estacionario es importante para conocer el mecanismo de inhibición enzimática que siguieron los compuestos evaluados.

Los valores calculados de las constantes cinéticas se muestran en el Cuadro 3, donde se observa que tanto K_m como V_{max} de la LP disminuyeron al aumentar la concentración de AT y PGG en el medio de reacción. El efecto de AT y PGG en las constantes cinéticas de la LP se muestra en los gráficos de Lineweaver-Burk (Figuras 9A y 10A). El análisis de los gráficos mostró, para ambos compuestos, un patrón de líneas paralelas respecto a la cinética control de la LP, lo cual es consistente con los valores aparentes de K_m y V_{max} . Este comportamiento sugiere

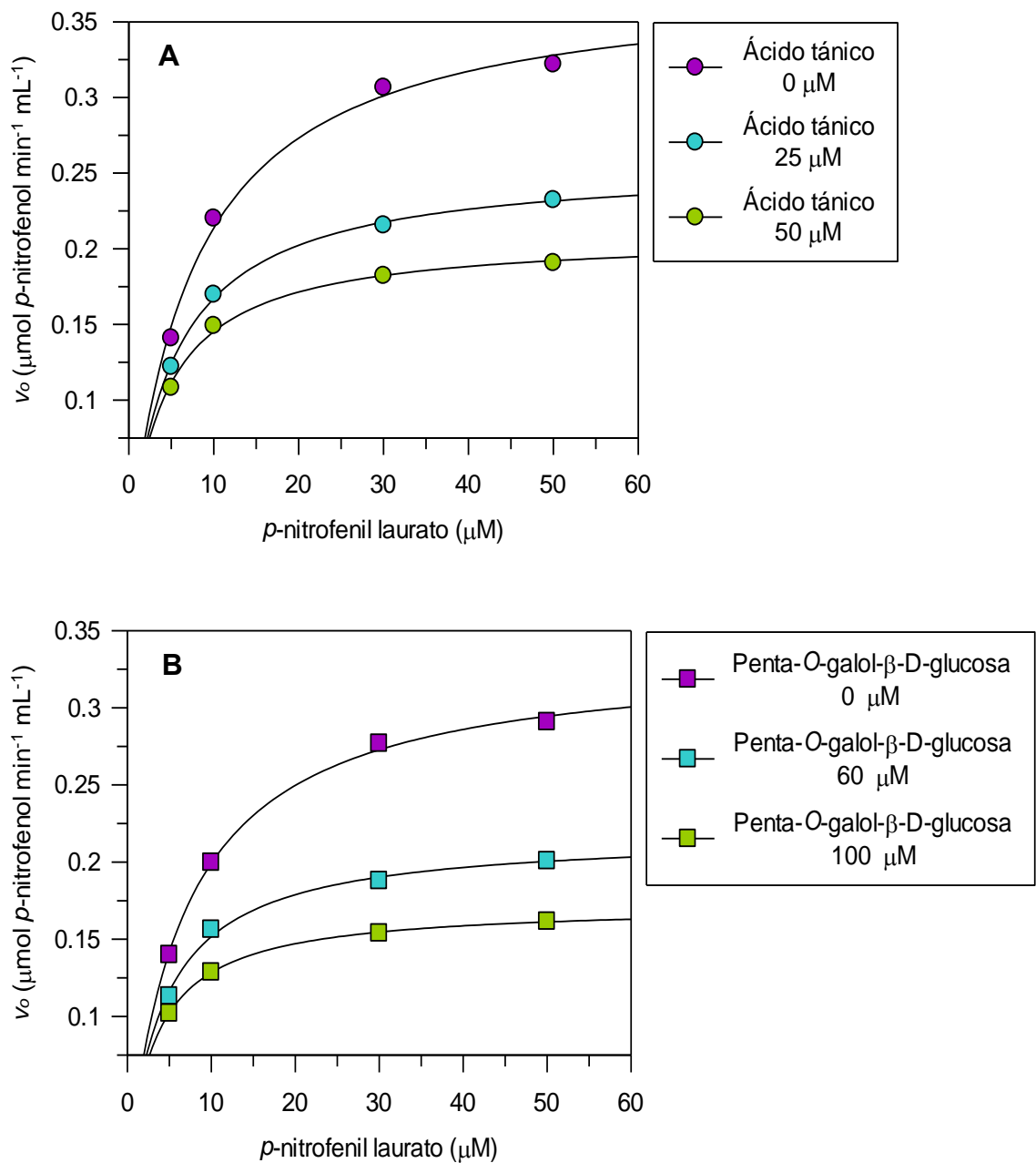


Figura 8. Gráfico de Michaelis-Menten de la cinética de inhibición de la lipasa pancreática porcina en presencia de A) ácido tánico y B) penta-O-galoil- β -D-glucosa. Cada punto representa el promedio \pm DE de 3 ensayos independientes, teniendo cada uno 3 réplicas por concentración evaluada.

Cuadro 3. Parámetros cinéticos aparentes de la lipasa pancreática porcina en presencia de ácido tánico (AT) y penta-*O*-galoil- β -D-glucosa (PGG).

Inhibidor	Concentración (μM)	K_m (μM)	V_{\max} ($\mu\text{mol } p\text{-nitrofenol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$)	K_i (μM)
AT	0 (control)	7.72 ± 0.90	0.38 ± 0.013	
	25	5.34 ± 0.28	0.26 ± 0.003	0.018 ± 0.002
	50	4.39 ± 0.37	0.21 ± 0.004	
PGG	0 (control)	6.79 ± 0.40	0.33 ± 0.005	
	60	4.38 ± 0.43	0.22 ± 0.005	0.009 ± 0.000
	100	3.43 ± 0.06	0.17 ± 0.0007	

Los valores fueron calculados a partir del ajuste de los datos al modelo no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten. Los valores representan el promedio \pm DE de 3 ensayos independientes, teniendo cada uno 3 réplicas por concentración evaluada.

que el mecanismo de inhibición de la LP que siguieron AT y PGG fue de tipo incompetitivo (Segel, 1993). Este tipo de inhibición enzimática se caracteriza en que el inhibidor (I) se une de manera reversible sólo al complejo enzima-sustrato (ES) y no a la enzima libre (E), dando como resultado la formación del complejo ternario enzima-sustrato-inhibidor (ESI), el cual es catalíticamente inactivo (Segel, 1993).

A la par, se realizó el cálculo de la constante de disociación/inhibición (K_i) para AT y PGG mediante los gráficos secundarios de $1 / V_{max\ i}$ versus [AT] o [PGG] (Figuras 9B y 10B). Por un lado, se observó que ambos gráficos resultaron ser lineales, lo cual comprueba que el mecanismo de inhibición de la LP por AT y PGG fue de tipo incompetitivo puro (Segel, 1993). De esta manera se descarta la posibilidad de un sistema de inhibición de tipo mixto hiperbólico (sistema C4), en donde el gráfico de dobles recíprocos también resulta en un patrón de líneas paralelas, pero K_m y V_{max} disminuyen hasta alcanzar un límite a concentraciones infinitas del inhibidor (Segel, 1993). Por otro lado, los valores bajos de K_i (Cuadro 4) indican que ambos inhibidores presentan una alta afinidad hacia el complejo ES, siendo mayor en el caso de PGG respecto a AT.

Recientemente se han publicado numerosos trabajos respecto a la capacidad de diversos compuestos fenólicos para inhibir la actividad de LP (Gondoin *et al.*, 2010; Sergent *et al.*, 2012; Worsztynowicz *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015a). Sin embargo, son escasos aquellos en los que se ha estudiado su mecanismo cinético de inhibición. En este contexto, Wu *et al.* (2013), Wang *et al.* (2014d) y Oliveira *et al.* (2015) han reportado que compuestos como galato de epigallocatequina, galato de epicatequina, epigallocatequina y un extracto rico en taninos condensados obtenido de semilla de *Araucaria angustifolia*, siguieron un mecanismo de inhibición no competitivo. Por otro lado, González-Castejón y Rodríguez-Casado (2011) en su estudio con procianidinas tipo B de alto grado de polimerización (pentámero y decámero), mostraron una inhibición de tipo

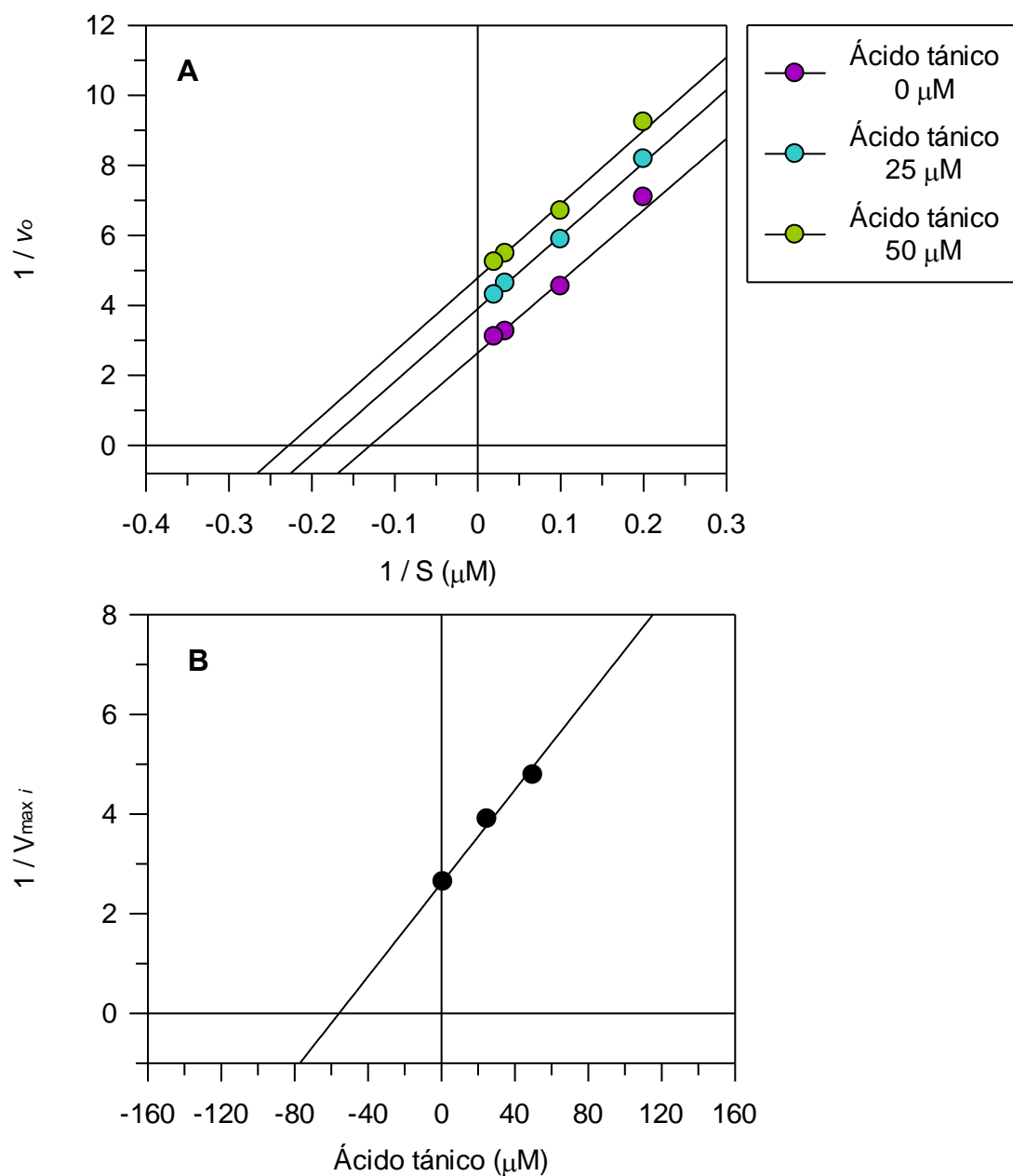


Figura 9. Gráfico de Lineweaver-Burk de la cinética de inhibición de lipasa pancreática porcina en presencia de ácido tánico (A) y gráfico secundario del gráfico de dobles recíprocos: interceptos del eje $1 / v$ ($1 / V_{\max i}$) versus concentración de ácido tánico para el cálculo de K_i (B). Cada punto representa el promedio \pm DE de 3 ensayos independientes, teniendo cada uno 3 réplicas por concentración evaluada.

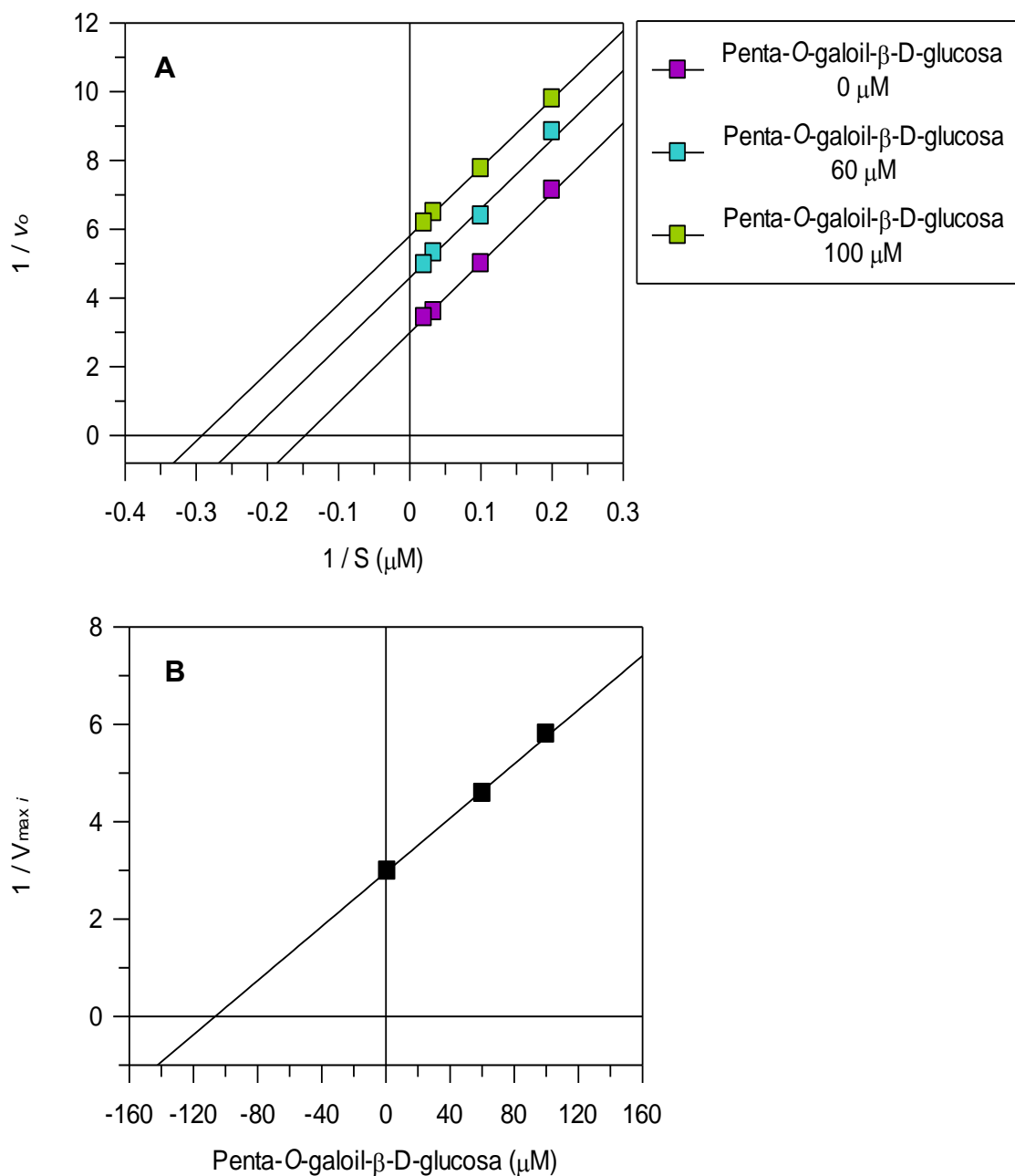


Figura 10. Gráfico de Lineweaver-Burk de la cinética de inhibición de lipasa pancreática porcina en presencia de penta-O-galloyl- β -D-glucosa (A) y gráfico secundario del gráfico de doubles recíprocos: interceptos del eje $1 / v$ ($1 / V_{max i}$) versus concentración de penta-O-galloyl- β -D-glucosa para el cálculo de K_i (B). Cada punto representa el promedio \pm DE de 3 ensayos independientes, teniendo cada uno 3 réplicas por concentración evaluada.

mixta. Adicionalmente, el estudio realizado por You *et al.* (2011) con cianidina y cianidina-3,5-diglucósido reportaron que la actividad de lipasa fue inhibida de manera competitiva. Los resultados obtenidos en este trabajo y lo reportado por otros autores sugieren que el mecanismo de inhibición de la LP está relacionado con el tipo y estructura del CF. Sin embargo, es necesario considerar que las diferencias entre los mecanismos de inhibición reportados podrían también deberse a las distintas metodologías utilizadas en los ensayos enzimáticos, principalmente el tipo de sustrato.

Desde el punto de vista estructural, para que el mecanismo acompetitivo de inhibición enzimática se lleve a cabo, es necesario que se efectúen algunos cambios conformacionales en la enzima. El cambio conformacional que ocurre en la enzima tras la unión del sustrato es determinante para formar o desenmascarar el sitio de unión del inhibidor. Tras la formación del complejo ESI, ocurre un segundo cambio conformacional importante en la enzima, donde el inhibidor podría causar la deformación del sitio activo y así impedir que el proceso catalítico se lleve a cabo (Copeland, 2005; Segel, 1993). En este sentido, conocer la estructura y función de la enzima de estudio es de suma importancia para comprender el mecanismo utilizado por un inhibidor, así como su posible sitio de unión (Copeland, 2000).

A partir de la estructura cristalográfica de la LP se conoce que, para poder llevar a cabo el proceso de catálisis, es de suma importancia la apertura del sitio activo (Hermoso *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 2005; Yang y Lowe, 2000). Por su naturaleza hidrofóbica, el sitio activo se encuentra protegido del medio acuoso por el dominio lid. La apertura del sitio activo mediante el movimiento del dominio lid en dirección al dominio C-terminal, donde interaccionará con la colipasa, es el cambio conformacional más importante en la estructura de la LP (Secundo *et al.*, 2006). Una vez sucedido este evento, por un lado, el sitio activo queda expuesto para la entrada del sustrato y, por otro lado, se suscitará la formación de una nueva cavidad en la enzima, gracias a la interacción del dominio lid con la colipasa (Yang y Lowe, 2000). Se sugiere que, en el caso específico de la LP,

ambas condiciones favorecerán la unión de un inhibidor acompetitivo, como AT y PGG.

Análisis de la Interacción entre Compuestos Fenólicos y la Lipasa Pancreática por Espectroscopía de Fluorescencia

La fluorescencia ocurre cuando las moléculas absorben energía, se excitan y emiten la energía absorbida en forma de radiación de menor energía, al regresar a su estado basal (Lakowicz, 2007). Dentro de las biomoléculas que son capaces de emitir fluorescencia se encuentran las proteínas. La fluorescencia intrínseca de una proteína está dada por sus aminoácidos aromáticos, principalmente por el triptófano (Möller y Denicola, 2002). Ya que la fluorescencia de este aminoácido es altamente sensible a la polaridad de su ambiente, la espectroscopía de fluorescencia es una herramienta que permite evaluar los cambios en el espectro de emisión del triptófano en respuesta a modificaciones en la estructura terciaria de una proteína o la interacción de un ligando (inhibidor) (Möller y Denicola, 2002).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de los compuestos fenólicos en el cambio de la fluorescencia intrínseca de la LP porcina, como proteína modelo de estudio, la cual contiene 7 moléculas de triptófano en su estructura (Trp17, Trp30, Trp86, Trp107, Trp253, Trp339 y Trp403) (Hermoso *et al.*, 1996). Para ello, después de incubar a la LP en presencia de los CF a evaluar, se excitó selectivamente a los triptófanos a una longitud de onda de 295 nm (Lakowicz, 2007; Möller y Denicola, 2002) y se colectó la emisión de fluorescencia en un rango de 300 a 500 nm. Es importante aclarar que, debido a la naturaleza del extracto enzimático, resulta imposible atribuir la fluorescencia y los cambios presentados en su patrón sólo a la fluorescencia proveniente de la LP, ya que se sabe que el extracto enzimático también contiene otras proteínas como la amilasa y la proteasa (Birner-Grünberger *et al.*, 2004). Los resultados del

presente estudio son en base a la fluorescencia total del extracto enzimático que contiene a la LP, los cuales para fines de especificidad, se relacionaron con lo observado en los ensayos enzimáticos específicos de la LP.

La Figura 11 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de la LP en ausencia y presencia de AT, PGG, MG, AC, AG y AP. Primeramente, se observó el máximo de emisión de fluorescencia de la LP a 343 nm, lo que concuerda con el rango reportado como el máximo de emisión característico del triptófano (308-355 nm) (Pan *et al.*, 2011; Vivian y Callis, 2001). Las Figuras 11A y 11B muestran los espectros de emisión de fluorescencia de la LP en presencia de AT y PGG, respectivamente, notándose dos fenómenos importantes. Por un lado, se observó que AT y PGG opacaron la fluorescencia de la LP, lo cual, para ambos casos, fue dependiente de su concentración en el medio de reacción. A su vez, se observó un efecto batocrómico o desplazamiento del máximo de emisión de la LP hacia mayores longitudes de onda (hacia el rojo), causando un cambio en el centro espectral de masas de fluorescencia de la enzima de 36 nm (AT) y 20 nm (PGG) (Figura 12A). Estos resultados sugieren que la interacción de AT y PGG con la LP causó una modificación en la estructura terciaria de la proteína, lo cual puede relacionarse con la disminución de su actividad catalítica y es consistente con lo observado en los ensayos de inhibición de enzimática.

La Figura 11C y 11D muestra los espectros de emisión de fluorescencia de la LP en presencia de MG y AC, respectivamente. En ambos casos se observó el opacamiento de la fluorescencia de la LP, lo cual fue dependiente de la concentración de dichos compuestos, así como desplazamientos de su máximo de emisión (Figura 12B). En el caso de MG, se observó un efecto hipsocrómico o desplazamiento del máximo de emisión de la LP hacia menores longitudes de onda (hacia el azul), así como la aparición de un nuevo pico de emisión de mucha menor intensidad a 420 nm. Éste último es indicativo de la presencia de un fenómeno de transferencia de energía de resonancia por fluorescencia (FRET fluorescence resonance energy transfer, por sus siglas en inglés), en el cual la energía contenida en la emisión de un fluoróforo (triptófano en este caso), sirve

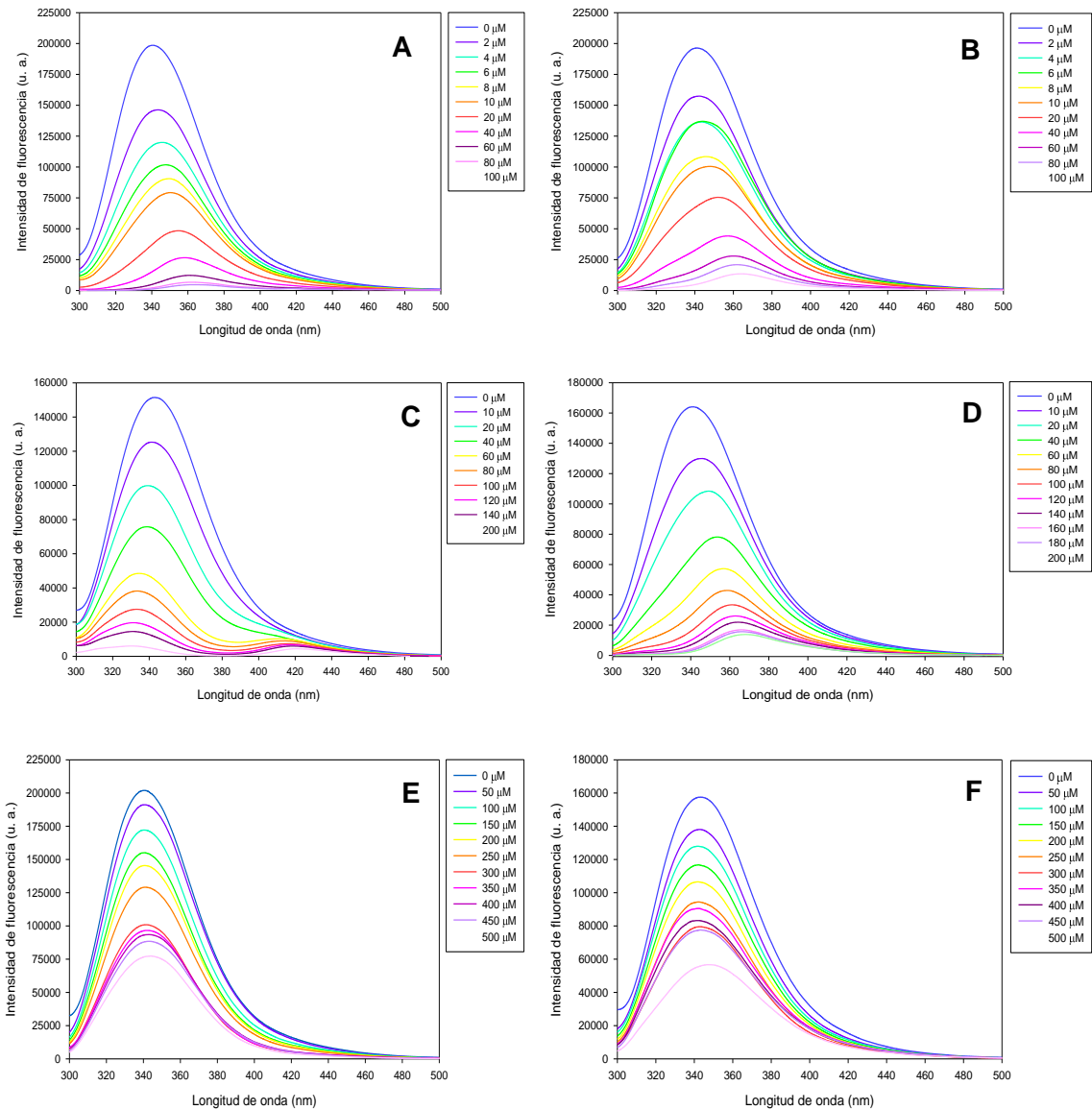


Figura 11. Espectros de emisión de fluorescencia de la lipasa pancreática porcina en presencia de compuestos fenólicos. Panel A) ácido tánico, B) penta-O-galoil- β -D-glucosa, C) mangiferina, D) ácido clorogénico, E) ácido gálico y, F) ácido protocateico. Cada gráfico representa los valores de emisión de fluorescencia colectados en una única repetición experimental.

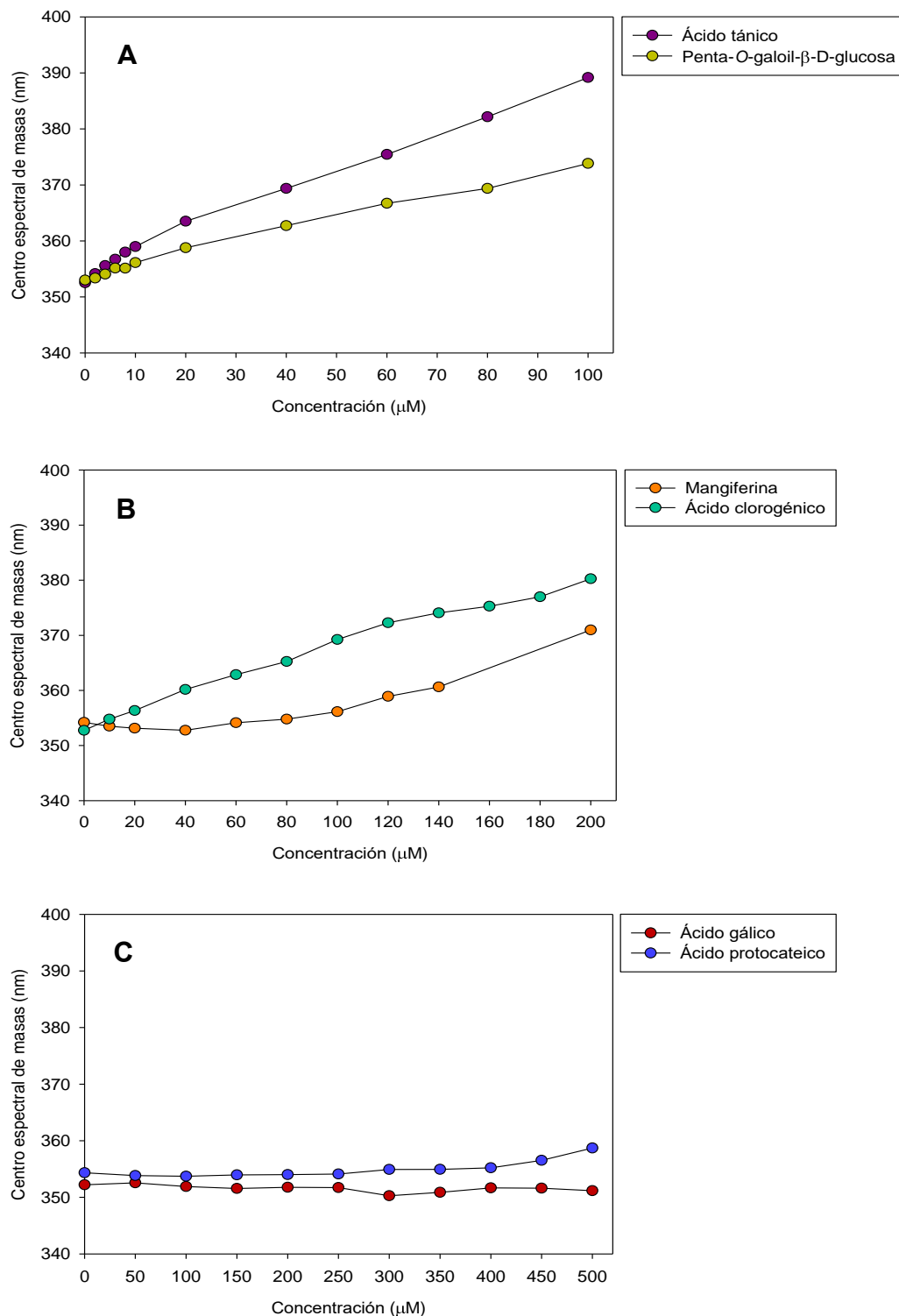


Figura 12. Análisis del centro espectral de masas de fluorescencia de la lipasa pancreática porcina en presencia de compuestos fenólicos. Cada punto representa el valor de una única repetición experimental.

de excitación a un segundo cromóforo (como puede ser la molécula de un compuesto fenólico, en este caso MG). Este a su vez puede emitirla o no con menor energía (mayor longitud de onda) y con menor intensidad de fluorescencia. De acuerdo a los resultados y su correlación con los ensayos de inhibición enzimática, estos sugieren que MG interacciona con la LP, causando un cambio en la estructura terciaria de la proteína, lo que a su vez tiene un impacto en la actividad catalítica de la misma.

En el caso de AC, se observó un desplazamiento del máximo de emisión del triptófano hacia mayores longitudes de onda (Figura 12B). Los resultados indican tanto la interacción de este compuesto con una proteína del extracto enzimático como el efecto de dicha interacción en la estructura terciaria de la misma. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la LP, los resultados de los espectros de emisión de fluorescencia no se correlacionan. A partir de ello es posible formular dos premisas: 1) La existencia de una interacción específica con la LP que no se refleja en los ensayos de inhibición de la actividad enzimática debido a bajas concentraciones de AC en el medio de reacción. Esto surge a partir de la reciente publicación hecha por Hu *et al.* (2015), en donde se reportó que AC es inhibidor competitivo de la actividad de LP a concentraciones en el rango milimolar. 2) La interacción de AC con las demás proteínas presentes en el extracto enzimático, como se ha reportado para la α -amilasa pancreática (Oboh *et al.*, 2015) y proteasas como la pepsina (Zeng *et al.*, 2014).

La Figura 11E y 11F muestra los espectros de emisión de fluorescencia de la LP en presencia de AG y AP, respectivamente. En ambos casos, se observó el opacamiento de la fluorescencia de la LP, aunque sin cambios en su centro espectral de masas (Figura 12C). Los resultados concuerdan con lo observado en los ensayos de inhibición de la LP, en donde ambos compuestos mostraron inhibir mínimamente la actividad enzimática. Por un lado, los resultados sugieren la existencia de una posible interacción entre estos compuestos y la LP, aunque no lo suficientemente fuerte como para causar un impacto importante en la

actividad enzimática. Por otro lado, el opacamiento de la fluorescencia por AG y AP se podría relacionar con una posible interacción con las otras proteínas presentes en el extracto enzimático, como se ha reportado en el caso de ácido gálico (Lu *et al.*, 2015).

Resultados similares han sido reportados en otros estudios, donde se ha analizado la interacción de diversos compuestos fenólicos con la LP mediante espectroscopía de fluorescencia. Se ha reportado que compuestos fenólicos como galato de epigallocatequina, procianidinas de alto peso molecular y algunos flavonoides como quercetina-3-O-glucuronido provocaron tanto el opacamiento de la fluorescencia intrínseca de lipasa como ligeros desplazamientos espectrales de su máximo de emisión hacia mayores longitudes de onda (Wang *et al.*, 2014a; Wang *et al.*, 2014d; Wu *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2014). Por otro lado, Gonçalves *et al.* (2010) en su estudio con procianidinas de alto peso molecular (dímeros hasta heptámeros) extraídas de semilla de uva, observaron sólo el opacamiento de la fluorescencia de la enzima, mas no un desplazamiento de su máximo de emisión. Por último, en el estudio realizado por Li *et al.* (2011) con quercetina, isoquercetina y ramnetina, se reportó que dichos compuestos causaron tanto un opacamiento de la fluorescencia como un ligero desplazamiento del máximo de emisión hacia menores longitudes de onda. Los resultados de estos estudios indicaron que, aunque todos los compuestos ensayados interaccionaron con la LP, sólo algunos lograron causar un cambio en su conformación.

De acuerdo a Lakowicz (2007), la disminución de la intensidad de fluorescencia de una proteína u opacamiento, indica la interacción entre los triptófanos de esta biomolécula y un ligando en solución (opacante). Esta disminución puede ocurrir mediante diferentes mecanismos, entre los que se encuentra la interacción de tipo colisional, misma que se ha reportado como característica entre compuestos fenólicos y algunas proteínas (Wang *et al.*, 2014d; Wu *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2011; Yuksel *et al.*, 2010). Este tipo de interacción ocurre cuando un ligando se une con el triptófano (fluoróforo) durante su estado excitado,

transfiriendo parte de su energía a éste y provocando que el fluoróforo retorne a su estado basal pero sin la emisión de un fotón. Además se conoce que este fenómeno ocurre sin un cambio permanente en las moléculas (fluoróforo y opacante), es decir, sin una reacción fotoquímica (Lakowicz, 2007).

Asimismo, los desplazamientos espectrales del máximo de emisión de una proteína o cambio en el centro espectral de masas, se correlacionan con cambios en su estructura terciaria (plegamiento o desplegamiento) al interaccionar con un ligando (Lakowicz, 2007; Pan *et al.*, 2011). Esto puede explicarse ya que el anillo indol del triptófano es muy sensible a su ambiente electrostático local o polaridad, lo cual se correlaciona con el grado de exposición que éste fluoróforo tenga con el solvente (Lakowicz, 2007). Se conoce que las interacciones electrostáticas, incluyendo la hidratación, son esenciales para mantener la estructura y por tanto, la función de una proteína. En una proteína, los triptófanos se encuentran orientados hacia diferentes ambientes, por lo que algunos de estos fluoróforos serán accesibles a cierto tipo de ligandos mientras que otros no lo serán. En este sentido, la interacción de un ligando con una proteína puede provocar cambios en su conformación. Como consecuencia de dicha interacción, ocurre una reorientación de las moléculas de solvente que se encuentran inmediatamente adyacentes al fluoróforo. Este fenómeno se conoce como relajación del solvente, y da como resultado un desplazamiento o cambio en el centro espectral de masas de fluorescencia de una proteína. La dirección de dicho desplazamiento espectral dependerá de la exposición del triptófano hacia un ambiente más hidrofílico o polar (efecto batocrómico) o hacia un ambiente hidrofóbico (efecto hipsocrómico). De esta manera, la exposición del triptófano hacia un ambiente polar indica el desplegamiento de la estructura de la proteína, mientras que su orientación hacia un ambiente no polar indica el plegamiento de la misma (Lakowicz, 2007; Pan *et al.*, 2011).

Como ya se ha mencionado, la estructura y función de una proteína están estrechamente relacionadas. Es por ello que, cambios en la conformación de una proteína o enzima afectarán directamente su actividad específica, impidiendo

que ésta se lleve a cabo de manera correcta y eficiente. La estructura y conformación de una proteína depende de las interacciones covalentes y no covalentes entre las cadenas laterales de sus aminoácidos (Jakobek, 2015). Tras la unión o interacción de un ligando, las interacciones no covalentes internas entre las cadenas peptídicas de una proteína podrían ser desestabilizadas o destruidas, afectando la función de la misma (Cerny y Hobza, 2007; Gallina *et al.*, 2014; Kasahara *et al.*, 2013). En este sentido, algunos autores han reportado que el principal mecanismo por el que algunos compuestos fenólicos interaccionan con las proteínas es a través de enlaces no covalentes (Le Bourvellec y Renard, 2012; Ozdal *et al.*, 2013). La estructura de los compuestos fenólicos favorece la formación de este tipo de enlaces.

Por un lado, ya que los CF poseen en su estructura grupos hidroxilo, éstos pueden formar puentes de hidrógeno con los residuos polares de las proteínas (Li y Hagerman, 2013). Por otro lado, la unidad galloil de algunos compuestos fenólicos presenta cierta hidrofobicidad, lo cual podría favorecer a la formación de interacciones hidrofóbicas con los residuos no polares (Nagy *et al.*, 2012). A pesar de que las interacciones no covalentes son débiles e inespecíficas, un conjunto de varios enlaces de este tipo puede alterar la conformación de una proteína y por lo tanto afectar su función. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, los compuestos AT, PGG y MG mostraron interacción con la LP, lo cual es consistente con lo observado en los ensayos de inhibición enzimática. En los tres casos se observó que dicha interacción causó un cambio en la estructura terciaria de la LP. Tanto la interacción, como el cambio conformacional de la enzima, se vieron favorecidos por los CF con mayor número de grupos hidroxilo y unidades galloil, probablemente debido a la formación de un mayor número de enlaces no covalentes con los residuos de las cadenas laterales en proximidad a su sitio de unión. Este comportamiento podría ayudar a explicar el mecanismo de inhibición determinado experimentalmente para AT y PGG.

Anclaje Molecular *In Silico* (Docking) de la Lipasa Pancreática Porcina con Ácido Tánico y Penta-O-galoil- β -D-glucosa

Se llevaron a cabo análisis de anclaje molecular *in silico* con el propósito de dar un acercamiento razonado al posible sitio de unión e interacciones moleculares entre la LP porcina y AT o PGG, de acuerdo al mecanismo de inhibición enzimático determinado experimentalmente. Este ensayo se llevó a cabo utilizando como modelo de estudio al complejo LP-colipasa porcina en su conformación abierta o catalíticamente activa, la cual es de suma importancia para explicar el mecanismo cinético de inhibición acompetitivo presentado por AT y PGG. Se identificaron en total 27 cavidades con dimensiones variables y ubicadas en distintas regiones de la estructura tridimensional del complejo LP-colipasa. La cavidad para el docking se seleccionó de acuerdo a su localización en la estructura de la proteína, dimensión y carga electrostática de los residuos expuestos al solvente.

El conocimiento de la estructura y función del complejo LP-colipasa pancreática permite hacer inferencias acerca del mecanismo cinético de inhibición acompetitivo (Hermoso *et al.*, 1996; van Tilbeurgh *et al.*, 1993). En este sentido, se conoce que la LP experimenta un cambio conformacional importante para descubrir y re-arreglar su sitio activo, acomodar al sustrato y realizar su actividad catalítica (Hermoso *et al.*, 1996; van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Dicho cambio conformacional está dado por la reorganización del dominio lid, el cual cubre al sitio activo e impide el acceso al sustrato, manteniendo a la enzima en su conformación cerrada o catalíticamente inactiva (Brockman, 2000; Winkler *et al.*, 1990; Yang y Lowe, 2000). El movimiento de dominio lid facilita una serie de eventos importantes y necesarios para la catálisis, lo cual también podría ser determinante para la unión de un inhibidor acompetitivo, como AT y PGG. El movimiento del lid: 1) descubre al sitio activo, haciéndolo accesible al sustrato, 2) causa un re-arreglo en el sitio activo (agujero oxianión), haciéndolo funcional, 3) genera el sitio de unión de la lipasa a la interface aceite-agua en proximidad con su sustrato, al incrementar su región hidrofóbica expuesta y, 4) facilita la

interacción con la colipasa, lo cual es imprescindible para mantener a la LP en su conformación catalíticamente activa (Secundo *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2005; Yang y Lowe, 2000).

Respecto a éste último, el movimiento del dominio lid favorece la formación de una nueva cavidad en la estructura tridimensional de la LP. Esta cavidad comprende el sitio interface formado por la región N-terminal, que incluye al dominio lid, y C-terminal de la LP, en contacto con la colipasa. Dicha cavidad se seleccionó para los estudios de docking ya que, además de los motivos descritos anteriormente, se pensó que una molécula con afinidad hacia este sitio podría inhibir la catálisis enzimática al provocar un cambio conformacional en alguna de estas regiones y por tanto, actuar como un inhibidor incompetitivo.

Los resultados obtenidos del anclaje molecular *in silico* entre la LP y AT se muestran en la Figura 13. Se observó una distribución uniforme y compacta del compuesto dentro de la cavidad, favoreciendo su posible interacción con aminoácidos de las regiones que comprenden dominio C y N terminal de la LP, incluyendo al dominio lid, en interacción con la colipasa. El acomodo de AT en esta cavidad dependió tanto de la conformación de la molécula como de su compatibilidad química entre sus grupos funcionales y los residuos expuestos en este sitio. En el panel C de la Figura 13 se presenta la cavidad en representación de superficie electrostática, donde se muestra la ubicación de AT hacia la región polar de la misma. El acomodo de AT en la cavidad ocurre posiblemente por una interacción por puentes de hidrógeno con aminoácidos de carácter polar, como se muestra en la Figura 13C. Los aminoácidos próximos a la región de contacto con AT se listan en el Cuadro 4.

Los resultados obtenidos sugieren que AT podría interaccionar con aminoácidos polares presentes en la cavidad analizada, abarcando respecto a su tamaño y número de grupos funcionales, una mayor superficie de contacto. Un hallazgo interesante es que, como se muestra en la Figura 14, parte de la estructura de AT se situó en la región de interacción entre el dominio lid y la colipasa. Se conoce que las interacciones lipasa-colipasa, principalmente mediante el dominio

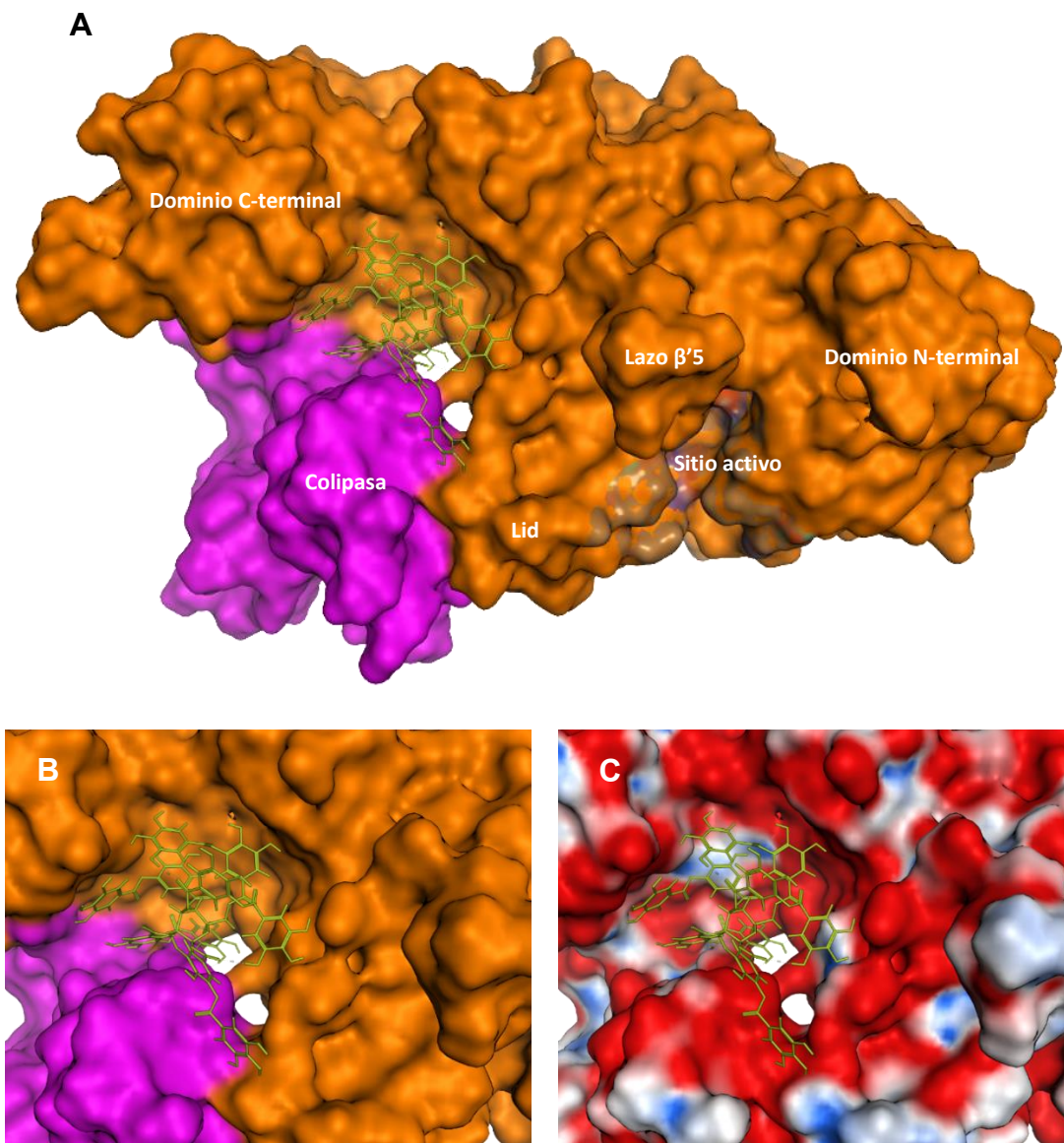


Figura 13. Representación en superficie de la interacción por anclaje molecular *in silico* entre ácido tánico y la lipasa pancreática porcina. Panel A) estructura tridimensional de la lipasa pancreática porcina (amarillo) y colipasa (magenta) (PDB 1ETH) en su forma abierta (catalíticamente activa) y ácido tánico en interface lipasa (dominio C, N terminal y lid)-colipasa. B) Acercamiento de ácido tánico en contacto con la cavidad formada por la interfase lipasa-colipasa. C) Diagrama electrostático de la cavidad formada por la interfase lipasa-colipasa y la distribución espacial de ácido tánico. Superficie en rojo representa residuos polares y en blanco residuos no polares.

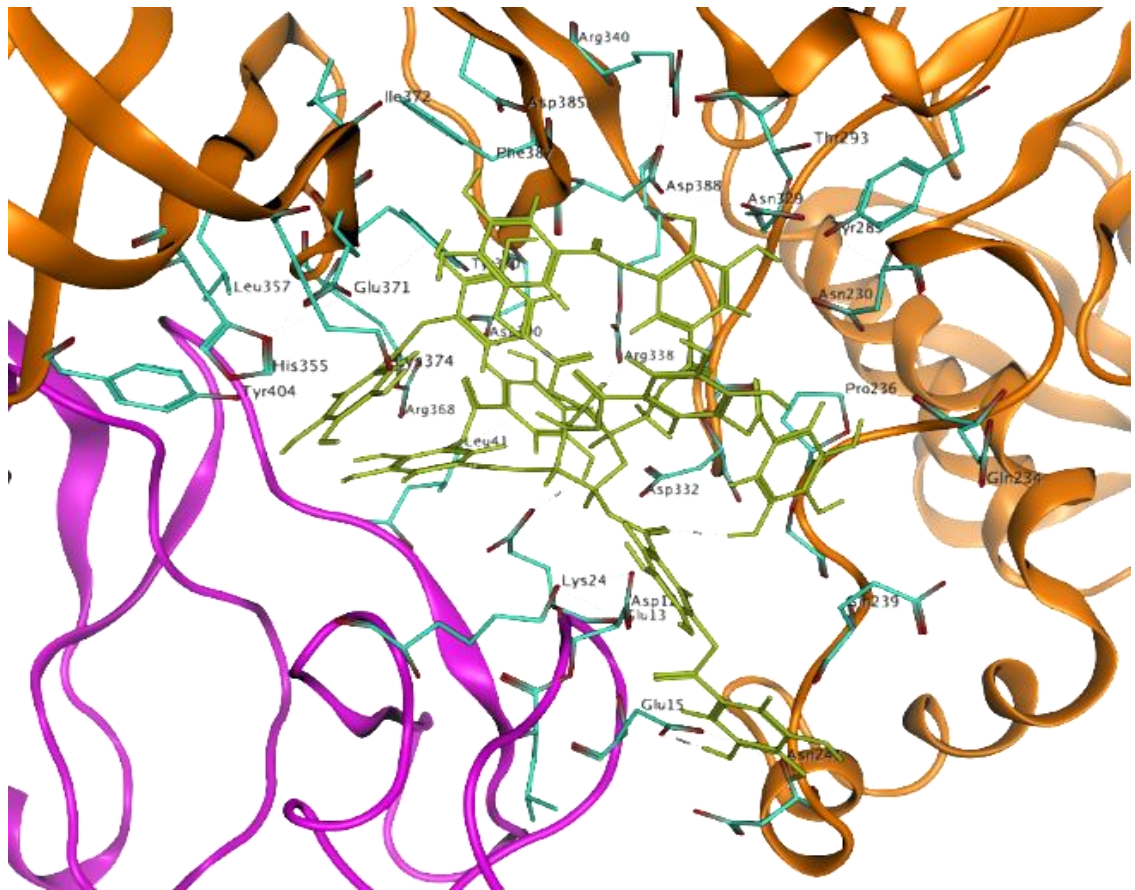


Figura 14. Representación en listón de la interacción por anclaje molecular *in silico* entre ácido tánico y la lipasa pancreática porcina. Dominios C y N terminal, y lid de lipasa se representan en amarillo; colipasa en color magenta; residuos en sitio interface lipasa-colipasa en interacción con ácido tánico se representan en azul; molécula de ácido tánico se representa en verde.

Cuadro 4. Resumen de residuos de la lipasa y la colipasa en proximidad con ácido tánico (AT) de acuerdo al análisis de anclaje molecular *in silico*.

Clasificación grupo -R	Residuos en proximidad con ligando	
	Lipasa	Colipasa
Alifáticos	Pro236, Ile372, Leu357	Leu41
Aromáticos	Tyr285, Tyr370, Phe387, Tyr404	-
Hidroxilados	Thr293	-
Básicos	Arg338, Arg340, His355, Lys374	Lys24
Ácidos y sus amidas	Asn241, Asn239, Gln234, Asn230, Asp338, Asn329, Asp385, Glu371	Asp12, Glu13, Glu15

lid, son de suma importancia para que el complejo pueda desempeñar su función catalítica de manera adecuada (Hermoso *et al.*, 1996; Lowe, 1997a). Se ha reportado que la LP y la colipasa interactúan principalmente mediante enlaces polares y fuerzas de van der Waals. Entre los enlaces polares, se destacan aquellos que hacen posible la interacción entre la colipasa y el dominio lid, que a su vez son determinantes para estabilizar a la LP en su conformación catalíticamente activa (Lowe, 1997a). Estas interacciones se encuentran estrictamente conservadas en todas las secuencias conocidas de la lipasa y colipasa, incluyendo el complejo lipasa humana-colipasa porcina (Hermoso *et al.*, 1996; van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Más específicamente, se ha reportado que interacción Glu15 de la colipasa con Asn241 de la LP es crítica para la actividad del complejo lipasa-colipasa, ya que contribuye de manera importante en la estabilización del dominio lid de la LP en su conformación abierta, lo cual facilita el proceso catalítico (Lowe, 1997a).

Dado lo anterior, se puede inferir que si alguna de las interacciones mencionadas es desestabilizada mediante la unión de un inhibidor, la actividad catalítica de la LP se afectará directamente. De acuerdo a los resultados, el número y tipo de aminoácidos en interacción o proximidad con AT sugiere la desestabilización de algunas de las interacciones mencionadas y otras. A su vez, esto sugiere un cambio y desestabilización de la conformación de la LP catalíticamente activa, provocando la deformación del sitio activo e impidiendo que el proceso catalítico se lleve a cabo. Las deducciones hechas a partir del análisis del anclaje molecular podrían ayudar a dar una explicación a nivel molecular de los resultados experimentales descritos a lo largo de este trabajo.

Los resultados del anclaje molecular *in silico* entre la LP y PGG se muestran en la Figura 15. Se observó una distribución uniforme, con la molécula de PGG extendida, dentro de la cavidad. Asimismo, se observó que los posibles sitios de interacción más favorecidos fueron los dominios C y N terminal de la LP en contacto con la colipasa (sin observarse un contacto directo con el dominio lid). La Figura 15C muestra la cavidad en representación de mapa electrostático,

donde se observa la orientación de PGG hacia la región polar, al igual que AT. Lo anterior sugiere la interacción de este compuesto con aminoácidos de carácter polar, como se muestra en la Figura 16. Los aminoácidos próximos a la región de contacto con PGG se listan en el Cuadro 5.

Los resultados obtenidos sugieren que PGG podría interactuar con aminoácidos polares presentes en la cavidad analizada, abarcando respecto a su tamaño y número de grupos funcionales, una menor superficie de contacto respecto a AT. Como se muestra en la Figura 16, PGG se ubicó preferentemente en la región de interacción dominio C terminal de la LP con la colipasa. Al igual que AT, las interacciones de PGG con aminoácidos polares podrían causar una desestabilización y cambio en la estructura de la LP. En este sentido, se conoce que la interacción iónica entre Glu45 de la colipasa y Lys400 de la LP es crítica para mantener al complejo lipasa-colipasa en su conformación catalíticamente activa (Ayvazian *et al.*, 1998). Si dicha interacción se afecta, el complejo no será funcional, lo que resultará en la disminución de la actividad catalítica de la LP. Las interacciones mencionadas están conservadas en el complejo lipasa humana-colipasa porcina (Crandall y Lowe, 2001; Egloff *et al.*, 1995; van Tilbeurgh *et al.*, 1993). Es importante señalar que el docking es una herramienta que permite hacer una aproximación teórica en cuanto a las interacciones con aminoácidos en proximidad al ligando. Sin embargo, aunque no sea visible en una pose dada, es necesario considerar que los efectos a larga distancia de la interacción ligando-proteína son de suma importancia (Wang *et al.*, 2001). De esta manera y al igual que AT, se sugiere que la interacción entre PGG y la LP tuvo un efecto importante en los enlaces que estabilizan la estructura terciaria de la enzima, lo cual se reflejó en la disminución de su actividad catalítica.

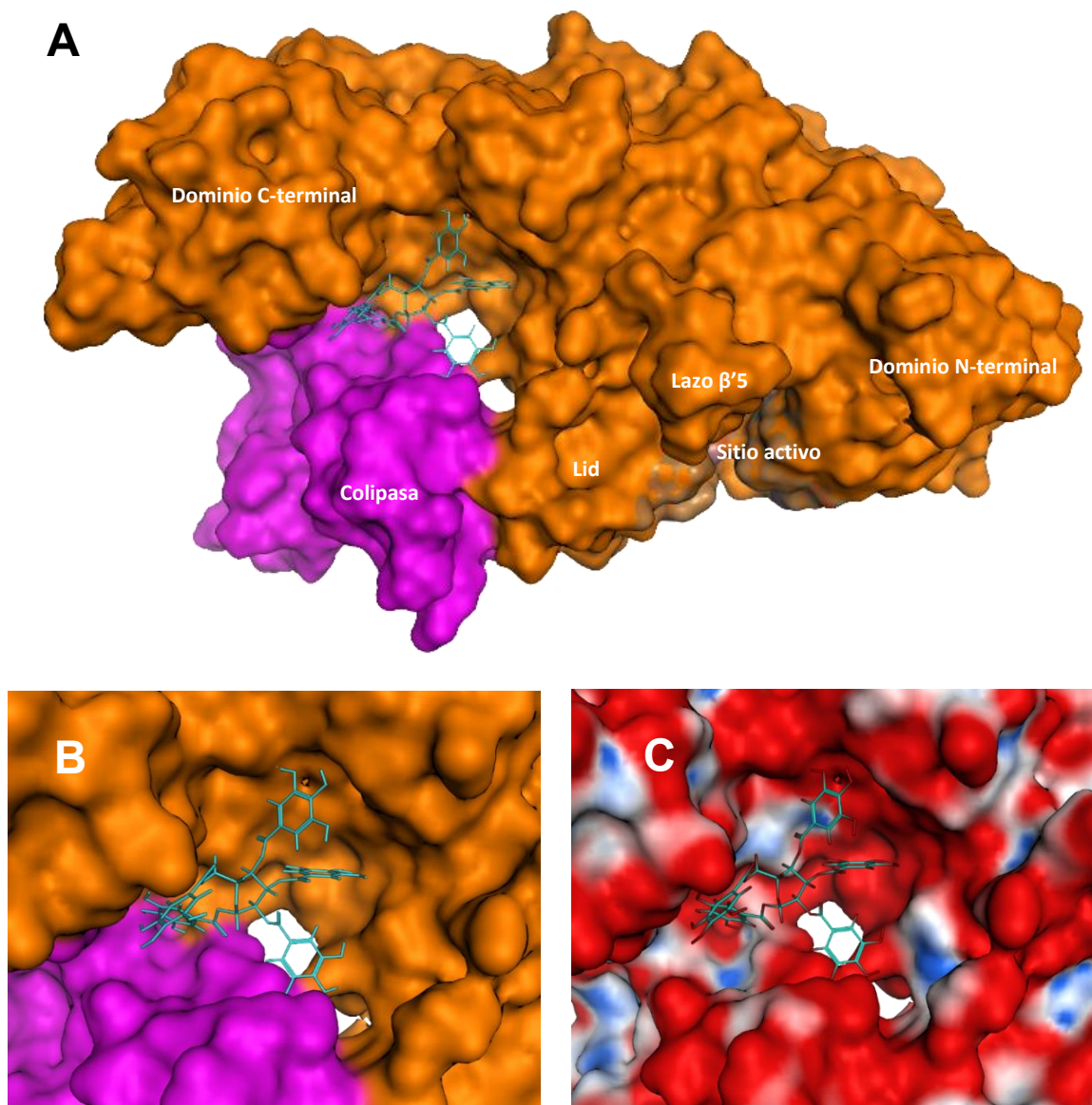


Figura 15. Representación en superficie de la interacción por anclaje molecular *in silico* entre penta-*O*-galoil- β -D-glucosa (PGG) y la lipasa pancreática porcina. Panel A) estructura tridimensional de la lipasa pancreática porcina (amarillo) y colipasa (magenta) (PDB 1ETH) en su forma abierta (catalíticamente activa) y PGG en interface de la lipasa (dominio C, N terminal y lid)-colipasa. B) Acercamiento de PGG en contacto con la cavidad formada por la interface del complejo lipasa-colipasa. C) Diagrama electrostático de la cavidad formada por la interface del complejo lipasa-colipasa y la distribución espacial de PGG. Superficie en rojo representa residuos polares y en blanco residuos no polares.

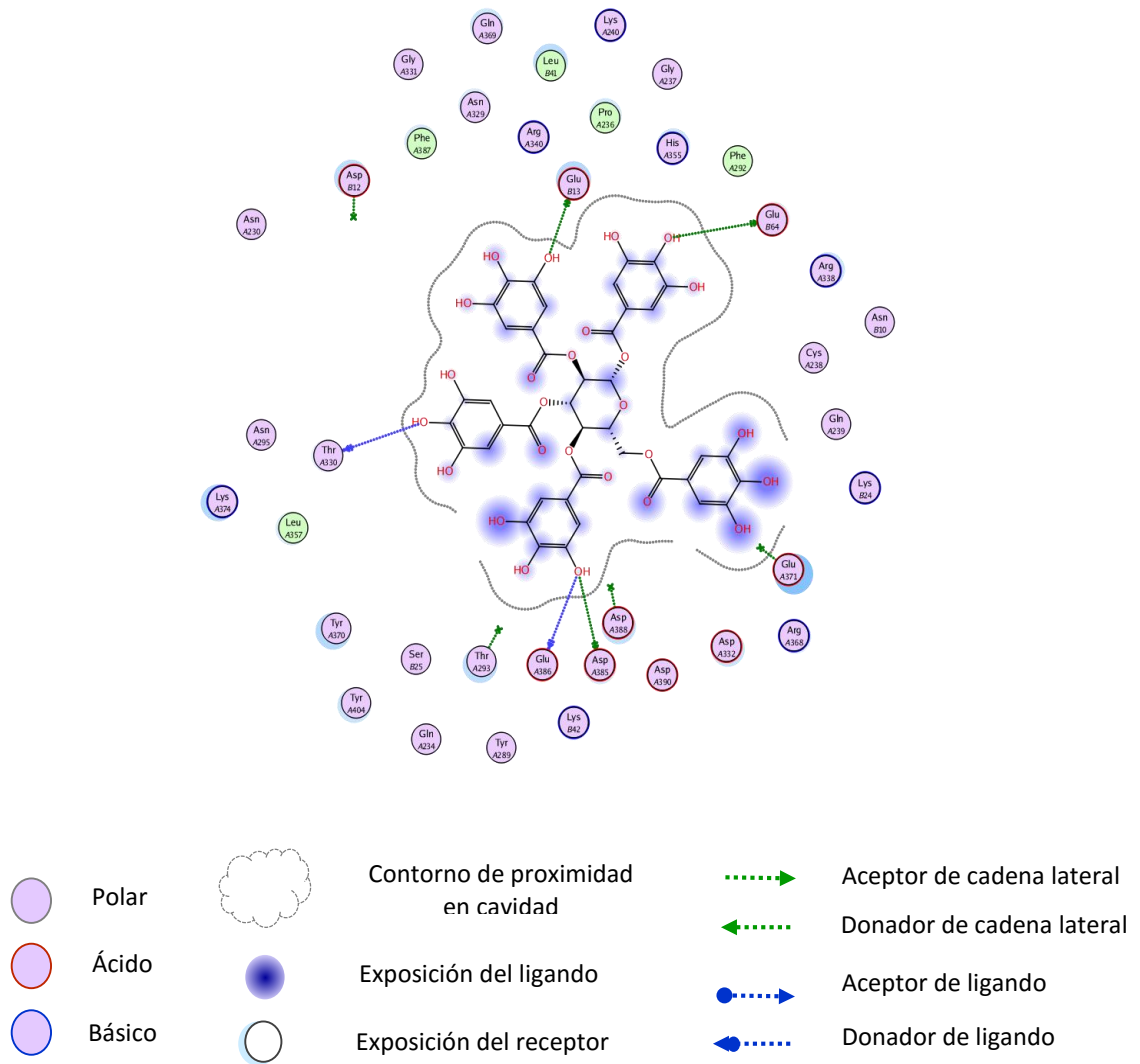


Figura 16. Representación en dos dimensiones de la interacción por anclaje molecular *in silico* entre penta-*O*-galoil- β -D-glucosa y la lipasa pancreática porcina. Residuos en sitio interfase lipasa – colipasa en interacción con penta-*O*-galoil- β -D-glucosa se representan en círculos; letra A representa residuos de la lipasa y B representa residuos de la colipasa.

Cuadro 5. Resumen de residuos de la lipasa y colipasa en proximidad con penta-O-galoil- β -D-glucosa (PGG) de acuerdo al análisis de anclaje molecular *in silico*.

Clasificación grupo -R	Residuos en proximidad con ligando	
	Lipasa	Colipasa
Alifáticos	Gly331, Leu357, Gly237, Pro236	Leu41
Aromáticos	Tyr370, Tyr404, Tyr289, Phe292, Phe387	-
Hidroxilados	Thr330, Thr293	Ser25
Básicos	Lys374, Arg338, His355, Lys240, Arg340, Arg368	Lys42, Lys24
Ácidos y sus amidas	Asn295, Gln234, Glu386, Asp385, Asp390, Asp332, Glu371, Gln239, Asn329, Gln369, Asn230	Asn10, Glu13, Glu64

CONCLUSIONES

Los compuestos fenólicos de cáscara de mango cv. 'Ataulfo' (AT, PGG y MG) demostraron ser inhibidores de la actividad de la LP porcina, siendo más efectivos que los presentes en pulpa (AC, AG, AP y AV).

Ácido tánico y penta-*O*-galoil- β -D-glucosa inhibieron la actividad de la lipasa mediante un mecanismo acompetitivo, lo cual demostró que estos compuestos son capaces de interactuar con la enzima de manera específica.

Los análisis de espectroscopía de fluorescencia sugirieron que los compuestos fenólicos AT, PGG y MG inhibieron la actividad de la LP al inducir un cambio en su conformación o estructura terciaria. Respecto a los compuestos de bajo peso molecular, por un lado, el comportamiento de AC en la titulación por fluorescencia no se correlacionó con su capacidad para inhibir la actividad de la lipasa, lo que sugiere que dicho compuesto mostró mayor afinidad de interacción con otra proteína presente en el extracto enzimático. Por otro lado, el comportamiento de AG y AP sugirieron que la interacción con la lipasa u otra proteína presente en el extracto enzimático no fue lo suficientemente fuerte para ocasionar un cambio en la estructura terciaria de la misma, lo cual se correlaciona con lo observado en los ensayos de inhibición de lipasa.

El análisis de anclaje molecular *in silico* sugirió que AT y PGG interactuaron en la cavidad formada por la interface de la región N-terminal, que incluye al dominio lid, y C-terminal de la LP, en contacto con la colipasa. Por su ubicación dentro de la cavidad, se sugirió la interacción de ambos compuestos con las cadenas laterales de aminoácidos polares. Además, se sugirió que las interacciones de AT y PGG a corta o larga distancia con el dominio lid o dominio C terminal de la

LP podrían ser importantes para explicar el mecanismo de inhibición acompetitivo.

RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de la lipasa pancreática humana como proteína recombinante pura, así como la utilización de un ensayo de actividad enzimática más cercano a las condiciones fisiológicas, como pH-Stat (Xiao *et al.*, 2013c), donde se incluyan el sustrato natural de esta enzima (triglicéridos de ácidos grasos de cadena larga, como trioleína), sales biliares, calcio y colipasa.

Asimismo, se recomienda el uso de técnicas biofísicas especializadas tales como calorimetría de titulación isotérmica, dicroísmo circular y cristalografía por difracción de rayos X para el estudio más profundo de las posibles interacciones entre compuestos fenólicos y la lipasa pancreática.

Se recomienda la realización de bioensayos con animales de experimentación, para el estudio de la inhibición de enzimas digestivas por los compuestos fenólicos en sistemas más complejos y su posible significancia *in vivo*.

Por último, sería de gran utilidad explorar otros posibles mecanismos de acción de los compuestos fenólicos para la inhibición de la actividad de la lipasa pancreática, tales como la interacción de estos compuestos con las partículas (emulsiones) lipídicas.

REFERENCIAS

- Abia, R., Bermúdez, B., Pacheco, Y. M., López, S., Abia, R., y Muriana, F. J. 2004. Digestion and absorption of olive oil. *Grasas y Aceites*. 55(1): 1-10.
- Akoh, C. C., Lee, G.-C., Liaw, Y.-C., Huang, T.-H., y Shaw, J.-F. 2004. GDSL family of serine esterases/lipases. *Progress in Lipid Research*. 43(6): 534-552.
- Allison, D. B., Gadde, K. M., Garvey, W. T., Peterson, C. A., Schwiers, M. L., Najarian, T., Tam, P. Y., Troupin, B., y Day, W. W. 2012. Controlled-release phentermine/topiramate in severely obese adults: a randomized controlled trial (EQUIP). *Obesity*. 20(2): 330-342.
- Anobom, C. D., Pinheiro, A. S., De-Andrade, R. A., Aguiéiras, E. C. G., Andrade, G. C., Moura, M. V., Almeida, R. V., y Freire, D. M. 2014. From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *BioMed Research International*. 2014: 1-11.
- Armand, M. 2007. Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 10(2): 156-164.
- Arterburn, D. E., y Courcoulas, A. P. 2014. Bariatric surgery for obesity and metabolic conditions in adults. *BMJ*. 349: 3961.
- Ayala-Castro, H. E., y Valenzuela-Soto, E. M. 2007. Ionic strength dependency of urea and its effect on renal betaine aldehyde dehydrogenase stability. En: P. B. Maser E., Lindahl R., Weiner H. (Eds.). *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 12*, Purdue University Press, West Lafayette, pp. 77-82.
- Ayvazian, L., Crenon, I., Hermoso, J., Pignol, D., Chapus, C., y Kerfelec, B. 1998. Ion pairing between lipase and colipase plays a critical role in catalysis. *Journal of Biological Chemistry*. 273(50): 33604-33609.
- Baboota, R. K., Bishnoi, M., Ambalam, P., Kondepudi, K. K., Sarma, S. M., Boparai, R. K., y Podili, K. 2013. Functional food ingredients for the management of obesity and associated co-morbidities – A review. *Journal of Functional Foods*. 5(3): 997-1012.
- Balsano, C., y Alisi, A. 2009. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. *Current Pharmaceutical Design*. 15(26): 3063-3073.
- Barja-Fernandez, S., Leis, R., Casanueva, F., y Seoane, L. 2014. Drug development strategies for the treatment of obesity: how to ensure efficacy, safety, and sustainable weight loss. *Drug Design, Development and Therapy*. 8: 2391-2400.
- Bauer, E., Jakob, S., y Mosenthin, R. 2005. Principles of physiology of lipid digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 18(2): 282-295.

- Belle, V., Fournel, A., Woudstra, M., Ranaldi, S., Prieri, F., Thomé, V., Currault, J., Verger, R., Guigliarelli, B., y Carrière, F. 2007. Probing the opening of the pancreatic lipase lid using site-directed spin labeling and EPR spectroscopy. *Biochemistry*. 46(8): 2205-2214.
- Beyea, M. M., Garg, A. X., y Weir, M. A. 2012. Does orlistat cause acute kidney injury? *Therapeutic Advances in Drug Safety*. 3(2): 53-57.
- Bezzine, S., Ferrato, F., Ivanova, M. G., Lopez, V., Verger, R., y Carrière, F. 1999. Human pancreatic lipase: Colipase dependence and interfacial binding of lid domain mutants. *Biochemistry*. 38(17): 5499-5510.
- Biesalski, H.-K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., y Weber, P. 2009. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*. 25(11–12): 1202-1205.
- Birari, R. B., y Bhutani, K. K. 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today*. 12(19–20): 879-889.
- Birner-Grünberger, R., Scholze, H., Faber, K., y Hermetter, A. 2004. Identification of various lipolytic enzymes in crude porcine pancreatic lipase preparations using covalent fluorescent inhibitors. *Biotechnology and Bioengineering*. 85(2): 147-154.
- Boath, A., Grussu, D., Stewart, D., y McDougall, G. 2012. Berry polyphenols inhibit digestive enzymes: a source of potential health benefits? *Food Digestion*. 3(1-3): 1-7.
- Borrelli, G. M., y Trono, D. 2015. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 16(9): 20774-20840.
- Bray, G. A. 1995. Evaluation of drugs for treating obesity. *Obesity Research*. 3(S4): 425S-434S.
- Brockman, H. L. 2000. Kinetic behavior of the pancreatic lipase-colipase-lipid system. *Biochimie*. 82(11): 987-995.
- Buchholz, T., y Melzig, M. F. 2015. Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. *Planta Medica*. 81(10): 771-783.
- Buchwald, H., Avidor, Y., Braunwald, E., y et al. 2004. Bariatric surgery: A systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 292(14): 1724-1737.
- Carocho, M., y Ferreira, I. 2013. The role of phenolic compounds in the fight against cancer - A review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 13(8): 1236-1258.
- Carriere, F., Barrowman, J. A., Verger, R., y Laugier, R. 1993. Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology*. 105(3): 876-888.
- Cerny, J., y Hobza, P. 2007. Non-covalent interactions in biomacromolecules. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 9(39): 5291-5303.

- Colagiuri, S. 2010. Diabetes: therapeutic options. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 12(6): 463-473.
- Colon-Gonzalez, F., Kim, G. W., Lin, J. E., Valentino, M. A., y Waldman, S. A. 2013. Obesity pharmacotherapy: What is next? *Molecular Aspects of Medicine*. 34(1): 71-83.
- Comerma-Steffensen, S., Grann, M., U Andersen, C., Rungby, J., y Simonsen, U. 2014. Cardiovascular effects of current and future anti-obesity drugs. *Current Vascular Pharmacology*. 12(3): 493-504.
- Copeland, R. A. 2000. *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. John Wiley & Sons, Inc. Segunda Ed. New York. pp. 390.
- Copeland, R. A. 2005. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: A guide for medicinal chemists and pharmacologists*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. pp. 271.
- Crandall, W. V., y Lowe, M. E. 2001. Colipase residues Glu64 and Arg65 are essential for normal lipase-mediated fat digestion in the presence of bile salt micelles. *Journal of Biological Chemistry*. 276(16): 12505-12512.
- Chakrabarti, R. 2009. Pharmacotherapy of obesity: emerging drugs and targets. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 13(2): 195-207.
- Cheung, B. M. Y., Cheung, T. T., y Samaranyake, N. R. 2013. Safety of antiobesity drugs. *Therapeutic Advances in Drug Safety*. 4(4): 171-181.
- D'Orazio, N., Gammone, M. A., Gemello, E., De Girolamo, M., Cusenza, S., y Riccioni, G. 2012. Marine bioactives: Pharmacological properties and potential applications against inflammatory diseases. *Marine Drugs*. 10(4): 812-833.
- Danielson, U. H. 2015. Molecular interaction analysis for discovery of drugs targeting enzymes and for resolving biological function. En: G. Scapin, D. Patel y E. Arnold (Eds.). *Multifaceted Roles of Crystallography in Modern Drug Discovery*, Springer Netherlands, pp. 223-240.
- De Caro, A., Figarella, C., Amic, J., Michel, R., y Guy, O. 1977. Human pancreatic lipase: A glycoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*. 490(2): 411-419.
- De Caro, J., Carrière, F., Barboni, P., Giller, T., Verger, R., y De Caro, A. 1998. Pancreatic lipase-related protein 1 (PLRP1) is present in the pancreatic juice of several species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1387(1-2): 331-341.
- DeMaria, E. J. 2007. Bariatric surgery for morbid obesity. *New England Journal of Medicine*. 356(21): 2176-2183.
- Dev, S., Nirmala, D. K., Sinha, S., y Surolia, A. 2006. Thermodynamic analysis of three state denaturation of Peanut Agglutinin. *IUBMB Life*. 58(9): 549-555.

- Dobreva, M. A., Green, R. J., Mueller-Harvey, I., Salminen, J.-P., Howlin, B. J., y Frazier, R. A. 2014. Size and molecular flexibility affect the binding of ellagitannins to bovine serum albumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(37): 9186-9194.
- Egloff, M. P., Sarda, L., Verger, R., Cambillau, C., y van Tilbeurgh, H. 1995. Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. 4(1): 44-57.
- Ekmekcioglu, C. 2002. A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailability studies using experimental systems. *Food Chemistry*. 76(2): 225-230.
- Eom, S.-H., Lee, M.-S., Lee, E.-W., Kim, Y.-M., y Kim, T. H. 2013. Pancreatic lipase inhibitory activity of phlorotannins isolated from *Eisenia bicyclis*. *Phytotherapy Research*. 27(1): 148-151.
- Erlanson-Albertsson, C. 1992. Pancreatic colipase. Structural and physiological aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1125(1): 1-7.
- Farooqi, S. I. 2015. Genetic, molecular and physiological mechanisms involved in human obesity: Society for Endocrinology Medal Lecture 2012. *Clinical Endocrinology*. 82(1): 23-28.
- Fave, G., Coste, T., y Armand, M. 2004. Physicochemical properties of lipids: new strategies to manage fatty acid bioavailability. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*. 50(7): 815-831.
- Fei, Q., Gao, Y., Zhang, X., Sun, Y., Hu, B., Zhou, L., Jabbar, S., y Zeng, X. 2014. Effects of oolong tea polyphenols, EGCG, and EGCG³Me on pancreatic α -amylase activity *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(39): 9507-9514.
- Fidler, M. C., Sanchez, M., Raether, B., Weissman, N. J., Smith, S. R., Shanahan, W. R., y Anderson, C. M. 2011. A one-year randomized trial of lorcaserin for weight loss in obese and overweight adults: the BLOSSOM trial. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 96(10): 3067-3077.
- Filippatos, T. D., Derdemezis, C. S., Gazi, I. F., Nakou, E. S., Mikhailidis, D. P., y Elisaf, M. S. 2008. Orlistat-associated adverse effects and drug interactions. *Drug Safety*. 31(1): 53-65.
- Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. N., y Petersen, S. B. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie*. 82(11): 1033-1041.
- Frazier, R. A., Deaville, E. R., Green, R. J., Stringano, E., Willoughby, I., Plant, J., y Mueller-Harvey, I. 2010. Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 51(2): 490-495.

- Gadde, K. M., Allison, D. B., Ryan, D. H., Peterson, C. A., Troupin, B., Schwiers, M. L., y Day, W. W. 2011. Effects of low-dose, controlled-release, phentermine plus topiramate combination on weight and associated comorbidities in overweight and obese adults (CONQUER): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 377(9774): 1341-1352.
- Gallina, A. M., Bork, P., y Bordo, D. 2014. Structural analysis of protein-ligand interactions: the binding of endogenous compounds and of synthetic drugs. *Journal of Molecular Recognition*. 27(2): 65-72.
- Gee, J. M., y Johnson, I. T. 2001. Polyphenolic compounds: Interactions with the gut and implications for human health. *Current Medicinal Chemistry*. 8(11): 1245-1255.
- George, M., Rajaram, M., y Shanmugam, E. 2014. New and emerging drug molecules against obesity. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 19(1): 65-76.
- Gómez-Zaleta, B., Pérez-Hernández, G., Beltrán, H. I., Aparicio, F., Rojas-Hernández, A., y Rojo-Domínguez, A. 2008. Molecular speciation effect on docking and drug design. A computational study for mangiferin, a carbohydrate-polyphenol bioconjugate as a test case. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 52(1): 78-87.
- Gonçalves, R., Mateus, N., y de Freitas, V. 2010. Study of the interaction of pancreatic lipase with procyanidins by optical and enzymatic methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(22): 11901-11906.
- Gondi, M., y Prasada Rao, U. J. S. 2015. Ethanol extract of mango (*Mangifera indica* L.) peel inhibits α -amylase and α -glucosidase activities, and ameliorates diabetes related biochemical parameters in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Journal of Food Science and Technology*. 52(12): 7883-7893.
- Gondoin, A., Grussu, D., Stewart, D., y McDougall, G. J. 2010. White and green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase *in vitro*. *Food Research International*. 43(5): 1537-1544.
- González-Castejón, M., y Rodríguez-Casado, A. 2011. Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. *Pharmacological Research*. 64(5): 438-455.
- Gyémánt, G., Zajác, Á., Bécsi, B., Rangunath, C., Ramasubbu, N., Erdódi, F., Batta, G., y Kandra, L. 2009. Evidence for pentagalloyl glucose binding to human salivary α -amylase through aromatic amino acid residues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 1794(2): 291-296.
- Hainer, V., y Hainerová, I. A. 2012. Do we need anti-obesity drugs? *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 28: 8-20.
- Hamosh, M. 1990. Lingual and gastric lipases. *Nutrition* 6(6): 421-428.

- Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., y Poutanen, K. 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 11(4): 1365-1402.
- Haslam, D. W., y James, W. P. T. 2005. Obesity. *The Lancet*. 366(9492): 1197-1209.
- Hasni, I., Bourassa, P., Hamdani, S., Samson, G., Carpentier, R., y Tajmir-Riahi, H.-A. 2011. Interaction of milk α - and β -caseins with tea polyphenols. *Food Chemistry*. 126(2): 630-639.
- Hermoso, J., Pignol, D., Kerfelec, B., Crenon, I., Chapus, C., y Fontecilla-Camps, J. C. 1996. Lipase activation by nonionic detergents: The crystal structure of the porcine lipase-colipase-tetraethylene glycol mono-octyl ether complex. *Journal of Biological Chemistry*. 271(30): 18007-18016.
- Hsu, C. L., y Yen, G. C. 2008. Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Molecular Nutrition & Food Research*. 52(1): 53-61.
- Hu, B., Cui, F., Yin, F., Zeng, X., Sun, Y., y Li, Y. 2015. Caffeoylquinic acids competitively inhibit pancreatic lipase through binding to the catalytic triad. *International Journal of Biological Macromolecules*. 80: 529-535.
- Iyengar, N. M., Hudis, C. A., y Dannenberg, A. J. 2015. Obesity and cancer: Local and systemic mechanisms. *Annual Review of Medicine*. 66(1): 297-309.
- Jakobek, L. 2015. Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*. 175: 556-567.
- Jennens, M. L., y Lowe, M. E. 1994. A surface loop covering the active site of human pancreatic lipase influences interfacial activation and lipid binding. *Journal of Biological Chemistry*. 269(41): 25470-25474.
- Johnson, E. R., Keinan, S., Mori-Sánchez, P., Contreras-García, J., Cohen, A. J., y Yang, W. 2010. Revealing noncovalent interactions. *Journal of the American Chemical Society*. 132(18): 6498-6506.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Fernández-Serrano, M., y García-Román, M. 2006. Kinetic model for the enzymatic hydrolysis of tributyrin in O/W emulsions. *Chemical Engineering Science*. 61(15): 5010-5020.
- Kademi, A., Aït-Abdelkader, N., Fakhreddine, L., y Baratti, J. C. 2000. Characterization of a new thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium *Bacillus circulans*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 10(4): 395-401.
- Kakkar, A. K., y Dahiya, N. 2015. Drug treatment of obesity: Current status and future prospects. *European Journal of Internal Medicine*. 26(2): 89-94.
- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J. B., y Reppas, C. 2006. Characterization of the human upper gastrointestinal

- contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical Research*. 23(1): 165-176.
- Kasahara, K., Shirota, M., y Kinoshita, K. 2013. Comprehensive classification and diversity assessment of atomic contacts in protein–small ligand interactions. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 53(1): 241-248.
- Keller, J., y Layer, P. 2005. Human pancreatic exocrine response to nutrients in health and disease. *Gut*. 54(suppl 6): 1-28.
- Kim, G. W., Lin, J. E., Blomain, E. S., y Waldman, S. A. 2013a. Antiobesity pharmacotherapy: New drugs and emerging targets. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 95(1): 53-66.
- Kim, G. W., Lin, J. E., Blomain, E. S., y Waldman, S. A. 2013b. New advances in models and strategies for developing anti-obesity drugs. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 8(6): 655-671.
- Kit, B., Ogden, C., y Flegal, K. 2014. Epidemiology of obesity. En: W. Ahrens y I. Pigeot (Eds.). *Handbook of Epidemiology*, Springer New York, pp. 2229-2262.
- Kwon, O. J., Bae, J.-S., Lee, H., Hwang, J.-Y., Lee, E.-W., Ito, H., y Kim, T. 2013. Pancreatic lipase inhibitory gallotannins from *Galla rhois* with inhibitory effects on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Molecules*. 18(9): 10629.
- Lai, C.-S., Wu, J.-C., y Pan, M.-H. 2015. Molecular mechanism on functional food bioactives for anti-obesity. *Current Opinion in Food Science*. 2: 9-13.
- Lakowicz, J. R. 2007. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer. Tercera Ed. Maryland. pp. 954.
- Le Bourvellec, C., y Renard, C. 2012. Interactions between polyphenols and macromolecules: quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 52(3): 213-248.
- Leatherbarrow, R. J. 2010. *GraFit Version 7*. Erithacus Software Ltd. Horley, UK.
- Lee, E. M., Lee, S. S., Chung, B. Y., Cho, J.-Y., Lee, I. C., Ahn, S. R., Jang, S. J., y Kim, T. H. 2010. Pancreatic lipase inhibition by C-glycosidic flavones isolated from *Eremochloa ophiuroides*. *Molecules*. 15(11): 8251.
- Lei, F., Zhang, X., Wang, W., Xing, D., Xie, W., Su, H., y Du, L. 2007. Evidence of anti-obesity effects of the pomegranate leaf extract in high-fat diet induced obese mice. *International Journal of Obesity*. 31(6): 1023-1029.
- Li, M., y Hagerman, A. E. 2013. Interactions between plasma proteins and naturally occurring polyphenols. *Current Drug Metabolism*. 14(4): 432-445.
- Liu, R. H. 2013a. Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*. 78(s1): A18-A25.

- Liu, R. H. 2013b. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 4(3): 384S-392S.
- Liu, S., Li, D., Huang, B., Chen, Y., Lu, X., y Wang, Y. 2013. Inhibition of pancreatic lipase, α -glucosidase, α -amylase, and hypolipidemic effects of the total flavonoids from *Nelumbo nucifera* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 149(1): 263-269.
- Loli, H., Kumar Narwal, S., Kumar Saun, N., y Gupta, R. 2015. Lipases in medicine: An overview. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 15(14): 1209-1216.
- Long, J. Z., y Cravatt, B. F. 2011. The metabolic serine hydrolases and their functions in mammalian physiology and disease. *Chemical Reviews*. 111(10): 6022-6063.
- Lowe, M. E. 1992. The catalytic site residues and interfacial binding of human pancreatic lipase. *Journal of Biological Chemistry*. 267(24): 17069-17073.
- Lowe, M. E. 1997a. Colipase stabilizes the lid domain of pancreatic triglyceride lipase. *Journal of Biological Chemistry*. 272(1): 9-12.
- Lowe, M. E. 1997b. Structure and function of pancreatic lipase and colipase. *Annual Review of Nutrition*. 17(1): 141-158.
- Lowe, M. E. 2002. The triglyceride lipases of the pancreas. *Journal of Lipid Research*. 43(12): 2007-2016.
- Lu, Q., Chen, C., Zhao, S., Ge, F., y Liu, D. 2015. Investigation on the Interaction Between Gallic Acid and α -Amylase by Spectroscopy. *International Journal of Food Properties*. 18(8).
- Lucas, E. A., Li, W., Peterson, S. K., Brown, A., Kuvibidila, S., Perkins-Veazie, P., Clarke, S. L., y Smith, B. J. 2011. Mango modulates body fat and plasma glucose and lipids in mice fed a high-fat diet. *British Journal of Nutrition*. 106(10): 1495-1505.
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A., y Mackie, A. 2011. The role of bile salts in digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*. 165(1): 36-46.
- Manning, S., Pucci, A., y Finer, N. 2014. Pharmacotherapy for obesity: novel agents and paradigms. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 5(3): 135-148.
- Manthey, J. A., y Perkins-Veazie, P. 2009. Influences of harvest date and location on the levels of β -carotene, ascorbic acid, total phenols, the in vitro antioxidant capacity, and phenolic profiles of five commercial varieties of mango (*Mangifera indica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(22): 10825-10830.

- Marti, A., Martínez-González, M. A., y Martínez, J. A. 2008. Interaction between genes and lifestyle factors on obesity. *Proceedings of the Nutrition Society*. 67(01): 1-8.
- McClements, D. J., y Li, Y. 2010. Review of *in vitro* digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*. 1(1): 32-59.
- McDougall, G. J., Kulkarni, N. N., y Stewart, D. 2009. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity *in vitro*. *Food Chemistry*. 115(1): 193-199.
- Medeiros-Neto, G., Halpern, A., y Bouchard, C. 2003. Progress in obesity research: 9. Food & Nutrition Press. Sao Paulo. pp. 1062.
- Miled, N., Beisson, F., de Caro, J., de Caro, A., Arondel, V., y Verger, R. 2001. Interfacial catalysis by lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 11(4-6): 165-171.
- Miled, N., Canaan, S., Dupuis, L., Roussel, A., Rivière, M., Carrière, F., de Caro, A., Cambillau, C., y Verger, R. 2000. Digestive lipases: From three-dimensional structure to physiology. *Biochimie*. 82(11): 973-986.
- Mohammad, M., Al-masri, I., Issa, A., Khair, A., y Bustanji, Y. 2013. Inhibition of pancreatic lipase by berberine and dihydroberberine: an investigation by docking simulation and experimental validation. *Medicinal Chemistry Research*. 22(5): 2273-2278.
- Möller, M., y Denicola, A. 2002. Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 30(3): 175-178.
- Möller, N., Scholz-Ahrens, K., Roos, N., y Schrezenmeir, J. 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*. 47(4): 171-182.
- Morgen, C. S., y Sorensen, T. I. A. 2014. Obesity: Global trends in the prevalence of overweight and obesity. *Nature Reviews in Endocrinology*. 10(9): 513-514.
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., y Schwartz, M. W. 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 443(7109): 289-295.
- Mozaffarian, D., y Wu, J. H. Y. 2011. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: Effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *Journal of the American College of Cardiology*. 58(20): 2047-2067.
- Mukherjee, M. 2003. Human digestive and metabolic lipases—a brief review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 22(5-6): 369-376.
- Mulaudzi, R. B., Ndhlala, A. R., Kulkarni, M. G., y Van Staden, J. 2012. Pharmacological properties and protein binding capacity of phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever. *Journal of Ethnopharmacology*. 143(1): 185-193.

- Nagy, K., Courtet-Compondu, M.-C., Williamson, G., Rezzi, S., Kussmann, M., y Rytz, A. 2012. Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence. *Food Chemistry*. 132(3): 1333-1339.
- Nathan, P. J., O'Neill, B. V., Napolitano, A., y Bullmore, E. T. 2011. Neuropsychiatric adverse effects of centrally acting antiobesity drugs. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 17(5): 490-505.
- Neves Petersen, M. T., Fojan, P., y Petersen, S. B. 2001. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *Journal of Biotechnology*. 85(2): 115-147.
- O'Neil, P. M., Smith, S. R., Weissman, N. J., Fidler, M. C., Sanchez, M., Zhang, J., Raether, B., Anderson, C. M., y Shanahan, W. R. 2012. Randomized placebo-controlled clinical trial of lorcaserin for weight loss in type 2 diabetes mellitus: The BLOOM-DM study. *Obesity*. 20(7): 1426-1436.
- Oboh, G., Agunloye Odunayo, M., Adefegha Stephen, A., Akinyemi Ayodele, J., y Ademiluyi Adedayo, O. 2015. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (*in vitro*): a comparative study. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*. 26(2): 165.
- Oliveira, R. F., Gonçalves, G. A., Inácio, F. D., Koehnlein, E. A., de Souza, C. G. M., Bracht, A., y Peralta, R. M. 2015. Inhibition of pancreatic lipase and triacylglycerol intestinal absorption by a Pinhão Coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. *Nutrients*. 7(7): 5601-5614.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G., y Goldman, A. 1992. The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering*. 5(3): 197-211.
- Ozdal, T., Capanoglu, E., y Altay, F. 2013. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*. 51(2): 954-970.
- Pafumi, Y., Lairon, D., de la Porte, P. L., Juhel, C., Storch, J., Hamosh, M., y Armand, M. 2002. Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. *Journal of Biological Chemistry*. 277(31): 28070-28079.
- Paiva, A. L., Balcão, V. M., y Malcata, F. X. 2000. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 27(3-5): 187-204.
- Palafox-Carlos, H., Yahia, E., y González-Aguilar, G. 2012. Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC-DAD-MS/MS-ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. *Food Chemistry*. 135(1): 105-111.

- Pan, C.-P., Muiño, P. L., Barkley, M. D., y Callis, P. R. 2011. Correlation of tryptophan fluorescence spectral shifts and lifetimes arising directly from heterogeneous environment. *The Journal of Physical Chemistry B*. 115(12): 3245-3253.
- Papadopoulou, A., y Frazier, R. A. 2004. Characterization of protein–polyphenol interactions. *Trends in Food Science & Technology*. 15(3–4): 186-190.
- Phelan, M., y Kerins, D. 2011. The potential role of milk-derived peptides in cardiovascular disease. *Food & Function*. 2(3-4): 153-167.
- Porter, C. J., Trevaskis, N. L., y Charman, W. N. 2007. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 6(3): 231-248.
- Rahim, A. T. M. A., Takahashi, Y., y Yamaki, K. 2015. Mode of pancreatic lipase inhibition activity in vitro by some flavonoids and non-flavonoid polyphenols. *Food Research International*. 75: 289-294.
- Rawel, H. M., Meidtner, K., y Kroll, J. 2005. Binding of Selected Phenolic Compounds to Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(10): 4228-4235.
- Reis, P., Holmberg, K., Watzke, H., Leser, M. E., y Miller, R. 2009. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 147–148: 237-250.
- Robinson, J. R., y Niswender, K. D. 2009. What are the risks and the benefits of current and emerging weight-loss medications? *Current Diabetes Reports*. 9(5): 368-375.
- Robles-Sánchez, M., Astiazarán-García, H., Martín-Belloso, O., Gorinstein, S., Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A., Yepiz-Plascencia, G., y González-Aguilar, G. A. 2011. Influence of whole and fresh-cut mango intake on plasma lipids and antioxidant capacity of healthy adults. *Food Research International*. 44(5): 1386-1391.
- Rodgers, R. J., Tschöp, M. H., y Wilding, J. P. 2012. Anti-obesity drugs: Past, present and future. *Disease Models & Mechanisms*. 5(5): 621-626.
- Roger, E., Lagarce, F., Garcion, E., y Benoit, J.-P. 2010. Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. *Nanomedicine*. 5(2): 287-306.
- Ross, L. E., Xiao, X., y Lowe, M. E. 2013. Identification of amino acids in human colipase that mediate adsorption to lipid emulsions and mixed micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1831(6): 1052-1059.
- Samaha, F. F., Iqbal, N., Seshadri, P., Chicano, K. L., Daily, D. A., McGrory, J., Williams, T., Williams, M., Gracely, E. J., y Stern, L. 2003. A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *New England Journal of Medicine*. 348(21): 2074-2081.

- Sanders, L. M. 2016. Carbohydrate: Digestion, absorption and metabolism. En: B. Caballero, P. M. Finglas y F. Toldrá (Eds.). Encyclopedia of Food and Health, Academic Press, Oxford, pp. 643-650.
- Savitzky, A., y Golay, M. J. E. 1964. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. Analytical Chemistry. 36(8): 1627-1639.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Moreno-Hernández, C. L., Montalvo-González, E., García-Magaña, M. L., Mata-Montes de Oca, M., Torres, J. L., y Pérez-Jiménez, J. 2013. Mexican 'Ataulfo' mango (*Mangifera indica* L) as a source of hydrolyzable tannins. Analysis by MALDI-TOF/TOF MS. Food Research International. 51(1): 188-194.
- Scapagnini, G., Davinelli, S., Kaneko, T., Koverech, G., Koverech, A., Calabrese, E., y Calabrese, V. 2014. Dose response biology of resveratrol in obesity. Journal of Cell Communication and Signaling. 8(4): 385-391.
- Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C., Gatti-Lafranconi, P., Brocca, S., Lotti, M., Jaeger, K.-E., Puls, M., y Eggert, T. 2006. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 39(1-4): 166-170.
- Segel, I. H. 1993. Enzyme kinetics: Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. pp. 957.
- Sergent, T., Piront, N., Meurice, J., Toussaint, O., y Schneider, Y.-J. 2010. Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an *in vitro* model of inflamed human intestinal epithelium. Chemico-Biological Interactions. 188(3): 659-667.
- Sergent, T., Vanderstraeten, J., Winand, J., Beguin, P., y Schneider, Y.-J. 2012. Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances. Food Chemistry. 135(1): 68-73.
- Shi, Y., y Burn, P. 2004a. Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. Nature Reviews Drug Discovery. 3(8): 695-710.
- Shi, Y., y Burn, P. 2004b. Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. Nat Rev Drug Discov. 3(8): 695-710.
- Shirakami, Y., Sakai, H., Kubota, M., Kochi, T., y Shimizu, M. 2015. Dietary phytochemicals as cancer preventive agents: Efficacy and mechanisms. Journal of Bioanalysis & Biomedicine. 7: 040-049.
- Sitrin, M. 2014. Digestion and absorption of dietary triglycerides. En: P. S. Leung (Eds.). The Gastrointestinal System, Springer Netherlands, pp. 159-178.
- Smith, S., Weissman, N., Anderson, C., Sanchez, M., Chuang, E., Stubbe, S., Bays, H., y Shanahan, W. 2010. Behavioral modification and lorcaserin for overweight and obesity management (BLOOM) study group. Multicenter,

- placebo-controlled trial of lorcaserin for weight management. *New England Journal of Medicine*. 363(3): 245-256.
- Sumithran, P., y Proietto, J. 2014. Benefit-risk assessment of orlistat in the treatment of obesity. *Drug Safety*. 37(8): 597-608.
- Tang, W., Zhu, X., y Ba, Z. 2015. Bioactive substances of microbial origin. En: P. C. K. Cheung y B. M. Mehta (Eds.). *Handbook of Food Chemistry*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 1035-1060.
- Thomas, A., Allouche, M., Basyn, F., Brasseur, R., y Kerfelec, B. 2005. Role of the lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity. *Journal of Biological Chemistry*. 280(48): 40074-40083.
- Tiss, A., Lengsfeld, H., Carrière, F., y Verger, R. 2009. Inhibition of human pancreatic lipase by tetrahydrolipstatin: Further kinetic studies showing its reversibility. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 58(1-4): 41-47.
- Torres-Fuentes, C., Schellekens, H., Dinan, T. G., y Cryan, J. F. 2015. A natural solution for obesity: Bioactives for the prevention and treatment of weight gain. A review. *Nutritional Neuroscience*. 18(2): 49-65.
- Valentino, M. A., Lin, J. E., y Waldman, S. A. 2010. Central and peripheral molecular targets for antiobesity pharmacotherapy. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 87(6): 652-662.
- van Tilbeurgh, H., Bezzine, S., Cambillau, C., Verger, R., y Carrière, F. 1999. Colipase: structure and interaction with pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1441(2-3): 173-184.
- van Tilbeurgh, H., Egloff, M.-P., Martinez, C., Rugani, N., Verger, R., y Cambillau, C. 1993. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature*. 362(6423): 814-820.
- van Tilbeurgh, H., Sarda, L., Verger, R., y Cambillau, C. 1992. Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. *Nature*. 359(6391): 159-162.
- Velderrain-Rodriguez, G. R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J. F., Chen, C. Y. O., Robles-Sanchez, M., Astiazaran-Garcia, H., Alvarez-Parrilla, E., y Gonzalez-Aguilar, G. A. 2014. Phenolic compounds: their journey after intake. *Food & Function*. 5(2): 189-197.
- Vivian, J. T., y Callis, P. R. 2001. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophysical Journal*. 80(5): 2093-2109.
- Wall-Medrano, A., Velderrain-Rodriguez, G. R., González-Aguilar, G. A., Laura, A., López-Díaz, J. A., y Álvarez-Parrilla, E. 2014. El mango: aspectos agroindustriales, valor nutricional/funcional y efectos en la salud. *Nutricion Hospitalaria*. 31(1): 67-75.
- Wang, S., Dong, S., Zhang, R., Shao, H., y Liu, Y. 2014a. Effects of proanthocyanidins on porcine pancreatic lipase: Conformation, activity, kinetics and thermodynamics. *Process Biochemistry*. 49(2): 237-243.

- Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., Bapat, P., Kwun, I., y Shen, C.-L. 2014b. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 25(1): 1-18.
- Wang, S., Moustaid-Moussa, N., Chen, L., Mo, H., Shastri, A., Su, R., Bapat, P., Kwun, I., y Shen, C.-L. 2014c. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 25(1): 1-18.
- Wang, S., Sun, Z., Dong, S., Liu, Y., y Liu, Y. 2014d. Molecular interactions between (-)-epigallocatechin gallate analogs and pancreatic lipase. *PLoS ONE*. 9(11): e111143.
- Wang, W., Donini, O., Reyes, C. M., y Kollman, P. A. 2001. Biomolecular simulations: Recent developments in force fields, simulations of enzyme Catalysis, protein-ligand, protein-protein, and protein-nucleic acid noncovalent interactions. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. 30(1): 211-243.
- Wang, Y. C., McPherson, K., Marsh, T., Gortmaker, S. L., y Brown, M. 2011. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *The Lancet*. 378(9793): 815-825.
- Whitcomb, D., y Lowe, M. 2007. Human pancreatic digestive enzymes. *Digestive Diseases and Sciences*. 52(1): 1-17.
- Wilde, P. J., y Chu, B. S. 2011. Interfacial and colloidal aspects of lipid digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*. 165(1): 14-22.
- Williams, D. J., Edwards, D., Hamernig, I., Jian, L., James, A. P., Johnson, S. K., y Tapsell, L. C. 2013. Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. *Food Research International*. 52(1): 323-333.
- Williamson, G., y Clifford, M. N. 2010. Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition*. 104(S3): S48-S66.
- Winkler, F. K., D'Arcy, A., y Hunziker, W. 1990. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*. 343(6260): 771-774.
- Wong, H., y Schotz, M. C. 2002. The lipase gene family. *Journal of Lipid Research*. 43(7): 993-999.
- Worsztynowicz, P., Napierała, M., Białas, W., Grajek, W., y Olkowicz, M. 2014. Pancreatic α -amylase and lipase inhibitory activity of polyphenolic compounds present in the extract of black chokeberry (*Aronia melanocarpa* L.). *Process Biochemistry*. 49(9): 1457-1463.
- Wu, X., He, W., Yao, L., Zhang, H., Liu, Z., Wang, W., Ye, Y., y Cao, J. 2013. Characterization of binding interactions of (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea and lipase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(37): 8829-8835.

- Wu, X., He, W., Zhang, H., Li, Y., Liu, Z., y He, Z. 2014. Acteoside: A lipase inhibitor from the chinese tea *Ligustrum purpurascens* kudingcha. *Food Chemistry*. 142: 306-310.
- Wu, X., Wu, H., Liu, M., Liu, Z., Xu, H., y Lai, F. 2011. Analysis of binding interaction between (-)-epigallocatechin (EGC) and β -lactoglobulin by multi-spectroscopic method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 82(1): 164-168.
- Xiao, H., Liu, B., Mo, H., y Liang, G. 2015. Comparative evaluation of tannic acid inhibiting α -glucosidase and trypsin. *Food Research International*. 76, Part 3: 605-610.
- Xiao, J., Cao, H., Wang, Y., Zhao, J., y Wei, X. 2009. Glycosylation of dietary flavonoids decreases the affinities for plasma protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(15): 6642-6648.
- Xiao, J., y Kai, G. 2012. A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 52(1): 85-101.
- Xiao, J., Kai, G., Yamamoto, K., y Chen, X. 2013a. Advance in dietary polyphenols as α -glucosidases inhibitors: A review on structure-activity relationship aspect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53(8): 818-836.
- Xiao, J., Mao, F., Yang, F., Zhao, Y., Zhang, C., y Yamamoto, K. 2011a. Interaction of dietary polyphenols with bovine milk proteins: Molecular structure-affinity relationship and influencing bioactivity aspects. *Molecular Nutrition & Food Research*. 55(11): 1637-1645.
- Xiao, J., Ni, X., Kai, G., y Chen, X. 2013b. A review on structure-activity relationship of dietary polyphenols inhibiting α -amylase. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53(5): 497-506.
- Xiao, X., Mukherjee, A., Ross, L. E., y Lowe, M. E. 2011b. Pancreatic lipase-related protein-2 (PLRP2) can contribute to dietary fat digestion in human newborns. *Journal of Biological Chemistry*. 286(30): 26353-26363.
- Xiao, X., Ross, L. E., Sevilla, W. A., Wang, Y., y Lowe, M. E. 2013c. Porcine pancreatic lipase related protein 2 has high triglyceride lipase activity in the absence of colipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1831(9): 1435-1441.
- Yahia, E. M. 2010. The contribution of fruit and vegetable consumption to human health. En: L. A. de la Rosa, E. Alvarez-Parrilla y G. A. Gonzalez-Aguilar (Eds.). *Fruit and Vegetable Phytochemicals*, Wiley-Blackwell, Oxford, pp. 1-51.

- Yang, D., Xie, H., Jiang, Y., y Wei, X. 2016. Phenolics from strawberry cv. Falandi and their antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities. *Food Chemistry*. 194: 857-863.
- Yang, Y., y Lowe, M. E. 2000. The open lid mediates pancreatic lipase function. *Journal of Lipid Research*. 41(1): 48-57.
- Yaqoob, P. 2013. Role of lipids in human nutrition. En: R. Aparicio y J. Harwood (Eds.). *Handbook of Olive Oil*, Springer US, pp. 655-675.
- You, Q., Chen, F., Wang, X., Luo, P. G., y Jiang, Y. 2011. Inhibitory effects of muscadine anthocyanins on α -glucosidase and pancreatic lipase activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(17): 9506-9511.
- Yuksel, Z., Avci, E., y Erdem, Y. K. 2010. Characterization of binding interactions between green tea flavanoids and milk proteins. *Food Chemistry*. 121(2): 450-456.
- Yun, J. W. 2010a. Possible anti-obesity therapeutics from nature—A review. *Phytochemistry*. 71(14): 1625-1641.
- Yun, J. W. 2010b. Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. *Phytochemistry*. 71(14–15): 1625-1641.
- Zeng, H.-j., Liang, H.-l., You, J., y Qu, L.-b. 2014. Study on the binding of chlorogenic acid to pepsin by spectral and molecular docking. *Luminescence*. 29(7): 715-721.
- Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D. D., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., Liu, Q., y Tsao, R. 2015a. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry*. 172: 862-872.
- Zhang, X., Chen, F., y Wang, M. 2015b. Bioactive substances of animal origin. En: P. C. K. Cheung y B. M. Mehta (Eds.). *Handbook of Food Chemistry*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 1009-1033.
- Zhao, Y., Wu, Y., y Wang, M. 2015. Bioactive substances of plant origin. En: P. C. K. Cheung y B. M. Mehta (Eds.). *Handbook of Food Chemistry*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 967-1008.
- Zhu, Y.-T., Jia, Y.-W., Liu, Y.-M., Liang, J., Ding, L.-S., y Liao, X. 2014. Lipase ligands in *Nelumbo nucifera* leaves and study of their binding mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(44): 10679-10686.