

5. Evaluación de la actividad enzimática durante la madurez del fruto de pingüica (*Ehretia tinifolia*) y la capacidad inhibitoria de los extractos fenólicos sobre la lipasa pancreática



ANDREÉ VELÁZQUEZ MARO*

RAÚL BALAM MARTÍNEZ PÉREZ**

LOURDES MARIANA DÍAZ TENORIO***

ANA MARÍA RENTERÍA MEXÍA****

DOI: <https://doi.org/10.52501/cc.348.05>

Resumen

Hoy en día la obesidad es uno de los más grandes problemas de salud a nivel mundial y, a pesar de ello, no existen muchas opciones farmacológicas para el tratamiento de la obesidad. La tetrahidrolipstatina, conocida comercialmente como Orlistat, es el único fármaco inhibidor de lipasas aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para la terapia a largo plazo de la obesidad. Debido a lo anterior diversas investigaciones se han enfocado en el desarrollo de fármacos antiobesidad, a partir de inhibidores de lipasas digestivas obtenidos principalmente de fuentes naturales, esto se debe a que algunos metabolitos secundarios de plantas, tales como los compuestos fenólicos, tienen la capacidad de inhibir la actividad de la lipasa pancreática. Este trabajo busca evaluar la producción de enzimas y las propiedades bioactivas del fruto de la pingüica (*Ehretia tinifolia*) para

* Ingeniero en Biotecnología por el Instituto Tecnológico de Sonora. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-3208-5016> ; correo electrónico: andree.velazquez212839@potros.itson.edu.mx

** Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología. Profesor del Instituto Tecnológico de Sonora, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5152-7695> ; Scopus: 57210646749

*** Doctora en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales. Adscrita al Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias del Instituto Tecnológico de Sonora, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8941-3965>

**** Doctora en Physical Activity, Nutrition, and Wellness. Adscrita al Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias del Instituto Tecnológico de Sonora, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9760-1213> ; Scopus: 57204177744

verificar su capacidad inhibitoria, enzimas lipasas. Para esto, se cuantificó la concentración de proteínas solubles y azúcares reductores en los extractos del fruto, se cuantificó la actividad enzimática (proteasa y lipasa) de los mismos, y con extractos etanólicos extrajeron compuestos fenólicos para realizar ensayos de inhibición de lipasa pancreática porcina. Se logró tener porcentajes de inhibición $16.06 \pm 3.06 \%$ y $26.6 \pm 2.1 \%$ en los estadios de madurez y senescencia respectivamente.

Palabras clave: *inhibición, pingüica, lipasas, compuestos fenólicos.*

Introducción

La obesidad es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, un trastorno metabólico es caracterizado por el exceso de grasa corporal, se considera uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, como diabetes, entre otras afecciones (Ceballos-Macías et al., 2018). Para el tratamiento de la obesidad se recomiendan dietas nutritivas, actividad física, tratamientos farmacológicos y opciones quirúrgicas (Rodrigo-Cano et al., 2017).

Uno de los principales focos de atención en el desarrollo de tratamientos farmacológicos para la obesidad son los inhibidores de lipasas digestivas (Liu et al., 2020), al inhibir la hidrólisis de los triacilglicéridos por las lipasas se puede disminuir la cantidad de grasa absorbida en el intestino (Kumar y Chauhan, 2021; Lowe, 1997; Winkler et al., 1990).

La tetrahidrolipastaina es un inhibidor irreversible de la lipasa pancreática, derivado de la lipstatina producida por *Streptomyces toxytricini*. Inhibe entre el 46.6 % y 91.4 % de la actividad enzimática y es el único inhibidor de lipasas aprobado por la FDA para el tratamiento a largo plazo de la obesidad. Sin embargo, su uso puede causar efectos secundarios como esteatorrea, incontinencia fecal y deficiencia de vitaminas liposolubles (Carrière et al., 2001; Heck et al., 2000; Zhang et al., 2008). Por lo tanto, una de las crecientes estrategias para el descubrimiento de medicamentos antiobesidad es la búsqueda de potentes inhibidores de lipasas en diferentes extractos de plantas, debido a que existen una variedad de compuestos bioactivos pre-

sentes en las plantas que han presentado potencial para el tratamiento de distintas enfermedades metabólicas, incluidas la obesidad (Buchholz y Melzig, 2015). Otro de los inhibidores utilizados comúnmente para el estudio de la inhibición de enzimas lipolíticas es el paraoxón (inhibidor irreversible de colinesterasas); sin embargo, este no se encuentra aprobado por ningún organismo regulatorio para el consumo humano debido a su alta toxicidad, a pesar de esto, muchos estudios lo han utilizado en modelos in vitro, para demostrar inhibición de enzimas lipolíticas.

Debido a lo anterior, esta investigación busca evaluar la producción de enzimas y las propiedades bioactivas del fruto de la pingüica (*Ehretia tinifolia*) en diferentes estadios de madurez, por métodos y técnicas bioquímicas para su potencial uso como inhibidor de enzimas lipolíticas digestivas.

Metodología

Introducción a la metodología

Las diferentes metodologías utilizadas en el presente estudio se enfocan en la cuantificación de la actividad lipolítica y proteolítica de los frutillos de la *E. tinifolia*, así como la cuantificación de los azúcares reductores presente en diferentes etapas del desarrollo.

Diseño del estudio

Las metodologías empleadas en este estudio fueron de carácter cuantitativo, ya que se calcularon los promedios, desviaciones estándar y el coeficiente de variación de los datos obtenidos con una de coeficiente de variación menor al 5 %. Asimismo, todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Métodos utilizados

Obtención de extractos de E. tinifolia, cuantificación de proteínas y azúcares reductores

Los frutos de *E. tinifolia* fueron recolectados y clasificados en seis diferentes estadios de maduración: inmadurez, desarrollo, madurez, sobremadurez, ablandamiento y senescencia. Se realizaron extractos acuosos de estadios de maduración en relación 1:1 (frutillo: agua destilada) para posteriormente realizar un macerado y centrifugar a 10 000 g durante 10 minutos a 4 °C, para así obtener el sobrenadante con actividad enzimática (extracto enzimático). La concentración de proteínas se realizó según el método de Bradford (1976). Se utilizó albumina sérica bovina (BSA) como estándar. Los azúcares se cuantificaron mediante el método de Miller (1959).

Cuantificación de actividad proteolítica

La actividad proteasa de las muestras se determinó a partir del método modificado de García-Carreño y Haard (1993). La actividad enzimática fue representada en unidades por mililitro (u/ml) y fue determinada por las siguientes ecuaciones:

$$\text{Unidades de absorbancia} = A_m - A_b \quad (1)$$

Donde A_m representa la absorbancia de la muestra, y A_b representa la absorbancia del blanco.

$$\text{Actividad proteasa (u/ml)} = \frac{\text{Abs/min}}{\text{ml}} \quad (2)$$

Donde Abs representa unidades de absorbancia, min representa el tiempo de la reacción en minutos y ml representa el volumen total de la reacción en mililitros.

Cuantificación de actividad lipolítica y zimogramas de actividad

Para la cuantificación de actividad lipasa se utilizó 4-nitrofenil laurato en terbutanol (10 mM) como sustrato, y se registró la absorbancia mediante cinética de 15 minutos, obteniendo lecturas cada 30 s, a una temperatura controlada de 30 °C y a una longitud de onda de 410 nm. La actividad lipasa se expresó en unidades por mililitros (u/ml). El perfil de proteínas de las muestras se realizó a partir del protocolo de Laemmli (1970). Se realizó en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12 %. La separación de proteínas se realizó a 15 mA y a una temperatura de 4 °C. Posteriormente, el gel se lavó con agua ultrapura y se incubó en 50 ml de buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (50 mM, pH 5.8) y 0.5 ml de tritón x-100 durante 30 min con agitación suave. A continuación, se incubó en 50 ml de buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (50 mM, pH 5.8) y 0.5 ml de 4-metilumbeliferil butirato (100 μM) en DMSO durante 10 min, con agitación suave y protegido de la luz; posteriormente se observaron las bandas con actividad lipolítica por fluorescencia bajo luz UV.

Obtención de extractos etanólicos del fruto de *E. tinifolia*

La extracción etanólica de compuestos fenólicos de *E. tinifolia* se realizó como se describe a continuación. Se pesaron 10 g del fruto y maceraron para posteriormente ser mezclados con 50 ml de etanol 96 %. La mezcla se almacenó a 4 °C durante 12 h y protegida de la luz, posterior a esto, se centrifugó a 10 000 g durante 10 minutos, se recuperó la fase líquida, la cual fue colocada en un rotavapor, para eliminar el etanol. Los compuestos obtenidos sin alcohol liofilizaron y almacenaron a 20 °C hasta posterior uso.

Inhibición de la lipasa pancreática porcina

Para analizar el efecto inhibitorio se incubó una solución de lipasa pancreática porcina (8.8 mg/ml) con exceso de colipasa, se utilizó el liofilizado de compuestos fenólicos disueltos en dimetil sulfoxido (DMSO; 1 mg/ml) en presencia del inhibidor paraoxón (1.376 mg/ml). La mezcla de lipasa pan-

creática porcina y moléculas inhibitorias se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente (25 °C), posteriormente, se cuantificó la actividad lipasa de acuerdo a la metodología de cuantificación de actividad lipasa con el método descrito por Mateos-Díaz et al. (2012). El porcentaje de inhibición fue determinada por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(Alc) - (Alm - Alc)}{Alc} \cdot 100 \quad (3)$$

Donde *Alc* representa la actividad lipasa del control y *Alm*, la actividad lipasa de la muestra. Los resultados fueron presentados el porcentaje de actividad relativa.

Resultados y discusión

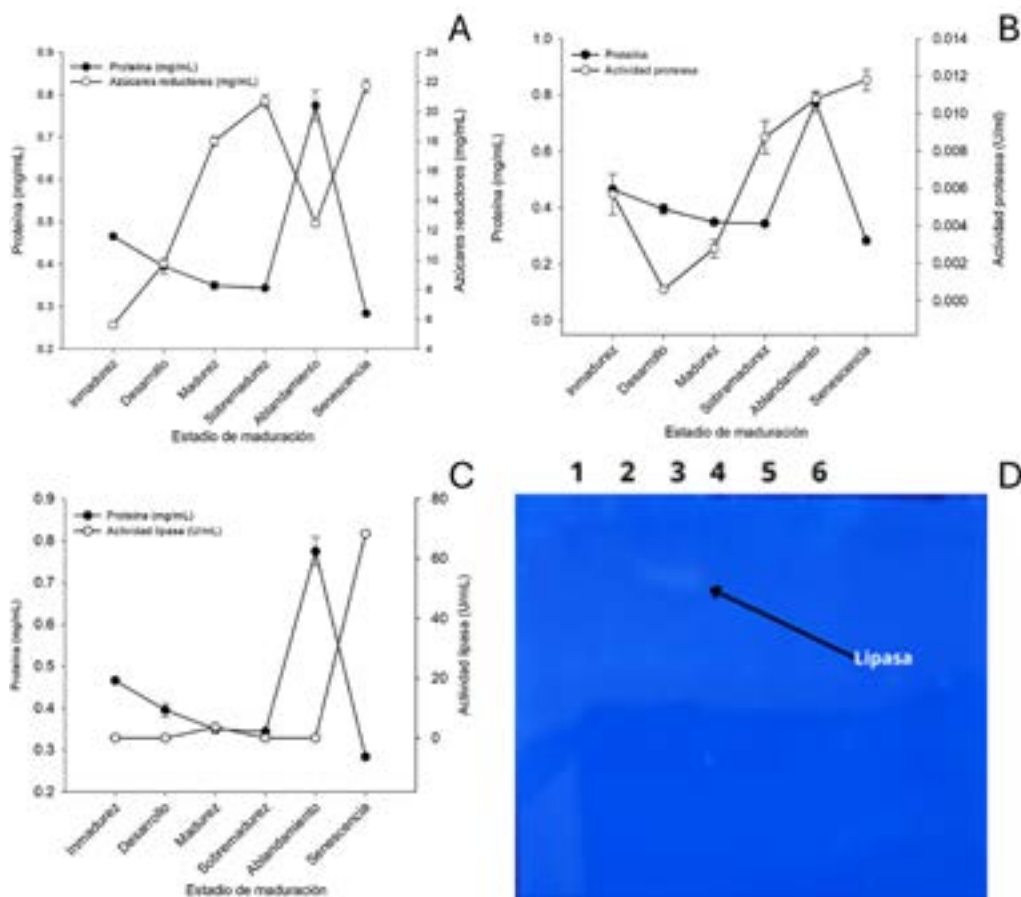
Cuantificación de proteína y azúcares reductores

Se observa un bajo contenido proteico y un aumento de la concentración de azúcares reductores a medida que el frutillo madura. Estos hallazgos son consistentes con lo reportado por Pío-León et al. (2012), quienes señalan que los frutos de *E. tinifolia* tienen un contenido de proteína del 16.5 % y un 65 % de carbohidratos en base seca figura 5.1a. Alqarni y Bazzi (2019) analizaron el aumento de proteína soluble, azúcares, actividades enzimáticas y polifenoles durante la maduración de los frutos de dátiles de la especie *Phoenix dactylifera* L. (variedad Hilwa). Los resultados presentados para la cantidad de proteína soluble muestran un comportamiento similar a los obtenidos en este trabajo para el fruto de *E. tinifolia*. Se reporta una baja cantidad de proteína durante los primeros estadios de maduración del fruto, alcanzan su máximo en la senescencia del fruto y disminuyen tras la madurez. En cuanto a los azúcares reductores, se evidencia un aumento progresivo durante la maduración, mostrando una disminución en el estadio de ablandamiento, comportamiento que coincide con los resultados del fruto de *E. tinifolia*.

En la figura 5.1b se muestra la actividad proteolítica en los extractos analizados, destacando que el estado de senescencia presentó la mayor ac-

tividad proteolítica junto con una baja concentración de proteínas. Este comportamiento se explica porque la degradación de proteínas durante la maduración de un fruto requiere la síntesis de enzimas hidrolíticas como las proteasas (Martínez-González et al., 2017).

Figura 5.1. Análisis de extractos enzimáticos de *Ehretia tinifolia*



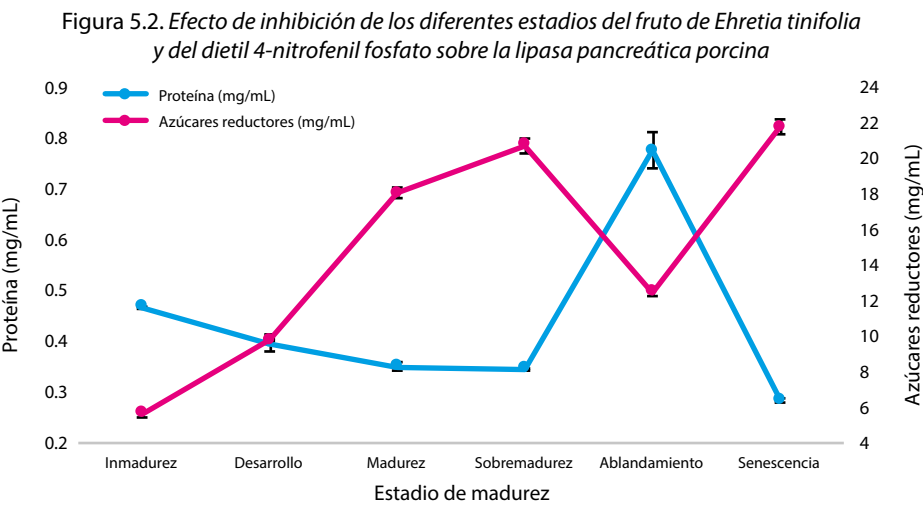
Notas: A = relación entre la concentración de proteínas y azúcares reductores en los distintos estadios del fruto de *Ehretia tinifolia*; B = relación entre la concentración de proteínas y actividad proteasa en los distintos estadios; C = relación entre la concentración de proteínas y actividad lipasa en los distintos estadios de frutillos de *Ehretia tinifolia*; D = zimograma de actividad lipasa; (1) inmadurez (4.65 μ g); (2) desarrollo (3.95 μ g); (3) madurez (3.49 μ g); (4) sobremadurez (3.44 μ g); (5) ablandamiento (7.74 μ g); (6) senescencia (2.83).

Fuente: elaboración propia.

Actividad lipasa y zimogramas

En la figura 5.1c se muestra la relación entre concentración de proteínas y actividad lipasa durante los estadios de madurez del fruto. Los resultados se comparan con el estudio de Henderson y Osborne (1991), quienes analizaron la actividad lipasa en *Elaeis guineensis* utilizando como sustrato glicerol tri[1-14C]oleato. En ambos estudios, se observa un aumento de la actividad lipasa al inicio de la madurez, que continúa aumentando a medida que el fruto madura. De igual manera, se menciona que este aumento puede estar correlacionado con la síntesis de carotenoides. Mientras que en la figura 5.1d se observa una banda de actividad lipolítica en el carril 3, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro*, sin embargo, el carril 6 que corresponde al estadio de senescencia no presenta ningún resultado visible en el zimograma, al ser el estadio que mayor actividad lipasa tuvo en los ensayos *in vitro*.

Inhibición de enzimas lipasas



Nota: se utilizó 4-nitrofenil laurato como sustrato.
Fuente: Elaboración propia.

La figura 5.2 muestra que únicamente el estadio de madurez y el de senescencia del fruto *E. tinifolia* presentaron una inhibición significativa sobre la lipasa pancreática porcina. Este efecto pudiera atribuirse a la presencia ácido rosmarínico (IC_{50} : 347.5 μ M) (Buchholz y Melzig, 2015; Sergent *et al.*, 2012) y al posible aumento de compuestos antioxidantes en el estadio de senescencia del fruto (Martínez-González *et al.*, 2017). En el estudio de Dzib Guerra (2015), *E. tinifolia* mostró una capacidad de inhibición de la lipasa pancreática de $41 \pm 1.8 \%$, $35 \pm 0.8 \%$, $12 \pm 0.4 \%$ para los extractos fenólicos extraídos con etanol (0.25 mg/ml) de hojas, tallos y raíces respectivamente.

Conclusiones

Durante la senescencia de los frutos se presenta una disminución en proteínas solubles, aumenta la cantidad de azúcares reductores y de igual manera, hay un aumento de actividad de proteasas y lipasas. Los extractos fenólicos del fruto de *E. tinifolia* de los estadios de madurez y senescencia inhibieron en un $16.06 \pm 3.06 \%$ y $26.6 \pm 2.1 \%$ la actividad de la lipasa pancreática porcina, respectivamente. Esto sugiere que los extractos del frutillo de *E. tinifolia* tienen la capacidad de inhibir la lipasa pancreática porcina. Mas ensayos son necesarios para conocer si estos también pueden tener un efecto significativo sobre las enzimas lipolíticas humanas.

Referencias

- Alqarni, S. S. M. y Bazzi, M. D. (2019). Understanding the increased fruit content of soluble proteins, sugars, certain enzyme activities, and certain polyphenols in context to date fruit ripening. *Annales Bogorienses*, 23(1), 49-57. <https://doi.org/10.14203/ann.bogor.2019.v23.n1.49-57>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buchholz, T. y Melzig, M. (2015). Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. *Planta Medica*, 81(10), 771-783. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546173>
- Carrière, F., Renou, C., Ransac, S., Lopez, V., de Caro, J., Ferrato, F., de Caro, A., Fleury, A., Sanwald-Ducray, P., Lengsfeld, H., Beglinger, C., Hadvary, P., Verger, R. y Laugier,

- R. (2001). Inhibition of gastrointestinal lipolysis by Orlistat during digestion of test meals in healthy volunteers. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(1), G16-G28. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.281.1.G16>
- Ceballos-Macías, J. J., Pérez Negrón-Juárez, R., Flores-Real, J. A., Vargas-Sánchez, J., Ortega-Gutiérrez, G., Madriz-Prado, R. y Hernández-Moreno, A. (2018). Obesidad: Pandemia del siglo XXI. *Revista de Sanidad Militar*, 72(5-6), 332-338. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-696X2018000400332&lng=es&tlng=es
- Crow, J. A., Bittles, V., Herring, K. L., Borazjani, A., Potter, P. M. y Ross, M. K. (2012). Inhibition of recombinant human carboxylesterase 1 and 2 and monoacylglycerol lipase by chlorpyrifos oxon, paraoxon and methyl paraoxon. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(1), 145-150. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.10.017>
- Dzib Guerra, W. C. (2015). *Actividad biológica de plantas utilizadas contra la diabetes, la hipertensión y la obesidad en la medicina tradicional maya* [Tesis de maestría]. Centro de Investigación Científica de Yucatán. <http://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/394>
- García-Carreño, F. L. y Haard, N. F. (1993). Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 17(2), 97-113. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1993.tb00864.x>
- Heck, A. M., Yanovski, J. A. y Calis, K. A. (2000). Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity. *Pharmacotherapy*, 20(3), 270-279. <https://doi.org/10.1592/phco.20.4.270.34882>
- Henderson, J. y Osborne, D. J. (1991). Lipase activity in ripening and mature fruit of the oil palm. Stability *in vivo* and *in vitro*. *Phytochemistry*, 30(4), 1073-1078. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95175-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95175-6)
- Kumar, A. y Chauhan, S. (2021). Pancreatic lipase inhibitors: The road voyaged and successes. *Life Sciences*, 271, 119115. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119115>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Liu, T. T., Liu, X. T., Chen, Q. X. y Shi, Y. (2020). Lipase inhibitors for obesity: A review. *Biomedicine y Pharmacotherapy*, 128, 110314. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110314>
- Lowe, M. E. (1997). Structure and function of pancreatic lipase and colipase. *Annual Review of Nutrition*, 17(1), 141-158. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.17.1.141>
- Martínez-González, M. E., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Cortes-Cruz, M. A., Palomino-Hermosillo, Y. A. y López-Guzmán, G. G. (2017). Poscosecha de frutos: maduración y cambios bioquímicos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(no. esp. 19), 4075-4087. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.674>
- Mateos-Díaz, E., Rodríguez, J. A., Camacho-Ruiz, M. Á. y Mateos-Díaz, J. C. (2012). High-throughput screening method for lipases/esterases. En G. Sandoval (Ed.), *Lipases and phospholipases: Methods and protocols*. (pp. 89-100; col. Methods in Molecular Biology, 861). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_5

- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Pío-León, J. F., Díaz-Camacho, S. P., López, M. G., Montes-Ávila, J., López-Angulo, G. y Delgado-Vargas, F. (2012). Physicochemical, nutritional, and antioxidant characteristics of the fruit of *Ehretia tinifolia*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 83(1), 273–280. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532012000100029&lng=es&tlng=en
- Rodrigo-Cano, S., Soriano del Castillo, J. M. y Merino-Torres, J. F. (2017). Causas y tratamiento de la obesidad. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 37(4), 87–92. <https://doi.org/10.12873/374rodrigo>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.074>
- Winkler, F. K., D'Arcy, A. y Hunziker, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature*, 343(6260), 771–774. <https://doi.org/10.1038/343771a0>
- Zhang, J., Kang, M.-J., Kim, M.-J., Kim, M.-E., Song, J.-H., Lee, Y.-M. y Kim, J.-I. (2008). Pancreatic lipase inhibitory activity of taraxacum officinale in vitro and in vivo. *Nutrition Research and Practice*, 2(4), 200–203. <https://doi.org/10.4162/nrp.2008.2.4.200>