Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riiit.com.mx

Inhibición de enzimas digestivas por acción de fitoquímicos: una revisión

Inhibition of digestive enzymes by the action of phytochemicals: a review

Reyes-Morales, K.G.[1], Michel, M.R.[2], Gallegos-Infante, J.A.[1], González-Laredo, R.F.[1], Aguilar-Zárate, P.[2*], Rocha-Guzmán, N.E.[1*]

[1] Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Durango, UPIDET, Departamento de Ingenierías Química y Bioquímica. Boulevard Felipe Pescador 1830 Oriente., Col Nueva Vizcaya, C.P. 34080, Durango, Durango, México.

[2] Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Ciudad Valles, Departamento de Ingenierías. Carretera al Ingenio Plan de Ayala Km. 2, Col. Vista Hermosa, C.P. 79010, Ciudad Valles, San Luis Potosí, México.

lnkarinareyes21@gmail.com; mariela.michel@tecvalles.mx; agallegos@itdurango.edu.mx; rubenfgl@itdurango.edu.mx; * pedro.aguilar@tecvalles.mx; * nrocha@itdurango.edu.mx

Innovación tecnológica: Aprovechamiento de residuos agroindustriales.
Área de aplicación industrial: Alimentos funcionales y Nutracéuticos.

Recibido: 01 junio 2022
Aceptado: 16 noviembre 2022

Abstract

The phytochemicals are compounds present in plants, which are mainly involved in growth and defense functions. Polyphenols are part of these constituents and exhibit beneficial functions for the human organism. These compounds have shown the ability to inhibit the activity of digestive enzymes such as: α-pancreatic amylase and α-glucosidase, proteases and lipases. The ability of phenolic compounds to interact with digestive enzymes can be evaluated by *in silico* assays. These types of scans are performed on computer and have the advantages of performing approximations to in vitro assays, reduced experimental expenses and less time investment. To evaluate the interactions between digestive enzymes and polyphenols, several parameters are considered in order to identify the compounds as inhibitors of digestive activity, the results being a preamble to the *in vitro* assays, which will later allow corroborating the effects of the inhibitory activity of the compounds on digestive enzymes. Therefore, this review evaluates the potential use of polyphenols, as a natural alternative to the use of drugs, to inhibit digestive enzymes. It includes the analysis of information on the enzymes involved in the digestion process, the use of polyphenols as inhibitors and the main methods of analysis for polyphenol-enzyme interaction.

Key words: α-Amylase, Glucosidase, Protease, lipase, polyphenols, *in silico*, *in vitro*.

Resumen

Los fitoquímicos son compuestos presentes en las plantas, que participan en funciones de crecimiento y defensa principalmente. Los polifenoles forman parte de estos constituyentes y exhiben funciones benéficas para el organismo del ser humano. Estos compuestos han mostrado la capacidad para inhibir la actividad de las enzimas digestivas como: α-amilasa pancreática y α-glucosidasa, proteasas y lipasas. La capacidad de los compuestos fenólicos de interactuar con las enzimas digestivas puede evaluarse mediante ensayos *in silico*. Este tipo de exploraciones son realizadas en computadora y presentan las ventajas de efectuar aproximaciones a los ensayos *in vitro,* la reducción de los gastos experimentales y una menor inversión de tiempo. Para evaluar las interacciones entre las enzimas digestivas y los polifenoles, se consideran diversos parámetros con la finalidad de identificar los compuestos como inhibidores de la actividad digestiva, siendo los resultados un preámbulo a los ensayos *in vitro*, que posteriormente permitirán corroborar los efectos de la actividad inhibitoria de los compuestos en las enzimas digestivas. Por ello en la presente revisión se evalúa el uso potencial de polifenoles, como alternativa natural al uso de fármacos, para inhibir las enzimas digestivas. Incluye el análisis de información sobre las enzimas que participan en el proceso de digestión, el uso de polifenoles como inhibidores y los principales métodos de análisis para la interacción polifenoles-enzimas.

Palabras clave: α-Amilasa, Glucosidasa, Proteasa, Lipasa, polifenoles, *in silico, in vitro.*

Introducción

Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios que se encuentran en frutas, verduras y plantas, entre otros (Poklar Ulrih, 2017) siendo los fitoquímicos más comunes en los alimentos (Xu *et al*., 2016). De una manera general, los compuestos polifenólicos se pueden clasificar en ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos, curcuminoides, y lignanos y entre otros (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Uribe, & Serna-Saldívar, 2014; González-Castejón & Rodriguez-Casado, 2011). Los ácidos fenólicos, que cuentan con un anillo aromático y al menos un resto de ácido carboxílico en su estructura, se encuentran divididos en dos grupos, ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico) y ácidos hidroxicinámicos (*p* -ácido cumárico). Los flavonoides contienen una base de estructura de tres anillos (C6-C3-C6), y se dividen en varios subgrupos como flavonas, flavonoles, flavanonas, flavonoides y otros (Buchholz & Melzig, 2015).

Las propiedades de los compuestos polifenólicos son la capacidad antioxidante (Li *et al.,* 2014*)*, antimicrobiana (Ruiz-Cruz *et al*., 2010), anti-inflamatoria, anti-alergénico, analgésico, antioxidante, hipoglucemiantes y hipolipidémico, por lo tanto, tienen un amplio potencial de aplicación (Chen *et al*., 2020). Los fitoquímicos han mostrado capacidades preventivas en patologías como la diabetes y obesidad mediante ingesta en la alimentación. La propiedad antidiabética de los compuestos polifenólicos se relaciona principalmente con su eficacia para disminuir los niveles de glucemia posprandial (da Silva *et al*., 2014). Existen mecanismos que explican la actividad anti-obesidad de los compuestos polifenólicos tales como la inhibición de las enzimas responsables de la absorción de carbohidratos (Yang & Kong, 2016).

Se ha descrito que altas concentraciones de taninos se unen y precipitan de forma inespecífica a proteínas y debido a esto se

consideran compuestos anti nutricionales (He *et al*., 2007). Por otra parte, solo pocos investigadores como Xiao *et al*., (2015) han analizado la inhibición de las proteasas digestivas, como la tripsina, mediante compuestos polifenólicos.

Por lo tanto, en la presente revisión se describen generalidades de las principales enzimas digestivas implicadas en el proceso digestivo, su mecanismo de acción, y los diversos compuestos inhibidores de la actividad enzimática. También, se describen los principales hallazgos sobre la inhibición de los compuestos fenólicos con enzimas digestivas. Además, se analizan las principales técnicas utilizadas para el análisis de las interacciones enzimas-polifenoles.

2. Principales enzimas involucradas en procesos digestivos

2.1 Lipasas

Los lípidos realizan diversas funciones importantes dentro del organismo humano, entre las cuales se encuentran: proveer de energía, son componentes estructurales en las membranas celulares, transportadores y las actividades hormonales (Sitrin, 2014). Las principales clases de lípidos que se encuentran en la dieta son los triacilglicéridos (90-95%), así mismo, los ésteres de colesterol, fosfolípidos y vitaminas liposolubles (Yaqoob, 2013). Los triacilglicéridos de la dieta cuentan con una estructura química formada por tres moléculas de ácidos grasos de diversos pesos moleculares (C6 – C22) y saturaciones unidas a través de un enlace éster a una molécula de glicerol. Los investigadores y expertos en el tema han tratado de comprender los mecanismos de digestión y absorción de los triacilglicéridos, debido a su importancia en el estado normal de la nutrición y de enfermedad en el organismo humano. La enzima responsable de la mayor parte de la digestión de los triglicéridos en los seres humanos adultos es la lipasa pancreática, esta es una glicoproteína de 449 aminoácidos y se secreta en el páncreas en su forma activa. La lipasa pancreática pura tiene un pH óptimo de 8-9, pero en presencia de sales biliares el pH óptimo se reduce a pH 6-7, que es el pH típico del intestino delgado superior. A pH ácido menor a 4.0, la lipasa pancreática se inactiva irreversiblemente; por consiguiente, la neutralización del ácido gástrico por bicarbonato en el jugo pancreático es esencial para preservar la actividad enzimática (D. Sitrin, 2014).

Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces éster que se encuentran presentes en los acilgliceroles, también pueden catalizar la hidrólisis o síntesis de un grupo amplio de ésteres carboxílicos. Este tipo de enzimas están distribuidas considerablemente en la naturaleza, y se pueden encontrar en microorganismos, plantas y animales. Cabe mencionar que una de las propiedades de las lipasas es que son enzimas solubles en agua y pueden ejercerse sobre sustratos insolubles y agregados, por lo que actúan unidas a interfaces lípido-agua. En base a estos términos, ocasionan un incremento de la actividad catalítica, respecto a las soluciones con concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica, este fenómeno se conoce como activación interfacial (González-Bacerio *et al*., 2010).

2.1.1 Mecanismo de acción (catálisis)

El mecanismo de acción de las lipasas (Fig. 1) se lleva a cabo mediante la hidrólisis del sustrato a través de la unión de lípidos, esto se genera cuando el átomo de oxígeno de la serina catalítica realiza un ataque al átomo de carbono del grupo carbonilo de enlace éster, para generar un intermediario tetraédrico que forma enlaces de hidrógeno con los átomos de nitrógeno del esqueleto del oxoanión. Debido a esto provoca una estabilización del estado de transición con carga negativa, hecho que ocurre durante la hidrólisis (Anobom *et al*., 2014). En

cambio, en las lipasas de clase Y, uno de los dos enlaces de hidrógeno se forma con ayuda del grupo hidroxilo de una cadena lateral de tirosina. La nucleofilia del residuo de serina es mayor debido a la histidina catalítica, en el cual se transfiere un protón del grupo serina hidroxilo. Esta transferencia se lleva a cabo debido al residuo ácido catalítico, con la orientación el anillo de imidazol de la histidina, lo que provoca que neutralice la carga que manifiesta (Borrelli & Trono, 2015). Por consiguiente, el protón se dona al átomo de oxígeno del enlace éster susceptible, con la consiguiente liberación del producto alcohólico. Así de esta manera liberando el complejo acil-lipasa, que por último se lleva a cabo una reacción de hidrólisis, liberando ácido graso libre y de una cuenta regenerando la enzima. De acuerdo con Peterson *et al*., (1990), quienes realizaron un mapeo de la superficie electrostática de distintas lipasas y esterasas, en donde anunciaron que el sitio activo de las enzimas está cargado negativamente en un rango de pH óptimo 6-10. Por ende, previo a la escisión del éster, el ácido carboxílico ionizado se libera de inmediato del sitio activo, a consecuencia de la repulsión electrostática entre el grupo carboxilo cargado negativamente y el potencial electrostático del sitio activo, este mecanismo recibe el nombre de catapulta electrostática (Anobom *et al*., 2014).

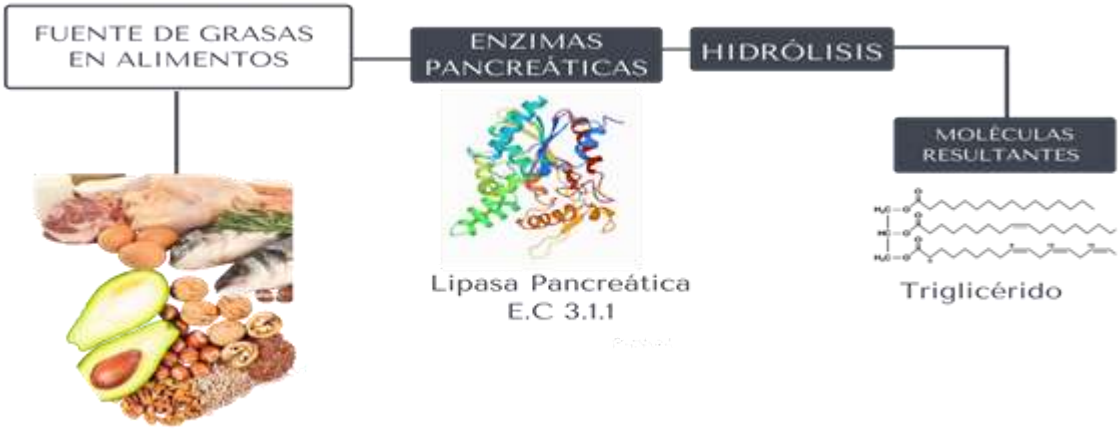


Figura 1. Mecanismo de acción de la enzima lipasa en el organismo humano.

2.2 Amilasas

La principal fuente de energía del ser humano es la glucosa, es posible obtenerla por medio de los hidratos de carbono en la alimentación. Luego de ingerir alimentos con contenido en carbohidratos la enzima α-amilasa salival se encarga de hidrolizar los componentes, para transformarlas en moléculas de menor tamaño facilitando su absorción a nivel intestinal, con la participación de la α-amilasa pancreática y la α-glucosidasa principalmente, obteniendo como productos: glucosa, maltosa, entre otros oligosacáridos que son importantes para la producción de energía de las diferentes rutas metabólicas (da Silva *et al*., 2014).

La α-amilasa es la enzima amilolítica más relevante y conocida. Realiza reacciones de hidrólisis de enlaces α-1,4-glucosídicos en almidón y α-glucanos. Esta enzima tiene una alta preferencia por sus sustrato y especificidad del mismo, siendo una de las glucósido hidrolasas de mayor prevalencia (Janeček *et al*., 2014).

La *α*-amilasa pancreática y salival (α-1,4-glucano-4-glucanohidrolasa) catalizan reacciones de hidrólisis de los enlaces *α*-1,4-glicosídicos en el almidón, glucógeno, entre otros polisacáridos. La amilasa salival es la enzima más abundante de la saliva de los seres humanos. La digestión

de los carbohidratos comienza en la cavidad oral, en donde el almidón se digiere de una manera parcial en oligosacáridos, maltosa y glucosa (Boehlke C, Zierau O, 2015).

La *α*-amilasa (*α*-1.4-D-glucano 4-glucanohidrolasa) es una enzima muy importante, esta se encuentra en la saliva, prevalece entre el 40-50% de proteína total que se produce en las glándulas salivales, en su mayoría es sintetizada por las glándulas parótidas en un 80%. Esta enzima se considera una metaloenzima, ya que contiene calcio y provoca la reacción de hidrólisis de los enlaces *α*-1,4 del almidón para obtener glucosa y maltosa (Nater & Ali, 2020). Su principal función es facilitar la trituración de alimentos en pequeñas partes que viajaran a través del tracto gastrointestinal.

Se han identificado cinco isoenzimas de la amilasa en el organismo del cuerpo humano. Tres son isoformas de amilasa salival y dos son isoformas de la amilasa pancreática las cuales pueden asignarse a dos familias (A, B) de isoenzima. La familia A contiene carbohidratos (62 KDa), mientras que la familia B (56 KDa) no, lo cual dificulta que los carbohidratos sean detectados (Boehlke y Zierau, 2015). A nivel estructural estas enzimas se encuentran relacionadas. La importancia radica en diversos trastornos metabólicos como la diabetes y la obesidad en donde se encuentra involucrada la *α* -amilasa pancreática, debido a esto los investigadores se enfocan principalmente en esta enzima, en comparación de la *α*-amilasa salival (Dabhi *et al*., 2013). Es por ello que han sido utilizadas para el evaluar el diseño de fármacos de utilidad en el control de enfermedades tales como diabetes tipo 2, obesidad, hiperlipidemia y caries.

Se ha identificado la participación de la enzima α-amilasa en la expresión del gen AMY1, donde el número de copias ha aumentado durante la evolución de los homínidos, provocado por cuestiones de selección efectos tales como: cambios en la dieta asociados a la preferencia por el consumo de azucares, propiciando así la ingesta de alimentos con un alto contenido en almidón (Boehlke y Zierau, 2015).

2.2.1 Mecanismo de acción (catálisis)

La α-amilasa es una enzima que representa la familia GH13, comparte entre 4-7 regiones de secuencia conservada (CSR) y además maquinaria catalítica que adoptan configuraciones α/β de dominio catalítico de 8 barriles (Janeček *et al*., 2014). La α-amilasa hidroliza enlaces glicosídicos en el carbono 1 y en carbono 4 de dos glucosas en un polímero, ejemplo de ello: el almidón (Fig. 2) (Salgado Rinquey, 2017). La reacción de hidrólisis se efectúa mediante la sustitución nucleofílica entre el carbono anomérico y el nucleófilo, esto a su vez forma un complejo enzima-sustrato con una configuración invertida llevada a cabo en el carbono anomérico (Salgado Rinquey, 2017).

Estructuralmente, el sitio activo de la enzima requiere la presencia de iones de calcio y cloruro ya que estos son esenciales para el mantenimiento de la actividad catalítica de la enzima pues sirven como sitios de unión para otro tipo de compuestos. En la actividad catalítica de estas enzimas están involucrados factores tales como: el número de grupos hidroxilo presentes en los compuestos inhibidores, la posición en que se encuentran estos grupos y las fuerzas de van der Waals (Berger *et al*., 2020).

El mecanismo de reacción utiliza gradualmente aspartato como nucleófilo, a su vez actúa como una base al utilizar un protón para eliminar el enlace α-1,4 entre la glucosa y el residuo que forma el enlace transitorio enzima-sustrato en una sustitución nucleofílica, que separa el centro activo del resto del polímero. El residuo de glutamato puede actuar como

ácido/base, ya que al inicio de la reacción actúa como ácido al donar un protón al fragmento de polímero saliente, esto durante la etapa de formación del enlace covalente enzima-sustrato. Por consiguiente, el glutamato actúa como una base debido a que utiliza un protón de una molécula de agua, adquiriendo de esta manera un carácter nucleofílico, ya que ataca el enlace enzima-sustrato y libera el resto de la cadena de carbohidratos de la enzima y se restaura en su forma original para iniciar de nuevo la catálisis (Salgado Rinquey, 2017).

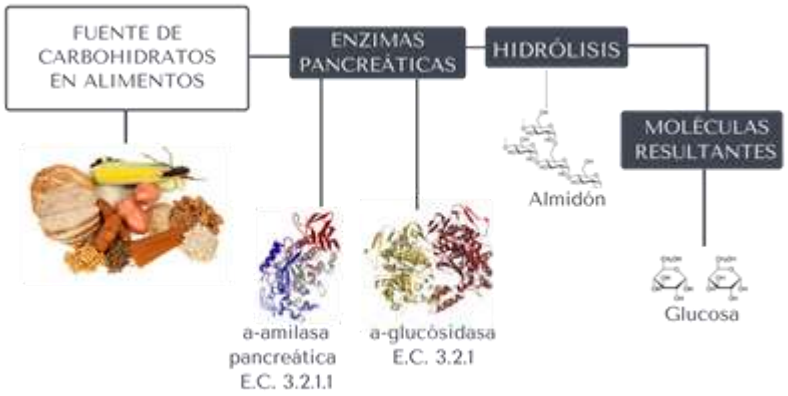


Figura 2. Mecanismo de acción de la enzima α-amilasa pancreática y α-glucosidasa en el organismo humano.

2.3 Glucosidasas

Las Glucosidasas son una clase de enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos y glucoconjugados, que se encuentran involucrados en distintos procesos biológicos que se relacionan con desórdenes metabólicos y enfermedades como: diabetes, obesidad, enfermedad de depósito lisosomal de glucoesfingolipidos, VIH y tumores (Chandran R et al., 2015).

Se han identificado dos isoformas de esta enzima, la isoforma α-glucosidasa que posee una actividad del tipo maltasa glucoamilasa (MGAM) y la otra es una sacarasa-isomaltasa (SI). Dentro de las características que componen la estructura de esta enzima, se describe un peso de 260 KDa, estructuralmente esta proteína está constituida por 868 aminoácidos y se divide en cinco dominios (A, B, C, D y E), se ha identificado que la triada catalítica se encuentra dentro de los dominios α y β. La triada catalítica la constituyen aminoácidos como Asp, Glu, Asp (Martinez-Gonzalez *et al*., 2017).

La α-glucosidasa es una enzima exo-carbohidrasa localizada en la membrana superficial de las microvellosidades de las células intestinales (enterocitos), lleva a cabo la catálisis del último procesos del metabolismo de glúcidos a través de la hidrólisis de carbohidratos complejos y disacáridos, en la porción terminal no reductora, obteniéndose como productos de reacción los monosacáridos absorbibles y de esta manera provocando el aumento de glucosa en sangre (Liu *et al*., 2017; Lordan *et al*., 2013; Zhang *et al*., 2015). Las Glucosidasas que son secretadas en el intestino medio, hidrolizan los enlaces glucosídicos entre los residuos de azúcar y su especificidad depende del tipo de enlace y de si el enlace es α o β. La α-glucosidasa hidroliza los α-glucósidos comunes de sacarosa, maltosa, trehalosa y melecitosa (Klowden Marc J., 2013).

2.3.1 Mecanismo de acción (catálisis)

Las α-glucosidasas están presentes en dos isoformas: EC 3.2.1.3 y EC 3.2.1.2.0, estas son codificadas por el gen GAA, su función principal es hidrolizar los enlaces α (1,4 y 1,6) de los oligosacáridos y

disacáridos liberando una unidad de α-D-glucosa como un producto de reacción (Aguilera-Otíz *et al*., 2011).

La isoforma EC 3.2.1.3 está presente en la mayoría de las células de organismo humano, en donde cumple funciones específicas del catabolismo; por otro lado, la isoforma EC 3.2.1.2.0 está presente en las vellosidades del intestino delgado, esta isoforma se encuentra involucrada en el metabolismo y digestión de los carbohidratos, en el último proceso de la digestión en los seres humanos (Avellaneda Ortiz, 2013).

Las glucosidasas como la maltasa, dextranasa, sacarasa y glucoamilasa ayudan en la absorción de los carbohidratos complejos para la producción de glucosa, solo monosacáridos como glucosa y fructosa pueden absorberse directamente en el torrente sanguíneo (Bardal *et al*., 2011).

La actividad de esta enzima se localiza en el borde en cepillo de los enterocitos a nivel de yeyuno, teniendo al igual que la α-amilasa la actividad hidrolítica en este sitio, donde ocurre la hidrólisis de los polisacáridos disminuyendo así los niveles de glucosa en el organismo, por medio de la enzima α-glucosidasa (Kalita *et al*., 2018).

Esta enzima cataliza las reacciones de hidrólisis de diversos sustratos, tales como los ésteres carboxílicos y los ácidos fosfóricos, éteres, péptidos y carbohidratos utilizando agua para tal efecto (Sacher *et al*., 2009). Este tipo de enzima genera la hidrólisis de disacáridos, oligosacáridos, y polisacáridos obteniendo unidades de monosacáridos.

Se pueden presentar dos tipos de mecanismos de hidrólisis: inversión u retención. En el caso del mecanismo de inversión, se emplean para ello dos residuos enzimáticos del tipo carboxílico que actúan como un ácido y una base respectivamente. Mientras que, en el mecanismo de retención, las enzimas actúan en dos etapas: involucrando dos residuos, uno actúa como nucleófilo mientras el otro como ácido o base. En primer lugar, el nucleófilo funciona sobre el centro anomérico formando la enzima glucosídica intermedia debido al ácido carboxílico. Luego, al perder el protón carboxilato ácido procede como base, uniéndose a una molécula de agua nucleofílica para hidrolizar la enzima intermedia, obteniendo un producto hidrolizado (Davies & Henrissat, 1995).

2.4 Proteasas

Las proteasas son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas. Se dividen en proteasas ácidas, neutras y alcalinas. Este tipo de enzimas se pueden obtener de las plantas, los animales y los microorganismos (Flores-Gallegos *et al*., 2018). Las proteasas también son conocidas como peptidasas, estas se encuentran en todos los organismos vivos y tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas, por consiguiente, existen distintos tipos de enzimas proteolíticas que se clasifican como exopeptidasas, estos a su vez actúan sobre los extremos de los sustratos proteicos y las endopeptidasas actúan sobre el interior de los sustratos proteicos. Existe una clasificación que se basa en el grupo funcional en el sitio activo. El grupo hidroxilo de las serina proteasas (EC 3.4.21) y treonina proteasas (EC 3.4.25), por otra parte, el grupo sulfhidrilo de las cisteínas proteasas (EC 3.4.22) son el nucleófilo en la reacción de catálisis, mientras que el agua activada es el nucleófilo de las proteasas aspárticas (EC 3.4.23), proteasas glutámicas (EC 3.4.19) y metaloproteasas (EC 3.4.24) (Gonçalves *et al*., 2016).

El grupo de las exopeptidasas, las carboxipeptidasas que actúan sobre aminoácidos en el carboxilo o C-terminal

de las cadenas polipeptidícas se pueden distinguir de las aminopeptidasas que escinden los aminoácidos en el amino o N-terminal de las cadenas polipeptidícas, las subclases de las endopeptidasas son: serina endopeptidasas, cisteína endopeptidasas, aspárticas endopeptidasas, metaloendopeptidasas y treoninaendopeptidasas; estas subclases se encuentran agrupadas sobre la base de su mecanismo catalítico (Chew *et al*., 2019).

Anteriormente en la nomenclatura enzimática, la peptidasa solo estaba restringida a enzimas incluidas en la subclase exopeptidasa, además el termino proteinasa que se usaba para las enzimas de las subclases que tenía el mismo significado que endopeptidasa, ahora ha sido reemplazado por endopeptidasa (Chew *et al*., 2019).

Estas enzimas proteasas son secretadas por todos los seres vivos: plantas, animales y microorganismos, debido a la participación en diversos procesos fisiológicos; las proteasas intracelulares juegan un papel importante en la regulación de procesos celulares y metabólicos, como el catabolismo de proteínas (Chew *et al*., 2019).

2.4.1 Mecanismo de acción (catálisis)

Las enzimas como moléculas catalizadoras de reacciones químicas se definen en función de su acción catalítica. En el caso de las enzimas proteasas, estas se encuentran organizadas en el grupo 11 de 49 hidrolasas, las cuales se caracterizan por llevar a cabo la reacción de hidrólisis de enlaces tipo amida o peptídicos (C-N), en donde presentan principalmente proteínas con un sitio diana de la reacción de hidrólisis (Vaseva *et al*., 2012).

Los mecanismos proteolíticos de la proteasoma involucran un sitio activo de treonina que estos a su vez involucran tres especificidades de diferentes sustratos de hidrólisis de péptidos similares a quimotripsina, tripsina y peptidil-glutamil. Las exoproteasas actúan cerca de los extremos de las cadenas peptídicas, delineadas como aminopeptidasas y carboxipeptidasas para indicar que su acción está en los extremos N o C terminales de los sustratos peptídicos.

Con base en el mecanismo de acción de la hidrólisis, las proteasas se clasifican en dos grupos. Las cuales son: serina, cisteína y treonina proteasas que pertenecen al primer grupo, estas se caracterizan por presentar un residuo de serina, cisteína o treonina como nucleófilo en su sitio activo y se activan tras la presencia del aminoácido de histidina. Dentro del segundo grupo se encuentran el aspartato y métalo proteasas, estas utilizan como nucleófilo una molécula de agua activada por las interacciones electrostáticas que ocurren entre la molécula y iones metálicos o el aminoácido de aspartato. Además, se pueden clasificar en función de la localización del sitio de catálisis del enlace peptídico en la misma proteína. Como ya se ha mencionado anteriormente las endopeptidasas son las proteasas que hidrolizan a nivel de proteínas en los enlaces peptídicos internos. Las exopeptidasas se clasifican en aminopeptidasas, cuando la hidrólisis se lleva a cabo en el enlace peptídico del extremo amino terminal, también se clasifican en carboxipeptidasas cuando ocurre en el extremo carboxilo terminal (Vaseva *et al*., 2012).

Cabe mencionar que el proceso general del mecanismo de reacción es el mismo para todas las clases de proteasas (Erez *et al*., 2009). El ácido glutámico y las treoninas endoproteasas representan nuevas familias de enzimas caracterizadas recientemente que tienen mecanismos de reacción que implican la participación específica de ácido glutámico y treonina en el sitio activo, respectivamente (Elinor *et al*., 2009).

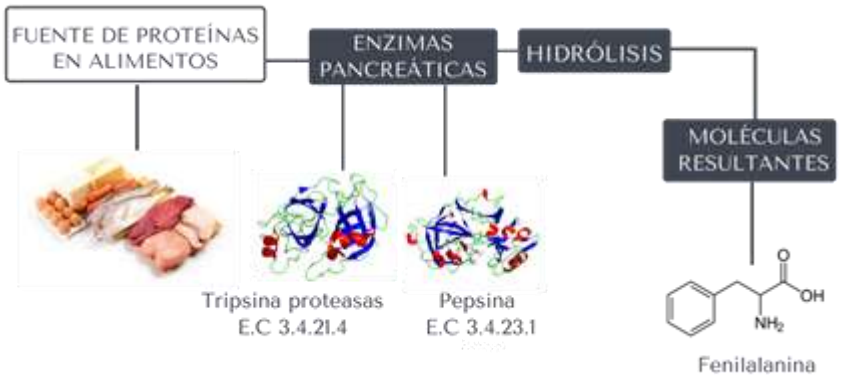


Figura 3. Mecanismo de acción enzimas proteasas.

3. Fitoquímicos relacionados con la inhibición de enzimas digestivas

De acuerdo con el estudio *in vitro* realizado por Zhang *et al*. (2015) se demostró que los compuestos fenólicos no coloreados continúan disponibles en concentraciones elevadas tras el proceso de digestión gastrointestinal, lo cual refiere que son excretados sin que ocurra una absorción en el organismo. Los estudios que relacionan los compuestos fenólicos con la inhibición de enzimas digestivas se han realizado principalmente con extractos, como por ejemplo en el té verde (*Camellia sinensis*), de frutas como la uva muscadina (*Vitis rotundifolia*) o con especias como el comino (*Cuminum cyminum*). El efecto inhibidor de los compuestos polifenólicos individuales también varía según la enzima analizada. Existen informes de un mayor efecto de los compuestos polifenólicos sobre las actividades de las enzimas hidrolizantes de carbohidratos como α-glucosidasa y la α-amilasa, en comparación con la lipasa pancreática (Ademiluyi & Oboh, 2013). A continuación, se hace un análisis de la interacción entre los polifenoles obtenidos de diversas fuentes y las enzimas digestivas descritas anteriormente.

3.1. Inhibidores de lipasa

Existen diversos estudios en los cuales se reportan que los compuestos fenólicos tienen la capacidad de inhibir la lipasa pancreática, presentes en productos naturales como los extractos de plantas y compuestos que fueron aislados. Según estudios de Sergent *et al*. (2012) quienes utilizaron estándares de compuestos fenólicos, los investigadores reportaron que los compuestos fenólicos más efectivos en la inhibición de la lipasa pancreática fueron epicatequina galato, kaempferol y quercetina a una IC_{50} de 0.8 µM, 13.3 µM y 21.5 µM, en comparación con el estándar orlistat® con una concentración inhibitoria de 32 µM.

Por otra parte Rahim *et al*., (2015) reportaron que el ácido gálico y otros ácidos como el ácido 3,4-dicafeoil-quínico, lograron inhibir la lipasa pancreática a concentraciones elevadas de IC_{50} = 387.2 µM y 252 µM. Estas investigaciones anuncian el potencial inhibitorio de algunos compuestos fenólicos, sin embargo, no demuestran el mecanismo de acción de la actividad enzimática de estos compuestos.

Otros estudios demostraron que compuestos como la cianidina-3-glucósido y el ácido clorogénico logran inhibir de una manera competitiva la lipasa (Hu *et al*., 2015). Sin embargo, compuestos tales como las procianidinas que son de alto peso molecular, actúan como inhibidores mixtos (González-Castejón y Rodriguez-Casado, 2011).

Le Bourvellec y Renard (2012) mencionan que los compuestos fenólicos tienen la

capacidad de unirse a enzimas y a consecuencia de ello, logran provocar cambios a nivel estructural y funcional. De acuerdo con Frazier *et al*. (2010) la estructura de los compuestos fenólicos tiene una función primordial en las interacciones entre los complejos fenol-proteína. Mulaudzi *et al*. (2012) mencionan los factores estructurales que influyen en la afinidad de los compuestos fenólicos: 1) el peso molecular, ya que en investigaciones se ha visto que este debe ser pequeño para lograr penetrar las regiones interfibrilares de las proteínas, pero en misma instancia grandes para entrecruzar cadenas peptídicas en distintos puntos; 2) el número y la posición de los grupos hidroxilo a nivel estructural de los compuestos fenólicos ayuda en las interacciones proteicas, pero esto no funciona cuando los grupos funcionales se encuentran metilados o glicosilados; 3) la presencia de grupos galoil en los compuestos fenólicos propician la afinidad para la interacción proteica con los compuestos fenólicos.

Distintos estudios han evidenciado la inhibición de la lipasa por extractos de compuestos fenólicos mediante hierbas o frutas en donde se han mostrado resultados en ocasiones contradictorios (Costamagna *et al*., 2016). Worsztynowicz *et al*. (2014) obtuvieron valores de inhibición de lipasa utilizando concentraciones relativamente altas (IC_{50}= 83.45 mg/mL) de extractos de *Aronia melanocarpa* L. Por otra parte Podsędek *et al*. (2014) realizaron un análisis de la actividad anti-lipasa de extractos crudos de treinta frutas, en donde observaron el valor más bajo de IC_{50} (i.e., mayor inhibición) para el extracto de arándanos. Otros componentes del extracto causaron una alteración en la actividad de las enzimas α-amilasa y lipasa, por lo que es posible la explicación de sus diferencias (Yang y Kong, 2016; Worsztynowicz *et al*. 2014).

Por lo tanto, es importante que los investigadores logren la identificación de los componentes polifenólicos de los extractos, omitiendo o ignorando otros compuestos que no sean estos metabolitos y realizar estudios de las estructuras de los polifenoles. Zhang *et al*. 2015 analizaron la diferencia entre los glicósidos de flavonol y sus agliconas. Ellos estudiaron los diferentes efectos del kaempferol y kaempferol-glucosa, y quercetina y quercetina-arabinósido de extractos de lentejas (*Lens culinaris*) contra la actividad de la lipasa pancreática, y en sus resultados no encontraron valores estadísticamente diferentes para cada par de flavonoides.

En otra investigación similar, Li *et al*. (2011) realizaron la evaluación del efecto de un sustituyente glucósido en la posición 3 del anillo C de quercetina, analizando quercetina, isoquercetina y rutina, en donde observaron que la rutina, posee un resto de disacárido, y que este era mejor inhibidor de la lipasa pancreática, seguido de isoquercetina (resto de monosacárido) y finalmente quercetina (aglicona). Se encontró que la colocación de una doble glicosilación, rutinósido para rutina o arabinósido para quercetina-arabinósido, respectivamente, obtuvo una mayor posibilidad de interactuar con la enzima al aumentar la polaridad del aducto compuesto polifenol-proteína, mediante la formación de enlaces de hidrógeno, y disminuir el ambiente hidrofóbico cerca del sitio catalítico, necesario para hidrolizar el triacilglicérido (Zhang *et al*., 2015; Li *et al*., 2011).

3.2. Inhibidores de α-amilasa

Uno de los trastornos metabólicos con mayor frecuencia es la diabetes, los agentes antidiabéticos disponibles han generado ciertos inconvenientes y es necesario un nuevo enfoque terapéutico. La α-amilasa es una enzima responsable en la descomposición de los polisacáridos como el almidón en monosacáridos. Esta enzima α-amilasa se considera un buen

objetivo para el diseño de fármacos que proporcionen un enfoque alternativo para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2.

Los inhibidores de α-amilasa son clasificados en dos grupos: inhibidores proteicos e inhibidores no proteicos. En la actualidad diversos investigadores se encuentran estudiando los inhibidores no proteínicos que incluyen chalconas, flavonas, benzotiazoles, etc. como posibles agentes antidiabéticos (Bashary *et al*., 2020).

El tratamiento de la diabetes tipo II es complicado debido a los factores fisiopatológicos relacionados con esta enfermedad, una de las complicaciones que se relacionan con esta afección es la hiperglucemia posprandial. Los inhibidores de la α-amilasa, son una clase de compuestos que controlan la hiperglucemia posprandial (Bhat *et al*., 2011).

Se ha estudiado la actividad de ciertas plantas, en las cuales los extractos de cloroformo, metanol y acuosos se prepararon secuencialmente de hojas y semillas de estas plantas. Por ejemplo, el extracto clorofórmico de *Ocimum tenuflorum, Bougainvillea spectabilis, Murraya koenigii* y *Syzygium cumini* tienen una propiedad inhibitoria de la *α*-amilasa (Bhat *et al*., 2011).

Los inhibidores de la α-amilasa son una clase de compuestos que ayudan a controlar la hiperglucemia posprandial, en el cual se ha recomendado el uso de hierbas de bajo costo debido a su menor efecto secundario en el tratamiento de la diabetes (Ghosh *et al*., 2012). En un estudio se probaron dos plantas con un potencial terapéutico: *Gnidia glauca* y *Dioscorea bulbifera*, para determinar su eficacia para inhibir la *α*-amilasa, el tallo, hoja y flor de *G. glauca* y bulbo de *D. bulbifera*se se extrajeron secuencialmente con éter de petróleo, acetato de etilo y metanol, y por separado con etanol al 70%. De manera que se demostró que el extracto de éter de petróleo de la flor de *G. glauca* inhibe la *α*-amilasa en un 78.56% debido a la presencia de flavonoides y terpenoides (Ghosh *et al*., 2012).

Quesille-Villalobos *et al*. (2013) evaluaron el potencial inhibitorio *in vitro* de α-amilasa en infusiones de té (*Camellia sinensis).* Un total de treinta y cuatro muestras de té (blanco, verde, rojo, oolong y negro) fueron evaluadas de acuerdo con sus perfiles de compuestos fenólicos, capacidad antioxidante e inhibición *in vitro* de la α-amilasa en el control de la hiperglicemia. Todas las muestras inhibieron el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo, en cambio sólo los tés negros inhibieron significativamente la enzima α-amilasa.

Mendoza-Meza & Loza-Rosas (2014), caracterizaron fitoquímicamente el extracto etanólico de hojas de Yacón (*Smallanthus sonchifolius*), en donde se observó la presencia de fenoles, flavonoides, leucoantocianidinas, taninos, triterpenoides, cumarinas, lactonas, sesquiterpenos y aminoácidos, así como una alta actividad inhibitoria de la α-amilasa *in vitro* (CI_{50}= 5.77 ± 0.14 μg/mL).

Particularmente los flavonoides, tienen grupos hidroxilo que les permiten unirse e inhibir los centros catalíticos de las enzimas digestivas, por ello ha sido identificado como potentes inhibidores. Es probable que la inhibición dependa de la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilo (OH) de los compuestos fenólicos y las cadenas laterales de los aminoácidos (Sun, 2017). Además, se han identificado a fitoquímicos como la quercetagetina y la scutellareina como potenciales inhibidores enzimáticos de la α-amilasa (Lo Piparo *et al*., 2008).

Se ha hecho un analisis de las concentraciones de los extractos de

compuestos fenólicos del té para inhibir la actividad enzimática de la α-amilasa, y se han observado resultados no inhibidores a una concentración de 1.5 mg/mL (Yang & Kong, 2016), pero se observó una inhibición de α-amilasa de moderada a grande para la guayaba (*Psidium guajava* L.) de los extractos de compuestos fenólicos a la misma concentración (Wang *et al*., 2010); esto indica que no todos los extractos de compuestos fenólicos son eficaces para inhibir la α-amilasa (Sakulnarmrat & Konczak, 2012).

Resultados similares se observaron (Miao *et al*. 2014) al analizar la inhibición de la α-amilasa mediante el resveratrol-3-*O*-glucósido de extractos de piel de uva, en este punto se sugirió que la glicosilación del flavonoide puede interrumpir el contacto enzima-sustrato al unirse al sustrato. Además, se observaron diferencias en la actividad de los glicósidos de flavonoides con base en la estructura del resto del glicósido.

De acuerdo con Akkarachiyasit *et al*. (2011), los compuestos cianidin-3-galactósido y cianidin-3-glucósido, demuestran mayor inhibición de α-amilasa en comparación con el resto de carbohidratos unidos mediante C4. Estudios de Dalar y Konczak (2013) mostraron actividad inhibidora de *Plantago lanceolata* tras la presencia de luteolin-7-O-glucósido, lo que indica que otras posiciones de sustitución del anillo C (C5 y C7) también pueden ser eficaces.

De manera similar a lo observado con los flavonoides, la inhibición de la α-amilasa también aumenta a medida que se acrecentaba el número de grupos hidroxilo en la estructura, lo que se atribuye al impedimento estérico de los grupos hidroxilo. Es sugerente que podrían existir algunas características estructurales que afectarían el efecto inhibitorio. En general una estructura más compleja de los compuestos polifenólicos está relacionada con una mayor afinidad por las enzimas (Martinez-Gonzalez *et al*., 2017).

You *et al*. (2012) observaron una diferencia de seis veces el valor IC_{50} de quercetina contra α-glucosidasa en comparación con la lipasa pancreática. Vazquez-Flores *et al*. (2017) observaron una mayor inhibición de la hidrólisis de carbohidratos que se atribuye a la actividad de la α-amilasa, en comparación con la inhibición de la hidrólisis de lípidos atribuida a la actividad de la lipasa pancreática (aproximadamente 46 y 30% de inhibición, respectivamente) cuando se evaluó una fracción de proantocianidinas de extracto de nuez pecana (*Carya illinoinensis*). You *et al*. (2012) observaron una diferencia de seis veces el valor IC_{50} de quercetina contra α-glucosidasa en comparación con la lipasa pancreática.

Worsztynowicz *et al*. (2014) observaron que el ácido clorogénico inhibe la la α-amilasa, mientras que no se detecta inhibición de la actividad de la lipasa pancreática. Estas investigaciones refieren que la mayor inhibición de la actividad de la la α-amilasa es con base en su peso molecular en comparación con otras enzimas.

3.3. Inhibidores de α-glucosidasa

La denominada voglibosa es una α-glucosidasa competitiva capaz de inhibir la actividad de la enzima α-glucosidasa, de acción hipoglucemiante. El mecanismo mediante el cual actúa, es retrasando la absorción y digestión de los alimentos con contenido polisacárido, inhibiendo de manera reversible los carbohidratos digestivos, enzimas como la sacarosa, maltosa, isomaltosa entre otras (Dabhi *et al*., 2013). Es utilizada en conjunto con la insulina y cambios en la dieta para lograr la eficacia en el tratamiento. De acuerdo con algunos estudios se ha identificado el uso de voglibosa como preventivo para el desarrollo de diabetes tipo 2, si se administra bajo un diagnóstico temprano.

Sin embargo, existen reportes en la literatura que demuestran la existencia de moléculas alternativas que tienen la capacidad de inhibir la actividad α-glucosidasa. De acuerdo a lo reportado por Martinez-Gonzalez *et al*. 2017 diversos extractos de compuestos fenólicos son capaces de inhibir la actividad enzimatica de la α-glucosidasa. Se incluyó el té verde (*Camellia sinensis*), uvas muscadine (*Vinis rotundifolia*) o especias como comino (*Cumminum cyminum* L.) diversos extractos de té negro, etc. Los cuales se han estudiado como digestivos e inhibidores enzimáticos.

En las patatas se han identificado compuestos fenólicos con potencial inhibidor, de la α-glucosidasa, los extractos de antocianinas al elaborar las cinéticas enzimáticas fueron identificadas como inhibidores no competitivos, los derivados de cianidinas, pelargonidina y algunos otros compuestos bioactivos, el ácido clorogénico, ácido cafeico, kaempferol, luteolina, catequina, epicatequina y betaglucogaloina (Kalita *et al*., 2018).

El extracto acuoso de hojas de *Annona macroprophyllata* inhibió tanto la actividad de la α-glucosidasa de levadura (*in vitro*) como la tolerancia a la sacarosa en ratas Wistar. Los resultados demostraron que el extracto acuoso de *A. macroprophyllata* inhibe la α-glucosidasa de levadura con una IC_{50} = 1.18 mg/mL, de una manera competitiva con 0.97 mg/mL, valor similar al de la acarbosa (0.79 mg/mL). La actividad inhibidora de *A. macroprophyllata* fue reforzado por su efecto anti hiperglucemiante a dosis de 100, 300 y 500 mg/kg en ratas. El análisis cromatográfico identificó flavonoides y la isoquercitrina en las fracciones más polares del extracto crudo de *A. macroprophyllata*, esto sugiere que estos flavonoides son parte de los componentes activos de la planta (Brindis *et al*., 2013).

Por otra parte, se determinó la actividad inhibidora de α-glucosidasa de extractos de etanol al 80% de hojas y ramas de algunas plantas de *Apocynaceae*, *Clusiaceae*, *Euphorbiaceae* y *Rubiaceae*. Para determinar la actividad inhibidora de la α-glucosidasa *in vitro* se utilizaron métodos espectrofotométricos. En comparación con la acarbosa como control (IC_{50} 117.20 μg/mL), se demostró que treinta y siete muestras de cuarenta y cinco eran inhibidores de la α-glucosidasa más fuertes con valores de IC_{50} en un rango de 2.33-112.02 μg/mL (Elya *et al*., 2012).

Además, se determinó la actividad inhibidora de noratiriol y mangiferina sobre la *α*-glucosidasa *in vitro* y se evaluó el efecto antidiabético en ratones diabéticos, se demostró que noratiriol inhibió la *α*-glucosidasa de manera no competitiva con un valor de IC_{50} de 3.12 μM, que es más potente que la mangiferina (IC_{50} = 358.54 μM) y la acarbosa positiva del fármaco (IC_{50} = 479.2 μM. Por lo tanto, el noratiriol así como mangiferina causaron una reducción relevante en la glucosa en sangre en ayunas y en los niveles de glucosa en sangre dos horas después de la carga de carbohidratos (Shi *et al*., 2017).

Li *et al*. (2010) revisaron los efectos inhibidores de la α-glucosidasa de epigalocatequina galato (EGCG) y epicatequina galato (ECG), dos clases de compuestos que se encuentran en el té y sus actividades que se expresan de una manera dosis-dependiente en comparación con la acarbosa, este último un fármaco antidiabético inhibidor de la alfa-glucosidasa comercial utilizado para tratar el tipo 2 diabetes. La concentración media inhibitoria (IC_{50}) de EGCG y ECG se determinó que eran de 175.1 y 246.9 μM respectivamente, mucho menor que la de la acarbosa (3553.0 μM). Los estudios cinéticos revelaron además que tanto el EGCG como el ECG inhiben la α-glucosidasa de una manera no competitiva.

De acuerdo con Sergent *et al*. 2012, los valores de CI_{50} bajos (mayor efecto inhibidor) contra la lipasa pancreática se obtuvieron con quercetina y kaempferol, en comparación con el ácido ferúlico o incluso con el orlistat. Por otro lado, You *et al*. (2012) observaron un mayor efecto inhibidor de la quercetina que el ácido elágico sobre α-glucosidasa y la lipasa pancreática. Mientras que Tan *et al*. (2016) observaron una mayor inhibición de las actividades α-glucosidasa, α-amilasa y lipasa pancreática utilizando miricetina en comparación con los ácidos fenólicos tales como ácido gálico, ácido cafeico, ácido sinápico, y otros. Además, Hu *et al*. 2015 observaron que los derivados del ácido cafeoilquínico más pequeños también exhibían una unión menor o más débil a la lipasa pancreática. Lo anteriormente descrito demuestra que la mayor actividad inhibitoria de los fitoquímicos se encuentra relacionada en la complejidad de las estructuras.

De acuerdo con Xiao *et al*. (2015) observaron una mayor inhibición de la α-glucosidasa (con mayor peso molecular) en comparación con tripsina, en presencia de ácido tánico. Pero es necesario ampliar la investigación para comprobar esto, ya que otras propiedades enzimáticas, como la polaridad de las proteínas y la estructura conformacional, también pueden desempeñar un papel importante en la inhibición enzimática (Kanakis *et al*., 2011; Wu *et al*., 2011). Cabe mencionar que es sumamente necesario realizar mas estudios sobre inhibición de diferentes hidrolasas (α-glucosidasa, α-amilasa y lipasa pancreática), ya que debido a que los investigadores afirman que algunos compuestos fenólicos puros como el ácido gálico y la catequina (Tan *et al*., 2017) o de distintos extractos de granos de quinoa (*Chenopodium quinoa*) (Hemalatha *et al*., 2016) fueron mejores inhibidores de la lipasa pancreática, enseguida de α-glucosidasa y por último la α-amilasa.

3.4. Inhibidores de proteasas

Los inhibidores de proteasa endógenos naturales se encuentran presentes en el tracto gastrointestinal (Motta *et al*., 2011). Son inhibidores producidos principalmente en el hígado o por células epiteliales intestinales o células inflamatorias infiltradas. Las serpinas (*Serin protease inhibitors*) A1, A3, A4, E1 y C1 son inhibidores de las serin-proteasas como tripsina, quimasa, triptasa, elastasas, calicreínas y catepsina G. El inhibidor de la proteasa leucocitaria secretora (SLPI) y la elafina son producidos *in situ* por células epiteliales intestinales o leucocitos, estas inhiben la elastasa y la proteinasa-3, mientras que SLPI también inhibe la tripsina, quimotripsina, catepsina G, triptasa y quimasa (Scott *et al*., 2011).

Existen fitoquímicos inhibidores de la actividad proteasa que han sido reportados en diversos trabajos de investigación. Por ejemplo, se estudió la capacidad inhibitoria para tripsina y elastasa de extractos vegetales de flores de *Achyrocline satureioides*, hojas de *Baccharis trimera*, frutos de *Eugenia uniflora* y frutos *Schinus molle*. Se utilizó agua o etanol como solventes en distintas condiciones de tiempo y temperatura. La capacidad de acción inhibitoria para elastasa fue baja (< 30%) o casi nula con los extractos ensayados. En el caso de la tripsina, todos los extractos presentaron acción inhibitoria, en donde se observó que para un mismo material vegetal existen importantes diferencias según el solvente utilizado, independientemente de la temperatura de extracción. Los extractos de *Schinus molle* fueron los de mayor actividad inhibitoria para tripsina. Al extracto acuoso de este vegetal, obtenido a 100 °C, se le determinó IC_{50} y tipo de inhibición (Macció *et al*., 2014).

En el estudio desarrollados por Muñoz Alvarez, (2011) se encontró la presencia de inhibidores de tripsina en distintas

variedades de leguminosas. En donde se observó que predominaban estos compuestos en *Lupinus mutabilis, Phaseolus vulgaris, Pisum sativum.*

Las especies de *Amaranthus caudatus; L y Amaranthus hybridus L,* poseen un alto contenido de carbohidratos y proteínas. De acuerdo con Montoya-Rodríguez *et al*. (2015) y Velarde-Salcedo *et al*. (2013) en las semillas de estas especies de pseudocereales se encuentra un alto contenido de inhibidores de proteasas. Las leguminosas son la principal fuente vegetal de inhibidores de proteasas, aunque también se han encontrado en cereales y muestras animales. Los estudios se han realizado en su mayoría sobre la tripsina, esto debido por ser una de las principales proteasas digestivas (Morales & Troncoso, 2012).

4. Métodos para evaluación de la inhibición enzimática

El estudio de los mecanismos cinéticos de enzimas y transportadores, así como el efecto de sus inhibidores y activadores sigue siendo una herramienta útil para entender mejor la naturaleza y regulación de las vías metabólicas involucradas en los procesos bioquímicos de todas las células. El mejor entendimiento de los mecanismos catalíticos ha cobrado mayor relevancia biotecnológica ya que nos acerca a un mejor diseño de fármacos en el caso del tratamiento de enfermedades o para realizar modificaciones puntuales y obtener así una mayor producción de metabolitos, entre otros. Existen diversas metodologías para evaluar los mecanismos de inhibición de las enzimas digestivas. En el presente documento se abordarán particularmente las evaluaciones *in silico* e *in vitro*.

4.1. Evaluación *in silico*

El análisis *in silico* es una herramienta de análisis de acoplamiento molecular ampliamente utilizada en el área de biología molecular, así como también para el diseño de fármacos asistidos por computadora. Se realiza por medio del acoplamiento ligando proteína, para predecir la forma en que los enlaces se unen al ligando, para ello se selecciona la estructura tridimensional de la proteína de interés. Este tipo de técnicas resultan convenientes ya que, disminuyen los costos experimentales y el tiempo empleado además de proporcionar aproximaciones en los resultados esperados, previos a la realización de ensayo *in vitro* (Scotti *et al*., 2018).

El modelado molecular puede definirse como una descripción simplificada de un sistema molecular o proceso entre las moléculas, ideado con la finalidad de facilitar los cálculos y predicciones (Pérez-Peña *et al*., 2016). Por medio de las interacciones con los ligandos se logran apreciar las fuerzas intermoleculares, la hidrofobicidad, los enlaces de hidrógeno, las interacciones electroestáticas y las fuerzas de van der Waals (Scotti *et al*., 2018).

En el análisis *in silico* se especifica a los procesos que se realizan a través de ordenadores computacionales en los programas y bases de datos. Este tipo de análisis tiene como base la bioinformática, cuenta con diversas aplicaciones, tres son muy importantes: el modelado, la simulación y la visualización.

El protocolo a seguir empleado por Abdelli *et al*. (2021) refiere tres pasos. En primer lugar, descubrir las posibles interacciones entre el átomo de ligando y los residuos del sitio activo y distancias. En segundo lugar, se comparan las afinidades de los compuestos hacia las enzimas de interés. Y finalmente en tercer lugar, se logra apreciar la información del complejo ligando-enzima y la puntuación energética.

La secuencia de aminoácidos en una proteína permite saber su función dentro de los organismos; con la ayuda de la

bioinformática se pueden realizar estructuras tridimensionales utilizando distintas técnicas. Las interacciones proteína-proteína (PPI) generadas de manera *in silico* permiten comprender los efectos que tienen sobre el cuerpo y las modificaciones que ocurren en las proteínas o la forma en la que los fármacos actúan sobre ellas.

Una base de datos es el lugar donde se reúne toda la información que se tiene acerca de un objeto de estudio; se accede a ellas por medio de un ordenador con la ayuda de buscadores universales. Gracias a la gran cantidad de descubrimientos que se han hecho en el área de la biología, surge la necesidad de recopilar toda la información en bases de datos biológicas y que comprenden diversas áreas: el estudio de la secuenciación del genoma, estructura de las proteínas, taxonomía, entre otros.

UniProt, es una base de datos en donde se registran las secuenciaciones de proteínas que se han estudiado en diversos organismos vivos. Además, es de fácil acceso y cuenta con apartados para cada proteína que hacen más fácil encontrar la información requerida. UniProt, nace por la unión de tres bases de datos: Swiss-prot, TrEMBL y PIR-PSD. Swiss-Prot y TrEML continúan siendo dos secciones en UniProt. Protein Data Bank, es una base datos que cuenta con un inmenso número de estructuras tridimensionales de proteínas y ácidos nucleicos; también contiene información acerca de la secuencia de cada estructura (Velázquez Moreno, 2017).

El análisis *in silico,* es uno de los métodos analíticos de más rápido crecimiento en los últimos años. Este tipo de análisis apoya en la identificación de dianas de fármacos mediante la utilización de herramientas bioinformáticas si la estructura de una proteína está disponible a partir de cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN). Dentro del análisis *in silico* se puede utilizar para analizar estructuras diana para la unión posible, y para los sitios activos. Gracias a esto se generan moléculas candidatas a ser revisadas para similitudes estructurales con fármacos conocidos, para que se pueda acoplar, y ordenarlas de acuerdo con potencial de unión y afinidades con el propósito de optimizar estas moléculas para mejorar su unión. Debido a la combinación de técnicas experimentales e informática, la posibilidad de éxito a través de estos procesos aumenta, desde la identificación de nuevas dianas y la elucidación de sus funciones. Las herramientas computacionales ofrecen así la ventaja de adquirir nuevos fármacos candidato de forma rápida y al menor costo (Poklar Ulrih, 2017).

Algunos estudios tales como el de Hashim *et al*. (2013), han realizado el método de acoplamiento molecular para evaluar la actividad inhibidora antioxidante, utilizando el programa AutoDock para obtener los modos favorables de unión con los sitios activos de la amilasa pancreática. Previamente se identifica el sitio de unión del inhibidor estudiado con respecto a la enzima, luego se extrae la estructura cristalina, para posteriormente realizar la confirmación de encuadernación, que puede visualizarse utilizando PyMOL.

Otros autores han identificado por medio del gráfico o diagrama denominado parcela Ramachandran, las posibles conformaciones estructurales que presenta una proteína, ilustrando los diferentes ángulos de unión. En el caso del estudio realizado por Blagojevic *et al*. 2020, se analizaron los porcentajes de aminoácidos que favorecen las interacciones entre los compuestos y las enzimas α-amilasa y α-glucosidasa lo que ha permitido observar también los sitios de acoplamiento de los ligandos probando con *Cornelian Cherry*, la cual demostró una mayor capacidad de inhibición en comparación con la acarbosa un inhibidor del tipo comercial. Utilizaron también la pelargonidina 3-robinobiosido

encontrando que, fue el mejor inhibidor enzimático para ambas enzimas, en especial para la α- glucosidasa.

Se ha realizado la exploración de la actividad molecular en compuestos presentes en arilos y semillas de granada dulce donde autores como Dewi *et al*. (2020) han encontrado compuestos fenólicos de interés como la quercetina que al compararse con el comportamiento del fármaco acarbosa y su capacidad para interactuar con la enzima α-amilasa presenta mecanismo de inhibición similares.

Además de este compuesto, algunos otros que han sido ampliamente probados como ligandos con la capacidad de inhibir la actividad enzimática de α-amilasa y α-glucosidasa han sido luteolina, kaempferol y rutina que pertenecen a la categoría de los flavonoides, coincidiendo con el residuo del aminoácido de GLU 233, que corresponde a uno de los residuos de aminoácidos presentes en el sitio activo (Sun *et al*., 2018).

Al realizar un estudio ADME (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) de los compuestos fenólicos que presentan la capacidad de inhibir la actividad de las enzimas digestivas α-amilasa y α-glucosidasa, se logra identificar como actúan dichos compuestos a lo largo del proceso digestivo posterior a la ingesta. Por otra parte, por medio de evaluaciones *in silico* es posible apreciar que, dichos compuestos presentan problemas de biodisponibilidad oral, pero muestran utilidad debido a la posibilidad para desarrollar propiedades farmacológicas (Abdelli *et al*., 2021).

4.2. Análisis *in vitro*

Para el análisis *in vitro* se utilizan técnicas analíticas para comprender los mecanismos de la interacción de proteínas. La espectrometría de emisión de fluorescencia es utilizada ampliamente para investigar las interacciones entre polifenoles y proteínas. Las proteínas se consideran que poseen emisión de fluorescencia intrínseca, se debe principalmente a sus residuos de triptófano, tirosina y fenilalanina. Posee características espectrales que cambian cuando estos residuos aromáticos están expuestos a diferentes condiciones de disolvente, gracias a esto se han realizado diversas investigaciones de las interacciones proteína–polifenol (Liang *et al*., 2013).

La espectrometría UV-Vis es una técnica relativamente sencilla y de amplio uso, se utiliza para analizar los cambios estructurales de las proteínas y su formación de complejos. Los espectros de absorción de proteínas muestran dos picos principales de absorción: a 200 nm, que refleja el marco conformación de la proteína, y a 280 nm que representan los aminoácidos aromáticos. Los compuestos polifenólicos también absorben en el rango UV-Vis. Los valores de UV-Vis generalmente se atribuyen a las transiciones electrónicas entre los orbitales moleculares de tipo π (Anouar *et al*., 2012).

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR): es una técnica que puede proporcionar ideas en los mecanismos moleculares de las interacciones de proteína-polifenol. No es invasiva, y puede proporcionar la información estructural de tales interacciones. Las ventajas de FT-IR son que puede ser aplicado tanto a las proteínas solubles y proteínas de membrana, es efectiva, y se ve de forma simultánea en toda la proteína, así como en sitios específicos (Wu & Bird, 2009).

Investigaciones realizadas *in vitro* demuestran que los compuestos fenólicos se unen a proteínas mediante enlaces no covalentes, como las interacciones hidrofóbicas que posteriormente se estabilizan por puentes de hidrógeno

(Frazier *et al*., 2010). Los enlaces no covalentes incluyen puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas e hidrofóbicas (Johnson *et al*., 2010). Y la 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).

En un estudio *in vitro* con plantas se evaluó la actividad en α-amilasa, considerando la temperatura optima de 37 °C y un pH de 6.9 (da Silva *et al*., 2014) empleando como sustrato almidón de patata 1.0 g/100 mL. Investigaciones realizadas *in vitro* demuestran que los compuestos fenólicos se unen a proteínas mediante enlaces no covalentes, como las interacciones hidrofóbicas que posteriormente se estabilizan por puentes de hidrógeno (Frazier *et al*., 2010). Los enlaces no covalentes incluyen puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas e hidrofóbicas (Johnson *et al*., 2010). Y la 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).

Se estudiaron nueve polifenoles con fracciones galoilo para evaluar la inhibición de α-amilasa pancreática, los efectos de inhibición se calcularon de acuerdo con la velocidad inicial de digestión de almidón en ausencia y presencia de los polifenoles. Los que tienen fracciones galoilo libres mostraron efectos significativos. Mientras los no libres, vinculados a otros grupos apenas mostraron actividad inhibitoria (Cao *et al*., 2020).

La inhibición de α-amilasa resulta de la competencia entre inhibidores y sustrato. La unión con la enzima depende tanto del inhibidor como del valor de IC_{50} requerida en concentraciones de sustrato y la actividad inhibitoria es dependiente de la concentración (Cao *et al*., 2020).

Los fitoquímicos presentes en cáscara de granada se evaluaron mediante un ensayo de actividad inhibitoria por el método DNSA (Di Sotto *et al*., 2019). Se identificaron previamente en la caracterización a la rutina como el compuesto más abundante, entre otros como ácido gálico, cuya actividad influye en α-amilasa y α-glucosidasa, teniendo un mayor potencial en esta última para inhibirla atribuyéndolo a rutina, catequina, ácido elágico y ácido gálico principalmente; mientras que la rutina y el ácido siríngico podrían contribuir con la inhibición de α-amilasa (Di Sotto *et al*., 2019).

Se realizó un análisis *in vitro* en hojas de *Simarouba glauca*, que mostró una actividad inhibitoria para la enzima α-glucosidasa de hasta 1000 veces mayor (IC_{50} = 2,4 ± 0,4 µg/mL) en comparación con la de acarbosa estándar (IC_{50}=2450 ± 24 µg/mL) lo que indica la presencia de un inhibidor potente de esta enzima (Mugaranja & Kulal, 2020).

5. Conclusiones

Los estudios existentes han analizado principalmente extractos polifenólicos de plantas informando la capacidad de estas para inhibir las actividades catalíticas de las enzimas digestivas. Dentro de las técnicas comúnmente empleadas para estas evaluaciones se encuentran las técnicas *in vitro* tradicionales, y evaluaciones *in silico*. Estos métodos proporcionan datos relevantes sobre las interacciones de compuestos polifenólicos con las enzimas digestivas.

La mejor capacidad de unión entre los polifenoles con estas enzimas digestivas está relacionada principalmente con la estructura de los compuestos polifenólicos, el número de grupos hidroxilo y aspectos que influyen en las interacciones de compuestos fenólicos con enzimas digestivas. También, influye la

composición de la enzima (i.e., su número de aminoácidos polares e hidrófobos y el peso molecular), así como las variables distintivas del tipo de enzimas, siendo las más frecuentes amilasas, lipasas y proteasas.

El uso de los compuestos polifenólicos como inhibidores de las enzimas digestivas, son una alternativa a los inhibidores comerciales empleados para tratar enfermedades crónico-degenerativas. Sin embargo, es importante conocer detalles específicos para cada molécula que se propone, tales como, entender las interacciones moleculares de los complejos enzima-polifenol y los mecanismos de acción a nivel gastrointestinal de los diversos fitoquímicos, teniendo como perspectiva a futuro la realización de ensayos clínicos.

6. Referencias Bibliográficas

Abdelli, I., Benariba, N., Adjdir, S., Fekhikher, Z., Daoud, I., Terki, M., Benramdane, H., & Ghalem, S. (2021). In silico evaluation of phenolic compounds as inhibitors of A-amylase and A-glucosidase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, *39*(3), 816–822. https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1718553

Ademiluyi, A. O., & Oboh, G. (2013). Soybean phenolic-rich extracts inhibit key-enzymes linked to type 2 diabetes (α-amylase and α-glucosidase) and hypertension (angiotensin I converting enzyme) in vitro. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *65*(3), 305–309. https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.09.005

Aguilera-Otíz, M., Reza-Vargas, M. del C., Chew Madinaveitia, R. G., & Meza-Velázquez, J. A. (2011). Propiedades Funcionales De Las Antocianinas. *BIOtecnia*, *13*(2), 16. https://doi.org/10.18633/bt.v13i2.81

Akkarachiyasit, S., Yibchok-Anun, S., Wacharasindhu, S., & Adisakwattana, S. (2011). In vitro inhibitory effects of cyandin-3-rutinoside on pancreatic α-amylase and its combined effect with acarbose. *Molecules*, *16*(3), 2075–2083. https://doi.org/10.3390/molecules16032075

Anobom, C. D., Pinheiro, A. S., De-Andrade, R. A., Aguieiras, E. C. G., Andrade, G. C., Moura, M. V., Almeida, R. V., & Freire, D. M. (2014). From structure to catalysis: Recent developments in the biotechnological applications of lipases. *BioMed Research International*, *2014*. https://doi.org/10.1155/2014/684506

Anouar, E. H., Gierschner, J., Duroux, J.-L., & Trouillas, P. (2012). UV/Visible spectra of natural polyphenols: A time-dependent density functional theory study. *Food Chemistry*, *131*(1), 79–89. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.034

Avellaneda Ortiz, I. M. (2013). *Evaluación de la actividad inhibitoria de la α-glucosidasa (α-GLC) in vitro por extractos vegetales* [Universidad Tecnológica de Pereira]. https://doi.org/10.1190/segam2013-0137.1

Bardal, S., Jason, W., & Doug, M. (2011). Endocrinology. In *Applied Pharmacology*. https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=nYPy70d1E50C&oi=fnd&pg=PP2&dq=Bardal+,+S.+K.,+Waechter+,+J.+E.,+%26+Martin+,+D.+S.+(2011)&ots=W6tU-DRB-d&sig=o8fWQ8DObwZRZDpKe0M1e04Sm20&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

Bashary, R., Vyas, M., Nayak, S. K., Suttee, A., Verma, S., Narang, R., & Khatik, G. L. (2020). An Insight of Alpha-amylase Inhibitors as a Valuable Tool in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reviews*, *16*(2), 117–136. https://doi.org/10.2174/1573399815666190618093315

Berger, K., Ostberg-Potthoff, J. J.,

Bakuradze, T., Winterhalter, P., & Richling, E. (2020). Carbohydrate Hydrolase-Inhibitory Activity of Juice-Based Phenolic Extracts in Correlation to Their Anthocyanin/Copigment Profile. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(22), 1–11. https://doi.org/10.3390/molecules25225224

Bernal Rodríguez, C. A. (2012). Contribución al estudio farmacotécnico del extracto estandarizado de frutos de Physalis peruviana L. con miras a la obtención de un producto fitoterapéutico. In *Facultad de Ciencias, departamento de Farmacia: Vol. Magister e*. Universidad Nacional de Colombia.

Bhat, M., Zinjarde, S. S., Y. Bhargava, S., Kumar, A. R., & Joshi, B. N. (2011). Antidiabetic Indian plants: A good source of potent amylase inhibitors. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2011*, 1–6. https://doi.org/10.1093/ecam/nen040

Blagojevic, B., Agic, D., Serra, A. T., Matic, S., Matovina, M., Bijelic, S., & Popovic, B. M. (2020). An in vitro and in silico evaluation of bioactive potential of cornelian cherry (Cornus mas L.) extracts rich in polyphenols and iridoids. *Food Chemistry*, *335*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127619

Boehlke C, Zierau O, H. C. (2015). Salivary amylase - the enzyme of unspecialized euryphagous animals. *Archives of Oral Biology*, *31*(2), 68–81. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.008

Borrelli, G. M., & Trono, D. (2015). Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 20774–20840. https://doi.org/10.3390/ijms160920774

Brindis, F., González-Trujano, M. E., González-Andrade, M., Aguirre-Hernández, E., & Villalobos-Molina, R. (2013). Aqueous extract of Annona macroprophyllata: A potential α-glucosidase inhibitor. *BioMed Research International*, *2013*, 1–6. https://doi.org/10.1155/2013/591313

Cao, J., Zhang, Y., Han, L., Zhang, S., Duan, X., Sun, L., & Wang, M. (2020). Both Galloyl Moiety Number and Molecular Flexibility Are Important to Alpha-amylase Inhibition by Galloyl-based Polyphenols. *Food and Function*, *11*(5), 3838–3850. https://doi.org/10.1039/c9fo02735a

Chandran R, P., Kumar S, N., S, M., Kader S, A., & Kumar B.S, D. (2015). In Vitro α-Glucosidase Inhibition, Antioxidant, Anticancer, and Antimycobacterial Properties of Ethyl Acetate Extract of Aegle tamilnadensis Abdul Kader (Rutaceae) Leaf. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *175*(2), 1247–1261. https://doi.org/10.1007/s12010-014-1335-y

Chew, L. Y., Toh, G. T., & Ismail, A. (2019). Application of Proteases for the Production of Bioactive Peptides. In *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects* (pp. 247–261). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00015-3

Costamagna, M. S., Zampini, I. C., M R, A., Cuello, S., Torres, S., Pérez, J., Quispe, C., Schmeda-hirschmann, G., & Isla, M. I. (2016). Polyphenols rich fraction from Geoffroea decorticans fruits flour affects key enzymes involved in metabolic syndrome , oxidative stress and inflammatory process. *FOOD CHEMISTRY*, *190*, 392–402. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.068

D. Sitrin, M. (2014). Digestion and Absorption of Dietary Triglycerides. In P. (eds) Leung (Ed.), *The Gastrointestinal System: Gastrointestinal, Nutritional and*

Hepatobiliary Physiology (pp. 1–364). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8771-0

da Silva, S. M., Koehnlein, E. A., Bracht, A., Castoldi, R., Gutierrez Rodrigues, de M., Baesso, M. L., Peralta, R. A., Marques de Souza, C. G., de Sá-Nakanishi, A. B., & Peralta, R. M. (2014). Inhibition of salivary and pancreatic α-amylases by a pinhão coat (Araucaria angustifolia) extract rich in condensed tannin. *Food Research International*, *56*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.12.004

Dabhi, A. S., Bhatt, N. R., & Shah, M. J. (2013). Voglibose: An alpha glucosidase inhibitor. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *7*(12), 3023–3027. https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/6373.3838

Dalar, A., & Konczak, I. (2013). Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from Eastern Anatolia. *Industrial Crops and Products*, *44*, 383–390. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.037

Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, *3*(9), 853–859. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9

Dewi, A. A. R. F., Muntholib, & Subandi. (2020). In vitro and in silico Analysis of Pomegranate (Punica granatum L.) Fruit Powder as Pancreatic Lipase and α-Amylase Inhibitor. *Journal of Physics: Conference Series*, *1665*(1). https://doi.org/10.1088/1742-6596/1665/1/012004

Di Cera, E. (2009). Serine proteases. *IUBMB Life*, *61*(5), 510–515. https://doi.org/10.1002/iub.186

Di Sotto, A., Locatelli, M., Macone, A., Toniolo, C., Cesa, S., Carradori, S., Eufemi, M., Mazzanti, G., & Di Giacomo, S. (2019). Hypoglycemic, antiglycation, and cytoprotective properties of a phenol-rich extract from waste peel of punica granatum L. Var. Dente di cavallo DC2. *Molecules*, *24*(17), 1–22. https://doi.org/10.3390/molecules24173103

Elinor, E., Fass, D., & Eitan, B. (2009). Proteases. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, *3*, 604–615. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00222-1

Elya, B., Basah, K., Mun'Im, A., Yuliastuti, W., Bangun, A., & Septiana, E. K. (2012). Screening of α-glucosidase inhibitory activity from some plants of Apocynaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, and Rubiaceae. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/281078

Erez, E., Fass, D., & Bibi, E. (2009). How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. In *Nature* (Vol. 459, Issue 7245, pp. 371–378). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nature08146

Flores-Gallegos, A. C., Delgado-García, M., Ascacio-Valdés, J. A., Villareal-Morales, S., Michel-Michel, M. R., Aguilar-González, C. N., & Rodríguez-Herrera, R. (2018). Hydrolases of halophilic origin with importance for the food industry. In *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects* (pp. 197–219). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00013-X

Frazier, R. A., Deaville, E. R., Green, R. J., Stringano, E., Willoughby, I., Plant, J., & Mueller-Harvey, I. (2010). Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*(2), 490–495. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.05.035

Fukasawa, K. M., Hata, T., Ono, Y., & Hirose, J. (2011). Metal Preferences of Zinc-Binding Motif on Metalloproteases. *Journal of Amino Acids*, *2011*, 1–7. https://doi.org/10.4061/2011/574816

Ghosh, S., Ahire, M., Patil, S., Jabgunbde, A., Dusane, M. B., Joshi, B. N., Pardesi, K., Jachak, S., & Chopade, D. D. D. B. A. (2012). Antidiabetic activity of gnidia glauca and dioscorea bulbifera: Potent amylase and glucosidase inhibitors. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/929051

Gonçalves, R. N., Gozzini Barbosa, S. D., & da Silva-López, R. E. (2016). Proteases from Canavalia ensiformis: Active and Thermostable Enzymes with Potential of Application in Biotechnology. *Biotechnology Research International*, *2016*, 1–1. https://doi.org/10.1155/2016/9872540

González-Bacerio, J., Rodríguez Hernández, J., & Del Monte Martínez, A. (2010). Lipases: enzymes having the potential for developing immobilised biocatalysts by interfacial adsorption. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *12*(1), 124–140. https://www.redalyc.org/pdf/776/77617786013.pdf

González-Castejón, M., & Rodriguez-Casado, A. (2011). Dietary phytochemicals and their potential effects on obesity: A review. *Pharmacological Research*, *64*(5), 438–455. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.07.004

Hashim, A., Khan, M. S., Khan, M. S., Baig, M. H., & Ahmad, S. (2013). Antioxidant and α-amylase inhibitory property of phyllanthus virgatus L.: An in vitro and molecular interaction study. *BioMed Research International*, *2013*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2013/729393

Helal, A., Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., & Conte, A. (2015). Gastro-pancreatic release of phenolic compounds incorporated in apolyphenols-enriched cheese-curd. *Lwt-Food Science and Technology*, *60*(2), 957–963. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.037

Hemalatha, P., Bomzan, D. P., Sathyendra Rao, B. V., & Sreerama, Y. N. (2016). Distribution of phenolic antioxidants in whole and milled fractions of quinoa and their inhibitory effects on α-amylase and α-glucosidase activities. *Food Chemistry*, *199*, 330–338. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.025

Hu, B., Cui, F., Yin, F., Zeng, X., Sun, Y., & Li, Y. (2015). Caffeoylquinic acids competitively inhibit pancreatic lipase through binding to the catalytic triad. *International Journal of Biological Macromolecules*, *80*, 529–535. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.031

Janeček, Š., Svensson, B., & MacGregor, E. A. (2014). α-Amylase: An enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(7), 1149–1170. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1388-z

Johnson, E. R., Keinan, S., Mori-Sánchez, P., Contreras-García, J., Cohen, A. J., & Yang, W. (2010). Revealing noncovalent interactions. *JACS Articles*, *132*(18), 6498–6506. https://doi.org/10.1021/ja100936w

Kalita, D., Holm, D. G., LaBarbera, D. V., Petrash, J. M., & Jayanty, S. S. (2018). Inhibition of α-glucosidase, α-amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds. *PLOS ONE*, *13*(1), 1–21. https://doi.org/10.1371/journal.pone.01910

Kanakis, C. D., Hasni, I., Bourassa, P., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G., & Tajmir-Riahi, H. A. (2011). Milk β-lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry*, *127*(3),

1046–1055. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.079

Klowden Marc J. (2013). Physiological Systems in Insects - Marc J. Klowden - Google Libros. In *Physiological System Insects*. https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=CABp1YL0F8gC&oi=fnd&pg=PP1&dq=En+Physiological+Systems+in+Insects+&ots=TK7K1JDE9C&sig=W2VzFu9NBz3nAiHAYFoA3Ox7UTY&redir_esc=y#v=onepage&q=En Physiological Systems in Insects&f=false

Le Bourvellec, C., & Renard, C. M. G. C. (2012). Interactions between polyphenols and macromolecules: Quantification methods and mechanisms. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*(3), 213–248. https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499808

Li, D. Q., Qian, Z. M., & Li, S. P. (2010). Inhibition of three selected beverage extracts on α-glucosidase and rapid identification of their active compounds using HPLC-DAD-MS/MS and biochemical detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(11), 6608–6613. https://doi.org/10.1021/jf100853c

Li, Y. Q., Yang, P., Gao, F., Zhang, Z. W., & Wu, B. (2011). Probing the interaction between 3 flavonoids and pancreatic lipase by methods of fluorescence spectroscopy and enzymatic kinetics. *European Food Research and Technology*, *233*(1), 63–69. https://doi.org/10.1007/s00217-011-1491-z

Liang, M., Liu, R., Qi, W., Su, R., Yu, Y., Wang, L., & He, Z. (2013). Interaction between lysozyme and procyanidin: Multilevel structural nature and effect of carbohydrates. *Food Chemistry*, *138*(2–3), 1596–1603. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.027

Liu, H., Xie, L., Wang, J., Guo, Q., Yang, S., Liang, P., Wang, C., Lin, M., Xu, Y., & Zhang, L. (2017). The Stress-Responsive and Host-Oriented Role of Nonribosomal Peptide Synthetases in an Entomopathogenic Fungus, Beauveria bassiana. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(3), 439–449.

Lo Piparo, E., Scheib, H., Frei, N., Williamson, G., Grigorov, M., & Chou, C. J. (2008). Flavonoids for controlling starch digestion: Structural requirements for inhibiting human α-amylase. *Journal of Medicinal Chemistry*, *51*(12), 3555–3561. https://doi.org/10.1021/jm800115x

Lordan, S., Smyth, T. J., Soler-Vila, A., Stanton, C., & Ross, R. P. (2013). The α-amylase and α-glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry*, *141*(3), 2170–2176. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.123

Macció, L., Vallés, D., & María, C. A. (2014). Búsqueda de actividad inhibitoria de tripsina y elastasa en extractos de vegetales autóctonos. *Innotec*, *9*. https://doi.org/10.26461/09.11

Martinez-Gonzalez, A. I., Díaz-Sánchez, Á. G., De La Rosa, L. A., Vargas-Requena, C. L., Bustos-Jaimes, I., & Alvarez-Parrilla, E. (2017). Polyphenolic compounds and digestive enzymes: In vitro non-covalent interactions. *Molecules*, *22*(4), 1–24. https://doi.org/10.3390/molecules22040669

Martínez Pérez, R. B. (2012). *Lipasas digestiva e intracelular de Penaeus vannamei. especificidad y actividad en presencia de surfactantes* [Centro de Investigaciones Biológicas del norte S.C]. http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/300

Mendoza-Meza, D. L., & Loza-Rosas, S. A. (2014). Inhibitory activity of alpha-amylase and total phenols in Smallanthus

sonchifolius (yacon) ethanolic leaf extracts. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, *19*(4), 310–318.

Miao, M., Jiang, H., Jiang, B., Zhang, T., Cui, S. W., & Jin, Z. (2014). Phytonutrients for controlling starch digestion: Evaluation of grape skin extract. *Food Chemistry*, *145*, 205–211. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.056

Mikawlrawng, K. (2016). Aspergillus in Biomedical Research. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications* (pp. 229–242). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00019-1

Montoya-Rodríguez, A., Gómez-Favela, M. A., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., & González de Mejía, E. (2015). Identification of Bioactive Peptide Sequences from Amaranth (Amaranthus hypochondriacus) Seed Proteins and Their Potential Role in the Prevention of Chronic Diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *14*(2), 139–158. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12125

Morales, M. L., & Troncoso, A. M. (2012). Sustancias antinutritivas presentes en alimentos. In A. M. Camean & M. Repetto (Eds.), *Toxicología Alimentaria* (pp. 250–252). Diaz de Santos. https://books.google.com.ec/books?id=SbUticcNWoMC&printsec=frontcover&dq=inauthor:%22Manuel+REPETTO+JIMÉNEZ%22&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjP8Ki5p4LsAhXMxlkKHZBBBiwQ6AEwAHoECAIQAg#v=onepage&q&f=false%0Ahttps://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=AA6PU4HL3EAC&oi=

Motta, J., Martin, L., & Vergnolle, N. (2011). Proteases and Their Receptors in Inflammation. In *Proteases and Their Receptors in Inflammation*. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0157-7

Mugaranja, K. P., & Kulal, A. (2020). Alpha glucosidase inhibition activity of phenolic fraction from Simarouba glauca: An in-vitro, in-silico and kinetic study. *Heliyon*, *6*(7), e04392. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04392

Mulaudzi, R. B., Ndhlala, A. R., Kulkarni, M. G., & 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. https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.06.022

Muñoz Alvarez, F. E. (2011). *Aislamiento y purificación parcial de los inhibidores de tripsina presentes en semillas de leguminosas o gramíneas producidas en el ecuador*. Escuela Politécnica Nacional.

Nagy, K., Courtet-Compondu, M. C., Williamson, G., Rezzi, S., Kussmann, M., & Rytz, A. (2012). Non-covalent binding of proteins to polyphenols correlates with their amino acid sequence. *Food Chemistry*, *132*(3), 1333–1339. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.113

Nater, U. M., & Ali, N. (2020). *Alpha-Amylase*. Encyclopedia of Behavioral Medicine; Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-39903-0_2

Pérez-Peña, J., Serrano-Heras, G., Montero, J. C., Corrales-Sánchez, V., Pandiella, A., & Ocaña, A. (2016). In silico analysis guides selection of BET Inhibitors for triple-negative breast cancer treatment. *Molecular Cancer Therapeutics*, *15*(8), 1823–1833. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0004/274607/AM/IN-SILICO-ANALYSES-GUIDES-SELECTION-OF-BET

Peterson, J., Bihain, B. E., Bengtsson-Olivecrona, G., Deckelbaum, R. J.,

Carpentier, Y. A., & Olivecrona, T. (1990). Fatty acid control of lipoprotein lipase: a link between energy metabolism and lipid transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *87*(3), 909–913.

Podsędek, A., Majewska, I., Redzynia, M., Sosnowska, D., & Koziołkiewicz, M. (2014). In vitro inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(20), 4610–4617. https://doi.org/10.1021/JF5008264/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2014-008264_0001.GIF

Poklar Ulrih, N. (2017). Analytical techniques for the study of polyphenol–protein interactions. *Https://Doi.Org/10.1080/10408398.2015.1052040*, *57*(10), 2144–2161. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1052040

Qiong, L., Qingyi, W., Erdong, Y., Jiguo, Y., & Zhengxiang, N. (2014). Interaction between four flavonoids and trypsin: Effect on the characteristics of trypsin and antioxidant activity of flavonoids. *International Journal of Food Science and Technology*, *49*(4), 1063–1069. https://doi.org/10.1111/ijfs.12401

Quesille-Villalobos, A. M., Torricoa, J. S., & Ranilla, L. G. (2013). Phenolic compounds, antioxidant capacity, and in vitro α-amylase inhibitory potential of tea infusions (Camellia sinensis) commercialized in Chile. *Http://Mc.Manuscriptcentral.Com/Tcyt*, *11*(1), 60–67. https://doi.org/10.1080/19476337.2012.688219

Rahim, A. T. M. A., Takahashi, 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. https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.05.017

Sacher, O., Reitz, M., & Gasteiger, J. (2009). Investigations of enzyme-catalyzed reactions based on physicochemical descriptors applied to hydrolases. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *49*(6), 1525–1534. https://doi.org/10.1021/CI800277F/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CI-2008-00277F_0011.GIF

Saha, S., & Imran, I. Bin. (2020). Isolation, detection, and quantification of hydrolyzable tannins of the biosynthetic pathway by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *35*(5), 1–15. https://doi.org/10.1002/rcm.9005

Sakulnarmrat, K., & Konczak, I. (2012). Composition of native Australian herbs polyphenolic-rich fractions and in vitro inhibitory activities against key enzymes relevant to metabolic syndrome. *Food Chemistry*, *134*(2), 1011–1019. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.217

Salgado Rinquey, D. (2017). *INCREMENTO EN LA ACTIVIDAD ALCOHOLITICA DE AmyA DE Thermotoga maritima MEDIANTE MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA* (Vol. 53, Issue 9). Universidad Autónoma del Estado de México.

Scott, A., Weldon, S., & Taggart, C. C. (2011). SLPI and elafin: Multifunctional antiproteases of the WFDC family. *Biochemical Society Transactions*, *39*(5), 1437–1440. https://doi.org/10.1042/BST0391437

Scotti, L., Júnior, F. J. B. M., Ishiki, H. M., Ribeiro, F. F., Duarte, M. C., Santana, G. S., Oliveira, T. B., Melo Diniz, M. de F. F., Quintans-Júnior, L. J. Q.-J., & Scotti, M. T. (2018). Computer-aided drug design studies in food chemistry. In *Natural and Artifiial Flavoring Agents and Food Dyes:*

Handbook of Food Bioengineering (Vol. 7, pp. 261–297). https://doi.org/10.1016/C2016-0-00380-7

Sergent, T., Vanderstraeten, J., Winand, J., Beguin, P., & 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

Shah, M. A., Mir, S. A., & Paray, M. A. (2014). Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: A review. *Dairy Science and Technology*, *94*(1), 5–16. https://doi.org/10.1007/s13594-013-0144-3

Shi, Z.-L., Liu, Y., Yuan, Y.-Y., Song, D., Qi, M.-F., Yang, X.-J., Wang, P., Li, X.-Y., Shang, J.-H., & Yang, Z.-X. (2017). In Vitro and in Vivo Effects of Norathyriol and Mangiferin on α-Glucosidase. *Biochemistry Research International*, *2017*(Figure 2). https://doi.org/10.1155/2017/1206015

Silva, C. P. da, Soares-Freitas, R. A. M., Sampaio, G. R., Santos, M. C. B., do Nascimento, T. P., Cameron, L. C., Ferreira, M. S. L., & Arêas, J. A. G. (2019). Identification and action of phenolic compounds of Jatobá-do-cerrado (Hymenaea stignocarpa Mart.) on α-amylase and α-glucosidase activities and flour effect on glycemic response and nutritional quality of breads. *Food Research International*, *116*(August 2018), 1076–1083. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.050

Smith, M. E., & Morton, D. G. (2010). *The digestive system: basic science and clinical condition*. Churchill Livingstone.

Sun, J., Dong, S., Wu, Y., Zhao, H., Li, X., & Gao, W. (2018). Inhibitor discovery from pomegranate rind for targeting human salivary α-amylase. *Medicinal Chemistry Research*, *27*(6), 1559–1577. https://doi.org/10.1007/s00044-018-2164-2

Sun, L. (2017). *Studying the interactions between Tea Polyphenols and a-amylase* (Vol. 2507, Issue February). The University of Queensland.

Tan, Y., Chang, S. K. C., & Zhang, Y. (2016). Comparison of a-amylase, a-glucosidase and lipase inhibitory activity of the phenolic substances in two black legumes of different genera. *Food Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.100

Tenore, G. C., Campiglia, P., Giannetti, D., & Novellino, E. (2015). Simulated gastrointestinal digestion, intestinal permeation and plasma protein interaction of white, green, and black tea polyphenols. *Food Chemistry*, *169*, 320–326. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.006

Torres, Á., Lebed, M., Arcia, P., Curutchet, A., & Cozzano, S. (2019). De residuo industrial a ingrediente funcional : el potencial de la cáscara de granada From industrial waste to functional ingredient : *REVISTA DEL LABORATORIO TECNOLOGICO DEL URUGUAY*, *19*(19), 76–96. https://doi.org/10.26461/19.04

Vaseva, J. S., Sustar-Vozlic, J., V., M., M, K., K., D., & Simova-Stoilova, L. (2012). The Response of plants to drought stress the role of dehydrins, chaperones, proteases and protease inhibitors in maintaining cellular protein function. *Nova Science Publishers, February 2014*.

Vazquez-flores, A. A., Wong-paz, J. E., Lerma-herrera, M. A., Martinez-gonzalez, A. I., & Olivas-aguirre, F. J. (2017). Proanthocyanidins from the kernel and shell of pecan (Carya illinoinensis): Average degree of polymerization and effects on carbohydrate , lipid , and peptide hydrolysis in a simulated human digestive system. *Journal of Functional Foods*, *28*,

227–234. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.11.003

Velarde-Salcedo, A. J., Barrera-Pacheco, A., Lara-González, S., Montero-Morán, G. M., Díaz-Gois, A., González De Mejia, E., & Barba De La Rosa, A. P. (2013). In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (Amaranthus hypochondriacus L.) proteins. *Food Chemistry*, *136*(2), 758–764. https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.08.032

Velázquez Moreno, J. O. (2017, October). *Análisis in silico: Modelado de Proteínas*. 1–13.

Verma, S., Dixit, R., & Pandey, K. C. (2016). Cysteine proteases: Modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Frontiers in Pharmacology*, *7*(APR), 1–12. https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00107

Wang, H., Du, Y. J., & Song, H. C. (2010). α-Glucosidase and α-amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chemistry*, *123*(1), 6–13. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.088

Williams, J. A. (2019). Amylase 2 . Pancreatic Function Amylase Localization , Deficiency Regulation. *Pancrepedia*, 1–8. https://doi.org/10.3998/panc.2019.02

Worsztynowicz, P., Napierała, M., Białas, W., Grajek, W., & 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. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.002

Wu, D., & Bird, M. R. (2009). The interaction of protein and polyphenol species in ready to drink black tea liquor production. *Journal of Food Process Engineering*, *33*(3), 481–505. https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2008.00286.x

Wu, J. W., & Chen, X. L. (2011). Extracellular metalloproteases from bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *92*(2), 253–262. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3532-8

Wu, S., & Tian, L. (2017). Diverse phytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (punica granatum). *Molecules*, *22*(10), 1–17. https://doi.org/10.3390/molecules221016006

Xiao, H., Liu, B., Mo, H., & Liang, G. (2015). Comparative evaluation of tannic acid inhibiting α-glucosidase and trypsin. *Food Research International*, *76*, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.029

Yang, X., & Kong, F. (2016). Effects of tea polyphenols and different teas on pancreatic α-amylase activity in vitro. *LWT - Food Science and Technology*, *66*, 232–238. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.035

Yaqoob, P. (2013). Role of Lipids in Human Nutrition. In *Handbook of olive oil: Analysis and properties* (pp. 656–673). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8

You, Q., Chen, F., Wang, X., Jiang, Y., & Lin, S. (2012). Anti-diabetic activities of phenolic compounds in muscadine against alpha-glucosidase and pancreatic lipase. *LWT - Food Science and Technology*, *46*(1), 164–168. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.011

Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D. D., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., Liu, Q., & Tsao, R. (2015). 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. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.144

Zhang, H., Wang, G., Beta, T., & Dong, J. (2015). Inhibitory properties of aqueous ethanol extracts of propolis on alpha-glucosidase. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*, 1–7. https://doi.org/10.1155/2015/587383