

# Inhibición de lipasa pancreática por flavonoides: importancia del doble enlace C2=C3 y la estructura plana del anillo C

Inhibition of pancreatic lipase by flavonoids: relevance of the C2=C3 double bond and C-ring planarity

Alejandra Isabel Martínez-González<sup>a</sup>, Ángel Gabriel Díaz-Sánchez<sup>a</sup>, Laura Alejandra de la Rosa<sup>a</sup>, Ismael Bustos-Jaimes<sup>b</sup>, Alma A. Vázquez-Flores<sup>a</sup>, Emilio Álvarez-Parrilla<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Ciudad Juárez 32310, México.

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX 04510, México.

## RESUMEN

Lipasa pancreática es una enzima clave en el metabolismo de lípidos. Los flavonoides son compuestos bioactivos de gran relevancia debido a sus interacciones con enzimas digestivas. Se evaluó la actividad de lipasa pancreática en presencia de flavonoides. Mediante espectroscopía UV-Visible se determinó que el mejor inhibidor fue quercetina, seguido de rutina > luteolina > catequina > hesperetina, con valores de IC<sub>50</sub> de 10.30, 13.50, 14.70, 28.50 y 30.50 μM, respectivamente. Todos los flavonoides mostraron una inhibición mixta, excepto catequina que mostró una inhibición acompetitiva. La capacidad inhibitoria de los flavonoides se relacionó con propiedades estructurales compartidas entre los distintos flavonoides, como la hidroxilación en las posiciones C5, C7 (anillo A), C2' y C3' (anillo B), y el doble enlace entre C2 y C3 (anillo C). Los resultados de inhibición coincidieron con el análisis de la fluorescencia extrínseca. Los estudios de docking molecular indicaron que la interacción entre lipasa pancreática y los flavonoides fue principalmente mediante interacciones hidrofóbicas (*pi*-stacking). Las interacciones de todos los flavonoides, excepto rutina, se dieron en el mismo sitio (subsitio 1) de la enzima. La insaturación entre C2 y C3 fue determinante para el acomodo de los flavonoides con la enzima, principalmente por interacciones de *pi*-stacking.

**Palabras clave:** Lipasa pancreática, flavonoide, estructura plana, sitio de unión.

## ABSTRACT

Pancreatic lipase is a key enzyme in lipid metabolism. Flavonoids are bioactive compounds obtained from vegetables with big relevance, due to their intrinsic interaction with digestive enzymes. Pancreatic lipase activity was evaluated in the presence of flavonoids, through UV-Vis spectroscopy. All tested flavonoids showed a mixed-type inhibition, except catechin, which showed a uncompetitive inhibition. The best inhibitor was quercetin followed by rutin > luteolin > catechin > hesperetin, with IC<sub>50</sub> values of 10.30, 13.50, 14.70, 28.50 and 30.50 μM, respectively. The flavonoids inhibitory capacity was related to structural properties shared between the different flavonoids, such as the hydroxylation at C5, C7 (ring A), C2' and C3' (ring B), and the double bond between C2 and C3 (ring C). The inhibition results are in agreement

with the extrinsic fluorescence analysis. Molecular docking studies indicated that the interaction between pancreatic lipase and flavonoids was mainly through hydrophobic interactions (*pi*-stacking). The interactions of all flavonoids, except rutin, occurred at the same enzyme site (subsitio 1). Instauration between C2 and C3 was decisive for the arrangement of flavonoids with the enzyme, mainly due to *pi*-stacking interactions.

**Keywords:** Pancreatic lipase, flavonoid, planarity, binding site.

## INTRODUCCIÓN

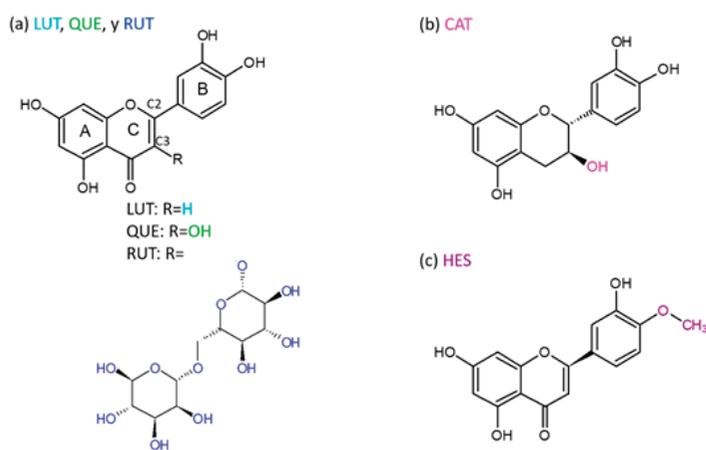
Los flavonoides, el grupo más amplio de polifenoles, han sido ampliamente estudiados por su actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, entre otras actividades biológicas (Li *et al.*, 2014; Calabrone *et al.*, 2015). En años recientes se ha estudiado su interacción con proteínas, como las enzimas digestivas para evaluar su posible uso en el control de la obesidad y diabetes (Li *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2015; Martínez-González *et al.*, 2017, 2019). La inhibición de enzimas digestivas está relacionada con la elevada afinidad de los flavonoides de interaccionar con las cadenas polipeptídicas, generando interacciones no covalentes con la enzima. En donde, la estructura de los flavonoides ha sido señalada como una de las responsables de esta interacción enzima-ligando (Gonzales *et al.*, 2015).

Los flavonoides derivados del 2-fenil-benzo-γ-pirano tienen una estructura común de dos anillos aromáticos (denominados "A" y "B"), unidos por un anillo heterocíclico central (anillo "C") (Figura 1) (Harborne, 1964; Ribeiro *et al.*, 2015). Existen aproximadamente 4,000 diferentes compuestos miembros de esta familia (Huang *et al.*, 2009) y sus variaciones dependen principalmente del grado de oxidación del anillo C (Rawel *et al.*, 2002). Se pueden encontrar distintas clasificaciones de los flavonoides. De manera sencilla, se pueden clasificar en dos grandes categorías, dependiendo de la presencia o ausencia del grupo hidroxilo en la posición C3, y se nombran como 3-hidroxi flavonoides y 3-desoxi flavonoides, respectivamente. Estos dos grupos se pueden dividir dependiendo de las sustituciones en otras posiciones de los anillos. Las principales subfamilias de flavonoides son las flavanonas, las flavonas, los flavonoles, y los flavan-3-oles o flavanoles (Erlund, 2004; Gon-

zales *et al.*, 2015) (Figura 1). De esta forma, las subfamilias de flavonoides presentan diferencias estructurales, en el número y tipo de sustituyentes, en la presencia de dobles enlaces, entre otras (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2017b). Los flavonoides pueden tener glicosilaciones (u otras sustituciones como metilaciones) como sustituyentes de los anillos. No obstante, la flexibilidad conformacional del flavonoide depende de la estructura de los anillos B y C (Amat *et al.*, 2008), la estructura plana del anillo C y las sustituciones en los diferentes anillos, son al parecer las principales características señaladas para la interacción con enzimas como las digestivas (Gonzales *et al.*, 2015).

En la Figura 1 se presentan las estructuras de algunos subgrupos de flavonoides. Se muestran las sustituciones o modificaciones estructurales correspondientes, tales como la carencia del grupo hidroxilo en el carbono 3 (C3) para la flavona luteolina (LUT, Figura 1a), a diferencia del flavonol quercetina (QUE) que cuenta con este grupo hidroxilo; o la presencia de una glicosilación en esta posición para el flavonol glicosilado, rutina (RUT). Mientras que en la Figura 1b se muestra la estructura del flavanol catequina (CAT) que carece del doble enlace entre el C2 y C3 en el anillo C. La flavanona hesperetina (HES) carece también de este doble enlace (Figura 1c), pero a diferencia de los otros flavonoides, presenta en su estructura un grupo metoxi en el C4' (anillo B). Así, estas estructuras presentan diferencias importantes como la presencia del doble enlace entre el C2 y el C3 del anillo C, la sustitución en el C3 por un grupo hidroxilo o una glicosilación, y la presencia de un grupo metoxi en el C4', que son características estructurales que han sido señaladas relevantes para su interacción con otras proteínas como las de la leche (Gonzales *et al.*, 2015)2015. Sin embargo, aspectos como la estructura plana del anillo C, otorgada por el doble enlace C2=C3 no ha sido completamente evaluado. La importancia de esta característica ha sido valorada para otras proteínas como las del factor de crecimiento endotelial vascular (Cerezo *et al.*, 2015).

El análisis de la unión de estos flavonoides con enzimas digestivas podría ayudar a elucidar un mecanismo de inhibición. La inhibición reversible de enzimas como lipasa pancreática, podría ser parte de un tratamiento alternativo para enfermedades no transmisibles como la obesidad (Buchholz y Melzig, 2015). La lipasa pancreática es la enzima encargada de hidrolizar alrededor del 70 % de los triglicéridos ingeridos por el ser humano (Birari y Bhutani, 2007). La disminución de su actividad enzimática por inhibidores reversibles, como los polifenoles, es objeto de estudio ya que podrían eliminar los efectos secundarios de un inhibidor no reversible (Sakulnarmrat y Konczak, 2012). Se ha reportado una actividad inhibitoria en valores de  $IC_{50}$  (concentración del ligando a la cual se inhibe la mitad de la actividad enzimática), más eficiente para flavonoides como la quercetina, en comparación con ácidos fenólicos como el ácido caféico (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2017a). Extractos vegetales ricos en flavonoides como QUE han sido evaluados por su elevada actividad inhibitoria frente a lipasa (Sakulnarmrat y Konczak, 2012), pero no se les había asociado con su estructura. Comparar a la quercetina con flavonoides de estructura similar, podría permitir elucidar el mecanismo de inhibición de estos flavonoides que cuentan con insaturación C2=C3. Analizar el efecto de la inhibición de la lipasa por parte de los flavonoides por sus interacciones con los sitios hidrofóbicos de unión de la enzima, considerando que el sitio de unión del sustrato es hidrofóbico, permitiría elucidar la relevancia de los aspectos estructurales de los flavonoides importantes para la unión con la enzima y su consecuente inhibición. En este sentido, en el presente estudio se pretende evaluar el efecto de diferentes sustituciones en los anillos de los flavonoides, como el doble enlace entre C2 y C3 (anillo C), sobre sus interacciones con lipasa pancreática y como afectan estas interacciones en la actividad enzimática de la lipasa pancreática.



**Figura 1.** Estructura química de los flavonoides evaluados. Luteolina (LUT), Quercetina (QUE) y Rutina (RUT) se muestran en una misma estructura (Figura 1a), se diferencian en el sustituyente en el C3 del anillo C. El grupo R de LUT es un H, para QUE R=OH, y RUT el grupo R corresponde a un rutinósido. La CAT y HES se muestran en las estructuras (b) y (c), respectivamente.

**Figure 1.** Chemical structure of evaluated flavonoids. The same structure (Figure 1a) was employed to show Lutein (LUT), Quercetin (QUE) and Rutin (RUT), and their differences are due to the substitution at C3 position. The radical group (R) of LUT is a hydrogen, whereas a hydroxyl and a rutinose are the R groups for QUE and RUT. CAT and HES are shown, (b) and (c) respectively.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales

La lipasa pancreática porcina tipo II, *p*-nitrofenil laurato (*p*NPL), Tris, Triton X-100, ácido clorhídrico, acetato de sodio, reactivo de Bradford, albúmina sérica bovina (BSA), ácido 1-anilino-8-naftalenosulfónico (ANS), y los flavonoides o ligandos: Luteolina (LUT), Quercetina (QUE), Catequina (CAT), Hesperetina (HES) y Rutina (RUT) fueron adquiridos de Sigma Aldrich Co. (Control Técnico y Representaciones, CTR, S.A. de C.V., Nuevo León, México). Etanol y metanol se adquirieron de J.T. Baker (CTR, Nuevo León, México). Todos los reactivos fueron de pureza grado reactivo o superior.

### Análisis de la actividad enzimática de lipasa pancreática

La inhibición de la actividad de la enzima lipasa pancreática se realizó de acuerdo a Martinez-Gonzalez *et al.* (2017a). La lipasa se disolvió en una disolución amortiguadora Tris 20 mM (pH = 7.2), a una concentración final de 2.0 mg/mL. La concentración de la proteína se determinó por el método Bradford, empleando una disolución de 1 mg/mL de albúmina de suero bovina (BSA) como disolución estándar, midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Agilent 8453 HP G1103A; Agilent Technologies, Santa Clara, California, Estados Unidos de América). El sustrato, *p*NPL, se disolvió (0.08 % de relación masa volumen) en acetato de sodio 5 mM (pH = 5.0, Triton X-100 al 1 %) para tener concentraciones finales de 11.7-124.2  $\mu$ M. Los flavonoides se disolvieron en metanol a una concentración final de 12.5, 25 y 50  $\mu$ M. Por problemas de solubilidad, la quercetina se disolvió en etanol a las mismas concentraciones. El ensayo se llevó a cabo en la disolución amortiguadora Tris 200 mM (pH = 8.2), de acuerdo a Martinez-Gonzalez *et al.* (2017a), y la reacción se midió a 400 nm durante 1000 s a 37 °C en un espectrofotómetro de UV-Visible (Agilent 8453 HP UV-Vis spectrometer G1103, Agilent Technologies, Santa Clara, E.U.A.). Todas las muestras se midieron por triplicado. Además se determinó el porcentaje de inhibición para cada uno de los ligandos a partir de medición realizada al término de la cinética (1000 s) (Dalar y Konczak, 2013), así como el valor de  $IC_{50}$  a partir de un gráfico de porcentaje de inhibición frente a concentración de sustrato. A partir de los valores cinéticos (velocidad inicial,  $v_0$ ) se calcularon los valores de velocidad máxima ( $v_{max}$ ) y constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ), ajustando los valores de  $v_0$  a las diferentes concentraciones de inhibidor y de sustrato a la ecuación de Michaelis-Menten (análisis no lineal, Ecuación 1), y la ecuación de Lineweaver-Burk (análisis lineal, Ecuación 2) con el programa GraphPad Prism v. 5 (GraphPad Software).

$$\text{Ecuación 1. } v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

$$\text{Ecuación 2. } \frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_M}{v_{max} \cdot [S]}$$

Las constantes de inhibición para una inhibición reversible mixta  $K_i$  y  $K_i'$  correspondientes a la enzima libre y

al complejo enzima-sustrato, respectivamente, fueron calculadas mediante las ecuaciones 3 y 4 (Tipton, 1996).

$$\text{Ecuación 3. } \frac{K_M}{v_{max}'} = \frac{K_M \cdot (1 + \frac{[I]}{K_i})}{v_{max}}$$

$$\text{Ecuación 4. } v_{max}' = \frac{v_{max}}{(1 + \frac{[I]}{K_i})}$$

Donde  $v_{max}'$  y  $K_M'$  corresponden a los valores obtenidos en presencia de los inhibidores, y la concentración del inhibidor (flavonoide) se representa con [I].

### Ensayo de la fluorescencia extrínseca del ANS

La posible unión de los flavonoides en sitios hidrofóbicos de lipasa pancreática, se evaluó de acuerdo a Martinez-Gonzalez *et al.* (2019) con algunas modificaciones. Se midió la intensidad de la fluorescencia (IF) emitida por una disolución de lipasa pancreática 0.05 mg/mL (Tris 200 mM pH 8.2) con ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico (ANS) 150  $\mu$ M en un espectrofluorómetro (Shimadzu RF-5301, Shimadzu Corporation, Kioto, Japón). Se monitoreó la IF a  $\lambda_{ex}$  de 380 nm y  $\lambda_{em}$  de 400 a 700 nm a 37 °C durante 900 s, en una celda de cuarzo de 1 cm. Se tituló a diferentes concentraciones de los flavonoides (hasta 300  $\mu$ M), midiendo la IF en el máximo de emisión (519 nm) y se realizaron las correcciones del cambio de volumen y efectos del filtro interno.

Se calculó el valor de la constante aparente de disociación  $K_D$  para el complejo enzima-ANS, en presencia de los ligandos, empleando la Ecuación 5.

$$\text{Ecuación 5 } \Delta FI = \frac{\Delta F_{max} \cdot [I]}{K_D + [I]}$$

Donde  $\Delta FI$  es el cambio en la intensidad de la fluorescencia a 340 nm (F0-F);  $\Delta F_{max}$  es el máximo valor de  $\Delta FI$ ; y  $K_D$  (Ecuación 5) corresponde al valor de la constante aparente de disociación para la unión entre la enzima y el ANS.

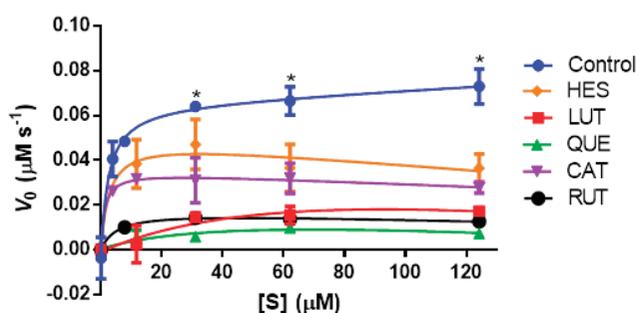
### Docking molecular

El posible sitio de unión de los flavonoides en la proteína se analizó mediante el software USCF-Chimera v. 4 con AutoDock Vina (Estados Unidos de América), de acuerdo a Martinez-Gonzalez *et al.* (2019). Se emplearon las estructuras tridimensionales del cristal de lipasa pancreática (Código 1ETH.pdb) y de los ligandos: luteolina, quercetina, catequina, hesperetina y rutina obtenidos de la base de datos de PubChem (Estados Unidos de América) y minimizados con el software PyMOL v. 13 (Estados Unidos de América). Las estructuras de los ligandos se consideraron como flexibles y la estructura de la proteína como fija, para obtener valores de energía de unión (cambio en la entalpía,  $\Delta H$  y energía libre de Gibbs,  $\Delta G$ ) y determinar el mejor modelo para la posible unión entre la proteína y el ligando.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Estudios de inhibición enzimática de flavonoides frente a lipasa

La actividad enzimática de lipasa pancreática fue evaluada en presencia de distintas concentraciones de los flavonoides. En la Figura 2 se muestra la actividad de la lipasa pancreática en presencia de distintas concentraciones de flavonoides con la enzima (valores de  $V_0$ ). El control presentó diferencias estadísticas significativas respecto a todos los flavonoides ( $p < 0.05$ ) es decir, todos los ligandos disminuyeron la actividad enzimática. En esta figura, se observa que el efecto inhibitorio de CAT y HES fue menor que la de los demás flavonoides analizados. Estos compuestos (CAT y HES) comparten similitudes estructurales, como la carencia del doble enlace entre C2 y C3. Este doble enlace al parecer es esencial para el acomodo de los flavonoides en su sitio de unión en la proteína. Resultados similares se observaron con la  $\alpha$ -amilasa, en donde LUT y QUE que presentan este doble enlace, presentaron una mejor capacidad inhibitoria (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2019). La estructura plana del anillo C, debido a la presencia de este doble enlace, aumenta la capacidad inhibitoria de los flavonoides (Lo Piparo *et al.*, 2008). Estos resultados son similares a los previamente reportados de una mayor inhibición de lipasa pancreática para el flavonoide QUE (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2017). Esta mayor inhibición puede explicarse considerando la estructura plana del anillo C del flavonol QUE y de la flavona LUT, mismo que les confiere una mayor capacidad para interaccionar con la cadena polipeptídica. La menor inhibición por parte de CAT y HES se explica por una ausencia de este doble enlace en su estructura y es similar a lo reportado para la inhibición de la  $\alpha$ -amilasa (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2019). La relevancia de



**Figura 2.** Efecto de los flavonoides Hesperetina (HES), Luteolina (LUT), Quercetina (QUE), Catequina (CAT), y Rutina (RUT) (25 µM) sobre la hidrólisis del pNPL catalizada por lipasa. Los símbolos representan los valores de velocidad inicial ( $V_0$ ) expresada como  $\mu\text{M s}^{-1} \pm$  desviación estándar. Las líneas representan el ajuste no lineal de Michaelis-Menten a los datos experimentales. Los asteriscos representan diferencias estadísticas entre los tratamientos respecto al control (Análisis de la diferencia mínima significativa de Fisher,  $p < 0.05$ ).

**Figure 2.** Effect of the flavonoids Hesperetin (HES), Lutein (LUT), Quercetin (QUE), Catechin (CAT) and Rutin (RUT) (25 µM) on pNPL hydrolysis catalyzed by pancreatic lipase. Symbols represent the initial velocity ( $V_0$ ) values expressed as  $\mu\text{M s}^{-1} \pm$  standard deviation. Lines are the Michaelis-Menten curves fitted to the experimental data. \* Statistical difference (Fisher's Least Significant Difference, LSD,  $p < 0.05$ ) between all treatments respect to control.

esta característica estructural para su unión con proteínas ha sido previamente reportada (Tadera *et al.*, 2006; Proença *et al.*, 2017; Martinez-Gonzalez *et al.*, 2019).

La RUT se comportó de manera similar a QUE, probablemente debido a la similitud estructural entre ambas moléculas, ya que RUT es el flavonol QUE glicosilado con el disacárido rutinósido en posición C3. Otros autores tampoco han observado diferencias significativas para la inhibición de lipasa pancreática entre flavonoides glicosilados y sin glicosilación, como la QUE y QUE-arabinósido (Zhang *et al.*, 2015). Se ha señalado que aunque estos compuestos glicosilados, de mayor tamaño que sus respectivas agliconas, no se pudieran acomodar en un sitio de unión, el aumento en el número de grupos hidroxilo por la glicosilación, les permitiría formar un mayor número de puentes de hidrógeno con la lipasa (Li *et al.*, 2011).

A partir del análisis lineal (Lineweaver-Burk; datos no mostrados) y no lineal (Figura 2) se calcularon los parámetros cinéticos para cada uno de los flavonoides (Tabla 1). Del análisis de esta tabla, se observó que su capacidad inhibitoria disminuyó en el siguiente orden: QUE > RUT > LUT > CAT > HES. Los valores calculados de  $IC_{50}$  respaldarían esta aseveración, ya que estos fueron  $10.30 \pm 2.45$ ,  $13.50 \pm 0.70$ ,  $14.70 \pm 0.90$ ,  $28.50 \pm 1.05$ , y  $30.50 \pm 2.10$ , respectivamente. Estos valores coinciden en que CAT y HES fueron los inhibidores con menor eficiencia frente a lipasa. QUE, RUT y LUT comparten la estructura de catecol en el anillo B (hidroxilaciones en las posiciones C2' y C3'), que ya había sido señalada para la inhibición de enzimas como la  $\alpha$ -amilasa y  $\alpha$ -glucosidasa (Gonzales *et al.*, 2015).

El tipo de inhibición se determinó por el cálculo de los parámetros cinéticos  $V_{max}$  y  $K_M$  (Tabla 1), y el análisis de Lineweaver-Burk (datos no mostrados). Para la mayoría de los flavonoides, se observó una disminución estadísticamente significativa del valor de  $V_{max}$  y un aumento en el valor de la  $K_M$ , esto indicó que fueron inhibidores reversibles mixtos. Para CAT se observó una inhibición acompetitiva, en donde el flavonoide sólo tendría preferencia por la unión con el complejo enzima-sustrato. Este flavonoide no se uniría como LUT y QUE (menor valor de  $IC_{50}$  que estos). La capacidad inhibitoria de la CAT se puede atribuir a la carencia del grupo oxo en el C4 y el doble enlace (C2 = C3) que disminuye su afinidad por la enzima libre. Se ha descrito que la presencia del grupo oxo en el C4 aumenta las interacciones de los flavonoides (por ejemplo QUE) frente a diferentes proteínas como el factor de crecimiento endotelial vascular (Cerezo *et al.*, 2015).

Los valores de las constantes de inhibición  $K_i$  y  $K_i'$  (Tabla 1), muestran que el componente competitivo de la inhibición mixta fue predominante ( $K_i < K_i'$ ). Algunos de estos flavonoides, como QUE y RUT, ya han sido reportados como inhibidores mixtos de la actividad de lipasa (Li *et al.*, 2011; Martinez-Gonzalez *et al.*, 2017a). Estos flavonoides podrían ejercer desde un mismo sitio de unión su efecto competitivo y no competitivo de la inhibición. De acuerdo con cálculos del coeficiente de Hill ( $\eta$ ), en ausencia y presencia de los ligandos, que fue de aproximadamente 1.00 (datos no mostrados), se

**Tabla 1.** Valores de los parámetros cinéticos,  $V_{max}$ ,  $K_M$ ,  $K_i$  y  $K_i'$ , así como el tipo de inhibición observada para la actividad de lipasa sobre el sustrato pNPL en presencia de los flavonoides.

**Table 1.** Kinetic parameters,  $V_{max}$ ,  $K_M$ ,  $K_i$  y  $K_i'$ , and inhibition type determined for pancreatic lipase activity with pNPL as substrate in presence of the evaluated flavonoids.

Ligando	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$V_{max}$ ( $\cdot 10^{-4}$ mM min $^{-1}$ )	$K_M$ (mM)	Tipo de Inhibición	$K_i$ and $K_i'$ (mM)
CONTROL	0.00	0.07 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	2.05 $\pm$ 0.80 <sup>e</sup>	Ninguno	0.00 0.00
HES	12.60	0.07 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	3.27 $\pm$ 0.35 <sup>e</sup>	Mixto	17.82 $\pm$ 1.06 <sup>a</sup> 25.10 $\pm$ 3.02 <sup>a</sup>
	25.00	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	3.54 $\pm$ 0.22 <sup>e</sup>		
	50.00	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	9.87 $\pm$ 1.14 <sup>d</sup>		
LUT	12.67	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	3.23 $\pm$ 0.60 <sup>e</sup>	Mixto	11.00 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup> 19.50 $\pm$ 2.90 <sup>b</sup>
	25.35	0.02 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	32.64 $\pm$ 3.10 <sup>b</sup>		
	50.00	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>	40.54 $\pm$ 3.02 <sup>a</sup>		
QUE	12.51	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	2.41 $\pm$ 0.50 <sup>e</sup>	Mixto	8.90 $\pm$ 0.65 <sup>c</sup> 15.70 $\pm$ 4.00 <sup>b</sup>
	24.83	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	28.93 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>		
	49.66	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>	30.03 $\pm$ 1.08 <sup>b</sup>		
CAT	12.32	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	1.87 $\pm$ 0.05 <sup>e</sup>	Acompetitivo	n.d. n.d.
	24.45	0.03 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	1.25 $\pm$ 0.00 <sup>f</sup>		
	50.00	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	1.03 $\pm$ 0.01 <sup>g</sup>		
RUT	12.84	0.04 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	10.36 $\pm$ 0.71 <sup>d</sup>	Mixto	10.63 $\pm$ 2.00 <sup>bc</sup> 16.40 $\pm$ 0.80 <sup>b</sup>
	25.57	0.02 $\pm$ 0.01 <sup>bc</sup>	11.15 $\pm$ 0.09 <sup>d</sup>		
	50.00	0.01 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	14.14 $\pm$ 1.35 <sup>c</sup>		

Los datos son representados como media  $\pm$  desviación estándar de los análisis realizados por triplicado. Las diferentes letras en una columna representan las diferencias significativas (Análisis de la diferencia mínima significativa de Fisher,  $p < 0.05$ ), n.d. significa no determinado. HES, Hesperetina, LUT, Luteolina, QUE, Quercetina, CAT, Catequina, RUT, Rutina.

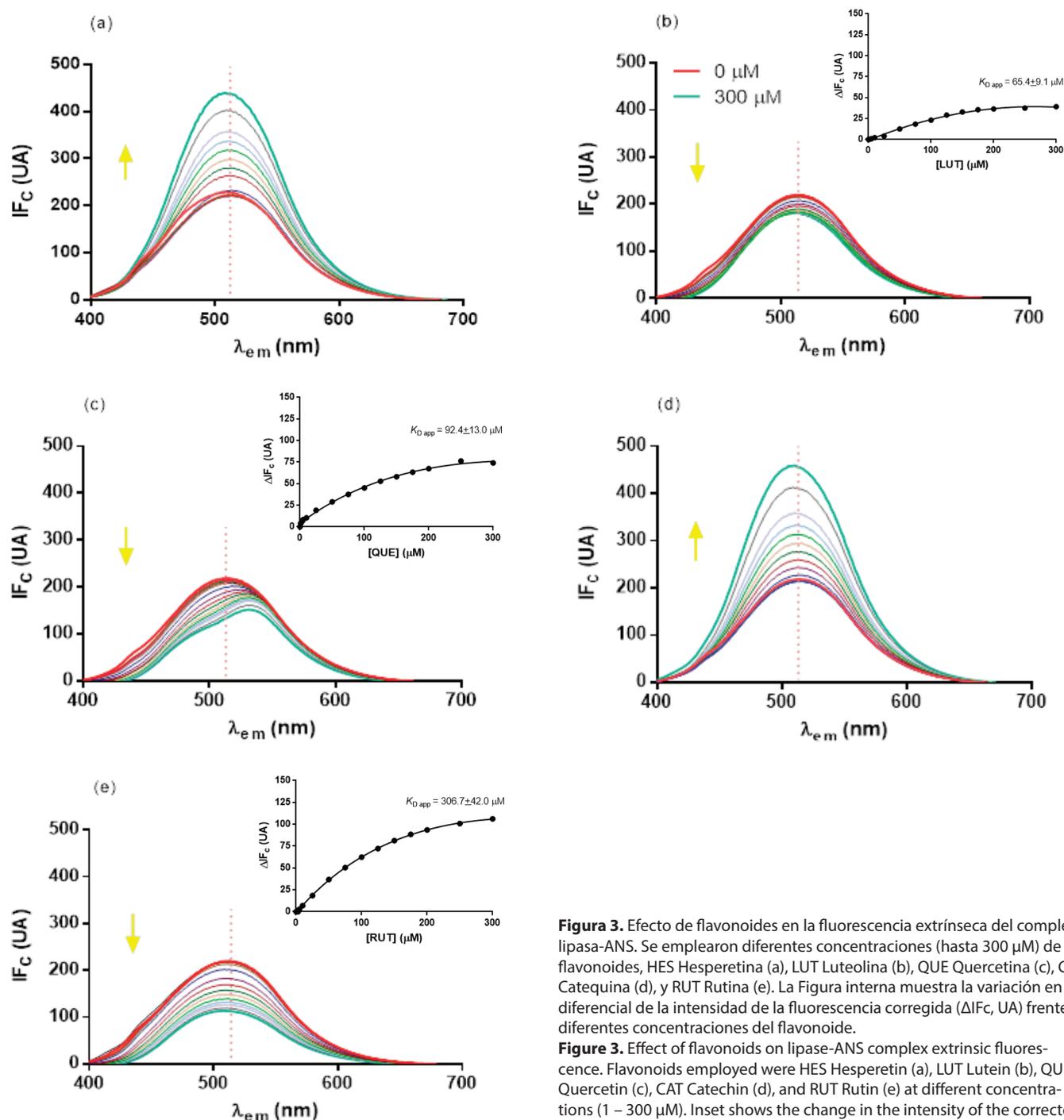
Values are mean  $\pm$  standard deviation of triplicate analysis. Different letters in columns represent significant differences (Fisher,  $p < 0.05$ ), n.d. not determined. HES, Hesperetin, LUT, Lutein, QUE, Quercetin, CAT, Catechin, RUT, Rutin.

concluye que existe un sólo sitio de unión para el sustrato. Resultados similares de coeficiente de Hill ( $\eta$  igual a 1.00) han sido reportados para flavonoides como LUT y genisteína con proteínas humanas, como quinasas de tirosina (Kuhnert *et al.*, 2011). Esto podría indicar que los ligandos, aunque impidieran el ingreso del sustrato al sitio activo (competitivo), luego permitirían la unión entre ambos y los flavonoides se mantendrían unidos a este complejo (enzima-sustrato; no competitivo).

#### Análisis de los sitios hidrofóbicos de unión en la enzima

La fluorescencia extrínseca permite evaluar la interacción del compuesto apolar ANS con los sitios hidrofóbicos de la enzima. Una disminución en la IF del ANS se relaciona con un desplazamiento del ANS de estos sitios apolares por parte de los flavonoides (Halim *et al.*, 2017). La Figura 3 muestra el efecto en la IF del ANS en presencia de los flavonoides. Se observa que los flavonoides que disminuyeron la intensidad fueron, en orden decreciente, RUT, QUE y LUT. Asimismo, se puede observar en las Figuras 3-internas, el ajuste no lineal (Ecuación 5) realizado, para calcular la  $K_{Dapp}$  de los flavonoides que mostraron disminución de la IF del ANS.

Además, QUE mostró un desplazamiento batocrómico (16 nm), que correspondería a un aumento en la polaridad alrededor del ANS, explicado por el desplazamiento de esta molécula de la región apolar de la enzima hacia el exterior de la proteína más polar (Lee *et al.*, 2014). La disminución en la fluorescencia generada por los flavonoides como QUE, se puede deber a cambios de polaridad del medio que rodea al ANS, por un desplazamiento de este por parte del flavonoide o por cambios estructurales de la proteína por la interacción flavonoide-lipasa (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2017). La posible interacción lipasa-QUE tendría el mayor efecto sobre el medio que rodea a los sitios hidrofóbicos en la enzima, debido a que las interacciones hidrofóbicas son las que tienen la mayor contribución a la estabilidad de las proteínas (Pace *et al.*, 2004). Un desplazamiento similar, pero de menor intensidad ( $p < 0.05$ ) se observó para LUT. En el caso de RUT, esta se comportó similar a QUE, aun cuando la variación de intensidad de fluorescencia ( $\Delta F_f$ ) fue mayor que para QUE, lo que indicaría que este flavonoide glicosilado tiene mayor afinidad por lipasa que QUE, como fue señalado por otros autores por medio de estudios de fluorescencia intrínseca (Li *et al.*, 2011). El mayor tamaño de RUT, por su componente glicosilado,



**Figura 3.** Efecto de flavonoides en la fluorescencia extrínseca del complejo lipasa-ANS. Se emplearon diferentes concentraciones (hasta 300  $\mu\text{M}$ ) de los flavonoides, HES Hesperetina (a), LUT Luteolina (b), QUE Quercetina (c), CAT Catequina (d), y RUT Rutina (e). La Figura interna muestra la variación en el diferencial de la intensidad de la fluorescencia corregida ( $\Delta\text{IF}_c$ , UA) frente a diferentes concentraciones del flavonoide.

**Figure 3.** Effect of flavonoids on lipase-ANS complex extrinsic fluorescence. Flavonoids employed were HES Hesperetin (a), LUT Lutein (b), QUE Quercetin (c), CAT Catechin (d), and RUT Rutin (e) at different concentrations (1 – 300  $\mu\text{M}$ ). Inset shows the change in the intensity of the corrected fluorescence ( $\Delta\text{IF}_c$ , AU) at different flavonoid concentrations.

podría impedir la unión del ANS en su sitio de la enzima, el cual podría ser el mismo sitio para el resto de los flavonoides. En un análisis de docking molecular realizado para las interacciones lipasa-ANS (datos no mostrados), se observó que el ANS podría unirse en un sitio cercano a la tríada catalítica de la enzima, y que sería el mismo que para la mayoría de los flavonoides. Esto también explicaría el menor efecto observado para CAT, mismo que coincide con su poca actividad inhibitoria. El desplazamiento hipsocrómico observado por CAT podría estar asociado también con el tipo de inhibición de este flavonoide, que expuso mayores sitios para la unión

con el ANS. La competencia por el sitio de unión con el ANS señala el componente competitivo de la inhibición mixta de los flavonoides y coincide con la inhibición acompetitiva observada para el ANS.

Los valores calculados de la  $K_{D,app}$  para RUT, QUE y LUT fueron  $96.70 \pm 1.30$ ,  $92.41 \pm 2.10$ , y  $65.40 \pm 7.30$ , respectivamente. Estos resultados indican que, en presencia de la RUT, el ANS presenta poca afinidad (valor alto de  $K_{D,app}$ ). Es decir, la RUT tiene alta afinidad por un sitio hidrofóbico en la enzima, y desplaza al ANS. Diversas interacciones no covalentes como interacciones hidrofóbicas entre flavonoides

y la lipasa pancreática han sido descritas (Li *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2015). Sin embargo, este efecto no ha sido descrito, mediante un análisis de interacciones de sitios hidrofóbicos con ANS. Este análisis es importante debido a que la lipasa cuenta con una región hidrofóbica que favorece la unión del sustrato, específicamente de las cadenas alifáticas del sustrato (Acharya y Madhusudhana, 2003), y es en esta región donde se podrían ubicar sitios de unión para los flavonoides hidrofóbicos por sus anillos aromáticos. Es decir, la unión de LUT, QUE y RUT con lipasa sería principalmente en sitios hidrofóbicos (desplazamiento del ANS). Características estructurales presentes en estos flavonoides, como el grupo oxo en el anillo C, la doble hidroxilación del anillo B (catecol), y el doble enlace C2 = C3 en el anillo C, permitirían estas uniones, en concordancia con los resultados cinéticos descritos previamente.

Por otra parte, el aumento en la intensidad de la fluorescencia del ANS en presencia de HES y CAT indicaría que el ANS tuvo mayor interacción con la proteína (Figura 4h). Probablemente, hubo una mayor exposición de regiones hidrofóbicas de la proteína para su unión con el ANS. Esto se podría deber a que la mayor flexibilidad de los anillos B y C de ambos flavonoides por la carencia del doble enlace C2 = C3, permitiría mayor movimiento sobre la superficie de la proteína, generando cambios en su estructura terciaria (Hawe *et al.*, 2008), mismos que permitirían una mayor unión del ANS. Estos resultados concuerdan con los obtenidos de inhibición incompetitiva de CAT, en donde este flavonoide tendría mayor afinidad por la enzima unida al sustrato, que en este caso sería el ANS (por su sitio de unión cercano al sitio activo). En el caso de la HES, su comportamiento se podría atribuir a dos razones; i) La mayor unión del ANS con la enzima por el movimiento del flavonoide, ii) formación de un complejo enzima-ANS en el cual el ANS emite fluorescencia debido a sus dos grupos auxocromos (amino y sulfonato) unidos a la cadena polipeptídica (Gasymov y Glasgow, 2007), junto con un segundo complejo, ANS-HES, en el que el ANS emita fluorescencia por la interacción de su grupo metoxi con estos grupos auxocromos. Se requieren otros estudios para determinar la presencia de estas interacciones entre grupos metoxi y auxocromos.

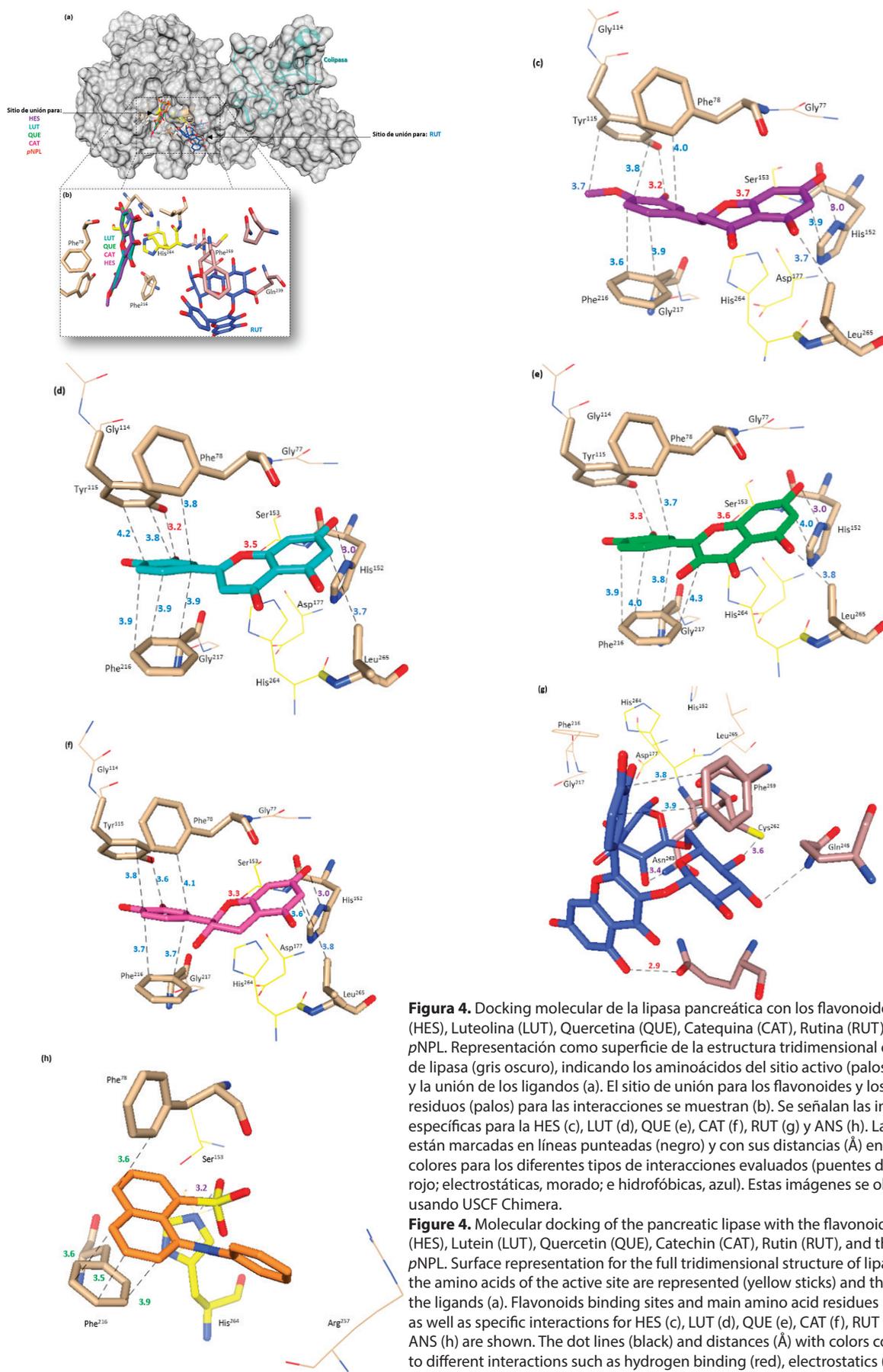
### **Análisis de las interacciones lipasa-flavonoides mediante docking molecular**

El análisis de docking predice las interacciones entre lipasa y los flavonoides y los resultados se presentan en la Figura 4. Se muestran dos posibles sitios de unión en la proteína, uno para LUT, QUE, CAT y HES, y otro para RUT (Figura 4a). Ambos sitios se encuentran en cavidades cercanas al sitio activo. El sitio para la mayoría de los flavonoides está más cercano al sitio catalítico, como ha sido descrito para la interacción de lipasa con compuestos polifenólicos como la QUE (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2017a). Adicionalmente, los autores señalaron que este sitio es el mismo para sustratos, como el pNPL, e inhibidores de la actividad de lipasa, como el Orlistat. Esto concuerda con el análisis de docking realizado para el

pNPL (Figura 4a). Mientras que el sitio para RUT, diferente al del resto de los flavonoides, se encuentra ubicado en una región comprendida entre el sitio activo y la colipasa (Zhang *et al.*, 2018). La inhibición mixta observada para la mayoría de los flavonoides, indica que los flavonoides se unen al enzima antes y después de que el sustrato esté unido (Birari *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011). El componente competitivo de esta inhibición se presenta cuando los flavonoides se unen al residuo de Ser<sup>153</sup>, que pertenece a la tríada catalítica (Kokotos, 2003). Teniendo en cuenta los resultados cinéticos, que indican que la CAT presenta una inhibición incompetitiva, a partir de los resultados del docking, se propone que la CAT sólo se podría unir al complejo enzima-sustrato, probablemente debido a que la interacción lipasa-CAT no es tan estable como la de QUE. Un comportamiento similar se observa para HES. Ambos flavonoides (HES y CAT) tienen el mismo sitio de unión que LUT y QUE, sin embargo, la falta de estructura plana en su estructura no les permite mantener los enlaces con lipasa. En el caso de la RUT, su mayor tamaño por la presencia del disacárido en posición C3, no le permite ingresar en el mismo sitio que el resto de los flavonoides (Figura 4b). La estructura plana del anillo C de LUT y QUE les permite ingresar e interactuar con los residuos de aminoácidos del sitio activo (Cerezo *et al.*, 2015). En este sentido, la mayoría de los flavonoides interactúan con el subsitio 1 (mayor actividad) de los tres sitios descritos por otros autores, y RUT con el subsitio 3, ambos hidrofóbicos (Zhang *et al.*, 2018). Se señala que el Orlistat se une a los tres subsitios e impide el ingreso del sustrato. De esta manera, se propone que el mecanismo de inhibición de la enzima por los flavonoides está regulado por la entrada del sustrato al sitio activo, siendo esta la principal diferencia con el Orlistat.

En la Tabla 2 se muestran las principales interacciones analizadas en las predicciones para la unión lipasa-flavonoides. En concordancia con resultados previos, todas las interacciones son no covalentes (He *et al.*, 2006; Birari y Bhutani, 2007; Zhang *et al.*, 2014; Martinez-Gonzalez *et al.*, 2017a). Se observaron uniones a través de fuerzas de Van der Waals con la His<sup>152</sup> para los flavonoides. Pero, la mayoría de las interacciones son hidrofóbicas debido a que ambos sitios de unión están conformados principalmente por residuos hidrofóbicos, ya que corresponden a una región empleada en la interfase para la unión con el sustrato (Miled *et al.*, 2000). Lo anterior concuerda con los estudios de fluorescencia extrínseca y con los resultados observados para la interacción con el ANS ( $\Delta G = -9.4$ , Figura 4h).

En la interacción con flavonoides, se observaron interacciones del tipo *pi*-stacking con los residuos de Phe en las posiciones 78, 216 para el primer sitio (QUE, CAT, HES, LUT, pNPL), y 259 para el sitio de RUT. La unión con los flavonoides genera un cambio conformacional en la lipasa, abriendo la estructura. La conformación abierta de la lipasa permite la entrada del sustrato (Egloff *et al.*, 1995; van Tilbeurgh *et al.*, 1999), lo que coincide con la descripción para la inhibición mixta.



**Figura 4.** Docking molecular de la lipasa pancreática con los flavonoides Hesperetina (HES), Luteolina (LUT), Quercetina (QUE), Catequina (CAT), Rutina (RUT), y el sustrato, *p*NPL. Representación como superficie de la estructura tridimensional completa de lipasa (gris oscuro), indicando los aminoácidos del sitio activo (palos amarillos) y la unión de los ligandos (a). El sitio de unión para los flavonoides y los principales residuos (palos) para las interacciones se muestran (b). Se señalan las interacciones específicas para la HES (c), LUT (d), QUE (e), CAT (f), RUT (g) y ANS (h). Las distancias están marcadas en líneas punteadas (negro) y con sus distancias (Å) en distintos colores para los diferentes tipos de interacciones evaluados (puentes de hidrógeno, rojo; electrostáticas, morado; e hidrofóbicas, azul). Estas imágenes se obtuvieron usando USCF Chimera.

**Figure 4.** Molecular docking of the pancreatic lipase with the flavonoids Hesperetin (HES), Lutein (LUT), Quercetin (QUE), Catechin (CAT), Rutin (RUT), and the substrate *p*NPL. Surface representation for the full tridimensional structure of lipase (dark gray), the amino acids of the active site are represented (yellow sticks) and the binding of the ligands (a). Flavonoids binding sites and main amino acid residues (sticks) (b), as well as specific interactions for HES (c), LUT (d), QUE (e), CAT (f), RUT (g), and the ANS (h) are shown. The dot lines (black) and distances (Å) with colors correspond to different interactions such as hydrogen binding (red), electrostatics (purple), and hydrophobic binding (blue). The images were obtained with USCF Chimera.

**Tabla 2.** Resultados de la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ , kCal mol<sup>-1</sup>), los residuos de aminoácidos presentes en la cavidad de lipasa, así como la distancia (Å) para las posibles conformaciones enzima-ligandos.

**Table 2.** Gibbs free energy values ( $\Delta G$ , kCal mol<sup>-1</sup>), amino acid residues and distances (Å) involved in the flavonoids binding with lipase.

Ligandos	Aminoácidos, distancia y energía libre de Gibbs para la interacción enzima-ligando			
	Interacción			$\Delta G$
	Fuerzas de Van der Waals	Hidrofóbica	Puentes de Hidrógeno (Å)	
HES	His <sup>152</sup> (3.0)	Tyr <sup>115</sup> (3.7; 3.8), Phe <sup>78</sup> (4.0), Phe <sup>216</sup> (3.6; 3.9; 3.9), His <sup>152</sup> (3.9), Leu <sup>265</sup> (3.7)	Tyr <sup>115</sup> (3.2), Ser <sup>153</sup> (3.7)	-9.9
LUT	His <sup>152</sup> (3.0)	Tyr <sup>115</sup> (4.2; 3.8), Phe <sup>78</sup> (3.8), Phe <sup>216</sup> (3.9; 3.9; 3.9), Leu <sup>265</sup> (3.7)	Tyr <sup>62</sup> (3.2), Ser <sup>153</sup> (3.5)	-10.0
QUE	His <sup>152</sup> (3.0)	Phe <sup>78</sup> (3.7), Phe <sup>216</sup> (3.9; 4.0; 3.8; 4.3), His <sup>152</sup> (4.0), Leu <sup>265</sup> (3.8)	Tyr <sup>115</sup> (3.3), Ser <sup>153</sup> (3.6)	-9.8
CAT	His <sup>152</sup> (3.0)	Tyr <sup>115</sup> (3.8; 3.6), Phe <sup>78</sup> (4.1), Phe <sup>216</sup> (3.7; 3.7), His <sup>152</sup> (3.6), Leu <sup>265</sup> (3.8)	Ser <sup>153</sup> (3.3)	-9.7
RUT	Asn <sup>263</sup> (3.4), Gln <sup>245</sup> (3.8), Cys <sup>262</sup> (3.6)	Phe <sup>259</sup> (3.9; 3.8)	Gln <sup>239</sup> (2.9)	-9.0

Los datos son representados como media  $\pm$  desviación estándar de los análisis realizados por triplicado. Las diferentes letras en una columna representan las diferencias significativas (Análisis de la diferencia mínima significativa de Fisher,  $p < 0.05$ ), n.d. significa no determinado. HES, Hesperetina, LUT, Luteolina, QUE, Quercetina, CAT, Catequina, RUT, Rutina.

Values are mean  $\pm$  standard deviation of triplicate analysis. Different letters in columns represent significant differences (Fisher,  $p < 0.05$ ), n.d. not determined. HES, Hesperetin, LUT, Lutein, QUE, Quercetin, CAT, Catechin, RUT, Rutin.

Sin embargo, en la Tabla 2 se indica que todos los flavonoides se podrían unir a este sitio, y entonces ¿en dónde radica la diferencia del poder inhibitorio de CAT sobre lipasa? La respuesta podría radicar en la movilidad del anillo C, que no le permite mantener interacciones hidrofóbicas entre anillos aromáticos, aunque haya proximidad del flavonoide con el sitio de unión. Se deben considerar aspectos de la estructura de la CAT, que a pesar de contar con anillos A y B similares a los de QUE, exhibió un efecto diferente al de este flavonoide. La carencia del grupo oxo en la posición 4 (anillo central, C) es un componente estructural de la CAT, el cual se podría relacionar con la carencia de interacciones estables. El 4-oxo es un grupo funcional que ha sido señalado como relevante respecto al mayor poder antioxidante de QUE en comparación con CAT (Cook y Samman, 1996; Plumb *et al.*, 1999; Heim *et al.*, 2002). Se requieren otros estudios para determinar si la responsabilidad del efecto inhibitorio de CAT (o HES) es debido a la presencia o ausencia del 4-oxo, aunado a la carencia del doble enlace y la flexibilidad, como análisis de microestados realizados por dinámica molecular (De Vivo *et al.*, 2016).

## CONCLUSIONES

Quercetina, Luteolina y Rutina fueron los mejores inhibidores de la actividad de lipasa. Al parecer, el mejor inhibidor debe poseer tres características estructurales para tener la capacidad de interactuar con lipasa: i) Doble enlace entre el C2 y el C3, ii) la estructura de catecol en el anillo B, y iii) la doble hidroxilación en el anillo A. En donde, el doble enlace que le confiere estructura plana y rigidez a la estructura es la

característica más relevante, al comparar los resultados con los de Hesperetina y Catequina.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores están agradecidos por el apoyo financiero por parte de CONACYT, México (CB-2016-01-286449). A.I.M.G. está muy agradecida por la beca de estudio de doctorado por parte de CONACYT y por el apoyo de la UACJ.

## REFERENCIAS

- Acharya, P., Madhusudhana, N. 2003. Stability Studies on a Lipase from *Bacillus subtilis* in Guanidinium Chloride. *Journal of Protein Chemistry*. 22: 51-60.
- Amat, A., Sgamellotti, A., Fantacci, S. 2008. Theoretical Study of the Structural and Electronic Properties of Luteolin and Apigenin Dyes. Berlin, Heidelberg.
- Birari, R.B., Bhutani, K.K. 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today*. 12: 879-889.
- Birari, R.B., Gupta, S., Gopi Mohan, C., Bhutani, K.K. 2011. Antiobesity and Lipid Lowering Effects of *Glycyrrhiza* Chalcones: Experimental and Computational Studies. *Phytomedicine*. 18: 795-801.
- Buchholz, T., Melzig, M.F. 2015. Polyphenolic Compounds as Pancreatic Lipase Inhibitors. *Planta Medica*. 81: 771-783.
- Calabrone, L., Larocca, M., Marzocco, S., Martelli, G., Rossano, R. 2015. Total phenols and flavonoids content, antioxidant capacity and lipase inhibition of root and leaf horseradish (*Armoracia rusticana*) extracts. *Food and Nutrition Sciences*. 6: 64-74.
- Cerezo, A.B., Winterbone, M.S., Moyle, C.W., Needs, P.W., Kroon, P.A. 2015. Molecular structure-function relationship of

- dietary polyphenols for inhibiting VEGF-induced VEGFR-2 activity molecular. *Nutrition & Food Research*. 59: 2119-2131.
- Cook, N.C., Samman, S. 1996. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 7: 66-76.
- 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.
- De Vivo, M., Masetti, M., Bottegoni, G., Cavalli, A. 2016. Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*. 59: 4035-4061.
- Egloff, M.P., Sarda, L., Verger, R., Cambillau, C., Tilbeurgh, H. 1995. Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase. *Protein Science*. 4: 44-57.
- Erlund, I. 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*. 24: 851-874.
- Gasymov, O.K., Glasgow, B.J. 2007. ANS fluorescence: Potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1774: 403-411.
- Gonzales, G., Smagghe, G., Grootaert, C., Zotti, M., Raes, K., Camp, J. 2015. Flavonoid interactions during digestion, absorption, distribution and metabolism: a sequential structure-activity/property relationship-based approach in the study of bioavailability and bioactivity. *Drug Metabolism Reviews* 47: 175-190.
- Halim, A., Zaroog, M., Kadir, H., Tayyab, S. 2017. Alcohol-induced structural transitions in the acid-denatured *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase. *Journal of Saudi Chemical Society*. 21: S349-S358.
- Harborne, J.B. 1964. Plant polyphenols—XI: The structure of acylated anthocyanins. *Phytochemistry*. 3: 151-160.
- Hawe, A., Sutter, M., Jiskoot, W. 2008. Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. *Pharmaceutical Research*. 25: 1487-1499.
- He, Q., Lv, Y., Yao, K. 2006. Effects of tea polyphenols on the activities of  $\alpha$ -amylase, pepsin, trypsin and lipase. *Food Chemistry*. 101: 1178-1182.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 13: 572-584.
- Hu, B., Cui, F.C., 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.
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Zhang, Y. 2009. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: Potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*. 62: 120.
- Kokotos, G. 2003. Inhibition of digestive lipases by 2-oxo amide triacylglycerol analogues. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 22: 255-269.
- Kuhnert, N., Dairpoosh, F., Jaiswal, R., Matei, M., Deshpande, S., Golon, A., Nour, H., Karaköse, H., Hourani, N. 2011. Hill coefficients of dietary polyphenolic enzyme inhibitors: can beneficial health effects of dietary polyphenols be explained by allosteric enzyme denaturing? *Journal of Chemical Biology*. 4: 109-116.
- Lee, J.S., Yoon, N.R., Kang, B.H., Lee, S.W., Gopalan, S.A., Jeong, H.M., Lee, S.H., Kwon, D.H., Kang, S.W. 2014. Response characterization of a fiber optic sensor array with dye-coated planar waveguide for detection of volatile organic compounds. *Sensors*. 14: 11659-11671.
- Li, Q., Wei, Q., Yuan, E., Yang, J., Ning, Z. 2014. Interaction between four flavonoids and trypsin: effect on the characteristics of trypsin and antioxidant activity of flavonoids. *International Journal of Food Science & Technology*. 49: 1063-1069.
- Li, Y.Q., Yang, P., Fei, G., 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: 63-69.
- 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  $\alpha$ -amylase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 51: 3555-3561.
- Martinez-Gonzalez, A.I., Alvarez-Parrilla, E., Díaz-Sánchez, Á.G., de la Rosa, L.A., Núñez-Gastélum, J.A., Vazquez-Flores, A.A., Gonzalez-Aguilar, G. 2017a. *In Vitro* Inhibition of pancreatic lipase by polyphenols: A kinetic, fluorescence spectroscopy and molecular docking study. *Food Technology and Biotechnology*. 55: 519-530.
- Martinez-Gonzalez, A.I., Díaz-Sánchez, Á.G., de la Rosa, L.A., Bustos-Jaimes, I., Alvarez-Parrilla, E. 2019. Inhibition of  $\alpha$ -amylase by flavonoids: Structure activity relationship (SAR). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 206: 437-447.
- Martinez-Gonzalez, A.I., Díaz-Sánchez, Á.G., Rosa, L.A., Vargas-Requena, C.L., Bustos-Jaimes, I., Alvarez-Parrilla, E. 2017b. Polyphenolic compounds and digestive enzymes: *In vitro* non-covalent interactions. *Molecules*. 22: 669.
- Miled, N., Canaan, S., Dupuis, L., Roussel, A., Rivière, M. 2000. Digestive lipases: from three-dimensional structure to physiology. *Biochimie*. 82: 973-976.
- Pace, N., Treviño, S., Prabhakaran, E., Scholtz, M. 2004. Protein structure, stability and solubility in water and other solvents. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 359: 1225-1235.
- Plumb, G.W., Price, K.R., Williamson, G. 1999. Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea. *Redox Report*. 4: 13-16.
- Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Sousa, J., Carvalho, F., Silva, A., Fernandes, P., Fernandes, E. 2017. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by flavonoids: A structure - Activity relationship study. *Food and Chemical Toxicology*. 111: 474-481.
- Rawel, H.M., Rohn, S., Kruse, H.P., Kroll, J. 2002. Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid. *Food Chemistry*. 78: 443-455.
- Ribeiro, D., Freitas, M., Lima, J.L., Fernandes, E. 2015. Proinflammatory pathways: The modulation by flavonoids. *Medicinal Research Review*. 35: 877-936.
- 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: 1011-1019.
- Tadera, K., Minami, Y., Takamatsu, K. 2006. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase by flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 52: 149-153.

- Tipton, K.F. 1996. Patterns of enzyme inhibition. En: *Enzymology Labfax*. P. C. Engel (ed.), pp. 115-171. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- van Tilbeurgh, H., Bezzine, S., Cambillau, C., Verger, R., Carrière, F. 1999. Colipase: structure and interaction with pancreatic lipase. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1441: 173-184.
- Zeng, H.J., Yang, R., Liang, H., Qu, L.B. 2015. Molecular interactions of flavonoids to pepsin: Insights from spectroscopic and molecular docking studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Biomolecular Spectros*. 151: 576-590.
- Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D.D., Tang, Y., Chen, P.X. 2015. Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry*. 172: 862-872.
- Zhang, J., Xiao, L., Yang, Y., Wang, Z., Li, G. 2014. Lignin binding to pancreatic lipase and its influence on enzymatic activity. *Food Chemistry*. 149: 99-106.
- Zhang, X., Jia, Y., Ma, Y., Cheng, G., Cai, S. 2018. Phenolic composition, antioxidant properties, and inhibition toward digestive enzymes with molecular docking Analysis of different fractions from *Prinsepia utilis* royle fruits. *Molecules*. 23: 1-21.