

Evaluación de la actividad inhibitoria de ñuatigenina, ñuatigenosido y extracto crudo de saponinas sobre la lipasa pancreática porcina. un estudio *in vitro* e *in silico*

Marcelo López, Fátima Yubero*, Ceferino Amarilla, Daniel Marecos

Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción. Campus Universitario, San Lorenzo, Departamento Central 111421, Paraguay.

* fyubero@qui.una.py

Resumen

El Orlistat es un inhibidor de la lipasa pancreática porcina (LPP) utilizada en el tratamiento antiobesidad. Esta molécula genera algunos efectos adversos lo que podría disminuirse utilizando otras alternativas como el uso de principios activos de plantas. Este estudio evaluó el efecto inhibitorio de los principios activos del ñuatí pytã (Solanum sisymbriifolium), la ñuatigenina y ñuatigenosido empleando modelos *in vitro* e *in silico* utilizando como control positivo al Orlistat. Para los estudios *in vitro* se determinó la actividad biológica en presencia de las moléculas de ñuatigenina y para un extracto crudo de saponinas con cantidad mayoritaria del ñuatigenosido, estimándose el porcentaje de inhibición, así como la afinidad de la enzima por el sustrato en presencia de la ñuatigenina mediante la constante de Michaelis aparente (K_{map}). En los estudios *in silico* se prepararon los ligandos para el “docking” o acoplamiento molecular, obteniéndose las figuras 2D que demuestran las interacciones con la enzima. Nuestros resultados indican que la LPP se inhibió por la ñuatigenina y por el extracto con ñuatigenosido no habiendo diferencias significativas con respecto al Orlistat. La K_{map} de la enzima fue mayor en relación al Orlistat para las concentraciones de 12.5 y 25 $\mu\text{g/mL}$ de ñuatigenina. Las energías libres de acoplamiento en el sitio activo para la ñuatigenina y ñuatigenosido fueron -8,0 y -9,1 kcal/mol respectivamente y menores a -7,6 kcal/mol del Orlistat lo que indica igual o mejor inhibición que el control.

Palabras Claves: Ñuatigenina –Nuatigenosido - inhibidor – Lipasa Pancreática Porcina - acoplamiento molecular

Abstract

Orlistat is a porcine pancreatic lipase (PPL) inhibitor used in anti-obesity treatment. This molecule generates some adverse effects which could be reduced by using other alternatives such as the use of active ingredients of plants. This study evaluated the inhibitory effect of the active substances of ñuatí pytã (Solanum sisymbriifolium), ñuatigenin and ñuatigenoside using *in vitro* and *in silico* models using Orlistat as a positive control. For *in vitro* studies, the biological activity was determined in the presence of the ñuatigenin molecules and for a crude extract of saponins with a majority amount of the ñuatigenoside estimating the percentage of inhibition, as well as the affinity of the enzyme for the substrate in the presence of ñuatigenin by means of the apparent Michaelis constant (K_{map}). The ligands were prepared for molecular docking, obtaining the 2D figures that demonstrate the interactions with the enzyme in *in silico* studies. Our results indicated that LPP was inhibited by ñuatigenin and by the extract with ñuatigenosido there were no significant differences with respect to Orlistat. The K_{Map} of the enzyme was higher in relation to Orlistat for concentrations of 12.5 and 25 $\mu\text{g/mL}$ of ñuatigenin. The free docking energies at the active site for ñuatigenin and ñuatigenoside were -8.0 and -9.1 kcal/mol respectively and less than -7.6 kcal/mol of Orlistat indicating the equal or better inhibition than control.

Key words: Nuatigenin -Nuatigenoside - inhibitor – Porcine pancreatic lipase- molecular docking

Introducción

La obesidad es un problema de salud mundial siendo factor de riesgo para muchas enfermedades como la hipertensión, la diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Luo et al., 2019) (Khedidja et al., 2018) (Wang et al., 2020) (Nguyen et al., 2020). Un enfoque aceptado para el tratamiento de personas obesas es la disminución de la digestión y absorción de triglicéridos a través de la inhibición de la lipasa pancreática. Esta enzima es encargada de hidrolizar entre el 50-70% de los triglicéridos, por lo tanto, un compuesto que la inhiba sería un prometedor medicamento. El único medicamento inhibidor de lipasa aprobado actualmente por la FDA es el Orlistat que presenta efectos secundarios como intolerancia gastrointestinal, incontinencia fecal, esteatorrea, nefrotoxicidad y otros (Noor et al., 2019) (Luo et al., 2019) (Wang et al., 2020) (Nguyen et al., 2020) (Wijaya & Subandi, 2020) (Marrelli et al., 2021). El Orlistat cuya estructura puede apreciarse en la Figura 1, presenta actividad inhibitoria debido al anillo β -lactónico que posee en su estructura; cuando éste se rompe la inhibición cesa (Nguyen et al., 2020) (Wijaya & Subandi, 2020).

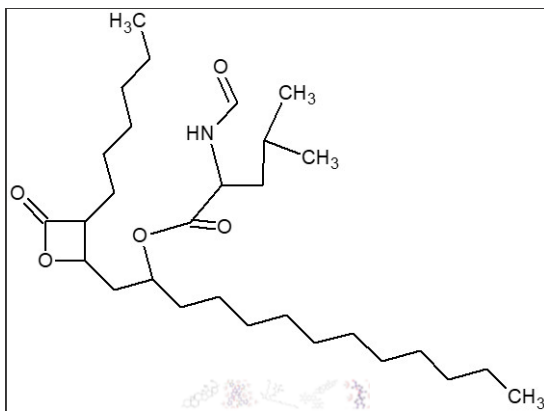


Figura 1. Estructura del medicamento inhibidor de la lipasa pancreática: Orlistat

El ñuati pytá (*Solanum sisymbriifolium*), una planta de origen ancestral del centro sur de América Latina se ha empleado como hipotensor, diurético y antiinflamatorio (Degen de Arrúa et al., 2014) (Fogel et al., 2016). De acuerdo con la literatura científica acerca de las propiedades farmacológicas de los

principios activos de este vegetal se han realizado ensayos *in vivo* donde se ha probado el efecto hipotensor empleando el extracto crudo de ñuati pytá (*Solanum sisymbriifolium*) y el Ñuatigenósido, un metabolito secundario extraído de la misma planta, observándose resultados positivos (Ibarrola et al., 1996 y 2011). El ñuatigenin-3-O-beta-solatriose o Ñuatigenósido es una molécula cuya estructura fue determinada mediante técnicas espectroscópicas y puede apreciarse en la Figura 2 (Ferro et al., 2005).

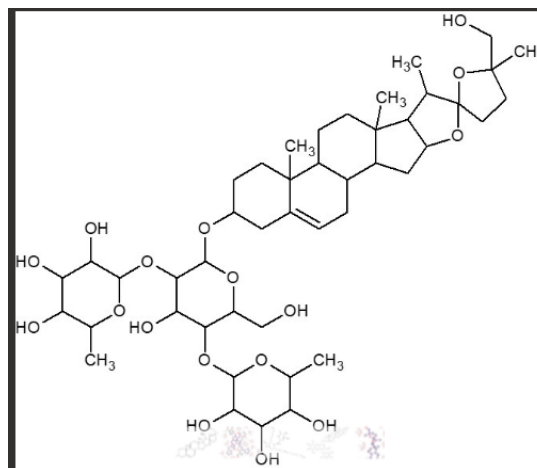


Figura 2. Estructura del ñuatigenin-3-O-beta-solatriose o Ñuatigenósido

Estructuralmente el Ñuatigenósido es una saponina esteroidea. Las saponinas son glicósidos formados por una aglicona de origen esteroidea o terpénica acompañadas de azúcares, estas características estructurales permiten que presente diversas funciones fisiológicas y farmacológicas (Puentes et al., 2009). La porción aglicona del ñuatigenósido, es denominada ñuatigenina y su estructura puede observarse en la Figura 3.

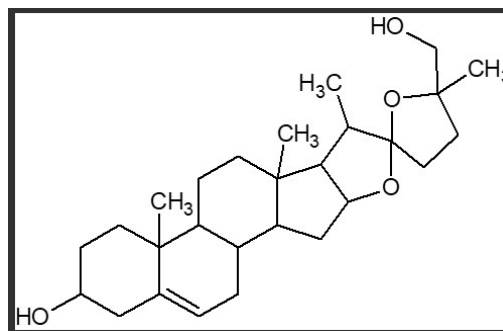


Figura 3. Estructura de la ñuatigenina, porción aglicona del ñuatigenósido

Se han descrito ensayos de inhibición mediante simulación computacional empleando terpenos como inhibidor y lipasa pancreática porcina como molécula objetivo, el inhibidor interactúa con los residuos de arginina e isoleucina mediante interacciones de tipo hidrofóbicas y del tipo electrostático por medio del grupo carboxilato presente en los terpenos empleados (Martínez et al., 2020). De igual manera Marrelli et al. (2016) en su revisión del efecto de saponinas sobre el metabolismo de lípidos mencionan que las saponinas son un grupo de moléculas con potencial inhibitorio sobre la lipasa pancreática, y que así, ejercerían su efecto terapéutico en el tratamiento de la obesidad.

Se han realizado pruebas *in vitro* con extractos obtenidos de vegetales tales como, Aloe vera, *Syzygium aromaticum*, *Cudrania tricuspidata*, *Araucaria angustifolia*, *Camellia sinensis*, *Cosmos caudatus*, tilacoides vegetales entre otros, con el propósito de conocer el tipo de interacción que estos presentan en presencia de la lipasa pancreática porcina. Se pudo observar una modificación de los parámetros cinéticos y se evidenció los efectos de inhibición enzimática entre los extractos testeados y la enzima lipasa pancreática porcina (Rojas et al., 2019).

Los ensayos *in silico* han abierto las puertas a investigaciones más rápidas y menos costosas puesto que se realizan pruebas preliminares para determinar los tipos de interacciones presentes entre la enzima o blanco molecular y moléculas conocidas (Álvarez, 2000). En este sentido se han descrito ensayos de inhibición mediante “*docking*” o acoplamiento molecular empleando distintas moléculas presentes en vegetales. Existen reportes previos de ensayos *in silico* de que las saponinas aisladas de las plantas medicinales tendrían efecto inhibitorio sobre la lipasa pancreática, y que podrían empleárselas como terapéutica natural en el tratamiento de la obesidad (Valdelamar et al., 2007; Subandi et al., 2019).

Kumar & Chauhan (2021) enlistaron los residuos de aminoácidos que son vitales en el funcionamiento de las lipasas pancreáticas, y mencionan que, si existe interés en hallar posibles inhibidores de la actividad enzimática, éstos deberían generar

interacciones intermoleculares con alguno de los siguientes residuos de aminoácidos; como los de la triada catalítica del sitio activo: Serina 153 (Ser153), Aspartato 177 (Asp177) e Histidina 264 (His264), y los residuos que hacen parte del bolsillo hidrofóbico: Fenilalanina 78 (Phe78), Isoleucina 210 (Ile210), Prolina 181 (Pro181), Tirosina 115 (Tyr115) y Fenilalanina 216 (Phe216).

Por los efectos adversos referidos al Orlistat, y el problema de salud mundial que constituye la obesidad, es necesaria la búsqueda de alternativas al Orlistat que presenten menos efectos adversos y sean accesibles para la población en general. Las plantas medicinales constituyen una fuente importante de moléculas con posibles efectos terapéuticos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio de dos moléculas derivadas del ñuati pytã (*Solanum sisymbriifolium*), la ñuatigenina y el ñuatigenósido sobre la actividad biológica de la lipasa pancreática porcina empleando un modelo *in vitro* e *in silico*.

Materiales y Métodos

Las determinaciones experimentales se llevaron a cabo en el Departamento de Físicoquímica. Los extractos de ñuatigenina y crudo de las saponinas fueron obtenidos de acuerdo con la metodología propuesta por Ferro, et al. (2005). Los estudios *in vitro* de inhibición de la lipasa fueron realizados mediante la técnica colorimétrica descrita por Dalar & Konczak, (2013) por el cual se emplea paranitrofenol butirato como sustrato en presencia de lipasa pancreática porcina (LPP) generándose un producto coloreado de paranitrofenol que se lee en espectrofotómetro, a 400nm. Para este estudio, la curva patrón fue realizada con paranitrofenol y todas las mediciones fueron realizadas por triplicado. Se emplearon concentraciones de 5, 12.5 y 25 µg/mL de ñuatigenina y crudo de saponinas y orlistat como control positivo como inhibidores de la LPP. Esta enzima presenta 88% de similitud con la lipasa pancreática humana (LPH) (Martínez, et al. 2017). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se utilizaron concentraciones mínimas de las sustancias químicas necesarias para la

realización de la metodología propuesta, de tal forma a minimizar los residuos, los cuales se desecharon en los contenedores correspondientes de acuerdo con el reglamento interno de los laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas con respecto a gestión de residuos. Los datos obtenidos fueron analizados por medio de análisis de varianza (ANOVA) utilizando herramientas informáticas en Microsoft Excel 2019.

Para los ensayos *in silico* se siguieron los siguientes pasos:

1. Obtención y preparación de ligandos y receptores

Se obtuvo la estructura bidimensional (2D) del Orlistat y de la Ñuatigenina, obteniéndolos desde la base de datos PubChem del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) de los Estados Unidos (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Estos fueron convertidos a estructuras tridimensionales utilizando el software Avogadro versión 1.2.0 (Hanwell et al., 2012).

El Ñuatigenósido (Nuatigenin-3-O- β -Chacotriosa) fue modelado dentro del mismo software a partir de la Ñuatigenina y de la Pennogenina-3-O- β -Chacotriosa, también descargado de *PubChem*. El Ñuatigenósido modelado y todos los demás ligandos fueron optimizados a la geometría de mínima energía por el algoritmo de mecánica molecular MMFF94 (Halgren, et al., 1996) hasta cien pasos utilizando el software Avogadro.

La estructura tridimensional (3D) de la lipasa pancreática porcina (PDB ID: 1ETH) obtenida por Cristalografía de Difracción de Rayos X con una resolución de 2,46 Å (Hermoso et al., 1996) fue descargada desde el banco de datos de proteínas del Laboratorio de Investigación para Bioinformática Estructural (RCSB) (<https://www.rcsb.org/>). Utilizando el visualizador UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004) se eliminaron las moléculas de agua, restos de solvente y otras moléculas co-cristalizadas, dejando solo la proteína de interés (Anigboro et al., 2021). Tanto los ligandos como las moléculas objetivo se convirtieron a archivos PDBQT, para correr los ensayos de docking molecular vía Autodock Vina.

Ensayo de Docking Molecular

Se realizó el “docking” entre 1ETH y los ligandos Orlistat (como control positivo), Nuatigenin-3-O- β -Chacotriosa, conocido como Ñuatigenósido y Ñuatigenina. Se realizó docking ciego con el centro de la caja en x: 64.0; y: 31.0 y z: 120.0 y tamaño x: 70.0; y: 71.0 y z: 80.0 con espaciado de 1 Å.

El propósito de realizar un docking ciego fue observar los distintos sitios de unión más estables ligando-proteína además del sitio activo (Anigboro et al., 2021). Se utilizó el Visualizador UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004) para llevar a cabo el docking mediante Autodock Vina (Trott & Olson, 2009) a la exhaustividad de 8. Se realizaron 30 iteraciones para cada ligando, obteniendo las tres conformaciones más estables en orden descendente en cada iteración (Chaturvedi & Gupta, 2021).

Obtención de figuras 2D de las interacciones intermoleculares

Para la obtención de las figuras 2D que muestran las interacciones intermoleculares resultantes del docking primeramente se generó un archivo .pdb único ligando-lipasa para cada tipo de ligando y luego éste se cargó a la interfase LigPlot+, donde se resaltan las interacciones hidrofóbicas y tipo puentes de hidrógeno si hubiere (Wallace et al., 1995).

Otras herramientas computacionales complementarias

Mediante el predictor web <http://www.way2drug.com/ra/> se calculó la probabilidad de que el ñuatigenósido sufra reacción de hidrólisis, liberándose así a la sapogenina. Además, de manera a complementar los resultados del *docking* molecular, se emplearon los predictores de actividad biológica: <https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties> y <http://www.way2drug.com/passonline/predict.php> para evaluar si los ligandos ensayados tenían posible actividad inhibitoria enzimática

y actividad hipolipémica respectivamente (Duvaud et al., 2021; Rudik et al., 2015).

Resultados

Las determinaciones experimentales in vitro del efecto que producían los extractos de Ñuatigenina y el crudo de saponinas utilizando

como control positivo Orlistat sobre la LPP indicaron que los extractos inhibieron a la enzima. Los datos del porcentaje de concentraciones inhibitorias de la enzima en presencia de los inhibidores fueron representados como media \pm desviación estándar del análisis realizado por triplicado representados en la Tabla 1.

Tabla 1. Porcentajes de inhibición de LPP para las concentraciones de 5, 12.5 y 25 $\mu\text{g/mL}$ del inhibidor y concentraciones de sustrato variable ANOVA $p < 0.05$.

Inhibidor	Sustrato ($\mu\text{g/mL}$)	% de Inhibición (I) (5 $\mu\text{g/mL}$)	% de Inhibición (I) (12.5 $\mu\text{g/mL}$)	% de Inhibición (I) (25 $\mu\text{g/mL}$)
Orlistat	20	72,7 \pm 0,96	88,23 \pm 0,92	98,58 \pm 0,44
	25	58,92 \pm 0,75	66,66 \pm 0,74	94,80 \pm 0,63
	30	66,91 \pm 0,60	70,91 \pm 0,58	92,23 \pm 0,41
	40	71,03 \pm 0,24	76,87 \pm 0,36	93,17 \pm 0,31
	50	73,96 \pm 0,20	77,22 \pm 0,29	89,30 \pm 0,34
Ñuatigenina	20	59,51 \pm 1,17	68,82 \pm 1,17	95,99 \pm 0,91
	25	59,54 \pm 1,21	65,65 \pm 0,53	86,44 \pm 0,89
	30	64,84 \pm 0,23	70,32 \pm 0,83	85,56 \pm 0,81
	40	75,93 \pm 0,29	78,66 \pm 0,74	87,71 \pm 0,55
	50	76,02 \pm 0,18	79,68 \pm 0,65	87,79 \pm 0,34
Extracto crudo de saponinas	20	57,44 \pm 1,01	72,19 \pm 0,32	87,19 \pm 1,56
	25	56,27 \pm 1,09	64,42 \pm 0,89	80,33 \pm 0,90
	30	64,69 \pm 0,30	67,65 \pm 1,25	82,61 \pm 0,67
	40	72,54 \pm 0,88	73,95 \pm 0,47	85,07 \pm 0,44
	50	71,41 \pm 0,90	75,39 \pm 0,12	83,26 \pm 0,53

Según lo reportado por Kumar & Chauhan, (2021), las saponinas son los fitoconstituyentes mayoritarios conocidos como inhibidores de las lipasas de origen bacteriano *Bacillus* spp. Las saponinas extraídas de *Solanum sisymbriifolium* representarían al tercer grupo de saponinas extraídas de raíces. Para el Análisis de la varianza de un factor (ANOVA, $p < 0.05$), no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición para el Orlistat, la ñuatigenina y el crudo de saponinas para las concentraciones de 5; 12.5 y 25 $\mu\text{g/mL}$ de los inhibidores evaluados y concentraciones de sustrato variable.

De acuerdo con lo reportado por Candela et al. (2021) el Orlistat presenta un mecanismo de inhibición del tipo competitivo. En este estudio cinético, si bien se pudo comprobar la actividad inhibitoria del crudo de saponinas, no pudo calcularse un parámetro cinético directo de la constante aparente de *Michaelis* (K_{MAP}) por no poseer este crudo de saponinas una sola molécula pura responsable de la inhibición (Markus et al.; 1976). Sin embargo, pudieron calcularse las constantes aparentes para la ñuatigenina, obtenida en estado puro (Ferro, et al, 2005) que se presentan en la **Tabla 2.**

Los valores de K_{Map} obtenidos *in vitro* indican la disminución de la afinidad existente entre el complejo enzima-sustrato y la mayor afinidad por los inhibidores.

En la revisión de la literatura se pudo observar que los valores de K_{Map} para la concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ de inhibidor Ñuatigenina y Orlistat fueron mayores con respecto a los valores indicados por Glisan *et al.* (2017) (Tabla 2). De igual manera la K_{Map}

para la Ñuatigenina aumentó en función a la concentración del inhibidor superando a los valores de K_{Map} para el Orlistat y Ñuatigenina lo que indica una menor afinidad de la enzima por el sustrato. Para la concentración de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de inhibidor la afinidad por el sustrato disminuye al comparar los valores de K_{Map} en presencia de la Ñuatigenina en relación al Orlistat (Markus *et al.*, 1976; Kumar & Chauhan (2021)) tal y como se observa en la **Tabla 2.**

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la LPP en presencia de los inhibidores Orlistat y Ñuatigenina

Inhibidor	5 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$
	K_{Map} μM	K_{Map} μM
Orlistat	230	167
Ñuatigenina	178	408

Al considerar que el ñuatigenósido es una de las principales saponinas constituyentes del extracto crudo (Ibarrola *et al.*, 2011), y al tratarse de un glicósido formado por una aglicona de origen esterooidal, se calculó mediante el predictor web <http://www.way2drug.com/ra/>, la probabilidad de que la saponina sufra reacción de hidrólisis, hallándose que aproximadamente un 40% de la saponina estaría hidrolizada, liberando así al glicósido y a la ñuatigenina, siendo esta última la porción aglicona del ñuatigenósido. Es por ello que para los ensayos *in silico* de docking molecular se consideraron como ligandos a la ñuatigenina cuya estructura fue importada desde la base de datos moleculares *Pubchem* y el ñuatigenósido, este último al no encontrarse en *Pubchem* fue modelado empleando el software *Avogadro* usando como referencia la estructura presentada por Ibarrola DA. *et al.*, 2011, y como objetivo a la lipasa pancreática porcina (ID-PDB 1ETH) que posee un 88 % de similitud en secuencias de residuos de aminoácidos con la lipasa pancreática humana (ID-PDB 1LPB).

Con base a los resultados de docking molecular de la **Tabla 3** se aprecia que las

energías libres de acoplamiento en el sitio activo para la Ñuatigenina y Ñuatigenósido fueron respectivamente -8,0 y -9,1 kcal/mol, menores a -7,6 kcal/mol del Orlistat, y así también las constantes de disociación de Ñuatigenina y Ñuatigenósido fueron $1,37 \cdot 10^{-6}$ y $0,15 \cdot 10^{-6}$ respectivamente y menores respecto a $2,69 \cdot 10^{-6}$ de Orlistat, apoyando la hipótesis de que ambos serían igual o mejores inhibidores que el control positivo Orlistat. Cabe mencionar que los ensayos *in silico* muestran además un acoplamiento de -9,3 kcal/mol del ñuatigenósido en una región diferente al sitio activo de la lipasa, y que podría ofrecer un efecto sinérgico en la inhibición, pues la región a la cual se hace mención es el lugar en donde la colipasa se asocia de manera no covalente con la lipasa, esta asociación resulta crucial para que el par lipasa-colipasa lleve a cabo la actividad hidrolítica de los lípidos, por lo que interfiriendo esta asociación se podría estar ejerciendo un efecto de inhibición de tipo no competitiva sobre la actividad enzimática.

De acuerdo con la eficiencia del ligando, que es un parámetro que relaciona la energía libre de acoplamiento con el tamaño de los ligandos ensayados y proporciona una idea de

Artículos

Tabla 3. Resultados del docking molecular

Ligandos ensayados y sus referencias según figuras	Parámetros resultantes del docking molecular con Lipasa Pancreática Porcina ID-PDB 1ETH						
	Energía libre de acoplamiento	Constante de Disociación	Eficiencia de acoplamiento del ligando	Interacciones intermoleculares obtenidas por LigPlot			
	ΔG Kcal.mol ⁻¹	Kd 10 ⁻⁶	EL Kcal.mol ⁻¹	Puentes de Hidrógeno			
				Nº	Residuo		
Orlistat (en el sitio activo)	-7,6 Fig. 4 (en el sitio activo)	2,69	-0,217	3	Gly77 His152 Ser153	1 4	Phe78
							Ile79
							Asp80
							Arg112
							Thr113
							Tyr115
							Ala179
							Pro181
							Phe216
							Ile210
							Arg257
Val260							
His264							
Leu265							
Ñuatigenina (en el sitio activo)	-8,0 Fig. 5 (en el sitio activo)	1,37	-0,258	-	-	1 0	Val21
							Arg23
							Gln22
							Pro24
							Phe78
							Tyr115
							Pro181
							Cys182
							Ile210
							Phe216
							Pro236
Ñuatigenósido (en el sitio de unión a colipasa)	-9,3 Fig. 7 (en el sitio de unión a colipasa)	0,15	-0,150	5	Thr330 Arg338 Asp388 Asp390 Tyr370	9	Asp332
							Asn329
							Phe387
							Arg368
							Glu371
							Leu357
							Gln369
							Tyr404
							Ile79
							Asp80
							Tyr115
His152							
Ser153							
Pro181							
Ile210							
Ile211							
Trp253							
Phe216							
Thr256							
Arg257							
Val260							
His264							
Leu265							
Ñuatigenósido (en el sitio activo)	-9,1 Fig. 6 (en el sitio activo)	0,18	-0,148	1	Phe78	1 5	Ile79
							Asp80
							Tyr115
							His152
							Ser153
							Pro181
							Ile210
							Ile211
							Trp253
							Phe216
							Thr256
Arg257							
Val260							
His264							
Leu265							

la cantidad de energía libre por átomo de ligando sin considerar a los hidrógenos, el orden de menor a mayor eficiencia de ligando fue el siguiente: ñuatigenósido < Orlistat < ñuatigenina.

Complementariamente, mediante la herramienta Quimioinformática: <https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>,

se calculó la probabilidad de que los ligandos ensayados sean posibles inhibidores enzimáticos, hallándose probabilidades que se muestran en la **Tabla 4** de -2,68 y +0,72 para Ñuatigenósido y Ñuatigenina respectivamente, que si lo comparamos con la eficiencia de ligando de uno y otro están en concordancia a lo calculado.

Si bien los ensayos *in silico* no lograron demostrar una interacción entre ñuatigenina y ñuatigenósido con alguno de los residuos de aminoácidos de la triada catalítica, como si puede apreciarse en la **Figura 4** un puente de hidrógeno entre Orlistat y Ser153, por el contrario en las **Figuras 5 y 6** se observan interacciones de Ñuatigenina y respectivamente, con residuos citados más arriba que hacen parte del bolsillo hidrofóbico y que son la razón de las energías libres de acoplamiento bastantes favorables hallados mediante ensayos de docking molecular empleando Autodock Vina. Respecto a la **Figura 7**, que muestra el acoplamiento entre ñuatigenósido y lipasa en la región de asociación entre lipasa-colipasa, habría que investigar que residuos de aminoácidos son importantes para que se dé dicha asociación, si en la lista de estos aminoácidos están algunos de los 5 y/o los 9 residuos que corresponden a los puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas respectivamente, que se hallaron en el acoplamiento ñuatigenósido-lipasa en la región diferente al sitio activo.

Finalmente mediante el predictor <http://www.way2drug.com/passonline/predict.php> basado en QSAR (de las siglas en inglés *Quantitative Structure Activity Relationship*) se calculó las probabilidades entre una serie de actividades biológicas de los ligandos ensayados, encontrándose que tanto

Ñuatigenina y Ñuatigenósido presentan una probabilidad positiva y relativamente elevada (> 0,9) de actuar como posibles ligandos con actividad hipolipémica, dichos resultados se presentan en la **Tabla 4**.

La inhibición enzimática hallada podría deberse a interacciones de tipo hidrofóbicas entre la enzima y las saponinas en porciones específicas de la enzima, lo que pudo

corroborarse mediante ensayos de docking molecular entre la enzima, el sustrato e inhibidor. Así también no existió diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones inhibitorias de 5, 12.5 y 25 ug/ml, consideradas en este estudio.

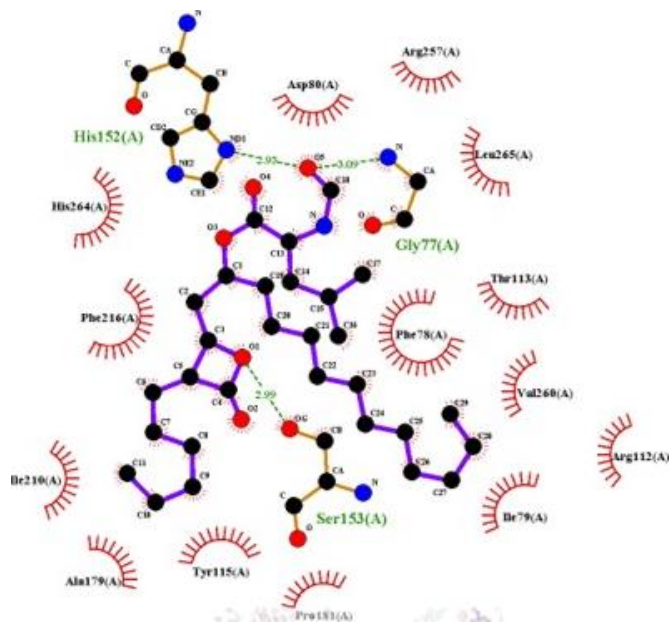


Figura 4. Puente de hidrógeno entre Orlistat y Ser153

Conclusión

La Ñuatigenina y un extracto crudo de saponinas conteniendo mayoritariamente ñuatigenósido inhibieron la lipasa pancreática porcina (LPP) empleando al Orlistat como control positivo. El análisis estadístico de los datos demostró que no existió diferencia estadísticamente significativa para los grupos control e inhibidores bajo nuestras condiciones de ensayo ($p \geq 0,05$).

La constante aparente de Michaelis (K_{Map}) fue mayor con la molécula de Ñuatigenina con relación al Orlistat lo que indica una menor afinidad de la LPP por el sustrato para una concentración de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de Ñuatigenina. El ensayo *in silico* de docking molecular entre LPP y el Ñuatigenósido y su correspondiente porción aglicona, la Ñuatigenina, tuvieron energías libres de acoplamiento menores respecto al Orlistat, lo que indica que la inhibición ejercida por el Ñuatigenósido y la

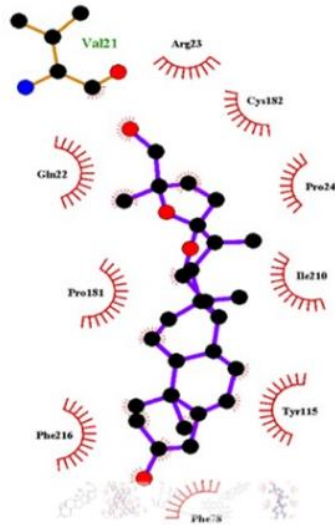


Figura 5. Interacción de la Ñuatigenina con residuos del sitio catalítico de la enzima

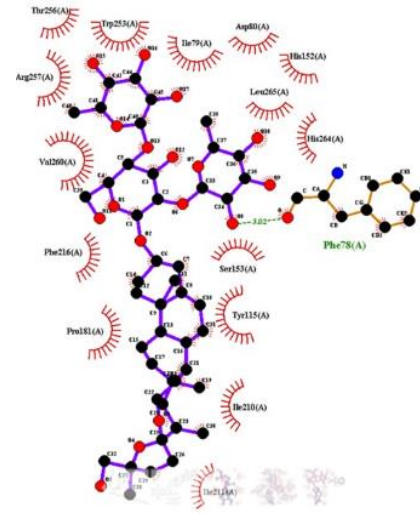


Figura 6. Interacción del Ñuatigenósido con residuos del sitio catalítico de la enzima

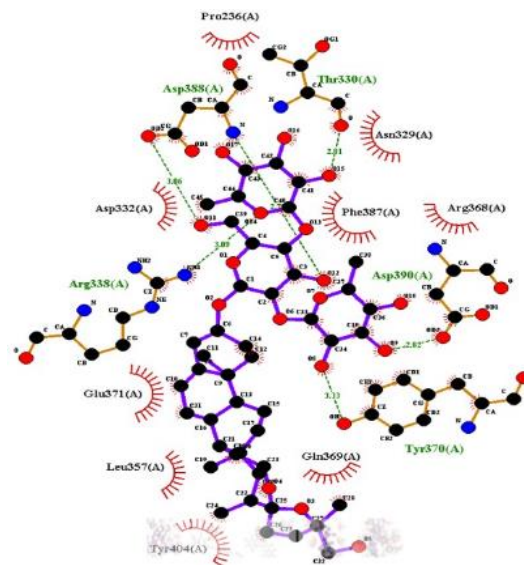


Figura 7. Acoplamiento entre ñuatigenósido y lipasa en la región de asociación entre lipasa-colipasa

Ñuatigenina sobre la LPP estaría mayormente favorecida, en términos termodinámicos.

En cuanto al modo molecular de los acoplamientos, todos los ensayos *in silico* se corrieron como docking ciego abarcando la caja de acoplamiento a la totalidad de la LPP lo que permitió hallar dos sitios de acoplamiento principales entre el

ñuatigenósido y la enzima, uno de ellos en el sitio activo y el otro en el sitio de interacción entre la lipasa y la colipasa, este último, clave para el funcionamiento normal de la actividad catalítica, mientras que la ñuatigenina se acopló a la enzima a través interacciones intermoleculares de tipo hidrofóbicas con residuos de aminoácidos adyacentes al sitio activo. Finalmente se corroboró mediante

ensayos *in vitro* e *in silico* el efecto inhibitorio sobre LPP del extracto crudo de saponinas, Ñuatigenósido y Ñuatigenina extraídas de *Solanum sisymbriifolium*, conocida en la lengua guaraní como ñuatí pytã.

Referencias

Álvarez V. Tratamiento farmacológico de la obesidad | Endocrinología y Nutrición. Rev Méd Clín Las Condes [Internet] 2000 [consultado 17 de abril del 2021]; 47(1): p.173-179. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es/revista-revista-medica-clinica-las-condes/202-articulo-tratamiento-farmacologico-obesidad-S071686401270295X>

Anigboro, A. A., Avwioroko, O. J., Akeghware, O., & Tonukari, N. J. (2021). Anti-obesity, antioxidant and *in silico* evaluation of Justicia carnea bioactive compounds as potential inhibitors of an enzyme linked with obesity: Insights from kinetics, semi-empirical quantum mechanics and molecular docking analysis. *Biophysical Chemistry*, 274, 106607. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106607>

Candela, M.F.; Arenas, N.E; Caicedo, O.; Malagón, A. Inhibition of Lipase by Orlistat: Kinetics Combined with *In Silico* Approaches to Visualize Interactions. *J. Chem. Education*. 2021, 98, 1792-1767. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.jchemed.0c0184>

Chaturvedi, S., & Gupta, P. (2021). Functional components in extracts of *Beta vulgaris* (Chukandar) parts for antioxidant effect and antiobesity potential with lipase inhibition. *Food Bioscience*, 41, 100983. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100983>

Dalar A., & Konczak I. Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from Eastern Anatolia. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2013 [consultado 15 de julio del 2021]; 44:383–390. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669012006267>

Degen de Arrúa R., & González Y. Plants used as anti-inflammatory in Paraguayan folk medicine. *Bol Latinoam y del Caribe Plantas*

Med y Aromat [Internet] 2014 [consultado 16 de abril del 2021]; 13(3): p.213–231.

Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/27321444_Plants_used_as_antiinflammatory_in_Paraguayan_folk_medicine

Ferro EA, Alvarenga NL, Ibarrola DA, Hellión-Ibarrola MC, Ravelo AG. A new steroidal saponin from *Solanum sisymbriifolium* roots. *Fitoterapia* [Internet]. 2005 [consultado 17 de julio del 2021];76(6): 577–579. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15990250/>

Fogel R, Céspedes C, López L, Valdez S, Soria N, Schmeda G. (2016). Propiedades medicinales de plantas, conocimiento tradicional y patentes [Internet]. Asunción: AGR S.A.; 2016 [consultado 27 de julio del 2021]. Disponible en: <http://dspace.conacyt.gov.py>

Glisan, S.L.; Grove, K.A ; Yenawar, N.H. & Lambert, J.D. Inhibition of Pancreatic Lipase by Black Tea Theaflavins: Comparative Enzymology and *In silico* Modeling Studies Neela H. Yennawarb; Lamberta J.D. *Food Chem*. 2017 February 01; 216: 296–300. doi:10.1016/j.foodchem.2016.08.052.20

Halgren, T. A. (1996). Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational chemistry*, 30

Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>

Hermoso, J., Pignol, D., Kerfelec, B., Crenon, I., Chapus, C., & Fontecilla-Camps, J. C. (1996). Lipase Activation by Nonionic Detergents. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30), 18007-18016.

<https://doi.org/10.1074/jbc.271.30.18007>

Ibarrola DA, Hellión-Ibarrola MC, Montalbetti Y, Heinichen O, Campuzano MA, Kennedy ML, et al. Antihypertensive effect of nuatigenin-3-O- β -chacotriose from *Solanum sisymbriifolium* Lam. (Solanaceae) (ñuatí pytã) in experimentally hypertensive (ARH +

DOCA) rats under chronic administration. *Phytomedicine* [Internet]. (2011) [consultado 28 de julio del 2021]; 18(8–9): p.634–640. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21353509/>

Ibarrola DA, Ibarrola MH, Vera C, Montalbetti Y, Ferro EA. Hypotensive effect of crude root extract of *Solanum sisymbriifolium* (Solanaceae) in normo- and hypertensive rats. *J Ethnopharmacol* [Internet]. (1996) [consultado 15 de abril de 2021]; 54(1): p.7–12. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874196014420>

Kumar, A., & Chauhan, S. (2021). Pancreatic lipase inhibitors: The road voyaged and successes. *Life Sciences*, 271, 119115. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119115>

Luo, S., Gill, H., Dias, D. A., Li, M., Hung, A., Nguyen, L. T., & Lenon, G. B. (2019). The inhibitory effects of an eight-herb formula (RCM-107) on pancreatic lipase: Enzymatic, HPTLC profiling and in silico approaches. *Heliyon*, 5(9), e02453. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02453>

Markus M.; Hess, B.; Ottaway, J.H.; Cornish-Bowden, A. (1976). The analysis of kinetic data in biochemistry a critical evaluation of methods. *FEBS Lett.* 63 (2): 225-230.

Marrelli, M., Conforti, F., Araniti, F., & Statti, G. A. (2016). Effects of Saponins on Lipid Metabolism: A Review of Potential Health Benefits in the Treatment of Obesity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(10), 1404. <https://doi.org/10.3390/molecules21101404>

Marrelli, M., Grande, F., Occhiuzzi, M. A., Maione, F., Mascolo, N., & Conforti, F. (2021). Cryptotanshinone and tanshinone IIA from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen) as a new class of potential pancreatic lipase inhibitors. *Natural Product Research*, 35(5), 863-866. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.160737>

Martínez AI, Álvarez E, Díaz ÁG, De la Rosa LA, Núñez JA, Vázquez AA, et al. In vitro inhibition of pancreatic lipase by polyphenols: A kinetic, Fluorescence spectroscopy and molecular docking study. *Food Technol*

Biotechnol [Internet] 2017 [consultado 23 de abril del 2021] 55(4): p.519–530. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29540986/>

Martínez AI, Díaz ÁG, De la Rosa LA, Bustos I, Vázquez AA, Alvarez E. Inhibición de lipasa pancreática por flavonoides: importancia del doble enlace C2=C3 y la estructura plana del anillo C. *Biocencia* [Internet] 2020 [consultado 14 de abril del 2021]; 22(2): p.50–60. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=arttext&pid=S166514562020000200050&ln=es&nrm=iso>

Nguyen, P. T. V., Huynh, H. A., Truong, D. V., Tran, T.-D., & Vo, C.-V. T. (2020). Exploring Aurone Derivatives as Potential Human Pancreatic Lipase Inhibitors through Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulations. *Molecules*, 25(20), 4657. <https://doi.org/10.3390/molecules25204657>

Noor, Z. I., Ahmed, D., Rehman, H. M., Qamar, M. T., Froeyen, M., Ahmad, S., & Mirza, M. U. (2019). In Vitro Antidiabetic, Anti-Obesity and Antioxidant Analysis of *Ocimum basilicum* Aerial Biomass and in Silico Molecular Docking Simulations with Alpha-Amylase and Lipase Enzymes. *Biology*, 8(4), 92. <https://doi.org/10.3390/biology8040092>

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>

Díaz Puentes, L.N. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. *RET Rev Estud Transdiscipl* [Internet]. 2009 [consultado 18 de julio del 2021]; 1(2):32–55. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=17924945004>

Rojas BK, Castillo MA, Moscoso JM. Inhibidores de la lipasa pancreática como alternativa de tratamiento frente a la obesidad. *Rev Med e Investig UAEMéx* [Internet]. 2019 [consultado 25 de julio del 2021]; 7(2): 23–30.

Artículos

Disponible en:

<https://rmi.diauaemex.com/index.php/numeros/ano-2019/julio-diciembre-2019/187/inhibidores-de-la-lipasa-pancreatica-como-alternativa-de-tratamiento-frente-a-la-obesidad#:~:text=La%20inhibici%C3%B3n%20de%20la%20LP,posterior%20almacenamiento%20en%20el%20organismo.>

Rudik A., Dmitriev A., Lagunin A., Filimonov D., Poroikov V. (2015). SOMP: web-service for in silico prediction of sites of metabolism for drug-like compounds. *Bioinformatics*, 31 (12), 2046-2048.

Séverine Duvaud, Chiara Gabella, Frédérique Lisacek, Heinz Stockinger, Vassilios Ioannidis, Christine Durinx; ExPasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users Nucleic Acids Research, 2021. DOI: [10.1093/nar/gks225](https://doi.org/10.1093/nar/gks225)

Subandi, S., Zakiyaturroddiyah, L. & Brotosudarmo, T.. (2019). Saponin from

purple eggplant (*Solanum melongena* L.) and their activity as pancreatic lipase inhibitor. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 509. 012139. 10.1088/1757-899X/509/1/012139)

Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, NA-NA.

<https://doi.org/10.1002/jcc.21334>

Valdelamar L, Rodríguez M, Bermúdez V, Leal E, Bermúdez F, Cabrera M, et al. Tratamiento farmacológico de la obesidad: Presente, pasado y futuro. *Arch Venez Farmacol y Ter* [Internet]. 2007 [consultado 19 de julio del 2021] ;26(1). Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-02642007000100003

Wallace, A. C.; Laskowski, R. A.; Thornton, J. M. "LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions". *Protein engineering, design and selection*, 1995, 8 (2), 127-134. DOI: 10.1093/protein/8.2.127

Wang, L., Guan, X.-Q., He, R., Huo, P.-C., Qin, W.-W., Cui, L.-T., Hu, Q., Hou, J., Mamat, M., Jia, S.-N., Tang, H., & Ge, G.-B. (2020). Discovery and characterization of pentacyclic triterpenoid acids in *Styrax* as potent and reversible pancreatic lipase inhibitors. *Journal of Functional Foods*, 74, 104159. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104159>

Wijaya, M. & Subandi. (2020). In Silico Analysis of Saponin Isolates from Mesocarp of Cucumber (*Cucumis sativus* L.) and Purple Eggplant (*Solanum melongena* L.) as Pancreatic Lipase Inhibitor. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 833, 012053. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/833/1/012053>