

INHIBICIÓN DE LA AMILASA POR *Coccoloba uvifera*

Mex-Alvarez Rafael Manuel de Jesús
Universidad Autónoma de Campeche,
México

Guillen-Morales María Magali
Universidad Autónoma de Campeche,
México

Garma-Quen Patricia Margarita
Universidad Autónoma de Campeche,
México

Yanez-Nava David
Universidad Autónoma de Campeche,
México

Vela-Cano José Antonio
Universidad Autónoma de Campeche,
México

Novelo-Pérez María Isabel
Universidad Autónoma de Campeche,
México

All content in this magazine is licensed under a Creative Commons Attribution License. Attribution-Non-Commercial-Non-Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).



Resumen: Los compuestos que inhiben la amilasa salival son útiles para evitar el incremento de la glucemia postprandial, debido a que disminuyen la biodisponibilidad de los monosacáridos a partir de carbohidratos complejos como el almidón; el objetivo de este trabajo fue evaluar y determinar el grado de la actividad inhibitoria de la amilasa salival por el extracto de la semilla de *Coccoloba uvifera*. Inicialmente se evaluaron los extractos acetónicos y metanólicos de la hoja, cáscara y semilla de *Coccoloba uvifera*, primero se cuantificaron los compuestos polifenólicos contenidos en cada extracto y posteriormente se evaluó la inhibición enzimática de manera cualitativa por la técnica de yodo, para finalmente determinar cuantitativamente la inhibición de la enzima por el extracto metanólico de la semilla utilizando el método de 2-cloro-p-nitrofenilmaltotriosa. Se obtuvo que la concentración de 1.6 ppm inhibió el 50% de la actividad de la amilasa salival, una actividad similar a la acarbosa (fármaco de referencia). La actividad de la semilla de *C. uvifera* resulta muy prometedora para continuar con su estudio para la identificación de los principios activos correspondientes y otorgarle un beneficio terapéutico.

Palabras claves: Índice glucémico, polifenoles, diabetes.

ANTECEDENTES

En México la diabetes es una de las primeras causas de muerte según los datos registrados por el Instituto Nacional de Salud Pública, para mejorar la calidad de vida de los diabéticos y evitar complicaciones se debe tener un buen control de la glucemia para ello además de la administración de fármacos se debe controlar el índice glucémico postprandial para permitir a los pacientes nutrirse adecuadamente y mejorar su salud¹⁻⁴. Existen infinidad de tratamientos para la diabetes pero ninguno promete garantizar una vida sana y

mucho menos promover el bienestar integral porque privar completamente del consumo de azúcares a un paciente diabético no es ni saludable ni viable; el control de la glucemia es uno de los aspectos más importantes en la farmacoterapia de la diabetes especialmente los niveles postprandiales.^{1,2}

En ese sentido, un blanco farmacológico relevamente para controlar la glucemia postprandial es la amilasa salival que se encarga de la digestión de polisacáridos para convertirlos en monosacáridos que pueden ser absorbidos; en consecuencia, inhibir la amilasa representa disminuir la biodisponibilidad de la glucosa con el correspondiente beneficio fisiológico^{3,4}. Las sustancias que disminuyen la biodisponibilidad de la glucosa ingerida en los alimentos es benéfica porque evitan el incremento de los niveles plasmáticos de carbohidratos; por ejemplo si se compara dos pacientes que consuman la misma cantidad de polisacáridos (como en el pan o la tortilla) pero a uno de ellos se administra un inhibidor de la amilasa se podrá observar que éste tiene un menor incremento del nivel de glucemia comparado con el paciente al que no se le administró el inhibidor.

Sin embargo; los inhibidores de la amilasa que se usan como fármacos en la clínica, como la acarbosa, presentan reacciones adversas o tiene una efectividad baja que limita su utilidad en el tratamiento de la diabetes. Así, surge la necesidad de investigar potenciales metabolitos secundarios de origen natural que puedan emplearse con este fin farmacológico³⁻⁴. En los últimos años, se han identificado inhibidores de la amilasa en varias especies de plantas y se observó que los metabolitos secundarios de tipo fenólicos son capaces de inhibir la acción enzimática de la amilasa salival. Diversos estudios han demostrado que los extractos de *Coccoloba uvifera* presentan un alto contenido de compuestos fenólicos especialmente taninos

por lo cual resultan prometedores como inhibidores de la amilasa⁵. El objetivo de este estudio fue examinar el efecto inhibitor de los extractos metanólico y acetónico de *Coccoloba uvifera* (uva de mar) sobre la amilasa salival para conocer su potencial uso biotecnológico y farmacéutico.

METODOLOGÍA

El material vegetal (hoja y fruto) se obtuvo en la ciudad de Champotón (Estado de Campeche, México), se separaron los frutos maduros de los verdes y de los frutos maduros se aisló la semilla y la pulpa, se trituraron las semillas con un martillo y se secaron en estufa a 40°C. El material vegetal se extrajo por maceración a temperatura ambiente durante 48 h usando metanol y cetona como disolventes, se filtró y se secó en un rotavapor; se prepararon soluciones de 2,000 ppm (en etanol al 70% en agua). Se realizó el tamizaje fitoquímico para corroborar la presencia de polifenoles, taninos y flavonoides en los extractos.

Posteriormente, la determinación de la actividad inhibitora de la amilasa se realizó por dos métodos, el primero Cualitativo, que consistió en depositar 50 mL de solución buffer de fosfato de pH 7.2 en una microplaca y se realizó diluciones seriadas de 2 con 50 mL de cada uno de los extractos, después se añadió 50 mL de una solución de almidón 1.0% en PBS, se agitó y finalmente se añadió una solución de la enzima de actividad estandarizada. En una columna se dispuso de blancos para ir monitoreando la reacción, cada cinco minutos, por la adición de una solución yodo yodurada hasta que no hubiera coloración azul-violácea; cuando se comprobó la hidrólisis completa de almidón, se añadía a cada uno de los pozos de reacción la tintura de yodo y se observó en qué pozos permaneció el almidón que indicaba la inhibición de la amilasa salival. Se usó como control positivo la acarbosa y se determinó

que el extracto metanólico de semilla era el que resultó prometedor por lo cual se realizó la determinación cuantitativa de la inhibición.

Para la determinación cuantitativa de la inhibición de la amilasa se realizó en microplacas de la siguiente manera: se depositó 50 mL de solución buffer de fosfato de pH 7.2 y a partir de esto realizar diluciones seriadas de 2 con 50 mL del extracto del fruto y se añadió a cada pozo 50 mL del reactivo para determinación de amilasa que contiene 2-cloro-p-nitrofenilmaltotriósido que libera el 2-cloro-p-nitrofenol de color amarillo, se incubó 10 minutos a 37°C y posteriormente se añadió 50 mL de la solución de amilasa, se programó el equipo de lector de microplacas para incubación a 37°C y lectura a 405 nm cada dos minutos con agitación; se usó un blanco para determinar la actividad enzimática basal y acarbosa como control positivo. La inhibición de la actividad enzimática se determinó por la diferencia porcentual de la actividad de la amilasa del problema con respecto al blanco.

RESULTADOS

En el análisis cualitativo (tabla 1) se observó que el extracto metanólico de la semilla de *Coccoloba uvifera* mostró la mayor actividad inhibitora (CMI=10 ppm) comparado con el resto de los extractos ensayados, el extracto que ejerció menor actividad inhibitora de la amilasa fue el acetónico de la cáscara.

Parte vegetal	Disolvente de extracción	Concentración mínima inhibitora (ppm)
Hoja	Metanol	83
Hoja	Acetona	166
Cáscara	Metanol	166
Cáscara	Acetona	333
Semilla	Metanol	10
Semilla	Acetona	83

Tabla 1. Concentraciones mínimas inhibitoras de la amilasa salival por los extractos de *C. uvifera*.

En consecuencia, se realizó el ensayo cuantitativo para el extracto metanólico de la semilla de *C. uvifera* que consistió en una curva dosis-respuesta y con ello se determinó la concentración efectiva al 50% (CE50%). Como se puede observar en la figura 1, la CE50% del extracto metanólico de la semilla fue de 1.6 ± 0.4 ppm, esto representa una buena actividad inhibitoria de la amilasa salival y permite sustentar estudios posteriores para determinar el metabolito responsable de esta actividad y para estudiar el tipo de inhibición que ejerce.

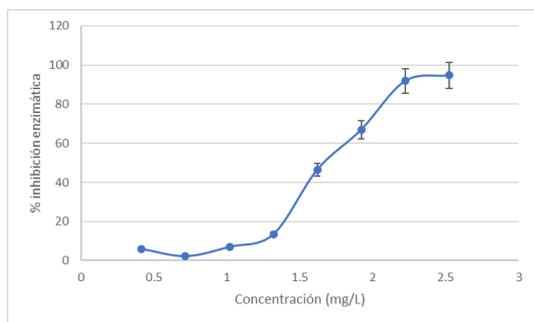


Figura 1. Curva dosis respuesta del extracto de *C. uvifera*.

DISCUSIONES

La uva de mar o *Coccoloba uvifera* es una especie con abundancia de compuestos polifenólicos y otros metabolitos de interés como los triterpenos que ejercen una diversidad de actividades biológicas⁵⁻⁹, por ello se puede suponer que estos metabolitos secundarios principales encontrados en los extractos ejercen la actividad inhibitoria de la amilasa. La parte vegetal ensayada con mayor capacidad de inhibición de la amilasa fue la semilla, esto coincide con estudios realizados en diversas especies vegetales en los que se reporta que las semillas contienen constituyentes bioactivos, generalmente de naturaleza liposoluble, que han mostrado acciones antidiabéticas.¹⁰⁻¹²

Los metabolitos extraídos de la semilla de *C. uvifera* presentan una actividad inhibitoria

buena según los datos que se reportan en semillas cuyos valores de CE50% son menores al 10 ppm, Ting y cols. (2021) atribuyen la inhibición de la amilasa principalmente a los polifenoles¹⁰⁻¹⁶; algunos estudios han descrito que compuestos fenólicos como el ácido cafeico, clorogénico y ferúlico son inhibidores potenciales de las enzimas degradadoras de carbohidratos como la amilasa y la glucosidasas¹⁷⁻¹⁸. Igualmente, flavonoides como la quercetina y el kaempferol también inhiben la alfa amilasa³⁻⁴.

Además los taninos son metabolitos secundarios que tienden a precipitar proteínas y afecta la biodisponibilidad de nutrientes y otros metabolitos secundarios, por ello aumentaría la actividad inhibitoria; asimismo, la actividad de los taninos se ejerce en los diferentes tipos de amilasa, tanto en la salival como en la pancreática y Kato y cols. (2017) observaron que los taninos hidrosolubles son más efectivos para inhibir que los condensados¹⁹⁻²⁰. Las protoantocianinas y los elegitaninos están ampliamente distribuidos en especies vegetales, la interacción de estos compuestos con las proteínas se debe a que poseen numerosos grupos hidroxilos que pueden producir asociaciones hidrofóbicas y generar la precipitación, esta acción permite una inhibición inespecífica de enzimas como la alfa amilasa²⁰⁻²¹. Actualmente se continúa con el estudio precipitando los taninos con albúmina y evaluando la actividad del sobrenadante y la inhibición persiste, esto indica que existen metabolitos que inhiben a la enzima por otro mecanismo de acción.

Aunque este trabajo se centró solamente en la acción inhibitoria de la amilasa, es importante señalar que los metabolitos secundarios que actúan sobre esta enzima igualmente pueden ejercer una actividad inhibitoria sobre otras enzimas de interés clínico en la terapia antidiabética por esto es recomendable ensayar otros posibles blancos

biológicos como la alfa glucosidasa y la glucoamilasa, también conviene experimentar su efecto *in vivo* sobre la absorción de polisacáridos complejos como el almidón y su impacto sobre el índice glucémico.²²⁻²³

En cuanto al disolvente utilizado para la obtención del extracto, el metanol fue más efectivo para extraer metabolitos inhibidores, en particular el metanol es un buen disolvente de metabolitos secundarios polares como los polifenoles que son compuestos antioxidantes, el metanol también es un buen disolvente para la extracción de flavonoides, saponinas y alcaloides, se ha observado que todos estos compuestos pueden inhibir a la amilasa.²⁴⁻²⁷

La acción inhibitoria de la amilasa salival es útil para evitar los picos de glucemia postprandial que afectan a los pacientes con resistencia a la insulina y diabéticos, por ello se podría emplear el extracto en alimentos para disminuir su índice glucémico y contribuir al mejoramiento de la salud de los pacientes con estas afecciones, la inhibición de la alfa amilasa facilita el mantenimiento de los niveles de glucosa circulante porque disminuye la absorción de carbohidratos; igualmente se puede continuar con el estudio de los extractos de la semilla para identificar si existe otros metabolitos diferentes a los ya conocidos que resulte prometedor como principio activo inhibidor de la amilasa.^{22,28-30}

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se demostró que los extractos metanólicos de *Coccoloba uvifera* inhibieron fuertemente la actividad enzimática de la amilasa, el extracto metanólico de la semilla fue el que ejerció una mayor inhibición enzimática con una actividad similar a la acarbosa, por ello resulta prometedor farmacológicamente para el desarrollo de medicamentos que disminuyan la glucosa postprandial.

REFERENCIAS

1. López-Martínez LX, Aguilar Cisneros LM, & Dublán-García O. (2014). Actividad antioxidante e inhibidora de α -glucosidasa y α -amilasa de tres variedades de cebolla (*Allium cepa* L.). *Nova scientia*, 6(12), 234-347.
2. Lawson P, Bakoma B, Titrikou A, Gadegbéku E, Aklikokou K, Gbeassor M, (2015). Phytochemical Screening, Antioxidant and Hypoglycemic Activity of *Coccoloba uvifera* Leaves and *Waltheria indica* Roots Extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7 (5): 279-283.
3. Díaz BE, Aguirre PC, Gotteland RM. (2004). Efecto de un inhibidor de (α -amilasa sobre la reducción de peso de mujeres obesas. *Revista chilena de nutrición*, 31(3), 306-317.
4. Mendoza Meza DL, & Loza Rosas SA. (2014). Actividad inhibitoria alfa-amilasa y fenoles totales en extractos etanólicos de hojas de *Smalanthus sonchifolius* (yacón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(4), 310-318.
5. Arias-Cedeño, Q., Hermosilla-Espinosa, R., Valdés-Izaguirre, L. E., Castillo-Montejo, H. C., & Eichler-Löbermann, B. (2022). Phytochemical characterization and antioxidant activity of polar extracts from fruits of *Coccoloba uvifera* L. *Revista Cubana De Química*, 34(2), 211–226. Retrieved from <https://cubanaquimica.uo.edu.cu/index.php/cq/article/view/5237>
6. Silveira, J. E., Pereda, M., Eberlin, S., Dieamant, G. C., & Di Stasi, L. C. (2008). Effects of *Coccoloba uvifera* L. on UV-stimulated melanocytes. *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, 24(6), 308–313. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0781.2008.00382.x>
7. Ramos-Hernández, J. A., Calderón-Santoyo, M., Burgos-Hernández, A., García-Romo, J. S., Navarro-Ocaña, A., Burboa-Zazueta, M. G., Sandoval-Petris, E., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2021). Antimutagenic, Antiproliferative and Antioxidant Properties of Sea Grape Leaf Extract Fractions (*Coccoloba uvifera* L.). *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 21(16), 2250–2257. <https://doi.org/10.2174/1871520621999210104201242>
8. Calderón-Chiu, C., Calderón-Santoyo, M., Damasceno-Gomes, S., & Ragazzo-Sánchez, J. A. (2021). Use of jackfruit leaf (*Artocarpus heterophyllus* L.) protein hydrolysates as a stabilizer of the nanoemulsions loaded with extract-rich in pentacyclic triterpenes obtained from *Coccoloba uvifera* L. leaf. *Food chemistry: X*, 12, 100138. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100138>
9. Ramos-Bell S, Calderón-Santoyo M, Barros-Castillo JC, Ragazzo-Sánchez JA. Characterization of submicron emulsion processed by ultrasound homogenization to protect a bioactive extract from sea grape (*Coccoloba uvifera* L.). *Food Sci Biotechnol*. 2020 Jun 6;29(10):1365-1372. doi: 10.1007/s10068-020-00780-0. PMID: 32999743; PMCID: PMC7492287.
10. Mahindrakar, K. V., & Rathod, V. K. (2021). Antidiabetic potential evaluation of aqueous extract of waste *Syzygium cumini* seed kernel's by in vitro α -amylase and α -glucosidase inhibition. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 51(6), 589–598. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1839908>
11. He, T., Zhao, L., Chen, Y., Zhang, X., Hu, Z., & Wang, K. (2021). Longan seed polyphenols inhibit α -amylase activity and reduce postprandial glycemic response in mice. *Food & function*, 12(24), 12338–12346. <https://doi.org/10.1039/d1fo02891j>
12. Teng, H., & Chen, L. (2017). α -Glucosidase and α -amylase inhibitors from seed oil: A review of liposoluble substance to treat diabetes. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(16), 3438–3448. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1129309>
13. X Barros I, Fidelis Q, Souza D, Pereira J, Garcia S, Silva Ribeiro G, et al. (2010). Toxicity, Antioxidant Activity and Phytochemical Characterization of *Coccoloba mollis* Roots and Leaves. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*.31 (2): 101- 106.
14. Segura R, Ruiz J, Chel L, Bentacur (2014) *Coccoloba uvifera* (L.) (Polygonaceae) Fruit: Phytochemical Screening and Potential Antioxidant Activity. *Journal of Chemistry* 20 (15): 1-9.
15. Gámez Y. (2012). Evaluación Fitoquímica y Actividad Antibacteriana de Extractos de *Coccoloba uvifera* Jacq. (Polygonaceae) de la Localidad de el Peñón. Cumaná, estado Sucre. Tesis de Grado. Universidad de Oriente Núcleo de Sucre, Cumaná.
16. Gámez Y. (2012). Evaluación Fitoquímica y Actividad Antibacteriana de Extractos de *Coccoloba uvifera* Jacq. (Polygonaceae) de la Localidad de el Peñón. Cumaná, estado Sucre. Tesis de Grado. Universidad de Oriente Núcleo de Sucre, Cumaná.
17. Hernández-Medina M, Torruco-Uco JG, Chel-Guerrero L, & Betancur-Ancona D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Food Science and Technology*, 28(3), 718-726.

18. Yubero, F. (2013). Semillas de *Moringa oleífera* cultivadas en el chaco central como fuente de enzimas para alimentacion animal. *Compendio de Ciencias Veterinarias*, 3(1), 15-20.
19. Andrade, J., Barros, R., Pereira, U. C., Gualberto, N. C., de Oliveira, C. S., Shanmugam, S., & Narain, N. (2022). α -Amylase inhibition, cytotoxicity and influence of the in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds in the peel and seed of *Theobroma grandiflorum*. *Food chemistry*, 373(Pt B), 131494. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131494>
20. Kato, C. G., Gonçalves, G. A., Peralta, R. A., Seixas, F., de Sá-Nakanishi, A. B., Bracht, L., Comar, J. F., Bracht, A., & Peralta, R. M. (2017). Inhibition of α -Amylases by Condensed and Hydrolysable Tannins: Focus on Kinetics and Hypoglycemic Actions. *Enzyme research*, 2017, 5724902. <https://doi.org/10.1155/2017/5724902>
21. Barrett, A., Ndou, T., Hughey, C. A., Straut, C., Howell, A., Dai, Z., & Kaletunc, G. (2013). Inhibition of α -amylase and glucoamylase by tannins extracted from cocoa, pomegranates, cranberries, and grapes. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(7), 1477–1486. <https://doi.org/10.1021/jf304876g>
22. Alam, F., Shafique, Z., Amjad, S. T., & Bin Asad, M. (2019). Enzymes inhibitors from natural sources with antidiabetic activity: A review. *Phytotherapy research : PTR*, 33(1), 41–54. <https://doi.org/10.1002/ptr.6211>
23. Freitas, D., Boué, F., Benallaoua, M., Airinei, G., Benamouzig, R., & Le Feunteun, S. (2021). Lemon juice, but not tea, reduces the glycemic response to bread in healthy volunteers: a randomized crossover trial. *European journal of nutrition*, 60(1), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s00394-020-02228-x>
24. Nguelefack, T. B., Fofie, C. K., Nguelefack-Mbuyo, E. P., & Wuyt, A. K. (2020). Multimodal α -Glucosidase and α -Amylase Inhibition and Antioxidant Effect of the Aqueous and Methanol Extracts from the Trunk Bark of *Ceiba pentandra*. *BioMed research international*, 2020, 3063674.
25. Kidane, Y., Bokrezion, T., Mebrahtu, J., Mehari, M., Gebreab, Y. B., Fessehaye, N., & Achila, O. O. (2018). In Vitro Inhibition of α -Amylase and α -Glucosidase by Extracts from *Psiadia punctulata* and *Meriandra bengalensis*. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2018, 2164345. <https://doi.org/10.1155/2018/2164345>
26. Unnikrishnan, P. S., Suthindhiran, K., & Jayasri, M. A. (2015). Alpha-amylase Inhibition and Antioxidant Activity of Marine Green Algae and its Possible Role in Diabetes Management. *Pharmacognosy magazine*, 11(Suppl 4), S511–S515. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.172954>
27. Oyedemi, S. O., Oyedemi, B. O., Ijeh, I. I., Ohanyerem, P. E., Cooposamy, R. M., & Aiyegoro, O. A. (2017). Alpha-Amylase Inhibition and Antioxidative Capacity of Some Antidiabetic Plants Used by the Traditional Healers in Southeastern Nigeria. *TheScientificWorldJournal*, 2017, 3592491. <https://doi.org/10.1155/2017/3592491>
28. Sales, P. M., Souza, P. M., Simeoni, L. A., & Silveira, D. (2012). α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*, 15(1), 141–183. <https://doi.org/10.18433/j35s3k>
29. Papoutsis, K., Zhang, J., Bowyer, M. C., Brunton, N., Gibney, E. R., & Lyng, J. (2021). Fruit, vegetables, and mushrooms for the preparation of extracts with α -amylase and α -glucosidase inhibition properties: A review. *Food chemistry*, 338, 128119. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128119>
30. Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L. - a phytochemical and pharmacological review. *Food chemistry*, 165, 424–443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.002>