

Determinación del Efecto Inhibitorio de los Polifenoles presentes en la Fresa (*Fragaria vesca* L.) sobre la Enzima Alfa Amilasa.

MIRIAM SOSA N., TIBISAY PERNÍA S., LILIANA ARAUJO B., GRECIA MÉNDEZ DE C., DIOLIMAR BUITRAGO, JAQUELINE PÉREZ L.

Laboratorio de Bioquímica . Facultad de Farmacia. Universidad de los Andes.
Mérida .Venezuela.

RESUMEN

La fresa (*Fragaria vesca* L.) es una planta perteneciente a la familia Rosaceae, la cual reporta polifenoles dentro de su composición química, compuestos a los cuales se les atribuye la capacidad de acoplarse con proteínas de manera inespecífica. Con el propósito de aislar e identificar polifenoles presentes en esta planta, se aplicaron técnicas cromatográficas de columna, empleándose sílicagel como adsorbente para obtener las diferentes fracciones, y cromatografía de papel para evaluar los registros de Rf en diversos solventes. Se comprobó la actividad inhibitoria de los compuestos presentes en las fracciones obtenidas sobre la enzima alfa amilasa del suero sanguíneo valorada por espectrofotometría. La alfa amilasa está involucrada en diferentes procesos metabólicos, de allí que la inhibición de la misma por los polifenoles resulta de gran importancia en la solución de problemas relacionados con la diabetes y la obesidad entre otros.

ABSTRACT

Strawberry (*Fragaria vesca* L.) is a plant of the Rosaceae family, which reports polyphenols in its chemical composition. These compounds are believed to have the ability to blend with proteins in an unspecific way. In order to isolate and identify polyphenols in this plant, we used the column chromatography technical, whit silica gel as a adsorbent, to obtain the different fractions, and the paper chromatography to value the Rf registers in several solvents. We confirm the inhibitory activity of the compounds in fractions obtained on the α -amylase enzyme from blood serum, determined for spectrophotometry. The TS-amylase is involved in several metabolic processes, so its inhibition by the polyphenols has a great importance in the solution of problems related to diabetes and obesity, among others.

PALABRAS CLAVE

Actividad α -amilasa, inhibición, strawberry, polifenoles, diabetes.

INTRODUCCIÓN

Hoy día, conociendo la clasificación de las plantas y teniendo el hombre la capacidad de identificarlas por sus características externas, recurre a ellas para mejorar su salud, debido a que son: económicas, efectivas, de fácil manejo, de uso popular y fuente histórica de principios activos con actividad biológica (Garrot, L. P., 1985).

La fresa (*Fragaria vesca* L.) presenta actividad antioxidante, la cual puede ser importante para la función del cerebro, además se le atribuye propiedades como, estimulante estomacal, depurativo, diurético, contra la diabetes, obesidad y gota (Fount, Q., 1962). La importancia de los polifenoles en la prevención y curación de enfermedades ha sido reportada por diversos investigadores, los cuales le atribuyen actividad farmacológica variada, por ejemplo: propiedad antiviral en jugos de frutas comerciales (Thresh, J. M., 1956), en el jugo de toronja y más recientemente en *Punica granatum* L (Zhang, J. y col.; 1995 y Corao, G.; 2001); y en la infusión de té (Dreosti, I. E.; 2000).

Numerosos estudios indican que extractos de té son efectivos para reducir las caries tanto en humanos como en animales. Los experimentos demostraron la inhibición de la actividad de la amilasa salival por extractos de un té comercial. El efecto sobre la amilasa salival puede contribuir significativamente a inhibir la cariogenicidad por alimentos que contienen almidón (Kashket S, y et al; 1988). *Punica granatum* y *Mangifera indica* mostraron un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima alfa amilasa. Un aislamiento de sus constituyentes activos puede

proporcionar inhibidores de la alfa amilasa, potencialmente útil en el control de la obesidad y la diabetes. (Prashanth D. et al; 2001).

Los polifenoles juegan un rol importante en la inhibición de la amilasa salival (Liu Z. y Ahang G.; 1995). De allí la escogencia de esta fruta para nuestro estudio. Este trabajo permitió estudiar a los polifenoles presentes en dicha planta y su capacidad inhibitoria sobre la enzima alfa-amilasa, la cual se usó como modelo para verificar la especificidad del polifenol sobre las proteínas (Kashket S., Paolino VJ., 1998).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del extracto de los frutos

500 g del fruto de la fresa fue licuado con 100 ml de metanol durante un minuto, para obtener una mezcla homogénea que luego se filtró a través de una gasa. El extracto colado se usó para obtener las diferentes fracciones.

Separaciones mediante cromatografía de columna

El extracto obtenido se mezcló con silicagel y se empacó en una columna de vidrio. La columna fue eluida con una mezcla de polaridad creciente de metanol-agua y las diferentes fracciones recogidas se concentraron a presión reducida en un rotavapor a 45 °C.

Cromatografía de papel

Se realizó cromatografía de papel para obtener el registro de valores Rf de las fracciones en diferentes solventes, tales como butanol - ácido acético - agua (BAW) en proporción de 4:1:5 y ácido acético y agua al 6%. Como revelador se usó cloruro férrico al 1% hexahidratado en metanol (Schomburgk, S.E., 1998).

Prueba de detección de polifenoles con cloruro férrico

Se mezcló una gota de cloruro férrico diluido al 1% en agua con una gota de cada una de las fracciones. La aparición de una coloración de azul a negro manifestó la positividad de la prueba.

Actividad inhibitoria

Para determinar el efecto inhibitorio de las fracciones sobre la alfa amilasa se utilizó suero sanguíneo como fuente de la enzima. Con el uso un kit enzimático marca Sigma se realizaron las determinaciones en un Espectrofotómetro automatizado marca Gilford a una longitud de onda de 450 nm. La actividad de la enzima se expresó en U/L comparándola contra la actividad de controles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las fracciones obtenidas en la cromatografía de columna se agruparon de acuerdo a sus valores de Rf, medidas a través de cromatografía de papel (Tabla 1). Al someter las fracciones a la prueba de detección de polifenoles tanto en el extracto puro como en el resto de las fracciones, se observó una coloración de azul a negro al contacto con el cloruro férrico (FeCl₃), siendo más intenso en el extracto puro y en la fracción 1, indicando la presencia de polifenoles (Tabla 1).

Tabla 1. Fracciones obtenidas de la extracción acuosa de la fresa (*Fragaria vesca* L.), sus respectivos Rf y la detección de polifenoles.

Cromatografía de papel (RfX100)	Polifenoles				
	UV	UV	FeCl ₃	FeCl ₃	Prueba
Extracto puro	45	99	86	95	+
*1	21	95			+
*2	18	92	45	88	+
*3	16	83			+
*4	14	70			+
*5	10	84			+

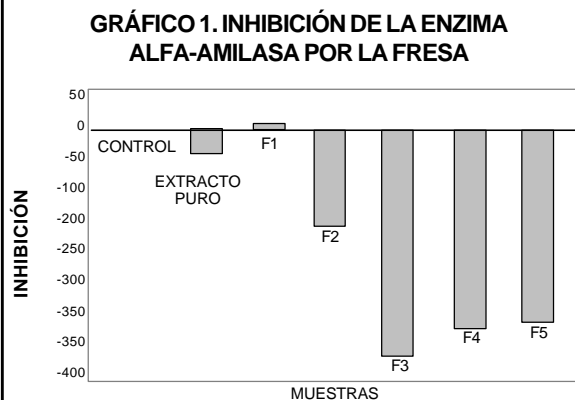
Clave: *Fracciones; Solventes de corrida = BAW (butanol:ácido acético: agua; 4:1:5), AcOH6% (Ácido acético al 6% v/v); Detección = UV (Luz ultravioleta), Spray FeCl₃ (FeCl₃ al 2% p/v en metanol); · Prueba para polifenoles = FeCl₃ al 2% p/v en metanol.

El efecto de inhibición de los polifenoles presentes en la fresa sobre la enzima alfa amilasa se muestra en la tabla 2 y grafico 1, en la cual se comparan los resultados de la actividad de la enzima utilizando el extracto puro y las diferentes fracciones obtenidos de la fresa (suero sanguíneo y fracciones 1:1) con una muestra control (suero sanguíneo y agua destilada 1:1).

Tabla Nº 2. Efecto inhibitorio de extractos de la fresa sobre la actividad de la α-amilasa.

Muestra	Actividad (U/L)
Control	21
Extracto Puro	29
Fracción 1	19
Fracción 2	52
Fracción 3	94
Fracción 4	85
Fracción 5	83

Al analizar los resultados se aprecia claramente que la Fracción 1 arroja un valor de actividad por debajo del control, demostrándose la inhibición en un 9,52% de la misma sobre la enzima alfa amilasa.



Zhang, J., Zhan, B., Yao, X., Gao, Y., Shong, J., 1995. "Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against genital herpes virus in vitro". *Chung-Kuo-Chung-Yao-Tsa-Chih*, 20:556-558.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron fracciones de la extracción acuosa de la fresa que resultaron positivas en la prueba de polifenoles.
2. La fracción 2 mostró un 9,52 % de inhibición sobre la actividad de la enzima α -amilasa.
3. Las propiedades terapéuticas atribuidas a la fresa posiblemente se deban a su contenido de polifenoles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Corao, G., 2001. "Antiviral activity of ingredients in the fruit rind of *Punica granatum* L. and other extracts". Tesis PhD Dissertation. School of Pharmacy and Biomolecular Sciences. University of Brighton. U. K.
- Dreosti, I. E., 2000. "Antioxidant polyphenols in tea, cocoa and wine". *Nutrition*, 16: 692-694.
- Fount, Q., 1962. "Plantas Medicinales". Editorial Labor, Barcelona. p. 320-322.
- Garrot, L. P., 1985. "Antibiótico", Salvat Editores, España. P. 97.
- Kashket, S., Paolino, VJ., 1998. "Inhibition of salivary amylase by water-soluble extracts of tea". *Arch. Oral. Biol.*, 33: 845-846.
- Liu, Z., Li, M., Zhang, G., 1995. "An approach to determinig the effect on salivary amylase by green tea extract". *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 30(2):89-91.
- Prashant, D., 2001 "Effect of certain plant extracts on a-amylase activity". *Fitoterapia*, 72:179-181.
- Schomburgk, S.E., 1998. "Polifenoles en cultivos y su importancia". Tesis Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.
- Thresh, J. M., 1956. "Some effects of tannic acid and leaf extracts which contain tannins on the infectivity of tobacco mosaic and tobacco necrosis virus". *Ann. Appl. Biol.*, 44:608-618.