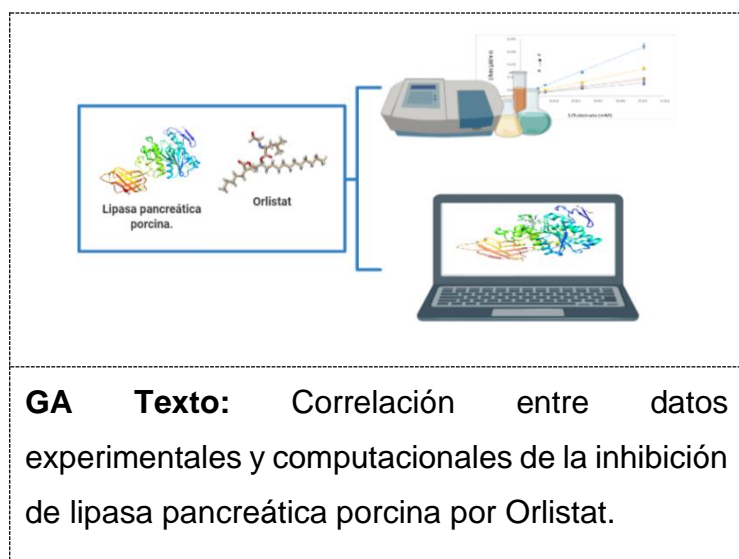


**Inhibición de la lipasa porcina por Orlistat: un ejercicio para entender la cinética enzimática, el mecanismo de acción del fármaco y la estructura enzimática.**

***Inhibition of porcine lipase by Orlistat: An exercise to understand enzyme kinetics, drug mechanism of action, and enzyme structure.***

**Graphical Abstract (GA)**



**GA Texto:** Correlación entre datos experimentales y computacionales de la inhibición de lipasa pancreática porcina por Orlistat.

# **Inhibición de la lipasa porcina por Orlistat: un ejercicio para entender la cinética enzimática, el mecanismo de acción del fármaco y la estructura enzimática.**

***Inhibition of porcine lipase by Orlistat: An exercise to understand enzyme kinetics, drug mechanism of action, and enzyme structure.***

***María Fernanda Candela Londoño\****

*\* Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

*Dirigido por: Dr. Edwin Andrés Malagón Bernal.*

## **Resumen**

La inhibición de la lipasa pancreática con Orlistat se utilizó para mostrar la correlación entre procedimientos experimentales y simulaciones computacionales. Ambos métodos son importantes para entender la cinética y el mecanismo de inhibición, y se complementan en cuanto al alcance de los resultados obtenidos. La actividad enzimática de la lipasa pancreática porcina se evaluó con la determinación de los parámetros cinéticos, tales como la constante de Michaelis-Menten y la velocidad máxima, valores que corresponden a 61mM y 74 $\mu$ M/min, respectivamente. Los ensayos de inhibición con Orlistat se realizaron para obtener las gráficas de Lineweaver-Burk y Dixon, herramientas complementarias con las que se determinó una inhibición competitiva. Además, se incluyó un acoplamiento molecular, para visualizar la interacción enzima-Orlistat, junto con un análisis de secuencias de lipasas para comparar la estructura de la enzima en diferentes organismos.

**Abstract**

Inhibition of pancreatic lipase with Orlistat was used to show the correlation between experimental procedures and computational simulations. Both methods are important to understand the kinetics and the inhibition mechanism, and they complement each other in terms of the scope of the results obtained. The enzymatic activity of porcine pancreatic lipase was evaluated by determining kinetic parameters, such as the Michaelis constant- Menten and maximum speed, values corresponding to 61mM and 74 $\mu$ M / min, respectively. Orlistat inhibition tests were performed to obtain Lineweaver-Burk and Dixon graphs, complementary tools with which competitive inhibition was determined. In addition, a molecular coupling was included, to visualize the enzyme-Orlistat binding, along with a lipase sequence analysis to compare the structure of the enzyme in different organisms.

**Keywords:** Orlistat, lipasa, inhibición, docking.

## Introducción

Las lipasas, más distinguidas como glicerol hidrolasas (EC 3.1.1.3), son proteínas de carácter enzimático, tienen el rol biológico de hidrolizar los triacilgliceroles para convertirlos en diacilgliceroles y un carboxilato. Las lipasas se han usado en procesos industriales, como cosméticos, farmacéuticos, en el tratamiento de residuos<sup>1</sup> y en la producción de biocombustibles<sup>2</sup>. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, se pueden encontrar en microorganismos, plantas y hasta en animales, una característica común entre ellas es la presencia de un sitio activo conservado, este sitio consta de una triada catalítica conformada por un residuo nucleofílico, que puede ser una serina (Ser), una cisteína (Cys) o un ácido aspártico (Asp), un residuo ácido, que puede ser un ácido aspártico (Asp) o un ácido glutámico (Glu) y una histidina (His)<sup>3</sup>. Un fármaco importante es el Orlistat, más conocido como tetrahidrolipstatina, un potente inhibidor de la lipasa humana y ampliamente usado en el combate de la obesidad a largo plazo, el Orlistat es un derivado de la lipstatina y fue aislado de *Streptomyces toxytricini*<sup>4</sup>, este fármaco se une de forma covalente a los residuos de serina de la enzima, reduciendo la absorción de grasa a nivel intestinal y su mecanismo de inhibición se ha descrito como irreversible<sup>5</sup>.

Una herramienta significativa en la bioquímica es la cinética enzimática, quien se apoya de modelos cinéticos tales como Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk y Dixon, pues resulta útil para entender y comprender la estructura enzimática, actividad enzimática y los mecanismos de inhibición, por lo que, los ensayos de acoplamiento molecular han tomado trascendencia y se han fundamentado en técnicas computacionales<sup>6,7</sup> que permiten la visualización de la interacción entre la enzima y el sustrato o sus inhibidores, por otra parte, los ensayos experimentales con modelos cinéticos y cálculos relacionados con los tipos de inhibición siguen siendo ampliamente usados<sup>8,9</sup>, sin embargo, son insuficientes los estudios

que complementan la parte experimental con la computacional, dualidad que se hace necesaria para demostrar cómo obtener datos certeros con análisis adecuados.

En este trabajo, proponemos el uso del Orlistat como inhibidor de la triacilglicerol lipasa, usando lipasa de páncreas porcino como modelo para llevar a cabo un conjunto de ensayos experimentales, tales como cinética enzimática e inhibición, además de metodologías computacionales, tales como docking molecular y análisis de secuencias mediante interferencia de árboles filogenéticos, con el objetivo de aplicar herramientas sencillas de cálculo para visualizar y correlacionar datos experimentales y computacionales de la inhibición de la lipasa pancreática por Orlistat.

## **1. Materiales y métodos**

### **1.1. Reactivos y sus concentraciones:**

- Buffer fosfato pH 8: se tomaron 1,77g de fosfato de hidrogeno disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) y se diluyeron en 250mL de agua destilada, para obtener una concentración 50mM. El pH se ajustó con gotas de solución concentrada de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH), usando el pHmetro hasta lograr un pH=8.
- Extracto enzimático: se usó lipasa de páncreas porcino (LPP) tipo II (30-90U/mg usado triacetina) de Sigma-Aldrich. Se tomaron 100mg de LPP y se diluyeron en 10,0mL de buffer fosfato pH 8, esto se agito y se centrifugo a 7000rpm durante 10minutos, de esta forma se recuperó el sobrenadante, que corresponde al extracto enzimático de LPP. Se logro una concentración de enzima 100mM.
- Sustrato: se usó 4-nitrofenil-palmitato (NPP). Se prepararon 10mL de NPP 0,4mg/mL, que corresponde a una concentración 1mM, usando etanol.
- Inhibidor: se usaron las capsulas comerciales de Orlistat (120mg) de Colmed International. Se diluyo una capsula de Orlistat en 10mL de etanol.

- 4-nitrofenol-palmitato (NP): Se diluyo 4-nitrofenol-palmitato en etanol para obtener una solución 0,1M. Esta solución se diluyo en buffer fosfato pH 8 para obtener concentraciones de NP que oscilaban entre 1mM y 4mM.

### 1.2. Actividad enzimática de la lipasa pancreática porcina (LPP):

La actividad enzimática se evaluó espectrofotométricamente. La reacción de la lipasa pancreática porcina (LPP) implica la producción y cuantificación de 4-nitrofenol (NP), lo que consiste en la hidrólisis de NPP<sup>10,11</sup>( figura 1).

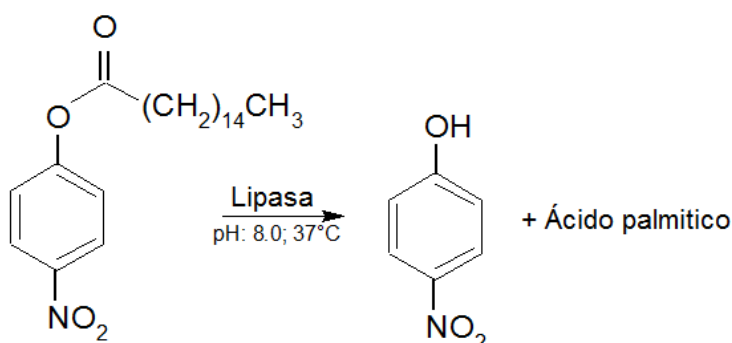


Figura 1. La hidrólisis de NPP con lipasa, el nitrofenol producido se registra a 405 nm.

Las condiciones del ensayo se aseguraron mediante el uso de un sistema peltier, para mantener una temperatura estable de 37°C. Los ensayos se realizaron por triplicado, usando una celda de cuarzo que contenía: 250µL de LPP (100mM), 1550µL de buffer fosfato pH 8 (50mM) y 200µL de NPP (1mM), las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 405nm durante 15 minutos, cada 30 segundos. El análisis de datos se realizó en Excel y los ensayos se realizaron por triplicado.

### 1.3. Inhibición de la lipasa pancreática porcina (LPP) por Orlistat:

El tipo de inhibición que experimenta la lipasa pancreática porcina (LPP) por Orlistat se determinó espectrofotométricamente. Los ensayos se realizaron por triplicado usando una celda de cuarzo y se evaluó la reducción de la actividad de LPP en función de la concentración del inhibidor (Orlistat) en un amplio rango de concentraciones 0µM - 50 µM y el rango de concentración del sustrato (NPP) que oscilaba entre 0mM y 100mM, el

inhibidor se agregó a cada ensayo, con excepción del control. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 405nm durante 15 minutos y cada 30 segundos.

Las gráficas de los modelos cinéticos de Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk y Dixon fueron obtenidas de los cálculos realizados en Excel, estos gráficos se usaron para determinar los parámetros cinéticos.

#### **1.4. Acoplamiento enzima-sustrato y enzima-inhibidor:**

Las moléculas de interés, es decir, el sustrato (4-nitrofenil-palmitato, NPP) y el inhibidor (Orlistat) se bosquejaron en el software ChemSketch<sup>12</sup> para así crear su formato de tipo .mol, además, se usó el software Avogadro para obtener las moléculas optimizadas<sup>13</sup>.

Las posibles interacciones entre LPP-NPP y LPP-Orlistat se exploraron usando el servidor gratuito SwissDock (<http://www.swissdock.ch/docking>)<sup>14</sup>, donde se seleccionó la cadena A de la lipasa pancreática porcina (Código PDB: 1ETH) y, donde se subió y selecciono el ligando de interés (NPP u Orlistat).

Los resultados de los acoplamientos (LPP-NPP y LPP-Orlistat) se visualizaron y analizaron de forma tridimensional mediante el software Chimera UCFS<sup>15</sup> y bidimensional a través del software Discovery Studio.

#### **1.5. Análisis de secuencias:**

Las secuencias de lipasas homologas se obtuvieron y recuperaron de UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>) y se alinearon en CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>). El análisis evolutivo se realizó mediante la interferencia de árboles filogenéticos en el software MEGA X.

## **2. Resultados y Discusión**

### **2.1. Actividad enzimática de la lipasa pancreática porcina (LPP):**

Para aproximar el comportamiento del Orlistat como inhibidor de la lipasa se aplicaron

cálculos a los datos obtenidos. Se estimaron los parámetros cinéticos ( $K_m$  y  $V_{max}$ ) a partir de las gráficas de Michaelis-Menten (figura 3) y Lineweaver-Burk (figura 4) que son consistentes con dichos modelos cinéticos (figura 2).

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S]+K_M} \quad (a)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (b)$$

Figura 2. Ecuaciones modelos cineticos: a. Ecuación de Michaelis-Menten y b. Ecuación de Lineweaver-Burk

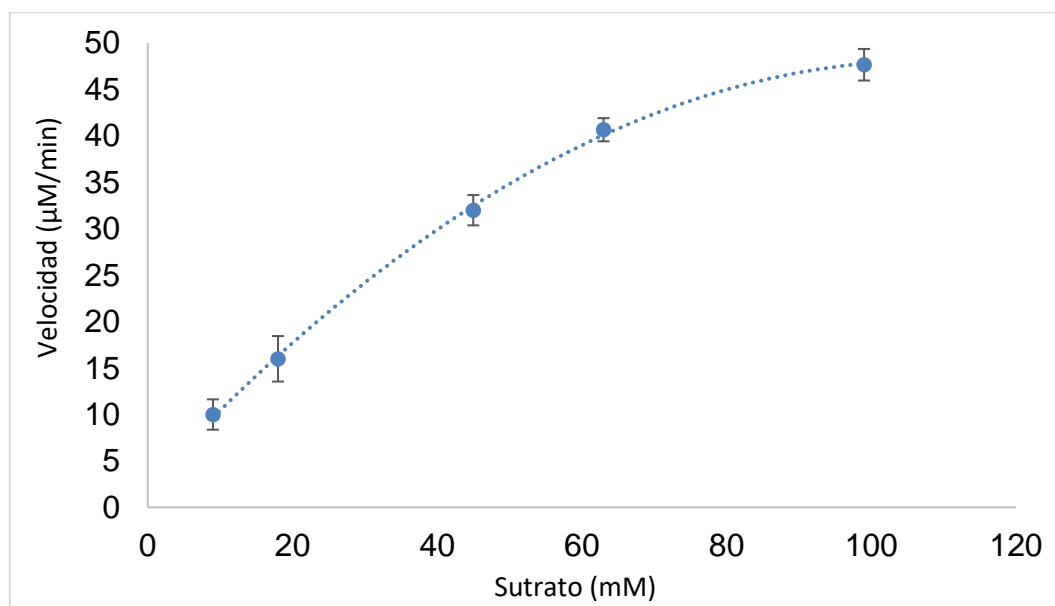


Figura . Michaelis-Menten en ausencia de inhibidor.



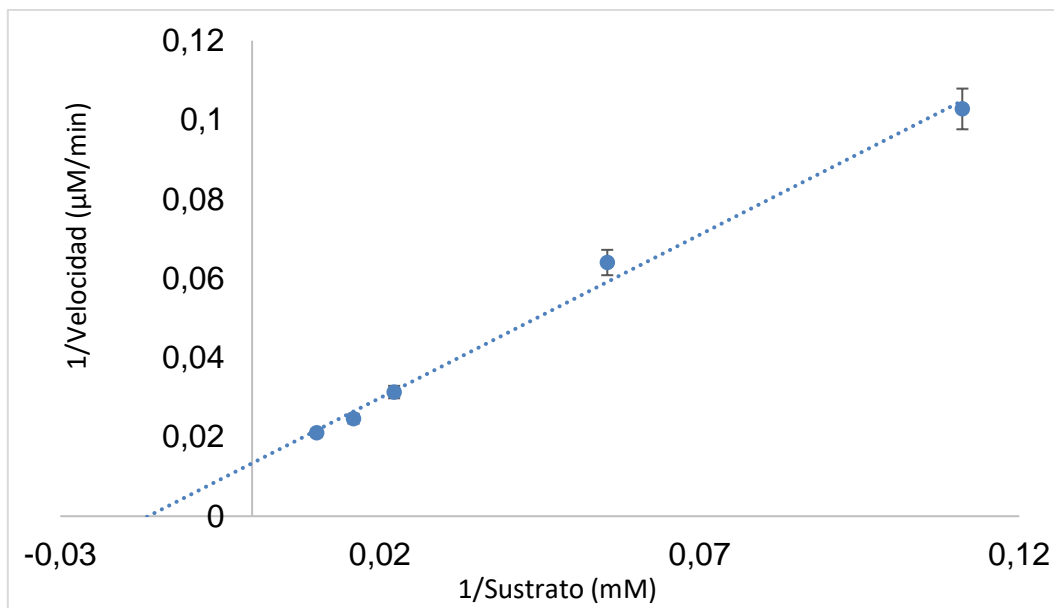


Figura 4. Lineweaver-Burk en ausencia de inhibidor.

Las gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk permitieron estimar la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), que corresponde a 61mM y la velocidad máxima ( $V_{max}$ ), que corresponde a 74μM/min, estos parámetros se determinaron con un  $R^2$  mejor que 0,97.

## 2.2. Inhibición de la lipasa pancreática porcina (LPP) por Orlistat:

El modelo cinético de Dixon se usa ampliamente cuando la interacción enzima-inhibidor es más compleja que la descripción clásica de competitivo o no competitivo<sup>16</sup>. En esta propuesta se utilizó el método de Dixon (figura 6) junto al modelo cinético de Lineweaver-Burk (figura 5) para determinar el tipo de inhibición.

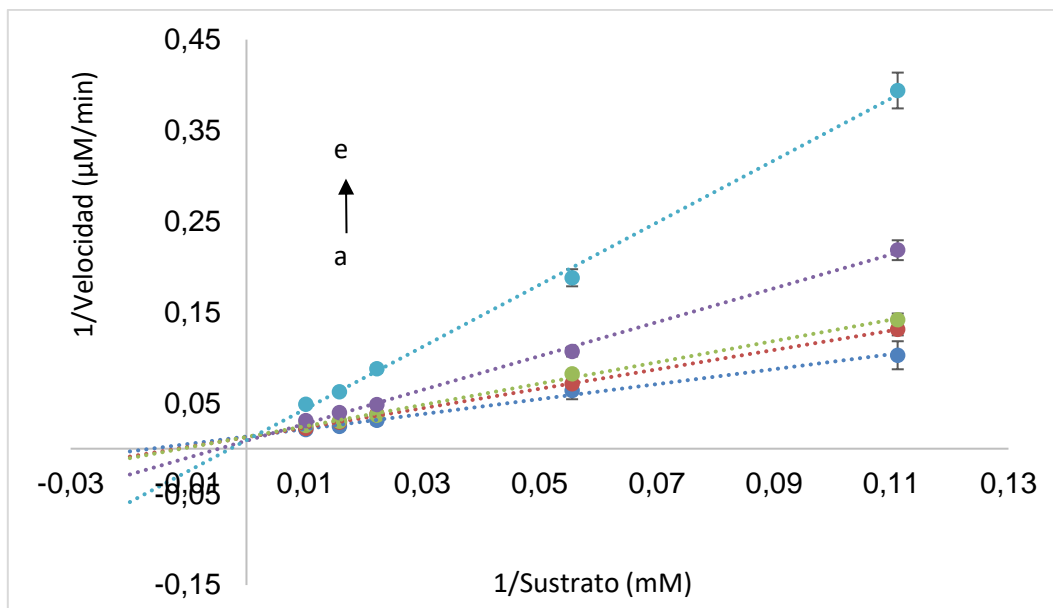


Figura 5. Inhibición competitiva de LPP por Orlistat. Lineweaver-Burk a diferentes concentraciones de Orlistat: a. 0μM, b. 5μM, c. 10μM, d. 20μM y e. 50μM.

La grafica de Lineweaver-Burk muestra que los datos tienen la misma intersección, donde no se muestran cambios significativos en los valores que corresponden a la velocidad máxima ( $V_{max}$ ), pero, si se muestran cambios en los valores que corresponden a la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), esta es una evidencia de una inhibición competitiva.

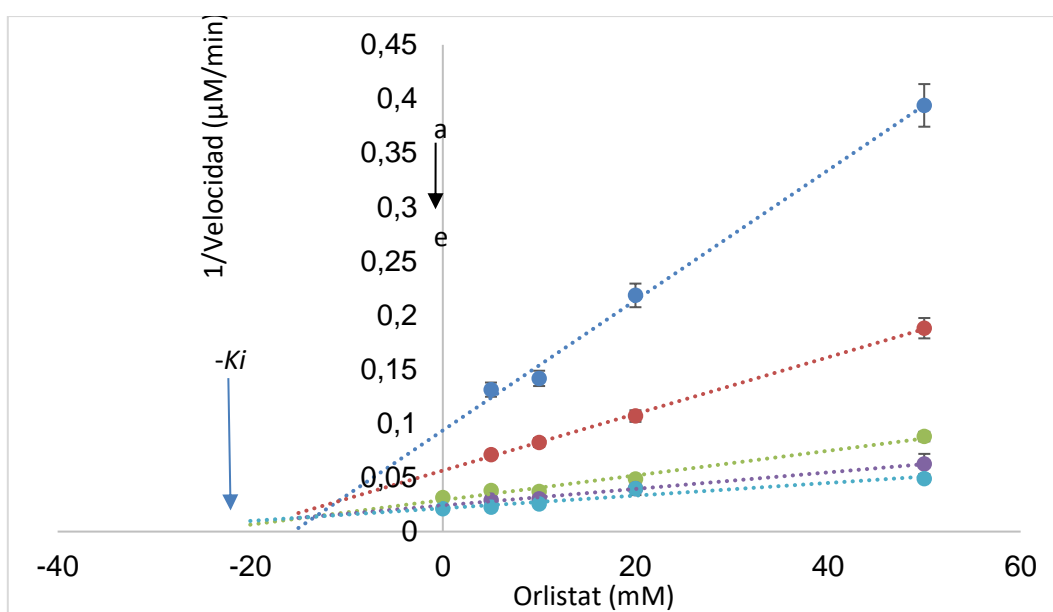


Figura 6. Inhibición competitiva de LPP por Orlistat. Dixon a diferentes concentraciones de

sustrato: a. 9 $\mu$ M, b. 18 $\mu$ M, c. 45 $\mu$ M, d. 63 $\mu$ M y e. 99 $\mu$ M.

El método de Dixon se usa cuando la inhibición ya ha sido reportada como irreversible, en el caso de una inhibición competitiva, se observa que la familia de rectas se interseca sobre el segundo cuadrante en un punto cuya abscisa determina la constante de inhibición ( $K_i$ ), teniendo esto en cuenta, el gráfico de Dixon es consistente con una inhibición competitiva y cuya  $K_i$  corresponde a 13mM.

### **2.3. Acoplamiento enzima-sustrato/enzima-inhibidor y análisis de secuencias:**

El mecanismo del Orlistat como inhibidor de la lipasa, ha sido descrito como irreversible y competitivo, en el que se forma la unión covalente entre el residuo de serina (Ser) del sitio activo y el anillo de lactona del inhibidor<sup>17</sup>.

El uso de ensayos bioinformáticos es importante en el estudio de las interacciones proteína-ligando<sup>18,19</sup>. En este trabajo se utilizó el acoplamiento molecular para ilustrar y complementar los datos experimentales junto a su interpretación. El resultado de este acoplamiento es una visualización de la interacción entre la triada catalítica de la enzima y el inhibidor (Orlistat), resultados en los que se evidencia la interacción del inhibidor con el residuo de serina 153 de la enzima (figura 7), lo que es consistente con los ensayos experimentales, cálculos aplicados y que corresponde al mecanismo de inhibición esperado (inhibición competitiva).

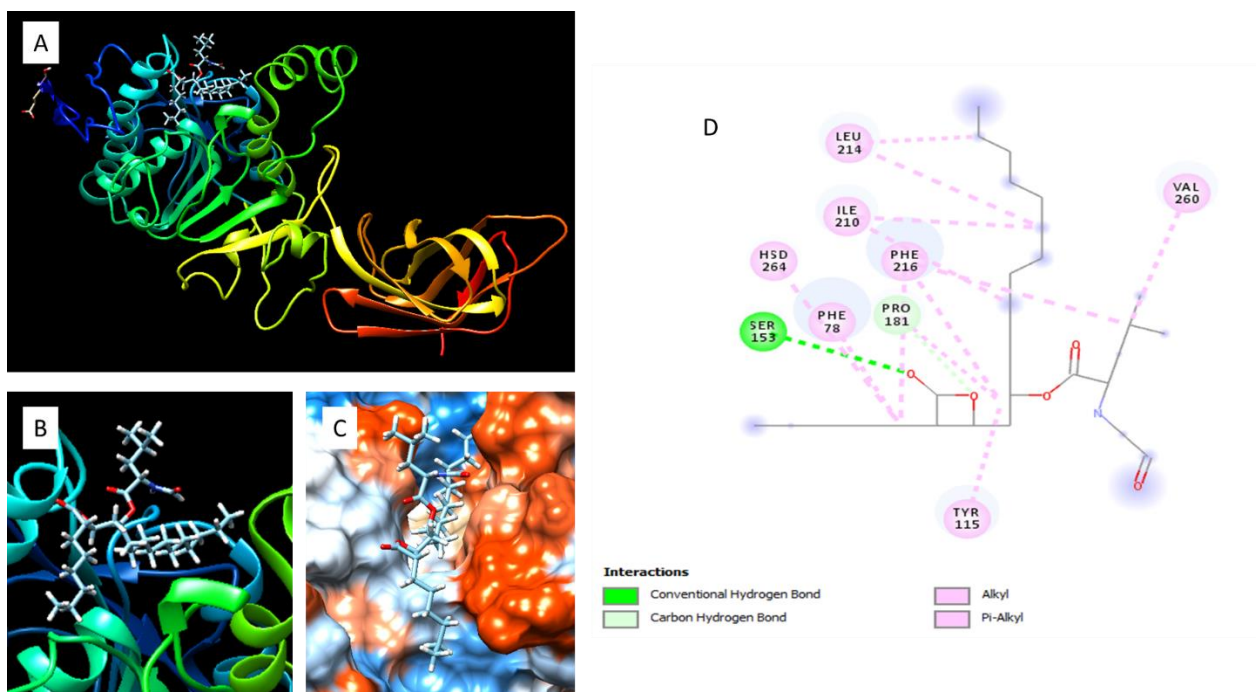


Figura 7. Acoplamiento molecular entre LPP y Orlistat: a. estructura LPP y Orlistat, b. sitio específico de unión, c. sitio de unión del Orlistat que interactúa con el bolsillo hidrofóbico de la enzima y d. interacciones visualizadas.

El acoplamiento molecular también fue aplicado a lipasas de distintos organismos y su interacción con sustrato (NPP) e inhibidor (Orlistat), la figura 8 muestra algunos resultados en los que el inhibidor se encuentra cerca del sitio activo.

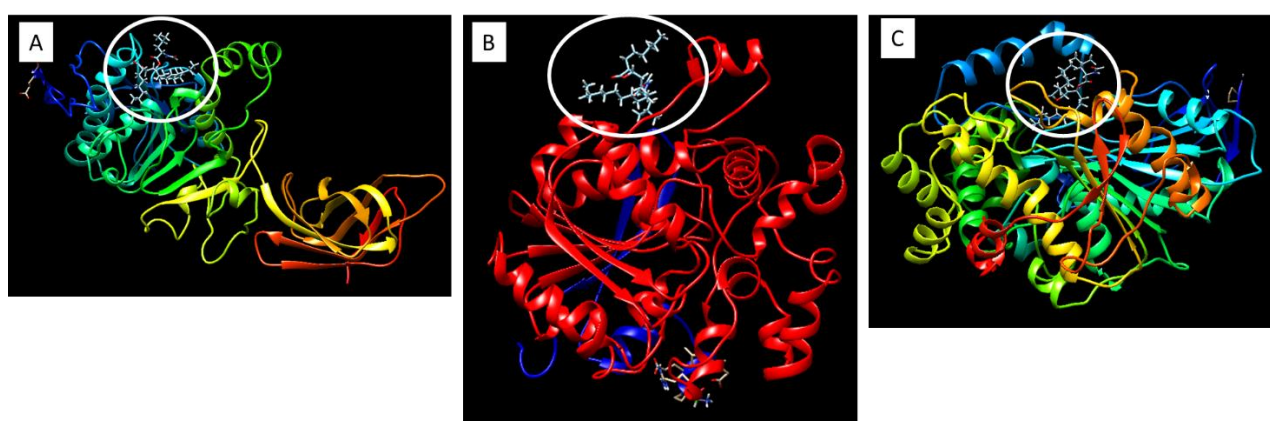
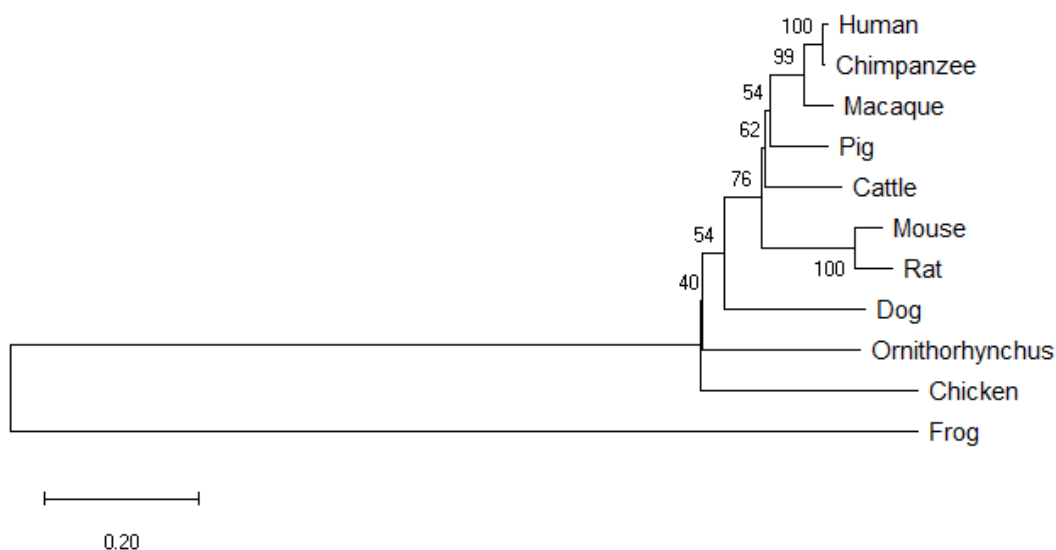


Figura 8. Acoplamiento molecular entre lipasas de diversos organismos y Orlistat: a. Lipasa porcina (1ETH), b. Lipasa humana (1HLG) y c. Lipasa de Candida Rugosa (1CRL)

La conexión entre lipasas de distintos organismos se puede explicar en términos de las relaciones evolutivas, lo que implica la conservación de secuencias, por lo que los resultados del análisis de secuencias, se fundamentaron en un alineamiento obtenido a partir de ClustaW (figura 9) y un árbol filogenético obtenido en MEGA X (figura 10), resultados en los que se evidencio una cercanía evolutiva entre la lipasa porcina (1ETH) y la lipasa humana (1HLG), lo que muestra un alto grado de conservación entre ambas secuencias proteicas y con lo que se justifica el uso de la lipasa pancreática porcina en el modelo de inhibición por Orlistat.

Papio_anubis	-MLLWTL SLLLGAVAGK EVCYERL GCFSDDSPMSGIVERPLHILPWAPKDVNTRFLLYT	59
Human	-MLPLWTL SLLLGAVAGK EVCYERL GCFSDDSPMSGITERPLHILPHSPKDVNTRFLLYT	59
Pongo_abelii	-MLPLWTL SLLLGAVAGK EVCYERL GCFSDDSPMSGIVERPLHILPHSPKDVNTRFLLYT	59
Delphinapterus_leucas	-MLLINTL SLLLGAVGK EICVYERL GCFSDSPMSGIVERPLKILPHAPKDVNTRFLLYT	59
Balaenoptera_acutorostrata_scammoni	-MLLINTL SLLLGAVGK EICVYERL GCFSDSPMSGIVERPLKILPHAPKDVNTRFLLYT	59
Eptesicus_fuscus	-MLLINTL SLLLGAVGK EICVYERL GCFSDSPMSGIVERPLKILPHAPKDVNTRFLLYT	59
Sus_scrofa	-MLLINTL SLLLGAVGK EICVYERL GCFSDSPMSGIVERPLKILPHAPKDVNTRFLLYT	59
Tupia_chinesis	-MLLWTL SLLLGAVGK EICVYERL GCFSDSPMSGIVERPLKILPHAPKDVNTRFLLYT	59
Papio_anubis	NENPNFQELVADSSSTISDSNFKTRNKRTRFIIHGFIDKGEENLNLANICKNLFQVESVNCI	119
Human	NENPNFQELVADSSSTISDSNFKTRNKRTRFIIHGFIDKGEENLNLANICKNLFQVESVNCI	119
Pongo_abelii	NENPNFQELVADSSSTISDSNFKTRNKRTRFIIHGFIDKGEENLNLADLCKNLFQVESVNCI	119
Delphinapterus_leucas	NENPNDFQLVADPSTITDSNFKTRNKRTRFIIHGFIDKGEENLNLANICKNLFQVESVNCI	119
Balaenoptera_acutorostrata_scammoni	NENPNDFQLVADPSTITDSNFKTRNKRTRFIIHGFIDKGEENLNLANICKNLFQVESVNCI	119
Eptesicus_fuscus	NENPNDFQLVADPSTITDSNFKTRNKRTRFIIHGFIDKGEENLNLANICKNLFQVESVNCI	119
Sus_scrofa	NENPNDFQLVADPSTITDSNFKTRNKRTRFIIHGFIDKGEENLNLANICKNLFQVESVNCI	119
Tupia_chinesis	NENPNDFQLVADPSTITDSNFKTRNKRTRFIIHGFIDKGEENLNLANICKNLFQVESVNCI	119
Papio_anubis	CVDNKGGSRTGYTQASQNIIRIVGAEVAYFVFLKSAFQYSPSSVHIIGHSLGAHAAGEAG	179
Human	CVDNKGGSRTGYTQASQNIIRIVGAEVAYFVFLKSAFQYSPSSVHIIGHSLGAHAAGEAG	179
Pongo_abelii	CVDNKGGSRTGYTQASQNIIRIVGAEVAYFVFLKSAFQYSPSSVHIIGHSLGAHAAGEAG	179
Delphinapterus_leucas	CVDNKGGSRTGYTQASQNIIRIVGAEVAYFVFLKSAFQYSPSSVHIIGHSLGAHAAGEAG	179
Balaenoptera_acutorostrata_scammoni	CVDNKGGSRTGYTQASQNIIRIVGAEVAYFVFLKSAFQYSPSSVHIIGHSLGAHAAGEAG	179
Eptesicus_fuscus	CVDNKGGSRTGYTQASQNIIRIVGAEVAYFVFLKSAFQYSPSSVHIIGHSLGAHAAGEAG	179
Sus_scrofa	CVDNKGGSRTGYTQASQNIIRIVGAEVAYFVFLKSAFQYSPSSVHIIGHSLGAHAAGEAG	179
Tupia_chinesis	CVDNKGGSRTGYTQASQNIIRIVGAEVAYFVFLKSAFQYSPSSVHIIGHSLGAHAAGEAG	179
Papio_anubis	RRTNGTIGRITGLDPAEPCFQGTPELVRLDPSDAQFVDVIHTDGAIPVNLGFGMSQVWG	239
Human	RRTNGTIGRITGLDPAEPCFQGTPELVRLDPSDAQFVDVIHTDGAIPVNLGFGMSQVWG	239
Pongo_abelii	RRTSGTIGRITGLDPAEPCFQGTPELVRLDPSDAQFVDVIHTDGAIPVNLGFGMSQVWG	239
Delphinapterus_leucas	RRTNGTIGRITGLDPAEPCFQGTPELVRLDPSDAQFVDVIHTDGAIPVNLGFGMSQVWG	239
Balaenoptera_acutorostrata_scammoni	RRTNGTIGRITGLDPAEPCFQGTPELVRLDPSDAQFVDVIHTDGAIPVNLGFGMSQVWG	239
Eptesicus_fuscus	RRTNGTIGRITGLDPAEPCFQGTPELVRLDPSDAQFVDVIHTDGAIPVNLGFGMSQVWG	239
Sus_scrofa	RRTNGTIGRITGLDPAEPCFQGTPELVRLDPSDAQFVDVIHTDGAIPVNLGFGMSQVWG	239
Tupia_chinesis	RRTNGTIGRITGLDPAEPCFQGTPELVRLDPSDAQFVDVIHTDGAIPVNLGFGMSQVWG	239
Papio_anubis	HLDFPFGGVEMPGCKNILSQIVDIDGIEGTRDFAAACNHLRSYKYTDSIVNPDGFGAG	299
Human	HLDFPFGGVEMPGCKNILSQIVDIDGIEGTRDFAAACNHLRSYKYTDSIVNPDGFGAG	299
Pongo_abelii	HLDFPFGGVEMPGCKNILSQIVDIDGIEGTRDFAAACNHLRSYKYTDSIVNPDGFGAG	299
Delphinapterus_leucas	HLDFPFGGVEMPGCKNILSQIVDIDGIEGTRDFAAACNHLRSYKYTDSIVNPDGFGAG	299
Balaenoptera_acutorostrata_scammoni	HLDFPFGGVEMPGCKNILSHIVDIDGIEGTRDFAAACNHLRSYKYTDSIVNPDGFGAG	299
Eptesicus_fuscus	HLDFPFGGVEMPGCKNILSQIVDIDGIEGTRDFAAACNHLRSYKYTDSIVNPDGFGAG	299
Sus_scrofa	HLDFPFGGVEMPGCKNILSQIVDIDGIEGTRDFAAACNHLRSYKYTDSIVNPDGFGAG	299
Tupia_chinesis	HLDFPFGGVEMPGCKNILSQIVDIDGIEGTRDFAAACNHLRSYKYTDSIVNPDGFGAG	299
Papio_anubis	FPCASYMFTANKCFPCPSGGCPQIGHYADRYSGKTNVDGQKFLYLDGASNFARIRYKV	359
Human	FPCASYMFTANKCFPCPSGGCPQIGHYADRYSGKTNVDGQKFLYLDGASNFARIRYKV	359
Pongo_abelii	FPCSSYVFTANKCFPCPSGGCPQIGHYADRYSGKTNVDGQKFLYLDGASNFARIRYKV	359
Delphinapterus_leucas	FPCASYVFSANKCFPCPSGGCPQIGHYADRYSGKTNVDGQKFLYLDGASNFARIRYKV	359
Balaenoptera_acutorostrata_scammoni	FPCASYVFSANKCFPCPSGGCPQIGHYADRYSGKTNVDGQKFLYLDGASNFARIRYKV	359
Eptesicus_fuscus	FPCASYVFSANKCFPCPSGGCPQIGHYADRYSGKTNVDGQKFLYLDGASNFARIRYKV	359
Sus_scrofa	FPCASYVFSANKCFPCPSGGCPQIGHYADRYSGKTNVDGQKFLYLDGASNFARIRYKV	359
Tupia_chinesis	FPCSSYVFTANKCFPCPSGGCPQIGHYADRYSGKTNVDGQKFLYLDGASNFARIRYKV	359

Figura 9. Alineamiento de secuencias de lipasas homologas de distintos organismos.



*Figura 10.* Relación evolutiva entre 11 enzimas homologas de LPP.

### 3. Conclusiones

El uso de métodos experimentales y simulaciones computacionales mejora la comprensión de la cinética enzimática, los mecanismos de inhibición y las interacciones de unión proteína-ligando, esto se concluye a partir de la evaluación de la cinética enzimática mediante la aplicación de modelos cinéticos y la determinación de dichos parámetros,  $K_m$  y  $V_{max}$ , que corresponden a 61mM y 74 $\mu$ M/min, respectivamente, la determinación del tipo de inhibición mediante las gráficas de Lineweaver-Burk y Dixon, con las cuales se evidencio una inhibición competitiva y su correlación con análisis bioinformáticos que incluyen acoplamiento molecular y análisis de secuencias, quienes permitieron la visualización de las interacciones enzima-ligando y la conservación del sitio activo de la enzima.

### Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Dios y a la vida, por permitirme y brindarme el tiempo para cumplir este sueño, uno muy anhelado.

A mis padres, quienes, con su esfuerzo, trabajo y dedicación, financiaron y apoyaron este sueño desde el primer hasta el último día ¡lo logramos!

A mi asesor de trabajo de grado, el Doctor Edwin Malagón, por su voto de confianza, paciencia, esfuerzo, orientación y horas de arduo trabajo, pues estos momentos representaron para mi crecimiento personal, académico y profesional.

A mis hermanos, Andrea Candela, Liliana Candela, por ser reflejo de una vida exitosa y a su vez, inspiración para llegar a esto, a Juan Candela, pero en especial a Sofia Viveros, por su compañía, escucha y apoyo constante durante este trayecto.

A mis amigos, en especial a Catherine Páez y Laura More por el apoyo y conocimiento que me brindaron siendo parte de la misma línea de investigación, a Angie Mendoza por su amistad y compañía permanente, a Estefanía Ávila por sus palabras de aliento.

Por último, pero no menos importante, a mis profesores, no solo los que conocí durante la carrera, sino también a los que conocí en el colegio, gracias porque de alguna manera forman parte de lo que ahora soy.

## Referencias

1. Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D. Lipases and Their Industrial Applications. An Overview. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2004, 118 (1-3), 155-170.
2. Fan, X.; Niehus, X.; Sandoval, G. Lipases as biocatalyst for biodiesel production. *Methods Mol. Biol.* 2012, 861, 471-483.
3. Lia, S.; Pana, J.; Hua, X.; Zhangb, Y.; Gongga, D.; Zhang, G. Kaempferol inhibits the activity of pancreatic lipase and its synergistic effect with orlistat. *J. Funct. Foods.* 2020, 104041.
4. Heck, A.M.; Yanocski, J.A.; Calis, K.A. Orlistat, a New Lipase Inhibitor for the Management of Obesity. *Pharmacotherapy.* 2000, 20(3), 270-279.

5. Deng, H. Li, W. Monoacylglycerol lipase inhibitors: modulators for lipid metabolism in cancer malignancy, neurological and metabolic disorders. *Acta Pharmac. Sin. B.* 2020, 10(4):582-602.
6. Karup, S.; Sakharkar, P. Three-Dimensional Visualization of Kinase Inhibitors as Therapeutically Relevant Examples To Reinforce Types of Enzyme Inhibitors. *J. Chem. Educ.* 2019, 96 (2), 296-303.
7. Rudnitskaya, A.; Török, B.; Török, D. Molecular Docking of Enzyme Inhibitors. *Biochem. Mol. Biol. Edu.* 2010, 38(4), 261-265.
8. Whiteley, C. G. (2000). Enzyme kinetics: partial and complete uncompetitive inhibition. *Biochemical Education*, 28(3), 144-147.
9. Locock, K., Tran, H., Codd, R., & Allan, R. (2015). Hands-On Approach to Structure Activity Relationships: The Synthesis, Testing, and Hansch Analysis of a Series of Acetylcholineesterase Inhibitors. *Journal of Chemical Education*, 92(10), 1745-1750.
10. Lewis, D.; Liu, D. Direct Measurement of Lipase Inhibition by Orlistat Using a Dissolution Linked In Vitro Assay. *Clin Pharmacol Biopharm.* 2012, 1: 1000103.
11. Guo, J.; Cheng, C.; Wang, S.; Huang, X. A convenient test for lipase activity in aqueous-based solutions. *Enzyme Microb. Technol.* 2015, 71, 8-12
12. Chi, H.; Jain, H. Teaching Computing to STEM Students via Visualization Tools. *Procedia Comput. Sci.* 2011, 4, 1937-1943.
13. Hanwell, M.D.; Curtis, D.E.; Lonie, D.C.; Vandermeersch, T. Zurek, E.; Hutchison, G.R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform, *J. Cheminformatics.* 2012, 4, 1–17.
14. Grosdidier, A.; Zoete, V.; Michielin, O. Swisdock a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, 270–277.
15. Pettersen, E.; Goddard, T.; Huang, C. Couch, G., Greenblatt, D.; Meng, E. Ferrin, T.



- UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. J. Compt. Chem. 2005, 25, 1605-1612.
16. Burlingham, B.; Widlanski, T. An Intuitive Look at the Relationship of  $K_i$  and  $IC_{50}$ : A More General Use for the Dixon Plot. J. Chem. Educ. 2003, 80 (2), 214-218.
17. Liu, T.; Liu, X.; Chen, Q.; Shi, Y. Lipase Inhibitors for Obesity: A Review. Biomed. Pharmacother. 2020, 128, 110314.
18. Haworth, N.; Martin, L. Biomolecules Come Alive: A Computer-Based Laboratory Experiment for Chemistry Students. J. Chem. Educ. 2018, 95 (12), 2256-2262.
19. Worrall, A.; Bergstrom, P.; Young, D.; Wormald, S. Cahill, S.; Stewart, M. Benefits of Simulations as Remote Exercises During the COVID-19 Pandemic: An Enzyme Kinetics Case Study. J. Chem. Educ. 2020, in press.

