

CAPÍTULO 2

Efeitos inibitórios das antocianinas sobre a absorção de amido e triglicerídeos: uma revisão

Tamires Barlati Vieira da Silva, Tatiane Francielli Vieira, Adelar Bracht, Rosane Marina Peralta

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-994457-7-4.c2>

Resumo

As antocianinas são compostos fenólicos, pertencentes à família dos flavonoides, normalmente encontrados em flores, frutos e tubérculos de coloração vermelha, roxa e azul. Tem sido proposto que o consumo regular das antocianinas reduz o risco de desenvolvimento de várias doenças, como aterosclerose, dislipidemias e diabetes, com consequentes benefícios potenciais para a saúde. O retardo da digestão de materiais amiláceos e dissacarídeos pela inibição das amilases (salivar e pancreática) e alfa-glucosidases intestinais pode ser considerada como uma abordagem terapêutica adequada para controlar a hiperglicemia pós-prandial em pré-diabetes. Da mesma forma, pode-se considerar o retardo da absorção dos ácidos graxos provenientes dos triglicerídeos da dieta em virtude da inibição da lipase pancreática ou de outra etapa do processo de absorção, que é bastante complexo, como uma abordagem terapêutica para controlar dislipidemias. Esta revisão tem como objetivo compilar e discutir recentes evidências da inibição de amilases e lipases pelas diferentes antocianinas, bem como comparar métodos *in vitro* e *in vivo* utilizados na avaliação destes fenômenos.

Palavras-chave: amido, amilases, antocianinas, enzimas digestivas, lipases, triglicerídeos.

1. Introdução

A obesidade e o diabetes são problemas de saúde pública mundial, com custos sociais incalculáveis (GAMBOA-GÓMEZ *et al.*, 2015). Muitos medicamentos têm sido utilizados para controlar tanto a obesidade quanto o diabetes ao longo dos anos. Uma das abordagens farmacológicas para o

controle da obesidade e do diabetes é a utilização de inibidores das enzimas digestivas, amilases e α -glucosidase intestinal e lipase pancreática (BIALECKA-FLORJANCZYK *et al.*, 2018; RÍOS; FRANCINI; SCHINELLA, 2015).

As α -1,4-glucan-4-glucanoidrolases (EC 3.2.1.1.) são enzimas pertencentes à família 13 das glicosídeo-hidrolases (GH), encontradas na saliva e no suco pancreático e conhecidas pelo nome comum de α -amilases (DASTJERDI; NAMJOYAN; AZEMI, 2015; PROENÇA *et al.*, 2019). Nos seres humanos, as α -amilases são produzidas principalmente no pâncreas e nas glândulas salivares. As α -amilases salivar e pancreática humana, junto com as glucosidases intestinais, promovem a digestão dos materiais amiláceos, hidrolisando as ligações α -1,4-glicosídicas de polímeros como amido, amilose, amilopectina, glicogênio e vários maltooligossacarídeos (SANTOS; FREITAS; FERNANDES, 2018; SUN; WARREN; GIDLEY, 2019). O retardo da absorção de glicose pela inibição da α -amilase e da α -glucosidase no trato digestivo tem sido sugerido como uma abordagem terapêutica para o diabetes tipo 2 e como uma estratégia de combate ao sobrepeso e à obesidade.

A lipase humana (EC 3.1.1.3) pertence a um grupo de enzimas que inclui lipases pancreáticas, endoteliais, hepáticas e outras lipases lipoproteicas que possuem semelhança estrutural. As lipases pancreáticas são enzimas exócrinas do suco pancreático, essenciais para a digestão de gorduras alimentares no lúmen intestinal, desempenhando um papel fundamental na decomposição dos triglicerídeos dietéticos em ácidos graxos livres circulantes e monoacilgliceróis (RAJAN; PALANISWAMY; MOHANKUMAR, 2020; SEYEDAN *et al.*, 2015). Por ser responsável pela hidrólise dos triglicerídeos, a lipase pancreática contribui para que a gordura proveniente da dieta seja absorvida pelas células intestinais. Sua inibição pode auxiliar no controle da absorção de triglicerídeos no intestino, sendo então eficaz no combate ao sobrepeso e à obesidade (FABRONI *et al.*, 2016; RAJAN; PALANISWAMY; MOHANKUMAR, 2020).

Inibidores das enzimas envolvidas na digestão do amido como a acarbose, miglitol e voglibose são amplamente utilizados como drogas orais para controlar a glicemia, pois diminuem a hiperglicemia pós-prandial o que também atenua a secreção de insulina. Embora apresentem um bom perfil de

segurança, efeitos adversos gastrointestinais podem limitar a adesão a longo prazo à terapia (NEUSER *et al.*, 2005).

No caso das lipases pancreáticas o inibidor clássico é o orlistat (tetraidrolipstatina). O composto, um derivado sintético da lipstatina, produzido naturalmente por *Streptomyces toxytricini*, é um inibidor potente, específico e irreversível tanto das lipases pancreáticas como gástricas (HADVÁRY; LENGSELD; WOLFER, 1988). Sua atividade é exercida através da formação de uma ligação covalente com o sítio ativo das lipases gástricas e pancreáticas no lúmen do trato gastrointestinal. Essa ação evita que essas enzimas hidrolisem a gordura alimentar (na forma de triglicerídeos) em ácidos graxos livres absorvíveis e monogliceróis, sendo os triglicerídeos não digeridos eliminados pela via fecal (HADVÁRY *et al.*, 1991). Contudo, assim como para os inibidores das glucosidases, o uso contínuo e prolongado do orlistat causa efeitos colaterais acentuados, como desconforto gastrointestinal, flatulência, cólicas abdominais e diarreia (AWOSIKA; ALUKO, 2019; GUTIÉRREZ-GRIJALVA *et al.*, 2019).

Compostos naturais presentes na alimentação têm sido explorados como potenciais ferramentas seguras no tratamento da obesidade e do diabetes. Alimentos ricos em compostos fenólicos da dieta têm atraído muito interesse devido às suas propriedades biológicas benéficas, que podem desempenhar um papel importante na manutenção da saúde humana. Diversos estudos têm demonstrado que extratos vegetais ricos em ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas exercem efeitos inibitórios sobre as lipases e amilases e poderiam, em tese, ser utilizados para reduzir a absorção de lipídeos e carboidratos complexos (CHIOU *et al.*, 2018). As antocianinas são excelentes opções para serem utilizadas como adjuvantes no controle da obesidade e do diabetes tipo 2, uma vez que, além das potenciais atividades inibidoras de lipases e amilases, apresentam consideráveis capacidades antioxidantes e anti-inflamatórias (FALLAH; SARMAST; JAFARI, 2020; LUNA-VITAL *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020).

O presente capítulo tem como objetivo fornecer uma contribuição atualizada, ampla e crítica sobre a ação inibitória das antocianinas sobre a absorção do amido e dos triglicerídeos, como resultado, principalmente, de sua capacidade em inibir as enzimas digestivas amilases e lipases. Estudos *in vitro*

e *in vivo* foram considerados. Para a seleção dos artigos científicos, foram utilizadas as bases de dados Science Direct, Pubmed e Web of Science considerando preferencialmente os artigos publicados nos últimos 5 anos (2016-2020). Os termos de busca foram “inibidores de amilase” (*amylase inhibitors*) em associação com antocianinas (*anthocyanins*) e “inibidores de lipase” (*lipase inhibitors*) em associação com antocianinas (*anthocyanins*).

2. Antocianinas

As antocianinas são compostos fenólicos pertencentes à família dos flavonóides, normalmente encontradas em flores, frutos e tubérculos de coloração vermelha, roxa e azul. Estes compostos têm sido utilizados nas indústrias de alimentos, normalmente como corantes, e na medicina popular, devido aos seus efeitos benéficos. Sua estabilidade varia com sua estrutura e é dependente do pH, da luz e da temperatura (KHOO *et al.*, 2017; LÓPEZ *et al.*, 2019). Sua estrutura molecular geral está mostrada na Figura 1.

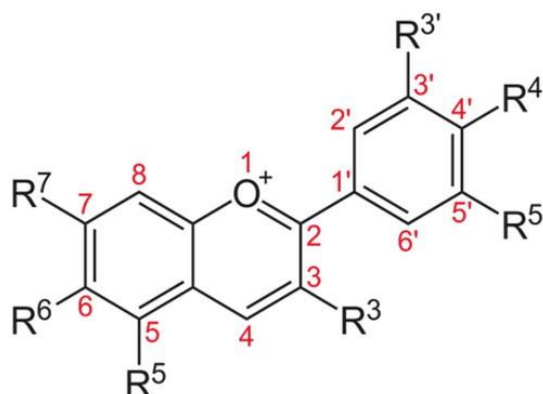


Figura 1. Estrutura básica das antocianinas. Fonte: KHOO *et al.* (2017).

Estes compostos aparecem frequentemente conjugados a açúcares (glicosídeos) que por sua vez podem estar acilados (antocianinas aciladas) (KHOO *et al.*, 2017). Quando encontrados em sua forma genuína (aglicona), são conhecidos como antocianidinas, sendo agrupadas em 3-hidroxiantocianidinas, 3-desoxiantocianidinas e antocianidinas O-metiladas (CELLI, TAN, SELIG, 2019; KHOO *et al.*, 2017).

Existem mais de 500 tipos de antocianinas na natureza, mas somente 23 agliconas (antocianidinas) são conhecidas, das quais apenas 6 são onipresentes, sendo essas: cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, pelargonidina e malvidina. Elas diferem entre si principalmente pelo número de grupos hidroxila, conforme ilustra a Tabela 1, que relaciona os diferentes grupos R e R' de cada antocianidina. As antocianinas diferem pela natureza e número de açúcares em sua estrutura (ligados aos grupos OH), pelos carboxilatos alifáticos ou aromáticos ligados aos açúcares e pelas posições dessas ligações (ALI; ALMAGRIBI; AL-RASHIDI, 2016; SUI; ZHANG; ZHOU, 2016).

Tabela 1. As seis principais antocianidinas encontradas em plantas com os grupos passíveis de substituição para formar as antocianinas (ver detalhes no texto).

Antocianidinas	Padrão de substituição						
	R3	R5	R6	R7	R3'	R4'	R5'
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	H
Delphinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH
Peonidina	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	H
Pelargonidina	OH	OH	H	OH	H	OH	H
Petunidina	OH	OH	H	OH	OH	OH	OCH ₃
Malvidina	OH	OH	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃

Fonte: KHOO *et al.* (2017).

2.1. Fontes de antocianinas

As antocianinas perfazem grande parte dos pigmentos solúveis em água que conferem cores vermelha, azul e roxa às plantas, flores, frutas, vegetais e resíduos provenientes de frutas e vegetais, como casca e bagaço (GUO; XIA, 2018; LIU *et al.*, 2018; RODRIGUEZ-AMAYA, 2019). Elas estão presentes principalmente em chás; frutas como maçãs, uvas, ameixas, morangos, mirtilos e amoras; legumes como repolho roxo, cebola roxa e berinjela; e bebidas como vinho tinto e suco de uva (GUVEN; ARICI; SIMSEK, 2019; KENT *et al.*, 2017).

A variedade na composição em antocianinas dos alimentos está relacionada com cultivar/variedade, maturação, práticas de cultivo, localização das plantações, diferenças climáticas, processamento e armazenamento. Entre outros fatores, que também podem afetar a cor e a estabilidade das antocianinas, estas moléculas podem ser afetadas por temperatura, pH, luz, oxigênio, enzimas, íons metálicos, outros flavonóides e fenólicos, ácido ascórbico, açúcares e sulfitos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019). Na Figura 2 podemos observar alguns exemplos de alimentos que possuem alto teor de antocianinas.



Figura 2. Alimentos ricos em antocianinas. Fonte: Autoria própria.

Além das partes comestíveis das plantas, a recuperação de compostos bioativos, incluindo as antocianinas, a partir de resíduos e subprodutos industriais (partes não comestíveis) vem atraindo cada vez mais interesse de diversas indústrias, no âmbito de uma ótica de aproveitamento total e recuperação de compostos de alto valor agregado, com eficiência e sustentabilidade (BARBA *et al.*, 2016; YAMASHITA *et al.*, 2017). Após a extração desses compostos dos resíduos, eles podem ser aplicados como enriquecimento em produtos alimentícios, aprimorando suas propriedades

sensoriais, melhorando seu valor nutricional e os benefícios à saúde (MALIK; ERGINKAYA, ERTEN, 2019).

2.2. Antocianinas como inibidores de enzimas digestivas

2.2.1. Antocianinas como inibidoras de amilases

Diversos estudos experimentais descrevem o efeito antidiabético das antocianinas, apontando-as como compostos promissores, e dentre tais estudos, a maioria parte do princípio de que as antocianinas agem inibindo as enzimas digestivas de carboidratos, como a α -amilase e a α -glucosidase (GOWD; JIA; CHEN, 2017).

Esta atribuição não deixa de ter alguma incerteza, no entanto, já que normalmente extratos de frutas e flores são investigados. Estes extratos contêm vários compostos fenólicos, o que dificulta a atribuição da atividade inibidora a apenas um determinado composto (GOWD; JIA; CHEN, 2017).

Na Tabela 2 são descritos resumidamente estudos que evidenciam a associação das antocianinas com a inibição de enzimas, tais como α -amilases e α -glucosidases.

Tabela 2. Estudos que associam a inibição de amilases a extratos ricos em antocianinas.

Extratos e/ou substâncias puras	Principais resultados	Referência
Extratos de groselhas pretas (BC) e verdes (GC).	Foram identificados teores de antocianinas específicas em maiores quantidades nas BC quando comparados às GC. Embora os dois tipos de extrato tenham apresentado efeitos inibitórios significativos sobre a α -amilase salivar humana, somente o das BC inibiram a α -glicosidase de levedura e com maior intensidade do que a droga comercial acarbose.	(BARIK <i>et al.</i> , 2020)
Pelargonidina-3-O-rutinosídeo (Pg3R)	O Pg3R foi isolado de morangos, revelou-se um potente inibidor da α -glicosidase que demonstrou possuir potencial em melhorar a hiperglicemia pós-prandial. A análise de docking molecular permitiu obter uma visão aprofundada da relação estrutura-atividade no que se refere à inibição da α -glicosidase pelas antocianinas naturais em geral.	(XU <i>et al.</i> , 2019)
Cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-rutinosídeo e peonidina-3-glicosídeo	As antocianinas estudadas mostraram inibição competitiva da α -amilase pancreática suína <i>in vitro</i> , com diferentes potências, mas a maior delas foi observada para a cianidina-3-glicosídeo. Em todos os casos a inibição ocorreu em concentrações na faixa milimolar. Por meio do estudo <i>in silico</i> (docking molecular) verificou-se que as quatro antocianinas ocupavam o sítio ativo da α -amilase pancreática suína formando ligações de hidrogênio.	(SUI; ZHANG; ZHOU, 2016)
Extratos de mirtilo (<i>Vaccinium uliginosum</i> L.), mirtilo (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.), amora (<i>Morus alba</i> L.) e oxicoco (<i>cranberry</i> ; <i>Vaccinium</i>	Todos os extratos apresentaram inibição da α -glicosidase, sendo a maior atividade observada para o de amora, seguida pelo do mirtilo (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.), mirtilo (<i>Vaccinium uliginosum</i> L.) e oxicoco, respectivamente. No ensaio enzimático da proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), o maior efeito inibitório foi observado para o extrato de mirtilo (<i>Vaccinium uliginosum</i> L.), seguido pelo de mirtilo (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.), amora e oxicoco,	(XIAO <i>et al.</i> , 2017)

oxycoccos L.)	respectivamente. O docking molecular revelou que as agliconas de cianidina apresentaram dois locais de ligação na PTP1B, apresentando assim a maior atividade de inibição desta enzima.	
Extrato de casca de feijão preto	O extrato de antocianinas da casca do feijão preto foi capaz de inibir mais efetivamente a α -glicosidase, seguido por α -amilase e dipeptidil peptidase-IV, respectivamente, além de diminuir as espécies reativas de oxigênio e, diminuir a captação de glicose, apresentando importante potencial biológico que pode contribuir para modular marcadores de diabetes.	(MOJICA <i>et al.</i> , 2017)
Extratos de mirtilo, groselha preta e madressilva azul	As antocianidinas extraídas do mirtilo, da groselha preta e da madressilva azul mostraram-se inibidoras do tipo misto da α -glucosidase. Por apresentarem mais grupos hidroxila no anel B, as antocianidinas obtidas a partir de groselha preta e madressilva azul apresentaram maior potencial inibidor. Por meio do ensaio de extinção de fluorescência, verificou-se que a inibição da α -glicosidase pela antocianidina consiste em um processo estático. O docking molecular revelou que todas as antocianidinas podem ligar ao sítio ativo da α -glicosidase e impedem o acesso ao p-nitrofenil-alfa -D-glucopiranosídeo (substrato).	(ZHANG <i>et al.</i> , 2019)
Cianidina 3-glicosídeo, delphinidina 3-glicosídeo, malvidina 3-glicosídeo, peonidina 3-glicosídeo e petunidina 3-glicosídeo e as correspondentes agliconas	Foi feito um estudo comparativo da atividade inibidora dos compostos relacionados ao lado mais a acarbose sobre a α -glicosidase de levedura. O IC_{50} da acarbose foi igual a $4,03 \times 10^{-4}$ M. Vários dos compostos relacionados, principalmente as agliconas, apresentaram IC_{50} inferiores a 10^{-4} M, mais potentes que a acarbose, portanto. Os glicosídeos tenderam a apresentar valores de IC_{50} maiores, mais próximos ao da acarbose. O inibidor mais potente foi a aglicona delphinidina (IC_{50} de $1,25 \times 10^{-5}$ M); o menos potente foi o peonidina 3-glicosídeo (IC_{50} de $4,54 \times 10^{-4}$ M)	(ZHANG <i>et al.</i> , 2019)

Extratos de variedades de cereja azeda húngara e correspondentes cianidinas purificadas (cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, malvidina-3-glicosídeo e malvidina-3,5-diglicosídeo)	Estudos cinéticos revelaram que os extratos de cereja azeda e as antocianinas selecionadas inibiram competitivamente a hidrólise catalisada pela alfa-amilase salivar humana. As variedades de cereja azeda húngara, especialmente “Cigánymeggy” e “VN1”, podem ser consideradas como fontes potenciais de antocianinas para aplicações em escala industrial.	(HOMOKI <i>et al.</i> , 2016)
Extratos de cultivares de batata roxa e vermelha	Os extratos de tubérculos de polpa roxa apresentaram maiores conteúdos totais de antocianinas quando comparado aos obtidos em batata vermelha e mostraram inibir mais eficazmente a α -amilase, a α -glicosidase e a aldose redutase. Os estudos cinéticos mostraram que as antocianinas são inibidores não competitivos da α -amilase e da α -glicosidase.	(KALITA <i>et al.</i> , 2018)
Extrato de cenoura preta (<i>Daucus carota</i> subespécie <i>sativus</i> var. <i>atrorubens</i> Alef.)	O estudo revelou que o extrato de cenoura preta purificado inibe as enzimas α -amilase, α -glicosidase e DPP-IV de modo mais efetivo do que a acarbose e a vildagliptina. O estudo <i>in silico</i> , usado para identificar a antocianina individual que contribuiu amplamente para a inibição, mostrou que o cianidina 3-xilosil galactosídeo interagiu fortemente com a enzima, sendo esta considerada a molécula mais promissora a ser investigada por suas propriedades antidiabéticas.	(KARKUTE <i>et al.</i> , 2018)

Tabela 3. Estudos que associam a inibição da lipase a extratos ricos em antocianinas ou antocianinas purificadas.

Extratos e/ou substâncias puras	Principais resultados	Referência
Extratos de laranja sanguínea, romã, amora preta, amora, sumagre, casca de laranja sanguínea, brotos jovens de limão, repolho roxo, couve-flor violeta, feijão preto, arroz preto e casca de arroz preto.	A atividade inibitória sobre a lipase pancreática <i>in vitro</i> dos extratos liofilizados foi avaliada e uma forte relação foi observada entre o conteúdo total de antocianinas e a inibição da lipase pancreática. As maiores inibições foram observadas para os extratos de laranja sanguínea e suco de romã, que apresentaram o maior conteúdo de antocianinas totais. Foi levantada a hipótese de que o alto potencial em inibir a lipase pancreática dos extratos contendo antocianinas está relacionado a uma ação sinérgica das antocianinas individuais.	(FABRONI <i>et al.</i> , 2016)
Cianidina e cianidina-3-glicosídeo derivados de <i>Vigna unguiculata</i>	O estudo identificou e avaliou os inibidores da lipase pancreática da leguminosa <i>Vigna unguiculata</i> revelando que a glicosilação das antocianidinas reduz significativamente a inibição da lipase. A inibição foi do tipo não-competitiva.	(VIJAYARAJ; NAKAGAWA; YAMAKI, 2019)
Extratos de arroz negro (<i>Oryza sativa</i> L.)	O estudo avaliou sistematicamente a inibição da absorção do colesterol. Foi verificado que os extratos aquosos de arroz negro (BRE), os extratos etanólicos e uma fração obtida do fracionamento com uma resina macroporosa causaram a redução da absorção do colesterol pela inibição da lipase pancreática, diminuindo a solubilidade do colesterol micelar e suprimindo a captação do colesterol nas células Caco-2. A inibição foi positivamente associada ao conteúdo de antocianinas (cianidina-3-glicosídeo (Cy-3-G) e peonidina-3-glicosídeo (Pn-3-G)) dos extratos, que apresentaram modo inibitório competitivo. Assim, considerou-se o arroz preto como fonte natural ideal para reduzir a absorção do colesterol, podendo suas antocianinas serem aplicadas na prevenção e no tratamento da hipercolesterolemia.	(YAO, S. <i>et al.</i> , 2013)
Cianidina-3-	Os mecanismos hipolipemiantes da C3R por meio da inibição da digestão e	(THILAVECH;

rutinosídeo (C3R)	absorção lipídica <i>in vitro</i> foram investigados por ensaios fluorométricos enzimáticos e colorimétricos enzimáticos, e demonstrou-se que o comportamento da C3R foi de inibidor competitivo de tipo misto da lipase pancreática, inibindo também a esterase do colesterol pancreático em cerca de 5-18%, a formação de micelas de colesterol e a ligação do ácido biliar. Houve também redução da micelização do colesterol. Sugeriu-se, portanto, o C3R como um composto com propriedades anti-hiperlipidêmicas promissoras.	ADISAKWATTANA, 2019)
Fitoquímicos da arônia	O objeto deste estudo foi uma possível ação preventiva dos fitoquímicos da arônia sobre o acúmulo de gordura visceral. O estudo avaliou a hiperlipidemia pós-prandial após a carga de óleo de milho em ratos, a atividade da lipase pancreática <i>in vitro</i> e a resposta glicêmica plasmática após a carga de sacarose. Os fitoquímicos inibiram significativamente os aumentos nos níveis de triglicerídeos no plasma nos testes de tolerância ao óleo de milho administrado oralmente. Também inibiram significativamente os aumentos nos níveis de glicose no sangue nos testes de tolerância à sacarose, sugerindo que tais fitoquímicos, ricos em antocianinas, suprimem o acúmulo de gordura visceral e a hiperglicemia, inibindo a atividade da lipase pancreática e/ou a absorção intestinal de lipídios.	(TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2015)
Extratos de <i>Cornus mas</i> (Cm) e <i>Cornus alba</i> (Ca)	Foram investigadas e comparadas as atividades inibitórias <i>in vitro</i> sobre a lipase pancreática (PL) e sobre a α-amilase dos extratos aquoso e etanólico de frutas frescas liofilizadas e frutas secas adquiridas comercialmente de <i>C. mas</i>, bem como de frutas frescas de <i>C. alba</i>. Por meio da identificação de constituintes guiada por bioensaio, o estudo revelou que os flavonóides e derivados do ácido fenólico da Ca provavelmente inibem a atividade da PL em maior extensão do que os componentes da Cm. Considerando a atividade do Cm, foi estabelecido que as antocianinas, podem ser responsáveis pela inibição das enzimas pancreáticas. No entanto, a composição complexa dos extratos pareceu ser mais eficaz devido ao potencial de atividade sinérgica ou aditiva de seus constituintes. Os resultados mostraram também que os extratos de frutas secas disponíveis no mercado foram menos ativos do que os de frutas frescas colhidas e liofilizadas, provavelmente devido à menor quantidade de antocianinas, indicando que o consumo de frutas frescas traz	(SWIERCZEWSKA <i>et al.</i> , 2018)

	benefícios à saúde. Todos os extratos testados foram inibidores da atividade da PL mais fortes do que os inibidores da atividade da α -amilase.	
Chá <i>Sunrouge</i> (SR), SR segunda safra (SR2), SR terceira safra (SR3) e <i>Yabukita</i> (YK)	No estudo <i>in vitro</i>, SRs ricos em antocianinas produziram forte inibição da lipase, em comparação ao YK. No entanto, embora SR2 contivesse altos níveis de antocianinas, não mostrou o maior efeito inibitório contra a lipase. As catequinas do tipo galato, como galato de epigallocatequina, podem representar um dos componentes inibidores da lipase do SR. O estudo <i>in vivo</i> mostrou que o purê de SR2 pode inibir a atividade da lipase e suprimir a absorção de gordura do intestino delgado, já que o aumento na concentração plasmática de triacilglicerol após a administração oral de óleo a camundongos foi significativamente suprimido. Nos grupos YK e controle a concentração plasmática de TG não diferiu significativamente.	(SHIRAI, 2017)
Extrato da casca de jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i>) e cianidina-3-O-glicosídeo	A cianidina-3-O-glicosídeo é um importante constituinte do extrato da casca da jaboticaba. No estudo os efeitos do extrato sobre a absorção de triglicerídeos e amido em camundongos foram comparados com os da cianidina-3-O-glicosídeo. O extrato inibiu a absorção de triglicerídeos e amido <i>in vivo</i>, mas foi aproximadamente 100 vezes mais potente no primeiro caso do que neste último, com 50% de inibição com uma dose de 3,5 mg/kg. Já a cianidina-3-O-glicosídeo não inibiu a absorção de amido com doses de até 20 mg/kg, mas produziu 72% de inibição da absorção de triglicerídeos na dose de 2 mg/kg. Tanto o extrato como a cianidina-3-O-glicosídeo inibiram a lipase pancreática, mas o efeito <i>in vivo</i> não pode ser explicado somente em termos desta ação. Muito provavelmente há também uma inibição direta de pelo menos uma das etapas que levam à absorção dos ácidos graxos livres, já que ambos, extrato e cianidina-3-O-glicosídeo, inibiram a co-absorção de ácido oleico livre e glicerol. A conclusão é que o extrato de casca de jaboticaba como também a cianidina-3-O-glicosídeo apresentam perspectivas amplamente favoráveis ao seu uso como adjuvantes medicamentosos.	(CASTILHO <i>et al.</i> , 2021)

2.2.2. Antocianinas como inibidoras de lipases

Diversos estudos já empregaram compostos purificados e extratos naturais para avaliar o efeito inibitório das antocianinas sobre a lipase (SEYEDAN et al., 2015; VIJAYARAJ; NAKAGAWA; YAMAKI, 2019). Na Tabela 3, estudos que evidenciam o poder inibitório das antocianinas sobre as lipases são descritos. Não há muitos estudos *in vivo*, o que seria altamente desejável. Neste aspecto cabe destacar o estudo de Yao et al. (2013) sobre os efeitos dos extratos de arroz negro sobre a absorção de colesterol, o de Takahashi et al. (2015) sobre a inibição do acúmulo de gordura visceral pelos fitoquímicos da arônia e o recente estudo de Castilho et al. (2021) acerca dos efeitos do extrato da casca de jabuticaba sobre a absorção de triglicerídeos. Este último estudo merece também destaque pelo fato de ter sido feita uma comparação dos efeitos *in vivo* do extrato da casca com os efeitos de um dos seus constituintes cianidínicos, mais precisamente, a cianidina-3-O-glicosídeo.

2.2.3. Métodos clássicos para avaliação da atividade inibidora das antocianinas sobre amilases e lipases

A caracterização de inibidores é fundamental para qualquer pesquisa que busque a descoberta de novos medicamentos ou adjuvantes em tratamentos que visem a melhoria da qualidade de vida de indivíduos afetados pela obesidade ou diabetes tipo 2. Devido ao grande número de parâmetros que precisam ser avaliados, é importante determinar quais são os mais importantes e manter estes sob foco constante (CESCO et al., 2017). Uma abordagem multidisciplinar é necessária quando se utilizam plantas como fonte farmacológica, pois um bom resultado dependerá diretamente de uma série de ensaios *in vitro* e *in vivo* cuidadosamente selecionados. A escolha dos métodos deve ser ajustada prezando sempre uma boa reprodutibilidade (ATANASOV et al., 2015).

2.2.3.1. Métodos *in vitro*

Os métodos de avaliação da inibição enzimática *in vitro* são relativamente simples. Na maioria das vezes, em ensaios enzimáticos, são utilizados substratos de preferência naturais ou análogos sintéticos em concentração fisiológica e o pH do experimento é alterado de acordo com o

adequado para cada tipo de enzima. Eventualmente podem ser utilizados substratos sintéticos, sobretudo quando isto facilita as medidas. A inibição é avaliada com base na determinação da velocidade da reação inicial catalisada pela enzima na ausência e presença de um possível inibidor. A inibição das enzimas pode ser quantificada *in vitro* por uma variedade de ensaios de atividade que frequentemente consistem em medidas espectrofotométricas. Métodos espectrofotométricos no caso das amilases são, por exemplo, a formação do complexo iodo-amido, os vários métodos de açúcares redutores e o método do p-nitrofenil- α -D-maltosídeo. Alternativamente, pode-se usar no ensaio das amilases derivados fluorogênicos como o p-nitrophenyl-maltopentaosídeo. A hidrólise deste composto resulta num aumento da fluorescência que é proporcional à atividade hidrolítica da enzima.

Para as lipases frequentemente são utilizados substratos lipídicos insolúveis em água como o butirato de p-nitrofenil (PNPB) e o 2,3-dimercapto-1-propanol tributirato (BALB) (RAHIM, TAKAHASHI, YAMAKI, 2015; BARRETT, FARHADI, SMITH, 2018; SUN, WARREN, GIDLEY, 2019; KANBARKAR, MISHRA, KHANAL, 2020). Outros substratos cromogênicos alternativos para as lipases são os ésteres de p-nitrofenol com ácidos orgânicos. Sua determinação também pode ser feita na presença de polissorbato e um sal de cálcio, fornecendo o precipitado de cálcio e um ácido graxo que dispersa a luz (POHANKA, 2019).

O grau de inibição é geralmente caracterizado pelo valor de “IC₅₀” do sistema experimental, que representa a concentração de inibidor necessária para reduzir a atividade de uma enzima específica em 50%. No entanto, este valor é função da concentração do substrato. No caso das inibições competitiva e mista, aumentos na concentração do substrato levam a aumentos no valor de IC₅₀. O contrário ocorre com a inibição incompetitiva, um tipo de inibição que é bastante raro, no entanto. Assim, uma boa prática é a de sempre especificar a concentração do substrato quando o valor de IC₅₀ for determinado (BARRETT; FARHADI; SMITH, 2018; SUN; WARREN; GIDLEY, 2019).

Após a identificação da inibição da enzima por algum inibidor isolado ou extrato, torna-se necessário avaliar que tipo de inibição foi causada. Tanto as amilases quanto as lipases são enzimas que obedecem à cinética de Michaelis-Menten,

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

onde v é a velocidade de reação, $[S]$ a concentração do substrato, K_M a constante de Michaelis-Menten e $V_{\max}$ a velocidade máxima (função da concentração da enzima). Deve-se mencionar, no entanto, que as lipases podem apresentar o fenômeno da inibição por substrato (CASTILHO et al., 2021).

Medir a curva de saturação do substrato na presença de diferentes concentrações do inibidor possibilitará avaliar se o inibidor causa uma inibição competitiva, não-competitiva, mista ou mesmo incompetitiva (ARSALAN; YOUNUS, 2018; SUN; WARREN; GIDLEY, 2019). Estas situações, inibição competitiva, mista e incompetitiva caracterizam-se, respectivamente, pelas equações a seguir, que resultam de uma modificação da equação de Michaelis-Menten:

$$v_i = \frac{V_{\max}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{I1}} \right) + [S]} \quad (2)$$

$$v_i = \frac{V_{\max}[S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_{I1}} \right) + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{I2}} \right)} \quad (3)$$

$$v_i = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{I2}} \right)} \quad (4)$$

Os símbolos K_{I1} e K_{I2} designam as constantes de dissociação dos complexos EI e ESI, respectivamente. Para a inibição não-competitiva pura vale a equação (3) com $K_{I1} = K_{I2}$. A determinação da velocidade máxima ($V_{\max}$), da constante de Michaelis-Menten (K_M) e das constantes de inibição usando o gráfico de Lineweaver-Burk, assim como outros métodos gráficos, tem várias limitações. Principalmente quando concentrações de substrato bem menores

do que o K_M são utilizadas, a determinação das inclinações das retas no *plot* duplamente recíproco (inverso da velocidade de reação contra o inverso da concentração do substrato, i.e., $1/v$ versus $1/[S]$) torna-se incerta o que, por sua vez, torna difícil a distinção entre inibição competitiva, incompetitiva e mista (CORNISH-BOWDEN, 1974; SUN *et al.*, 2019).

Deste modo, outros métodos podem ser utilizados para auxiliar na análise do tipo de inibição, tais como o gráfico de Dixon, que consiste em plotar o inverso da velocidade de reação ($1/v$) contra a concentração do inibidor ($[I]$). A representação de $1/v$ versus $[I]$ deverá resultar numa reta caso não haja a formação de complexos enzima-inibidor múltiplos. Se a curva for parabólica ou hiperbólica o mecanismo de inibição certamente será bastante complexo e uma análise numérica mais elaborada se fará necessária. A melhor solução para estes problemas será utilizar programas específicos para ajustes não-lineares de mínimos quadrados (CASTILHO *et al.*, 2021). Programas deste tipo permitem distinguir entre vários mecanismos possíveis através de indicadores de precisão estatística.

2.2.3.2. Métodos *in vivo*

Os compostos isolados ou extratos que resultaram promissores nas análises *in vitro* necessitam ser testados *in vivo*, ou seja, é necessário verificar se os efeitos inibitórios são fisiologicamente relevantes. Vale ressaltar que os testes *in vivo* devem sempre ser conduzidos dentro de princípios éticos relacionados ao uso de animais (ATANASOV *et al.*, 2015).

Um método experimental que pode mostrar esses resultados é realizado através da quantificação da glicemia após a alimentação do animal com amido, no caso das análises que visam a inibição das amilases. Para as análises que avaliam a inibição da lipase, realiza-se a quantificação de triglicerídeos presentes no sangue após a administração por gavagem de azeite de oliva na ausência ou presença de diferentes concentrações dos potenciais inibidores (KATO-SCHWARTZ *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

2.2.4. Métodos para avaliação das interações moleculares dos inibidores com as enzimas

Os ensaios *in vitro* e *in vivo* são muito importantes para avaliar a capacidade inibitória de antocianinas puras ou extratos ricos em antocianinas, mas apresentam algumas limitações, associadas às respostas e às perguntas de como ocorrem as ligações e interações do inibidor com a enzima e suas possíveis interações. Abaixo, são descritas algumas das técnicas utilizadas para avaliar tais interações moleculares.

2.2.4.1. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica altamente sensível para visualizar propriedades estruturais terciárias de proteínas que resultam do processo de dobramento/desdobramento de proteínas. Esta técnica tem sido utilizada para verificar se ocorre interação entre os compostos fenólicos e as proteínas em nível molecular e para explicar o modo como estas interações acontecem. Os resíduos aromáticos das proteínas, triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) são os responsáveis pela fluorescência das proteínas. A intensidade da fluorescência está diretamente relacionada à quantidade de proteína em solução (SUN; WARREN; GIDLEY, 2019; WU *et al.*, 2019). Mudanças nas condições do solvente em que uma proteína se encontra e a interação com ligantes, por outro lado, alteram as características espectrais de sua fluorescência. Isto se traduz tanto em mudanças no comprimento de onda das emissões bem como em alterações na intensidade destas mesmas emissões.

2.2.4.2. Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

A DSC pode ser usada para caracterizar propriedades térmicas e monitorar transições de fases. Na prática, ela mede a mudança do calor associada à desnaturação térmica das moléculas quando aquecida a uma velocidade constante. Como resultado, a desnaturação térmica e a variação da entalpia podem ser obtidas após a proteína ser totalmente desnaturada na DSC (GUO *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018).

O processo de desnaturação da proteína é geralmente dividido em dois estágios. O primeiro é reversível, havendo perda parcial da atividade da

proteína, decorrente da ruptura das interações não-covalentes intermoleculares, pelo processo de desdobramento das proteínas. Já o segundo estágio, é irreversível, levando à desnaturação da molécula inicialmente desdobrada e a interação da enzima com o inibidor durante a análise de DSC (SUN; GIDLEY; WARREN, 2017).

O efeito da temperatura na inativação pode ser entendido por meio do termograma, que apresenta normalmente um pico endotérmico que representa a temperatura de fusão, e esta, por sua vez, indica que a enzima foi de fato inativada, sendo considerada um indicador de termoestabilidade. Via de regra, quanto maior o valor da temperatura de fusão, mais estável é a proteína (HAN *et al.*, 2020).

2.2.4.3. Dicroísmo circular (DC)

A espectroscopia de DC é uma técnica bem estabelecida para estudar a estrutura tridimensional das macromoléculas, uma vez que a formação de complexos compostos fenólicos-proteína afeta estruturalmente as proteínas, alterando a estrutura secundária de um ou dos dois ligantes após a interação, modificando seu espectro (GUO *et al.*, 2018; YAO *et al.*, 2018).

A técnica consiste em monitorar alterações moleculares através da absorção de luz em diferentes comprimentos de onda (ZENG *et al.*, 2016). Cada estrutura na proteína tem comprimentos de onda específicos para sua detecção, por exemplo, a α -hélice tem, tipicamente, uma banda positiva em 193 nm e bandas negativas em 222 e 208 nm, já as folhas pregueadas β tem bandas negativas em 218 nm e bandas positivas em 195 nm.

Portanto, o uso do dicroísmo circular (DC) em conjunto com outras técnicas como, espectroscopia de fluorescência e o DSC é de grande valia, pois podem corroborar para análise de resultados, uma vez que ambos os métodos possuem a mesma finalidade de avaliação das alterações estruturais da proteína (espiral aleatória ou desordenada), pós ligação com polifenóis. A composição da estrutura secundária das proteínas também pode ser determinada usando espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) (CZUBINSKI; DWIECKI, 2017).

2.2.4.4. Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Por meio da termodinâmica também é possível analisar as interações entre proteínas e outras moléculas. A ITC é a única técnica com capacidade de medir a afinidade de ligação e os componentes de entalpia, entropia da energia de Gibbs. Ambos são medidos com base na determinação do calor liberado ou absorvido durante a interação. Tais dados fornecem informações sobre todos os mecanismos de interação nos meios biológicos que afetam as propriedades da superfície do sistema (VELAZQUEZ-CAMPOY, LEAVITT, FREIRE, 2015; LIU *et al.*, 2018; PROZELLER, MORSEBACH, LANDFESTER, 2019).

Normalmente, os dados são obtidos por meio de um gráfico de calor contra o número de injeção num dado tempo ($\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$) e exibem uma série de picos para cada injeção. Esses dados devem ser normalizados pico a pico a fim de obter um gráfico da variação de entalpia por mol (ΔH , $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) em relação à razão molar polifenol/enzima (KARONEN *et al.*, 2015; SUN, GIDLEY, WARREN, 2017).

Entende-se que a técnica em questão é mais uma alternativa para avaliar as interações enzima-inibidor, neste caso, se tem uma alternativa de análise rápida das constantes de Michaelis e IC_{50} para os pares enzima-substrato ou enzima-inibidor, que pode ser utilizada em combinação com as demais técnicas citadas anteriormente com o intuito de corroborar os resultados.

2.2.4.5. Docking molecular

Os métodos computacionais são tecnologias que auxiliam na seleção de extratos naturais com atividade biológica. Através do docking molecular é possível realizar simulações em nível molecular, ou seja, encenar a ligação entre os ligantes de proteínas e as estruturas moleculares (ATANASOV *et al.*, 2015; KAZMI *et al.*, 2019; SUN, WANG, MIAO, 2020). Com os dados obtidos é possível selecionar os compostos naturais com potencial inibitório. Isto porque a modelagem computacional permite prever a estrutura conformacional do complexo inibidor-enzima, calcular a priori a energia de ligação do inibidor, e prever as possíveis interações envolvidas, inclusive com identificação dos resíduos de aminoácidos (ZHANG, ARYEE, SIMPSON, 2020). Esse tipo de abordagem *in silico* tem sido amplamente utilizado na indústria farmacêutica

para selecionar fármacos que tenham afinidade para com o sítio ativo. Além disso, essa tecnologia também é utilizada para caracterizar o modo de interação ligante-proteína, podendo prever os resíduos de aminoácidos envolvidos nas ligações com os polifenóis (SUN, WANG, MIAO, 2020).

3. Limitações dos estudos

As antocianinas possivelmente desempenham um papel significativo como inibidores de enzimas. Muitas destas inibições, se adequadamente controladas, poderão eventualmente beneficiar a saúde humana. Apesar do potencial das antocianinas como auxiliares nos tratamentos da obesidade e do diabetes, o uso de extratos apresenta certas limitações devido às incertezas geradas pelo grande número de seus constituintes moleculares. Fazem-se, portanto, necessários estudos que utilizem antocianinas purificadas. Estas nem sempre estão disponíveis e quando estão são muitas vezes bastante caras, dificuldades que se espera que sejam superadas em breve como fruto do futuro desenvolvimento tecnológico.

4. Conclusão e perspectivas

O consumo de alimentos ricos em antocianinas, como mirtilo, amoras, framboesas, morangos, uvas vermelhas, entre outros, bem como o uso de extratos com altos teores de antocianinas, podem ser recomendados como coadjuvantes dos tratamentos convencionais.

A atividade inibitória das antocianinas sobre as enzimas amilase, glicosidase e lipase é determinada principalmente por sua estrutura molecular. Considera-se em geral que a determinação dos valores de IC_{50} (concentração que produz 50% de inibição) e a caracterização da cinética de inibição são abordagens preliminares indispensáveis. Estas abordagens preliminares devem ser seguidas de experimentos *in vivo* para certificar se o efeito de fato tem ou não relevância fisiológica. Como aprimoramento posterior do conhecimento acerca dos mecanismos da inibição a nível molecular podem ser feitas análises tais como, espectroscopia de fluorescência e calorimetria de titulação isotérmica. Simulações computacionais (docking molecular) podem ser úteis em qualquer fase das investigações para corroborar os dados cinéticos e sugerir possíveis abordagens experimentais para elucidar,

sobretudo, a participação de determinados grupos nas interações inibidor-proteína.

Em perspectiva pode-se dizer que estudos *in vivo* e sobretudo estudos clínicos são altamente necessários para confirmar e dar relevância aos inúmeros dados já obtidos nas condições *in vitro*. Também são necessários esforços que permitam uma atribuição mais segura dos efeitos observados a espécies moleculares bem definidas, já que de um modo geral os experimentos têm sido conduzidos com extratos que contém grande diversidade de compostos.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio financeiro da Universidade Estadual de Maringá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

6. Referências

ALI, Hussein M; ALMAGRIBI, Wafaa; AL-RASHIDI, Mona N. Antiradical and reductant activities of anthocyanidins and anthocyanins , structure – activity relationship and synthesis. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1275–1282, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.003>.

ARSALAN, Abdullah; YOUNUS, Hina. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 87, p. 394–399, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.030>.

ATANASOV, Atanas G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>.

AWOSIKA, Temitola O.; ALUKO, Rotimi E. Inhibition of the *in vitro* activities of α -amylase, α -glucosidase and pancreatic lipase by yellow field pea (*Pisum sativum* L.) protein hydrolysates. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 54, n. 6, p. 2021–2034, 2019. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14087>.

BARBA, Francisco J. *et al.* Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 96–109, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.006>.

BARIK, Sisir Kumar *et al.* The anthocyanins in black currants regulate postprandial hyperglycaemia primarily by inhibiting α -glucosidase while other phenolics modulate salivary α -amylase, glucose uptake and sugar transporters. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 78, p. 108325, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.108325>.

BARRETT, Ann H.; FARHADI, Nicole F.; SMITH, Tracey J. Slowing starch digestion and inhibiting digestive enzyme activity using plant flavanols / tannins - A review of efficacy and mechanisms. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 394–399, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.002>.

BIALECKA-FLORJANCZYK, Ewa *et al.* Synthetic and Natural Lipase Inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 672–683, 2018. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160630123356>.

CASTILHO, Pamela Alves *et al.* Effects of a Myrciaria jaboticaba peel extract on starch and triglyceride absorption and the role of cyanidin-3- O -glucoside. **Food & Function**, v. 12, n. 6, p. 2644–2659, 2021. <https://doi.org/10.1039/D0FO02927K>.

CELLI, Giovana B.; TAN, Chen; SELIG, Michael J. Anthocyanidins and Anthocyanins. **Encyclopedia of Food Chemistry**, p. 218-223, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21780-0>.

CESCO, Stephane de *et al.* European Journal of Medicinal Chemistry Covalent inhibitors design and discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 96–114, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.019>.

CHIOU, Shiow-Ying *et al.* In vitro inhibition of lipase, α -amylase, α -glucosidase, and angiotensin-converting enzyme by defatted rice bran extracts of red-pericarp rice mutant. **Cereal Chemistry**, v. 95, n. 1, p. 167–176, 2018. <https://doi.org/10.1002/cche.10025>.

CORNISH-BOWDEN, Athel. Statistical Considerations in the Estimation of

Enzyme Kinetic Parameters by the Direct Linear Plot and Other Methods. **Biochemical Journal**, v. 3, p. 721–730, 1974.

CZUBINSKI, Jaroslaw; DWIECKI, Krzysztof. A review of methods used for investigation of protein – phenolic compound interactions. **Food Science and Technology**, v. 52, p. 573–585, 2017. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13339>.

DASTJERDI, Zohre Mirzaalian; NAMJOYAN, Foroogh; AZEMI, Ebrahim. Alpha Amylase Inhibition Activity of Some Plants Extract of Teucrium Species. **European Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 1, p. 26–31, 2015. <https://doi.org/10.5829/idosi.ejbs.2015.7.01.91127>.

FABRONI, Simona *et al.* Screening of the anthocyanin profile and in vitro pancreatic lipase inhibition by anthocyanin-containing extracts of fruits, vegetables, legumes and cereals. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 14, p. 4713–4723, 2016. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7708>.

FALLAH, Aziz A.; SARMAST, Elham; JAFARI, Tina. Effect of dietary anthocyanins on biomarkers of glycemic control and glucose metabolism: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **Food Research International**, v. 137, p. 109379, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109379>.

GAMBOA-GÓMEZ, Claudia I. *et al.* Review article: plants with potential use on obesity and its complications. **EXCLI Journal**, v. 14, p. 809–831, 2015. <https://doi.org/10.17179/excli2015-186>.

GOWD, Vemana; JIA, Zhenquan; CHEN, Wei. Anthocyanins as promising molecules and dietary bioactive components against diabetes – A review of recent advances. **Trends in Food Science & Technology**, v. 68, p. 1–13, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.015>.

GUO, Honghui; XIA, Min. Chapter 12 - Anthocyanins and Diabetes Regulation. *In: WATSON, Ronald Ross; PREEDY, Victor R.; ZIBADI, Sherma. Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease.* Academic Press, 2018, p. 135-145. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813006-3.00012-X>.

GUO, Qingwen *et al.* Studies on the binding characteristics of three

polysaccharides with different molecular weight and flavonoids from corn silk (Maydis stigma). **Carbohydrate Polymers**, v. 198, p. 581–588, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.120>.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, Erick P. *et al.* Cellular antioxidant activity and in vitro inhibition of α -glucosidase, α -amylase and pancreatic lipase of oregano polyphenols under simulated gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 116, p. 676–686, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.096>.

GUVEN, Hulya; ARICI, Aylin; SIMSEK, Oguzhan. Flavonoids in our foods: a short review flavonoids in our foods: a short review. **Journal of Basic and Clinical Health Sciences**, v. 3, p. 96–106, 2019. <https://doi.org/10.30621/jbachs.2019.555>.

HADVÁRY, P. *et al.* The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 4, p. 2021–2027, 1991. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)52203-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)52203-1).

HADVÁRY, P.; LENGSELD, H.; WOLFER, H. Inhibition of pancreatic lipase in vitro by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. **Biochemical Journal**, v. 256, n. 2, p. 357–361, 1988. <https://doi.org/10.1042/bj2560357>.

HAN, Qianyun *et al.* International Journal of Biological Macromolecules Characterization of membrane-bound polyphenol oxidase from Granny Smith apple (*Malus × domestica* Borkh.). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 158, p. 977–984, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.225>.

HOMOKI, Judit R. *et al.* Anthocyanin composition, antioxidant efficiency, and α -amylase inhibitor activity of different Hungarian sour cherry varieties (*Prunus cerasus* L.). **Food Chemistry**, v. 194, p. 222–229, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.130>.

KALITA, Diganta *et al.* Inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds. **PLOS one**, v. 13, n. 1, p. 1–21, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191025>.

KANBARKAR, Nikita; MISHRA, Sanjay; KHANAL, Pukar. Beneficial effect of phospholipase A2 group IIA inhibitors from *Acacia suma* in obesity: an in silico and in vitro study. **Advances in Traditional Medicine**, v. 20, p. 599-608, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13596-020-00456-4>.

KARKUTE, Suhas G. *et al.* Anti-diabetic Phenolic Compounds of Black Carrot (*Daucus carota* Subspecies *sativus* var. *atrorubens* Alef.) Inhibit Enzymes of Glucose Metabolism: An in silico and in vitro Validation. **Medicinal chemistry**, v. 14, p. 641–649, 2018. <https://doi.org/10.2174/1573406414666180301092819>

KARONEN, Maarit *et al.* Binding of an Oligomeric Ellagitannin Series to Bovine Serum Albumin (BSA): Analysis by Isothermal Titration Calorimetry (ITC). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 49, p. 10647–10654, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04843>.

KATO-SCHWARTZ, Camila Gabriel *et al.* Potential anti-diabetic properties of Merlot grape pomace extract: An in vitro, in silico and in vivo study of α -amylase and α -glucosidase inhibition. **Food Research International**, v. 137, p. 109462, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109462>.

KAZMI, Sayada Reemsha *et al.* In silico approaches and tools for the prediction of drug metabolism and fate: A review. **Computers in Biology and Medicine**, v. 106, p. 54–64, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2019.01.008>.

KENT, K. *et al.* Food-based anthocyanin intake and cognitive outcomes in human intervention trials: a systematic review. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 30, n. 3, p. 260–274, 2017. <https://doi.org/10.1111/jhn.12431>.

KHOO, Hock Eng *et al.* Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food & Nutrition Research**, v. 61, n. 1, 2017. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>.

LIU, Meng *et al.* Optimization of green extraction of anthocyanins from purple passion fruit peels by response surface methodology. **Food Processing and Preservation**, p. 1–8, 2018. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13756>.

LÓPEZ, Cecilia J. *et al.* Stability of a cyanidin-3-O-glucoside extract obtained from *Arbutus unedo* L. and incorporation into wafers for colouring purposes.

Food Chemistry, v. 275, p. 426–438, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.099>.

LUNA-VITAL, Diego *et al.* Maize extract rich in ferulic acid and anthocyanins prevents high-fat-induced obesity in mice by modulating SIRT1, AMPK and IL-6 associated metabolic and inflammatory pathways. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 79, p. 108343, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108343>.

MALIK, Abdul; ERGINKAYA, Zerrin; ERTEN, Hüseyin. **Health and Safety Aspects of Food Processing Technologies**. Cham: Springer International Publishing, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-24903-8>.

MOJICA, Luis *et al.* Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants : Physicochemical stability and antidiabetes potential. **Food Chemistry**, v. 229, p. 628–639, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.124>.

NEUSER, Dieter *et al.* Safety and Tolerability of Acarbose in the Treatment of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. **Clinical Drug Investigation**, v. 25, n. 9, p. 579–587, 2005. <https://doi.org/10.2165/00044011-200525090-00003>.

OLIVEIRA, Roselene *et al.* Inhibition of Pancreatic Lipase and Triacylglycerol Intestinal Absorption by a Pinhão Coat (*Araucaria angustifolia*) Extract Rich in Condensed Tannin. **Nutrients**, v. 7, n. 7, p. 5601–5614, 2015. <https://doi.org/10.3390/nu7075242>.

POHANKA, Miroslav. Biosensors and bioassays based on lipases, principles and applications, a review. **Molecules**, v. 24, n. 3, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24030616>.

PROENÇA, Carina *et al.* Evaluation of a flavonoids library for inhibition of pancreatic α -amylase towards a structure – activity relationship structure – activity relationship. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 577–588, 2019. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1558221>.

PROZELLER, Domenik; MORSBACH, Svenja; LANDFESTER, Katharina. Isothermal titration calorimetry as a nanoparticle – protein interactions. **Royal Society of Chemistry**, v. 11, p. 19265–19273, 2019. <https://doi.org/10.1039/c9nr05790k>.

RAHIM, Abu Torab M. A.; TAKAHASHI, Yoko; YAMAKI, Kohji. Mode of pancreatic lipase inhibition activity in vitro by some flavonoids and non-flavonoid polyphenols. **Food Research International**, v. 75, p. 289–294, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.017>.

RAJAN, Logesh; PALANISWAMY, Dhanabal; MOHANKUMAR, Suresh Kumar. Targeting obesity with plant-derived pancreatic lipase inhibitors: A comprehensive review. **Pharmacological Research**, v. 155, p. 104681, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104681>.

RÍOS, José; FRANCINI, Flavio; SCHINELLA, Guillermo. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **Planta Medica**, v. 81, n. 12/13, p. 975–994, 2015. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546131>.

RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, v. 124, 2018, p. 200–205, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.028>.

SANTOS, Clementina M. M.; FREITAS, Marisa; FERNANDES, Eduarda. A comprehensive review on xanthone derivatives as α -glucosidase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 157, 2018, p. 1460–1479, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.073>.

SEYEDAN, Atefehalsadat *et al.* Medicinal plants and their inhibitory activities against pancreatic lipase: a review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-13, 2015.

SHIRAI, Nobuya. The Inhibitory Effects of Anthocyanin-Rich Sunrouge Tea on Pancreatic Lipase Activity. **Journal of oleo science**, v. 1348, n. 12, p. 1343–1348, 2017.

SUI, Xiaonan; ZHANG, Yan; ZHOU, Weibiao. In vitro and in silico studies of the inhibition activity of anthocyanins against porcine pancreatic α -amylase. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 50–57, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.042>.

SUN, Lijun *et al.* Mechanism of binding interactions between young apple polyphenols and porcine pancreatic α -amylase. **Food Chemistry**, v. 283, n.

January, p. 468–474, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.087>.

SUN, Lijun; GIDLEY, Michael J.; WARREN, Frederick J. The mechanism of interactions between tea polyphenols and porcine pancreatic alpha-amylase: Analysis by inhibition kinetics, fluorescence quenching, differential scanning calorimetry and isothermal titration calorimetry. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 61, n. 10, p. 1–13, 2017. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700324>.

SUN, Lijun; WANG, Yueyi; MIAO, Ming. Inhibition of α -amylase by polyphenolic compounds: Substrate digestion, binding interactions and nutritional intervention. **Trends in Food Science and Technology**, v. 104, p. 190–207, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.003>.

SUN, Lijun; WARREN, Fredrick J; GIDLEY, Michael J. Natural products for glycaemic control: Polyphenols as inhibitors of alpha-amylase. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, p. 262–273, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.009>.

SWIERCZEWSKA, Anita *et al.* In vitro α -amylase and pancreatic lipase inhibitory activity of *Cornus mas* L. and *Cornus alba* L. fruit extracts a. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 7, p. 1–10, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.06.005>.

TAKAHASHI, Azusa *et al.* Anthocyanin-rich Phytochemicals from Aronia Fruits Inhibit Visceral Fat Accumulation and Hyperglycemia in High-fat Diet-induced Dietary Obese Rats. **Journal of oleo science**, v. 1250, n. 12, p. 1243–1250, 2015.

THILAVECH, Thavaree; ADISAKWATTANA, Sirichai. Cyanidin-3-rutinoside acts as a natural inhibitor of intestinal lipid digestion and absorption. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, p. 1–10, 2019.

VELAZQUEZ-CAMPOY, Adrian; LEAVITT, Stephanie A.; FREIRE, Ernesto. Characterization of Protein-Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. In: MEYERKORD, C.; FU, H. (eds). **Protein-Protein Interactions**. Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2015. p. 183–204. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2425-7_11.

VIJAYARAJ, Panneerselvam; NAKAGAWA, Hiroyuki; YAMAKI, Kohji. Cyanidin

and cyanidin-3-glucoside derived from *Vigna unguiculata* act as noncompetitive inhibitors of pancreatic lipase. **Journal of food biochemistry**, v. 43, n. 3, p. 1–10, 2019. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12774>.

WANG, Shuyu *et al.* A power compensated differential scanning calorimeter for protein stability characterization. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 256, p. 946–952, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.10.034>.

WU, Tiantian *et al.* What is new in lysozyme research and its application in food industry - A review. **Food Chemistry**, v. 274, 2018, p. 698–709, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.017>.

XIAO, Ting *et al.* Identification of Anthocyanins from Four Kinds of Berries and Their Inhibition Activity to α - Glycosidase and Protein Tyrosine Phosphatase 1B by HPLC – FT-ICR MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 6211–6221, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02550>.

XU, Yang *et al.* Pelargonidin-3-O-rutinoside as a novel α -glucosidase inhibitor for improving postprandial hyperglycemia. **Royal Society of Chemistry**, v. 55, p. 39, 2019. <https://doi.org/10.1039/c8cc07985d>.

YAMASHITA, Camila *et al.* Microencapsulation of an anthocyanin-rich blackberry (*Rubus* spp.) by-product extract by freeze-drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 256–262, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.063>.

YAO, Han *et al.* Circular dichroism in functional quality evaluation of medicines. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 50–64, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.031>.

YAO, Shu-long *et al.* Black rice and anthocyanins induce inhibition of cholesterol absorption in vitro. **Food & Function**, v. 4, n. 11, p. 1602, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3fo60196j>.

ZENG, Li *et al.* Inhibitory Mechanism of Apigenin on α - Glucosidase and Synergy Analysis of Flavonoids. **Agricultural and food chemistry**, v. 64, p. 6939–6949, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02314>.

ZHANG, Hanyue *et al.* Anthocyanin supplementation improves anti-oxidative and anti-inflammatory capacity in a dose – response manner in subjects with

dyslipidemia. **Redox Biology**, v. 32, p. 101474, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101474>.

ZHANG, Jiangtao *et al.* Chemical compositions and α -glucosidase inhibitory effects of anthocyanidins from blueberry, blackcurrant and blue honeysuckle fruits. **Food Chemistry**, v. 299, p. 125102, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125102>.

ZHANG, Jiaojiao *et al.* Inhibitory effects of anthocyanins on α -glucosidase activity. **Journal of Berry Research**, v. 9, n. 1, p. 109-123, 2019. <https://doi.org/10.3233/JBR-180335>.

ZHANG, Yi; ARYEE, Alberta N. A.; SIMPSON, Benjamin K. Current role of in silico approaches for food enzymes. **Current Opinion in Food Science**, v. 31, p. 63–70, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.11.003>.

Autores

Tamires Barlati Vieira da Silva^{1,*}, Tatiane Francielli Vieira¹, Adelar Bracht², Rosane Marina Peralta²

1. Programa de Pós-graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Brasil.
2. Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Brasil.

*Autor para correspondência: tamiresbarlati93@gmail.com