

Alimentos funcionais ricos em compostos fenólicos na prevenção e controlo da Diabetes Mellitus tipo 2

Filipa Campos

Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar

Departamento de Química e Bioquímica

2021

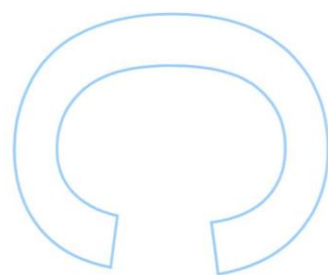
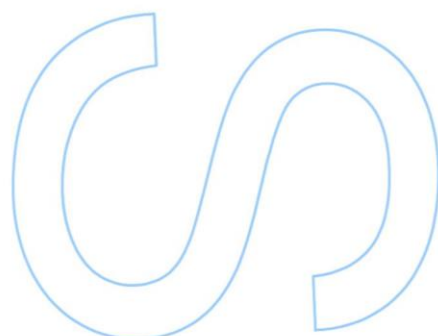
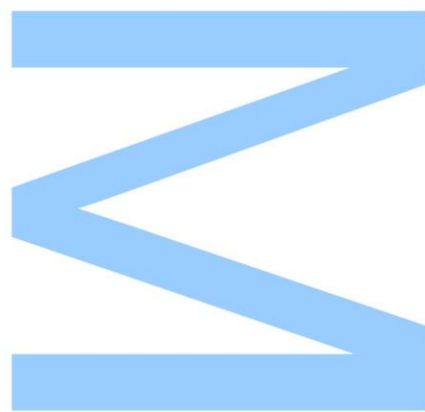
Orientador

Doutora Ana Fernandes, LAQV-REQUIMTE, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

Coorientador

Doutora Iva Fernandes, LAQV-REQUIMTE, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

Professor Doutor Nuno Mateus, Faculdade de Ciências da Universidade
do Porto

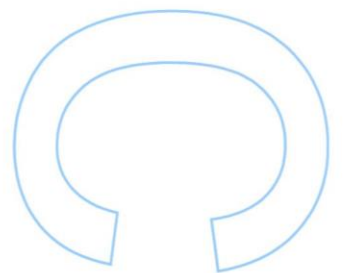
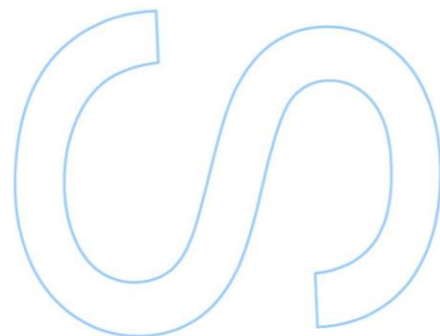
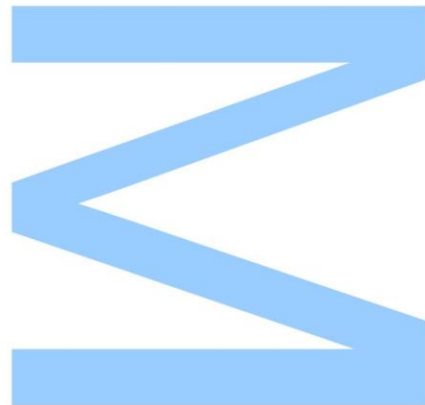




Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

O desenvolvimento desta dissertação não teria sido possível sem a ajuda e apoio de algumas pessoas, as quais eu gostaria de agradecer.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora, Doutora Ana Fernandes e coorientadora Doutora Iva Fernandes, por todos os ensinamentos que me foram transmitidos no decorrer desta dissertação, por todo o apoio e pela disponibilidade que sempre tiveram.

De seguida, gostaria também de agradecer ao meu coorientador, o Professor Doutor Nuno Mateus, pela oportunidade de participar neste projeto e pela disponibilidade em ajudar quando necessário.

Um obrigada ao Professor Doutor Victor de Freitas e a todo restante grupo do Food Polyphenol LAB por sempre se terem mostrado disponíveis a ajudar e a tirar qualquer dúvida quando estas surgissem.

Gostaria também de deixar um agradecimento especial à minha família, em particular, aos meus pais e avós pelo apoio que foi fundamental. Obrigada pela ajuda que me deram, não apenas no decorrer deste ano, mas sempre. Obrigada por terem tornado todo o meu percurso académico mais feliz.

Gostaria ainda de agradecer aos meus amigos, em especial à Inês Leão, e às minhas colegas de tese, Inês Pereira e Sara Alves, por terem estado sempre presentes e me terem ajudado quando era necessário. Esta etapa académica foi melhor com vocês.

Resumo

A Diabetes Mellitus é uma doença metabólica crónica com uma elevada taxa de incidência a nível mundial (cerca de 463 milhões de doentes em 2019). Tendo em conta o potencial efeito antidiabético dos compostos bioativos (compostos fenólicos, polissacáridos) presentes em matrizes vegetais, a sua incorporação como ingredientes funcionais em produtos alimentares poderá ser uma alternativa natural para prevenir e controlar a doença.

Deste modo, o objetivo deste trabalho incidiu na recuperação de compostos bioativos a partir de um subproduto da indústria vitivinícola (bagaço de uvas tintas) para potencial aplicação destes como ingredientes funcionais para a Diabetes Mellitus tipo 2. Para além de extratos ricos em compostos fenólicos, uma fração solúvel de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos foi isolada pela primeira vez a partir deste subproduto. Os extratos foram obtidos por extração sólido-líquido (extração convencional) e por extração com água subcrítica a duas temperaturas (95 e 120°C). O seu potencial antidiabético foi estudado avaliando o seu efeito: i) na atividade das enzimas digestivas (α -amilase e α -glucosidase), ii) na formação de produtos finais de glicação avançada e iii) na modelação do transporte da glucose transepitelial *in vitro* através do modelo celular intestinal C2BBel.

O extrato de compostos fenólicos obtido com água subcrítica a 95°C apresentou um maior teor em compostos fenólicos (por g de extrato) e uma atividade antioxidante superior, comparativamente com o extrato obtido por extração sólido-líquido. Os extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos obtidos por extração alcalina sólido-líquido e com água subcrítica a 120°C, foram obtidos com um rendimento semelhante, mas superior ao obtido para a extração a 95°C. Estes extratos revelaram uma constituição abundante em polissacáridos (entre os 61 e 69 %), ricos em ácido galacturónico, arabinose, galactose e glucose, característico da presença de polissacáridos pécticos, sendo também constituídos por cerca de 10 % de compostos fenólicos.

Relativamente à atividade da α -amilase, os dois métodos de extração não influenciaram a capacidade de inibição da enzima pelos compostos fenólicos. Relativamente aos extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos, a extração efetuada com água subcrítica a uma temperatura de 95°C originou um extrato com uma capacidade inibitória da atividade da α -amilase significativamente superior. Na

inibição da atividade da α -glucosidase, todos os extratos testados exibiram um efeito inibitório significativamente superior ao do controlo positivo (acarbose).

O extrato de compostos fenólicos livres obtido por extração com água subcrítica revelou um potencial de antiglicação superior comparativamente com os extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos, constituindo um grande fator de valorização do extrato.

Por sua vez, no ensaio do estudo de transporte de glucose observou-se uma redução da eficiência de transporte na presença do extrato de compostos fenólicos livres (aproximadamente 2,1 %), sendo esta redução mais acentuada após incubação com os conjugados polissacáridos-compostos fenólicos (aproximadamente 1,2 %).

Neste trabalho, o bagaço de uvas tintas demonstrou ser uma boa fonte vegetal para a obtenção de compostos bioativos, nomeadamente, compostos fenólicos livres e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos. O método de extração com água subcrítica demonstrou ser uma metodologia de extração eficiente, tendo permitido a obtenção simultânea de extratos de compostos fenólicos e de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos, com propriedades biológicas semelhantes ou melhoradas, comparativamente com a metodologia convencionalmente aplicada.

Palavras-chave: Conjugados polissacáridos-compostos fenólicos; extração com água subcrítica; inibição enzimática; atividade de antiglicação; transporte de glucose

Abstract

Diabetes Mellitus is a chronic metabolic disease with a high incidence rate worldwide (about 463 million patients in 2019). Considering the potential antidiabetic effect of bioactive compounds (phenolic compounds, polysaccharides) present in plant matrices, their incorporation as functional ingredients in food products could be a natural alternative to prevent and manage the disease.

Thus, the aim of this work was to recover bioactive compounds from wine industry by-products (red grape pomace) for potential application as functional ingredients for type 2 Diabetes Mellitus management. In addition to phenolic compounds rich extracts, a soluble fraction of polysaccharide-phenolic compounds conjugates was isolated for the first time from this by-product.

The extracts were obtained by solid-liquid extraction (conventional extraction) and by subcritical water extraction at two temperatures (95 and 120°C). Their antidiabetic potential was studied by assessing their effect: (i) on the activity of digestive enzymes (α -amylase and α -glucosidase), (ii) on the formation of advanced glycation end products, and (iii) on modeling of glucose transepithelial transport *in vitro* using the C2BBel intestinal cell model.

The phenolic compounds extract obtained by subcritical water extraction at 95°C showed a higher content of phenolic compounds (per g of extract) and a higher antioxidant activity, compared to the extract obtained by solid-liquid extraction. The polysaccharide-phenolic compounds conjugates extracts obtained by alkaline solid-liquid extraction and by subcritical water at 120°C were obtained with a similar yield, but higher than the obtained for the extraction at 95°C. These extracts showed an abundant polysaccharide constitution (between 61 and 69 %), rich in galacturonic acid, arabinose, galactose and glucose, characteristic of the presence of pectic polysaccharides, being also constituted by about 10% of phenolic compounds.

Regarding α -amylase activity, the two extraction methods didn't influence the ability of phenolic compounds to inhibit enzyme activity. For polysaccharide-phenolic compounds conjugates, extraction by subcritical water at 95°C resulted in an extract with a significantly higher α -amylase inhibitory capacity. In the inhibition of α -glucosidase activity, all the extracts tested had a significantly higher inhibitory effect than the positive control (acarbose).

The extract of phenolic compounds obtained by subcritical water extraction (95°C) showed a higher antiglycation potential compared to the extracts of polysaccharide-phenolic compounds conjugates, constituting a major factor of valorization of the extract.

Additionally, in the glucose uptake assay, a reduction in transport efficiency was observed in the presence of the phenolic compounds extract obtained by subcritical water extraction (95°C) (approximately 2.1 % transported glucose), with this reduction being more pronounced after incubation with the polysaccharide-phenolic compounds conjugates obtained by subcritical water extraction 95° C (approximately 1.2 % transported glucose).

In this work, red grape pomace proved to be a good plant source to obtain bioactive compounds, namely, free phenolic compounds and glycoconjugates. The subcritical water extraction method proved to be an efficient extraction methodology, allowing simultaneous extraction of phenolic compounds and polysaccharide-phenolic compounds conjugates, with similar or improved biological properties, compared to the conventionally applied methodology.

Keywords: polysaccharides-phenolic compounds conjugates; subcritical water extraction; enzyme inhibition; antiglycation activity; glucose transport

Índice

Agradecimentos	3
Resumo	5
Abstract	7
Índice	9
Índice de figuras	13
Índice de tabelas	15
Introdução	19
1. Enquadramento	21
2. Compostos fenólicos	21
2.1. Não flavonóides	23
2.2. Flavonóides	25
3. Flavan-3-óis	28
4. Antocianinas	29
4.1. Estabilidade das antocianinas: influência do pH	32
4.2. Antocianinas na dieta humana	34
4.3. Antocianinas na saúde	35
5. Subprodutos alimentares	36
6. Métodos de extração de compostos fenólicos	37
6.1. Método de extração convencional	37
6.2. Métodos de extração verde	37
7. Compostos fenólicos extraíveis e não extraíveis	39
8. Conjugados polissacáridos-compostos fenólicos	40
9. Diabetes Mellitus	43
9.1. Compostos fenólicos e a Diabetes Mellitus	44
Design experimental	49
Materiais e métodos	51

1. Reagentes.....	53
2. Material vegetal.....	53
3. Extração de compostos fenólicos	53
4. Extração dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos	54
4.1. Extração alcalina convencional.....	54
4.2. Extração com água subcrítica	54
5. Caracterização físico-química dos extratos de compostos fenólicos e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos	55
5.1. Doseamento de compostos fenólicos totais	55
5.2. Doseamento de antocianinas monoglucósidas	56
5.3. Caracterização do perfil antociânico por HPLC-DAD/ESI-MS	56
5.4. Determinação da percentagem de cor polimérica.....	57
5.5. Doseamento de compostos fenólicos de baixo peso molecular e proantocianidinas	58
5.5.1. Compostos fenólicos de baixo peso molecular.....	58
5.5.2. Proantocianidinas	58
5.6. Recuperação e caracterização dos compostos fenólicos presentes nos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos	59
5.6.1. Espectroscopia de UV-Vis	59
5.7. Doseamento de proteínas	60
5.8. Doseamento de açúcares.....	60
5.8.1. Doseamento de açúcares simples.....	60
5.8.2. Análise e quantificação do conteúdo em monossacáridos dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos	61
5.9. Avaliação das propriedades antioxidantes	61
5.9.1. Capacidade antiradicalar (DPPH).....	61
5.9.2. Poder redutor (FRAP).....	62
6. Ensaio de inibição enzimática.....	62
6.1. Enzima pancreática α -amilase	62

6.2. Enzima α -glucosidase	63
7. Avaliação da atividade de antiglicação	64
8. Estudo de transporte: <i>uptake</i> de glucose	65
9. Análise estatística.....	66
Resultados e discussão	69
1. Caracterização físico-química das frações de compostos fenólicos e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos	71
1.1. Extratos de compostos fenólicos totais	74
1.1.1. Doseamento de compostos fenólicos	74
1.1.2. Caracterização e quantificação de pigmentos antociânicos.....	74
1.1.3. Determinação da percentagem de cor polimérica.....	77
1.1.4. Doseamento de compostos fenólicos de baixo peso molecular e proantocianidinas	77
1.1.5. Determinação de proteínas e açúcares simples	77
1.1.6. Avaliação das propriedades antioxidantes	77
1.2. Extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos	78
1.2.1. Análise e quantificação do conteúdo em monossacáridos dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos	78
1.2.2. Doseamento de compostos fenólicos	80
1.2.3. Determinação de proteínas.....	80
1.2.4. Avaliação das propriedades antioxidantes	80
1.2.5. Recuperação e caracterização dos compostos fenólicos presentes nos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos	81
2. Avaliação do potencial antidiabético das frações.....	84
2.1. Ensaio de inibição enzimática	84
2.1.1. Enzima pancreática α -amilase	84
2.1.2. Enzima α -glucosidase	87
2.2. Avaliação da atividade de antiglicação	90
2.3. Estudo de transporte: <i>uptake</i> de glucose	93

Conclusões e perspectivas futuras	95
Bibliografia.....	97

Índice de figuras

Figura 1- Estrutura química dos flavonóides.....	25
Figura 2- Estrutura química geral das antocianinas. R_1 e R_2 = H, OH ou OCH_3 ; R_3 = H ou resíduo glicosídico.	30
Figura 3- Estrutura química dos açúcares que mais frequentemente se ligam à aglicona: (A) α -D-glucose, (B) β -D-xilose, (C) β -D-galactose, (D) α -L-ramnose e (E) α -L-arabinose.	31
Figura 4- Estrutura química dos ácidos aromáticos, ácido gálico (A), ácido ferúlico (B), ácido sinápico (C), ácido p-hidroxibenzóico (D), ácido p-cumárico (E) e ácidos alifáticos, ácido málico (F), acético (G), succínico (H), malónico (I) e o oxálico (J).	32
Figura 5- Formas das antocianinas em equilíbrio, em solução aquosa, consoante o pH, adaptado de [69].	33
Figura 6- Constante dielétrica da água a temperaturas entre os 27 e os 527°C, a uma pressão de 10 a 100 Mpa e constante dielétrica do acetonitrilo, metanol, etanol e diclorometano a uma temperatura de 20°C e uma pressão de 0,1 Mpa, adaptado de [122].	39
Figura 7- Esquematização da estrutura da parede celular primária e organização dos seus componentes, adaptado de [140].	41
Figura 8- Potenciais mecanismos de interação entre os compostos fenólicos e os polissacáridos da parede celular, adaptado de [142].	42
Figura 9- Representação esquemática das etapas realizadas no decorrer do procedimento experimental.	49
Figura 10- Extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos obtidos por extração sólido-líquido (A), extração subcrítica a 95°C (B) e extração subcrítica a 120°C (C).	71
Figura 11- Espectros UV-Vis obtidos antes (A) e após o aquecimento (B) para o extrato alcalino convencional (ECA), extrato subcrítico a 95°C (ES-95) e extrato subcrítico a 120°C (ES-120).	81
Figura 12- Extrato alcalino convencional (ECA), extrato subcrítico a 95°C (ES-95) e extrato subcrítico a 120°C (ES-120), antes (A) e após o aquecimento (B) na hidrólise ácida.	82
Figura 13- Cromatogramas de LC-DAD/ESI-MS dos extratos após hidrólise (A) ECA, (B) ES-95 e (C) ES-120, respetivamente, onde 1- delfinidina, 2- cianidina e 3- malvidina.	83

- Figura 14-** Percentagem de inibição enzimática (α -amilase) na presença do controlo positivo (A), CFLC (B), CFL-95 (C), ECA (D), ES-95 (E) e ES-120 (F). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=9). 87
- Figura 15-** Percentagem de inibição enzimática (α -glucosidase) na presença do controlo positivo (A), CFLC (B), CFL-95 (C), ECA (D), ES-95 (E) e ES-120 (F). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=9) 90
- Figura 16-** Percentagem de inibição da formação de produtos de glicação avançada na presença do controlo positivo (A), CFLC (B), CFL-95 (C), ECA (D), ES-95 (E) e ES-120 (F). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=9)..... 93
- Figura 17-** Eficiência de transporte (%) na ausência (controlo C) e na presença dos extratos ricos em compostos fenólicos livres (CFL-95) e em conjugados polissacáridos-compostos fenólicos (ES-95) obtidos por extração subcrítica a 95°C. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. *, p < 0,05, diferenças estatisticamente significativas entre os extratos e o controlo. # , p < 0,05, diferenças estatisticamente significativas entre os extratos. 94

Índice de tabelas

Tabela 1- Teor em compostos fenólicos presente em alguns frutos, vegetais e bebidas (mg por 100 g ou mg por 100 mL), adaptado de [24]	22
Tabela 2- Subclasses dos não flavonóides, estrutura química e exemplos de alimentos onde cada subclasse pode ser encontrada [23, 34-36]	24
Tabela 3- Subclasses dos flavonóides, estrutura química e exemplo de exemplos de alimentos onde cada subclasse pode ser encontrada [23, 43-46]	26
Tabela 4- Estrutura química geral dos flavan-3-óis e respetivo padrão de substituição, adaptado de [48].....	29
Tabela 5- Padrão de substituição de cada uma das antocianidinas, sua respetiva cor e absorção máxima, adaptado de [62]	30
Tabela 6- Teor em antocianinas (mg.Kg ⁻¹ ou mg.L ⁻¹) de determinados alimentos e bebidas, adaptado de [46].....	34
Tabela 7- Composição e teor em compostos fenólicos presente em determinados subprodutos alimentares (mg equivalentes de ácido gálico.g ⁻¹ de peso seco), adaptado de [90].....	36
Tabela 8- Constituintes da mistura reacional	64
Tabela 9- Constituintes utilizados na suplementação do meio.....	65
Tabela 10- Rendimento de extração obtido para cada um dos extratos de compostos fenólicos livres e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos expressos em massa de extrato por massa de amostra seca liofilizada	72
Tabela 11- Composição em compostos fenólicos, antocianinas, % de polimerização, compostos fenólicos de baixo peso molecular, proantocianidinas, proteínas, açúcares simples, DPPH e FRAP dos extratos de compostos fenólicos livres (CFLC e CFL-95) e dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos (ECA, ES-95 e ES-120). * p < 0,05, diferenças significativas entre os extratos de compostos fenólicos livres; ^a p < 0,05, diferenças significativas entre o extrato ECA e ES-120; ^b p < 0,05, diferenças significativas entre o extrato de ECA e os restantes extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos.....	73
Tabela 12- Tabela e cromatograma representativo da análise HPLC-DAD-ESI-MS de pigmentos antociânicos (modo positivo) nos extratos de compostos fenólicos.	76
Tabela 13- Composição total em polissacáridos e % mol por monossacárido dos extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos (ECA, ES-95 e ES-120). 79	
Tabela 14- Valores de IC ₅₀ determinados na inibição enzimática da enzima pancreática α-amilase. Os resultados são expressos como média ± EPM. * , p < 0,05, diferenças	

significativas entre o valor obtido para os extratos e o controlo positivo (acarbose); $p < 0,05$, letras diferentes entre tipos de extratos (compostos fenólicos livres ou conjugados polissacáridos-compostos fenólicos) representam diferenças estatisticamente significativas 84

Tabela 15- Valores de IC_{50} determinados na inibição enzimática da enzima α -glucosidase. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. *, $p < 0,05$, diferenças significativas entre o valor obtido para o extrato e o controlo positivo (acarbose); $p < 0,05$, letras diferentes entre tipos de extratos (compostos fenólicos livres ou conjugados polissacáridos-compostos fenólicos), representam diferenças estatisticamente significativas. 88

Tabela 16- Valores de IC_{50} determinados na inibição da formação de produtos de glicação avançada. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. *, $p < 0,05$, diferenças significativas entre o valor obtido para o extrato e o controlo; ^{a, b}, $p < 0,05$, Letras diferente entre tipos de extratos de compostos fenólicos livres representam diferenças estatisticamente significativas; ^{c, d}, $p < 0,05$, Letras diferentes entre tipos de extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos, representam diferenças estatisticamente significativas 91

Lista de abreviaturas

Abs	Absorvância
ACN	Acetonitrilo
AG	Aminoguanidina
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
BSA	Albumina de soro bovino
CFLC	Compostos fenólicos livres convencionais
CFL-95	Compostos fenólicos livres subcríticos a 95°C
DM	Diabetes Mellitus
DMG	Diabetes Mellitus gestacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT1	Diabetes Mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
ECA	Extrato convencional alcalino
EPM	Erro padrão da média
ES-95	Extrato subcrítico a 95°C
ES-120	Extrato subcrítico a 120°C
HMDS	Hexametildisilazano
MeOH	Metanol
Papp	Permeabilidade aparente
PBS	Tampão fosfato salino
P.e.	Por exemplo
ROS	Espécies reativas de oxigénio
TFA	Ácido trifluoroacético

UV

Ultravioleta

λ_{max}

Comprimento de onda máximo de absorção

Introdução

1. Enquadramento

A Diabetes Mellitus (DM) é um distúrbio metabólico crónico associado a concentrações elevadas de açúcar no sangue [1]. Esta doença constitui um problema de saúde pública emergente e inclui três tipos: tipo 1 (DMT1), tipo 2 (DMT2) e gestacional (DMG), sendo o mais frequente a Diabetes Mellitus tipo 2 [2-4]. Na Diabetes, entre os fatores de risco com maior relevância encontra-se a obesidade e o sedentarismo existindo evidências de que a adoção de um estilo de vida saudável, como a prática de atividade física frequente e uma dieta equilibrada pode normalizar os níveis de glucose na corrente sanguínea e diminuir o risco de complicações na DMT2 [5-7].

Atualmente, os alimentos não possuem como propósito único o fornecimento dos nutrientes essenciais estando, especialmente, os alimentos de origem vegetal associados a potenciais efeitos benéficos para a saúde [8, 9]. Deste modo, a associação estabelecida entre a saúde, a alimentação e regimes alimentares constituídos por alimentos ricos em compostos bioativos tem despertado uma atenção cada vez maior [10]. Os vegetais e as frutas proporcionam uma grande diversidade de compostos bioativos como, por exemplo, compostos fenólicos e fibras alimentares [11]. No entanto, também os subprodutos resultantes do processamento de vegetais e frutos, apresentam um elevado teor em compostos bioativos, podendo constituir uma fonte atrativa para a sua extração [12, 13].

Dentro da diversidade de compostos bioativos, os compostos fenólicos, devido aos seus potenciais efeitos benéficos na saúde, têm assumido um interesse crescente por parte da comunidade científica [14].

2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas e representam a classe mais numerosa de compostos bioativos que mais frequentemente são encontrados nestas [15, 16]. Em variadas plantas, foram identificados mais de 8000 compostos, sendo que, as funções que estes metabolitos possuem nas mesmas envolvem a reprodução, o crescimento, a resistência contra agentes patogénicos e a pigmentação [16, 17]. Para além disto, estes compostos também se encontram envolvidos na defesa contra radiação ultravioleta (UV) [18].

Os compostos fenólicos são uma parte constituinte da dieta, contribuindo para as propriedades organolépticas dos alimentos (cor, sabor, adstringência), para a estabilidade oxidativa e odor dos mesmos [19]. Podem ser encontrados em diversos alimentos como vegetais, frutas e produtos derivados destes como sumos de fruta, vinho

tinto, chá e café [20, 21]. Geralmente, os produtos alimentares possuem misturas complexas de compostos fenólicos, existindo alguns compostos que se encontram mais uniformemente distribuídos em produtos de origem vegetal, como a quercetina, mas outros que são específicos de certos alimentos como o caso das flavanonas em citrinos [22]. O conteúdo de compostos que está presente nas plantas pode ser afetado por variados fatores como a variedade, fatores ambientais (p.e. exposição solar, rega), maturação no momento da colheita, processamento e o armazenamento [23].

O teor em compostos fenólicos presente em alguns frutos, vegetais e bebidas encontra-se descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1- Teor em compostos fenólicos presente em alguns frutos, vegetais e bebidas (mg por 100 g ou mg por 100 mL), adaptado de [24]

Alimentos/bebidas	Teor em compostos fenólicos
Ameixa	377
Amêndoa	187
Amora	260
Cebola roxa	168
Espinafre	119
Maçã	136
Morango	235
Pêssego	59
Uva tinta	169
Chá verde	89
Chá preto	102
Vinho tinto	101

Dado que a ingestão média total destes metabolitos é de cerca de 1 g/dia, são considerados os antioxidantes mais abundantes na dieta humana [25].

Na indústria alimentar, estes compostos podem ser aplicados como corantes e conservantes naturais [26]. A cor que determinados compostos fenólicos apresentam é devida ao facto de absorverem luz na zona entre os 400 e 700 nm [27]. Além disto, existe um interesse progressivo na identificação de fontes ricas em compostos fenólicos

para a sua extração com o objetivo de fortificar alimentos e bebidas funcionais e produzir suplementos alimentares [28].

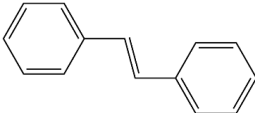
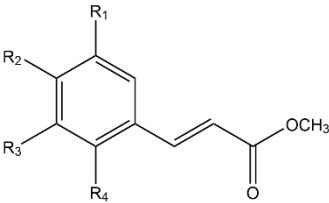
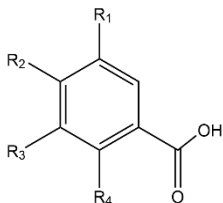
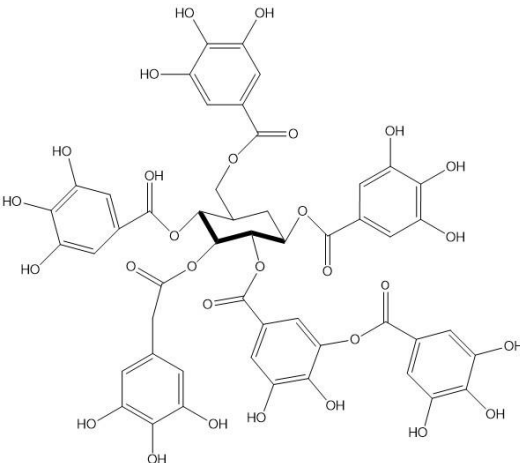
Além da indústria alimentar, a indústria cosmética é outro exemplo onde estes compostos também têm sido aplicados tanto pelas suas ações regenerativas na pele como pelos seus efeitos antioxidantes [15].

Quimicamente, os compostos fenólicos possuem um ou mais anéis benzénicos, aos quais se encontra ligado, no mínimo, um grupo hidroxilo (OH) [29]. Podem ser classificados em não flavonóides e flavonóides, de acordo com as suas estruturas químicas [30].

2.1. Não flavonóides

Os não flavonóides incluem, principalmente, moléculas muito simples como os estilbenos e os ácidos fenólicos [31]. Compostos mais complexos derivados das moléculas mais simples estão igualmente incluídos nesta classe, como é o caso dos galhotaninos e elagitaninos (**Tabela 2**) [31]. A par com os flavonóides, os ácidos fenólicos são considerados os compostos fenólicos mais usuais na dieta humana e podem encontrar-se divididos em: derivados do ácido cinâmico e derivados do ácido benzóico [32, 33].

Tabela 2- Subclasses dos não flavonóides, estrutura química e exemplos de alimentos onde cada subclasse pode ser encontrada [23, 34-36]

Subclasse	Estrutura química	Alimentos em que podem ser encontrados
<u>Estilbeno</u>		
<u>Ácidos fenólicos</u>	 <u>Derivados do ácido cinâmico (exemplos)</u> R₁= H; R₂ = OH; R₃= OH; R₄= H: Ácido cafeico R₁= OCH₃; R₂ = OH; R₃= H; R₄= H: Ácido ferúlico R₁= OCH₃; R₂ = OH; R₃= OCH₃; R₄= H: Ácido sinápico 	
	 <u>Derivados do ácido benzóico (exemplos)</u> R₁= OH; R₂ = OH; R₃= OH; R₄= H: Ácido gálgico R₁= H; R₂ = OH; R₃= OCH₃; R₄= H: Ácido vanílico R₁= H; R₂ = H; R₃= H; R₄= OH: Ácido salicílico 	
<u>Galhotaninos</u>		

2.2. Flavonóides

A composição em flavonóides nas plantas é extremamente variável, quer qualitativamente quer quantitativamente [37]. Esta classe de compostos apresenta um esqueleto comum C6-C3-C6, constituída por dois anéis aromáticos (anéis A e B) que se encontram ligados por três átomos de carbono, criando um heterociclo oxigenado (anel C) (**Figura 1**) [23, 38, 39].

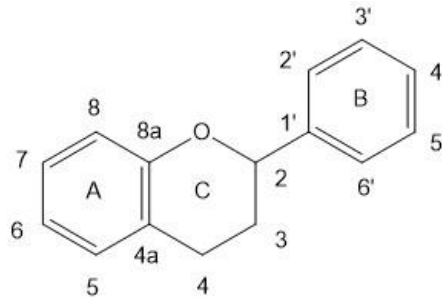
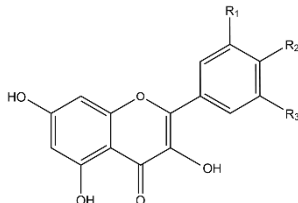
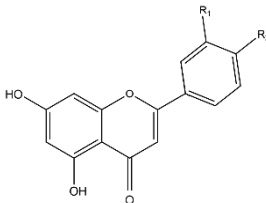
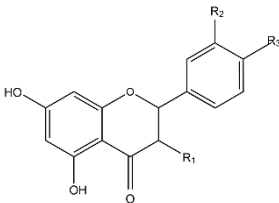
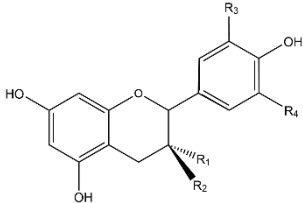


Figura 1- Estrutura química dos flavonóides.

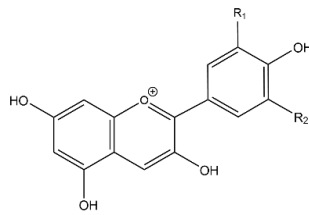
Consoante as diferenças no grau de insaturação do anel C, os flavonóides dividem-se em flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, antocianidinas e isoflavonas [40].

Os flavonóides quando possuem a ligação a, pelo menos, um açúcar são denominados de glicosídeos mas, no caso de não haver nenhum açúcar presente, a denominação dos mesmos é de agliconas [41]. Na dieta humana é, usualmente, sob a forma de β -glicosídeos que os flavonóides se encontram presentes [42]. Na **Tabela 3** representam-se os principais tipos de flavonóides presentes na dieta humana.

Tabela 3- Subclasses dos flavonóides, estrutura química e exemplo de exemplos de alimentos onde cada subclasse pode ser encontrada [23, 43-46]

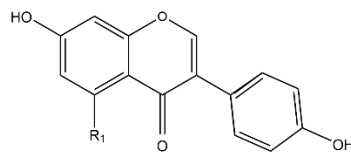
Subclasse	Estrutura química	Alimentos em que podem ser encontrados
<u>Flavonóis</u>	 $R_1 = OH; R_2 = OH; R_3 = H$: Quercetina $R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = H$: Canferol $R_1 = OH; R_2 = OH; R_3 = OH$: Miricetina	
<u>Flavonas</u>	 $R_1 = H; R_2 = OH$: Apigenina $R_1 = OH; R_2 = OH$: Luteolina	
<u>Flavanonas</u>	 $R_1 = H; R_2 = H; R_3 = OH$: Naringenina $R_1 = OH; R_2 = OH; R_3 = OCH_3$: Hesperetina	
<u>Flavan-3-óis</u>	 $R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = H; R_4 = OH$: Catequina $R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = H; R_4 = OH$: Epicatequina $R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = OH; R_4 = OH$: Galhocatequina	

Antocianidinas



$R_1 = OH$; $R_2 = H$: Cianidina
 $R_1 = H$; $R_2 = H$: Pelargonidina
 $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$: Peonidina
 $R_1 = OH$; $R_2 = OH$: Delfinidina
 $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OCH_3$: Malvidina
 $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$: Petunidina

Isoflavonas



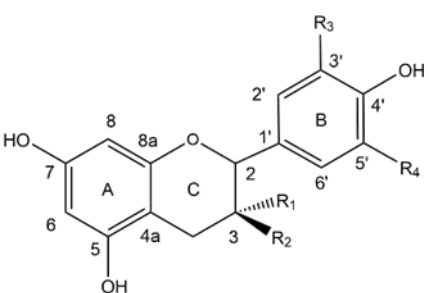
$R_1 = H$: Daidzeína
 $R_1 = OH$: Genisteína

Entre as diferentes classes de flavonóides, os flavan-3-óis e as antocianinas são duas das classes mais abundantes na dieta humana. Adicionalmente, os flavan-3-óis e as antocianinas desempenham um papel fundamental na qualidade e propriedades sensoriais dos alimentos e bebidas, particularmente no sabor (adstringência e amargor) (flavan-3-óis) e propriedades cromáticas (antocianinas). Como resultado destas características, uma breve descrição destas duas classes será apresentada.

3. Flavan-3-óis

Os flavan-3-óis representam uma subclasse de flavonóides que existe na forma de monómeros (catequinas), oligómeros ou polímeros (proantocianidinas ou taninos condensados) [47]. Contrariamente ao que se verifica com muitos dos flavonóides, os flavan-3-óis não possuem uma ligação dupla entre a posição 2 e 3 [43].

A diferentes estruturas desta subclasse distinguem-se na configuração do anel C e no padrão de hidroxilação do anel B, podendo no mesmo existir um grupo hidroxilo (afzequina, epiafzequina), dois grupos hidroxilo (catequina, epicatequina) ou três grupos hidroxilo (galhocatequina, epigalhocatequina) (**Tabela 4**) [48].

Tabela 4- Estrutura química geral dos flavan-3-óis e respetivo padrão de substituição, adaptado de [48]


Composto	Substituintes			
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(+)-afzelequina	H	OH	H	H
(-)-epiafzelequina	OH	H	H	H
(+)-catequina	H	OH	H	OH
(-)-epicatequina	OH	H	H	OH
(+)-galhocatequina	H	OH	OH	OH
(-)-epigalhocatequina	OH	H	OH	OH

Além disto, os flavan-3-óis podem encontrar-se esterificados com o ácido gálico no grupo OH do carbono 3 [49].

Esta subclasse contribui para a sensação de adstringência e sabor amargo, encontrando-se em alimentos como maçãs, pêssegos, bananas e mirtilos e em bebidas como chá preto, sumo de fruta e vinho [43, 50, 51]

4. Antocianinas

As antocianinas encontram-se, sobretudo, nos vacúolos celulares, constituindo, nas plantas, o grupo de pigmentos solúveis em água com maior relevância [52, 53]. Este termo resulta da junção de *Anthos* e *Kyanos* (de origem grega) que significam, respetivamente, flor e azul, sendo que, estes compostos acumulam-se, essencialmente, nos frutos, vegetais e flores [54, 55].

Esta subclasse de flavonóides possui um comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) na zona do visível, entre os 465 e os 550 nm e um outro entre os 270 e os 280 nm, correspondente à zona do UV [56]. Deste modo, estes pigmentos são produtores,

em variadas flores, vegetais e frutas, de um espectro de cor laranja-vermelho a violeta-azul [57].

Relativamente à sua estrutura química, as antocianinas possuem a estrutura básica do catião flavílio (**Figura 2**) [58].

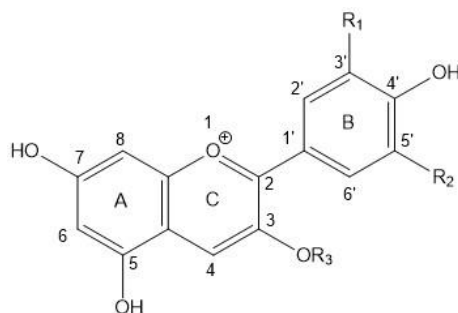


Figura 2- Estrutura química geral das antocianinas. R_1 e R_2 = H, OH ou OCH_3 ; R_3 = H ou resíduo glicosídico.

As antocianinas consistem a forma glicosilada das antocianidinas, as agliconas, sendo que na natureza, cerca de 95 % destas, derivam de seis antocianidinas principais, cianidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, delphinidina e petunidina (**Tabela 5**) [59, 60].

Os derivados glicosídeos mais abundantes são os da cianidina, pelargonidina e delphinidina [61].

Tabela 5- Padrão de substituição de cada uma das antocianidinas, sua respetiva cor e absorção máxima, adaptado de [62]

Antocianidina	Substituintes		Cor	Absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) ¹ (nm)
	R_1	R_2		
Cianidina	OH	H	Magenta	535
Pelargonidina	H	H	Roxo	542
Peonidina	OCH_3	H	Roxo	546
Delphinidina	OH	OH	Magenta	532
Malvidina	OCH_3	OCH_3	Vermelho	520
Petunidina	OH	OCH_3	Roxo	543

¹Em MeOH acidificado com HCl

As diferenças que existem dentro desta subclasse baseiam-se no número e posição dos grupos hidroxilo, grau de metilação dos mesmos e, ainda, no número e natureza dos açúcares ligados à antocianidina. Além disto, também é considerado como fator de diferenciação, o tipo de ácidos, aromático ou alifático, esterificado na molécula de açúcar [63].

Dependendo do número de grupos metoxilo e hidroxilo que a antocianina possui, o tipo de cor e a sua intensidade diferem, possuindo um tom mais vermelho com um maior número de grupos metoxilo e, em contrapartida, um tom mais azulado na presença de um maior número de grupos hidroxilo [55]. Geralmente, a metilação da antocianina causa uma melhoria na estabilidade enquanto que a hidroxilação, em contrapartida, leva a uma redução na mesma [59].

Relativamente à glicosilação, entre os açúcares que mais frequentemente se ligam à aglicona está a molécula de glucose, xilose, galactose, ramnose e arabinose (**Figura 3**) [64]. Estes açúcares podem ligar-se ao catião flavílio na forma de mono-, di- e, ainda, trissacárido [65].

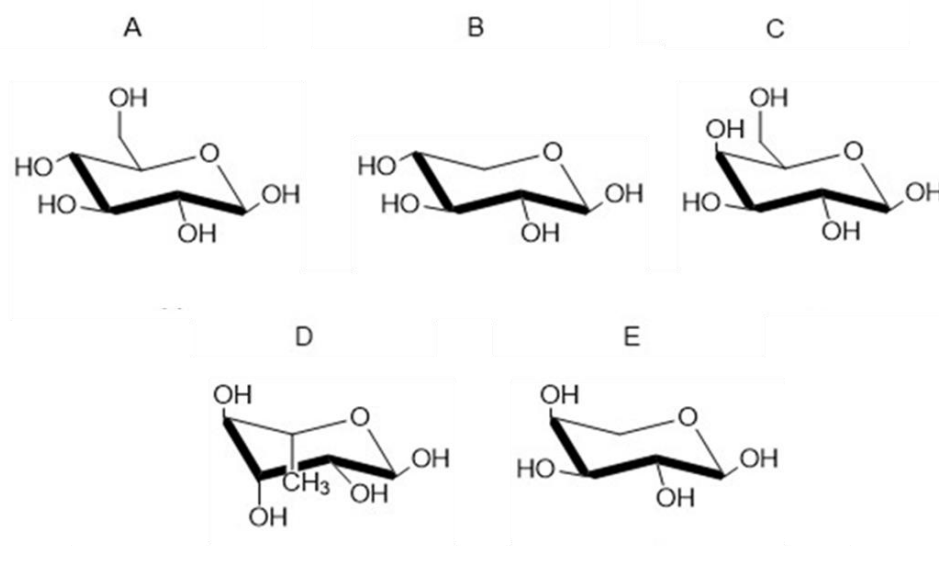


Figura 3- Estrutura química dos açúcares que mais frequentemente se ligam à aglicona: (A) α-D-glucose, (B) β-D-xilose, (C) β-D-galactose, (D) α-L-ramnose e (E) α-L-arabinose.

A ligação das unidades glicosídicas ocorre preferencialmente na posição 3 e, quando há a ligação de mais que um açúcar, a ligação poderá ocorrer nas posições 5 e 7 e, de

forma mais rara, nas posições 3' e 5' [66]. A ocorrência da glicosilação faz com que haja um aumento da solubilidade em água, sendo que, além disto, faz com que também a estabilidade da antocianina seja melhorada [62].

Quanto à acilação do açúcar, poderá ocorrer com ácidos aromáticos, como o ácido gálico, ferúlico, sinápico, *p*-hidroxibenzoico e *p*-cumárico ou ácidos alifáticos como o ácido málico, acético, succínico, malónico e oxálico (**Figura 4**) [67].

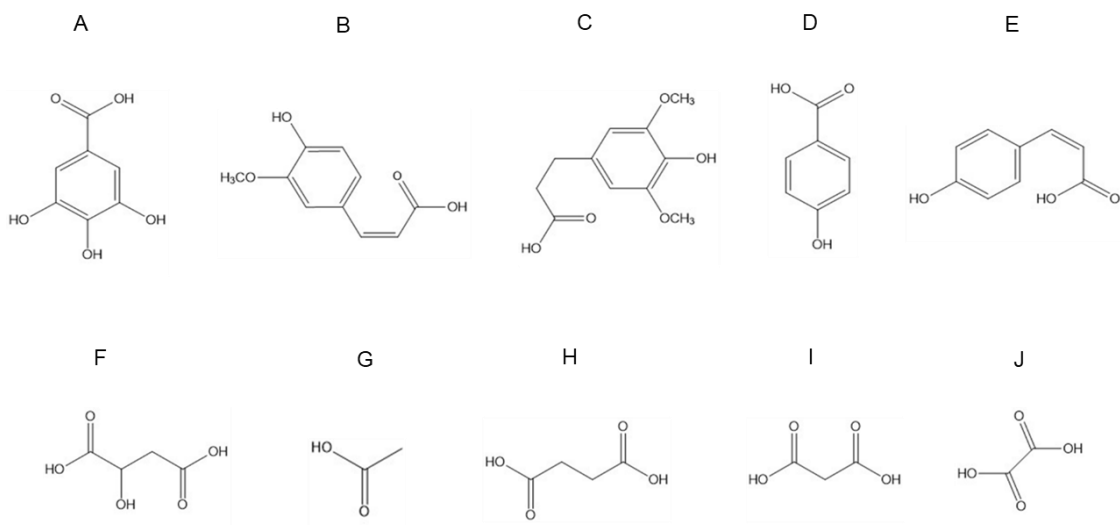


Figura 4- Estrutura química dos ácidos aromáticos, ácido gálico (A), ácido ferúlico (B), ácido sinápico (C), ácido *p*-hidroxibenzoico (D), ácido *p*-cumárico (E) e ácidos alifáticos, ácido málico (F), acético (G), succínico (H), malónico (I) e o oxálico (J).

Quando a acilação ocorre com ácidos aromáticos, ocorre uma mudança de tom para azul e, por sua vez, quando esta é realizada com ácidos alifáticos, não se verifica uma mudança na cor [68]. Quanto à solubilidade em água desta subclasse, contrariamente do que se verifica com a glicosilação, a acilação provoca uma diminuição da mesma [62].

4.1. Estabilidade das antocianinas: influência do pH

As propriedades físico-químicas que estes pigmentos possuem são únicas, em especial, a sua estabilidade e características da cor [69]. As antocianinas caracterizam-se por serem bastante reativas e suscetíveis a diversas reações de degradação [70].

O pH, a luz, a temperatura, a estrutura e os solventes, são alguns dos fatores que afetam, de forma significativa, a estabilidade da cor das antocianinas [71].

A cor que as antocianinas apresentam é dependente do pH da solução em que se encontram dissolvidas [58]. Em solução aquosa, as antocianinas podem encontrar-se em diversas formas diferentes de equilíbrio, dependendo do pH da solução (**Figura 5**) [72].

A pH ácido, a forma predominante é a do catião flavílio (AH^+) de cor vermelha [73]. Com o aumento de pH acima de pH 2, ocorrem duas reações: desprotonação do catião flavílio, levando à formação da base quinoidal (A), de cor violeta e hidratação do catião flavílio, responsável pela formação do hemiacetal (B), que por sua vez é incolor [74].

A transferência de prótons é uma reação que ocorre de forma mais rápida que a hidratação, esta última, termodinamicamente mais estável [75]. Além disto, esta última forma (B) pode sofrer uma reação de tautomerização formando a cis-chalcona (C_c), de cor amarelo claro e, por isomerização desta, a trans-chalcona (C_t) [73].

Com o aumento do pH para um valor acima de 6, a base quinoidal (A) pode sofrer uma reação de ionização e originar a forma quinoidal aniónica, que, por sua vez, possui a cor azul [74].

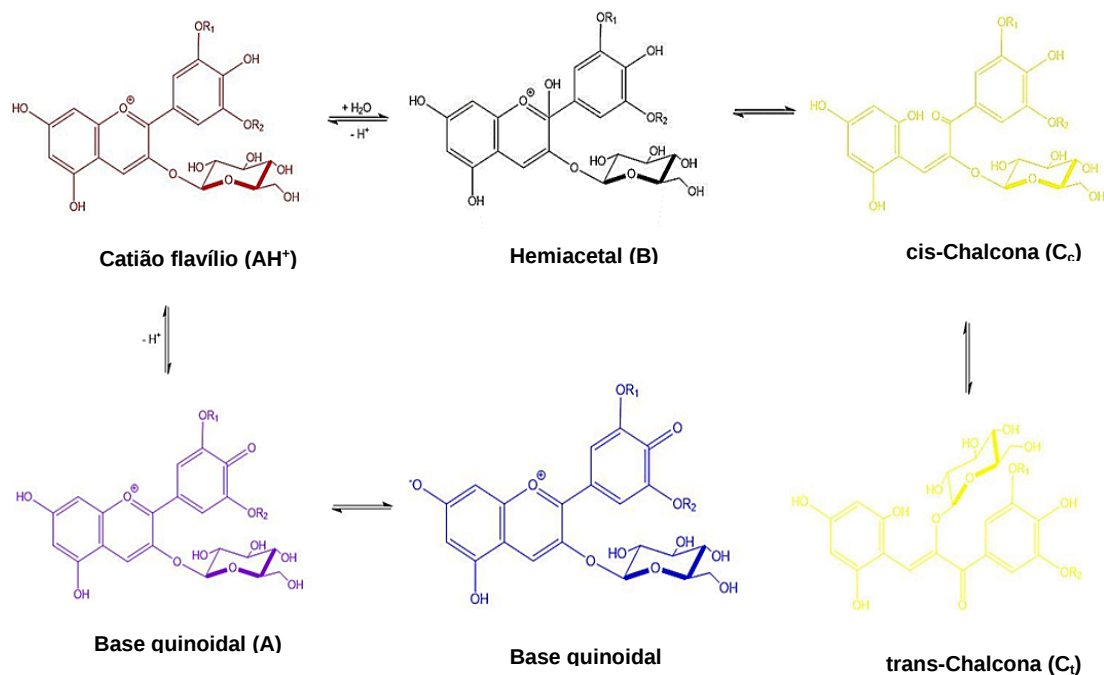


Figura 5- Formas das antocianinas em equilíbrio, em solução aquosa, consoante o pH, adaptado de [69].

4.2. Antocianinas na dieta humana

As antocianinas podem ser encontradas em frutos, cereais, vegetais e legumes [65]. De entre as fontes onde é possível encontrar as antocianinas na dieta, as mais abundantes são os frutos vermelhos, como framboesas, amoras, uvas, cerejas, morangos e groselhas pretas e cereais, como a cevada e o trigo [76, 77]. É, ainda, através de bebidas e alimentos processados, como é o caso do vinho tinto, que as antocianinas podem fazer parte da dieta humana [78].

De acordo com os hábitos alimentares das populações, hábitos estes que são influenciados pelo estilo de vida e por fatores demográficos e socioeconómicos, a ingestão diária destes compostos pode apresentar uma grande variação [79].

Na **Tabela 6** apresenta-se o teor de antocianinas (mg.Kg^{-1} ou mg.L^{-1}) presente em alguns exemplos vegetais de frutas e bebidas.

Tabela 6- Teor em antocianinas (mg.Kg^{-1} ou mg.L^{-1}) de determinados alimentos e bebidas, adaptado de [46]

Alimento/bebida	Teor em antocianinas
Ameixa	20-250
Amora	1150
Beringela	7500
Cebola	> 250
Cereja	20-4500
Framboesa preta	1700-4277
Framboesa vermelha	100-600
Groselha preta	1300-4000
Mirtilo	825-4200
Morango	150-350
Uvas tintas	300-7500
Vinho do Porto	140-1100
Vinho tinto	240-350

Entre frutos do mesmo tipo pode ocorrer uma variação do teor de antocianinas, isto devido a diversos fatores, internos e externos (p.e. temperatura, intensidade de luz, fatores genéticos e fatores agrícolas) [80].

Relativamente às seis antocianidinas já mencionadas, a sua distribuição em vegetais e frutas corresponde a aproximadamente 50 % cianidina, 12 % pelargonidina, 12 % peonidina, 12 % delphinidina, 7 % malvidina e 7 % petunidina e, desta forma, nas plantas e nas frutas, a antocianina que é considerada mais abundante é a cianidina-3-glucósido [58, 81].

4.3. Antocianinas na saúde

As antocianinas possuem uma vasta gama de efeitos terapêuticos, os quais, foram demonstrados não só em sistemas *in vitro* mas, também, em testes em animais e humanos [82]. Desde, pelo menos, o século XVI, há conhecimento dos seus efeitos benéficos na saúde humana quando, no tratamento de infeções nos olhos e na boca, foi utilizado sumo de amora [83].

De entre os efeitos biológicos das antocianinas, encontra-se a sua atividade antioxidante [84]. De facto, a maioria dos efeitos na saúde que esta subclasse possui são atribuídos, principalmente, às suas atividades antioxidantes [58].

As antocianinas possuem uma atividade antioxidante superior comparativamente aos restantes flavonóides. Esta capacidade aumenta com hidroxilação no anel B (-OH > -OCH₃ > -H). Assim, a capacidade segue a seguinte ordem: delphinidina > petunidina > malvidina = cianidina > peonidina > pelargonidina. A glicosilação e a acilação são outros fatores dos quais a atividade antioxidante das antocianinas depende [52].

Além deste efeito, também se encontram reportados estudos que demonstram que esta subclasse possui uma atividade anti-inflamatória, tendo efeito, por exemplo, em doenças como a colite e a sua atividade antimicrobiana, tendo já sido relatado a inibição de bactérias Gram-negativas com extratos ricos em antocianinas [85-87].

A sua atividade anticancerígena e capacidade de melhorarem a visão são outros exemplos dos efeitos que as antocianinas possuem na saúde [88, 89].

Assim, de uma forma geral, a ingestão frequente de alimentos ricos em antocianinas pode ajudar a melhorar o estado de saúde e a prevenir diversos distúrbios crónicos [77].

5. Subprodutos alimentares

Os subprodutos provenientes de frutas e legumes também constituem uma fonte de um elevado teor em compostos bioativos [12]. Na **Tabela 7** está descrito a composição e o teor em compostos fenólicos presente em determinados subprodutos alimentares.

Tabela 7- Composição e teor em compostos fenólicos presente em determinados subprodutos alimentares (mg equivalentes de ácido gálgico.g⁻¹ de peso seco), adaptado de [90]

Subproduto	Teor em compostos fenólicos	Exemplos de compostos fenólicos presentes
Bagaço de uva	142,1	Ácidos cafeico, ácido gálgico, antocianinas, proantocianidinas, quercetina e resveratrol
Caroço da manga	72,1	Ácido gálgico, ácido elágico e galhotaninos
Casca da banana	29,2	Ácido ferúlico, ácido hidroxibenzóico e ácido gálgico
Casca da laranja	65,7	Ácido cafeico e ácido p-cumárico
Casca da maçã	34,3	Ácido gálgico e catequina
Casca da romã	139,4	Ácido gálgico, ácido elágico e catequina
Grainha da uva	74,0	Ácido gálgico, catequina e epicatequinas

Portugal é o 11º produtor mundial de vinho [91]. O processo de vinificação conduz à produção de uma elevada quantidade de resíduos e subprodutos num reduzido espaço temporal, como é o caso das grainhas da uva, do engaço e do bagaço de uva, este último correspondendo a cerca de 200 toneladas/ano [92, 93]. O bagaço de uva é tipicamente utilizado para produção de fertilizantes e ração mas, dada a sua composição química tem sido considerado como uma alternativa promissora como fonte de produtos de valor acrescentado [92]. O bagaço de uva representa entre 20-25 % do peso da uva e é rico numa vasta diversidade de compostos fenólicos como ácidos fenólicos, antocianinas, flavonóis e proantocianidinas [94-96]. Além disto, ainda possuem na sua composição fibras alimentares, proteínas e minerais [97].

A utilização de subprodutos como fontes de ingredientes funcionais encontra-se em forte crescimento [96]. Assim, dada a composição dos subprodutos em compostos bioativos e ao facto de possuírem um potencial valor nutricional, os subprodutos

alimentares e agrícolas possuem um papel relevante no desenvolvimento de novos alimentos funcionais sustentáveis [98].

6. Métodos de extração de compostos fenólicos

6.1. Método de extração convencional

O procedimento de extração ideal de compostos bioativos deve ser económico, rápido e simples [99]. Além disso, diversos fatores deverão ser tidos em consideração na escolha de um procedimento de extração, como é o caso do tempo de extração e polaridade do solvente [100]. Deste modo, as características que os extratos obtidos apresentam, tanto qualitativamente como quantitativamente, são influenciados pelas condições de extração [101].

Encontram-se descritas várias técnicas de extração de compostos bioativos, mas, de um modo geral, os compostos fenólicos são extraídos recorrendo a métodos convencionais, como a maceração, a infusão, a extração soxhlet e a decocção [100, 102, 103]. A extração considerada convencional diz respeito à recuperação dos compostos bioativos presentes nas matrizes vegetais, através do uso de solventes aquosos e orgânicos [100]. As matrizes são homogeneizadas e imersas num solvente ou numa mistura destes, frequentemente sob constante agitação, sem ou com tratamento térmico e, dessa forma, extraídas as moléculas segundo fenómenos de transferência de massa e difusão [104].

Para a extração de compostos fenólicos, os métodos que mais usualmente são empregues utilizam água em mistura com solventes orgânicos, sendo que, para a extração destes compostos são utilizados, especialmente, solventes orgânicos polares, como é o caso do etanol, metanol, acetato de etilo e acetona [105, 106].

Apesar destes métodos recorrerem ao uso de equipamentos económicos e de serem de fácil execução, possuem diversas limitações tais como, a baixa eficiência, uma taxa de extração menor e um elevado consumo de solvente [104]. Além disto, possuem uma taxa elevada de evaporação do solvente durante a extração e caracterizam-se, normalmente, por tempos de extração extensos [107].

6.2. Métodos de extração verde

Atualmente, as “técnicas de extração verdes”, bem como os “solventes verdes” têm ganho bastante atenção na recuperação de compostos bioativos, tais como extração

com água subcrítica, extração assistida por micro-ondas, extração com líquido pressurizado, extração com alta pressão hidrostática, extração assistida por ultrassom, extração com fluidos supercríticos e a extração com campo elétrico pulsado [108-115].

Como alternativa aos métodos convencionais de extração, a extração com água subcrítica é uma tecnologia que tem sido aplicada com sucesso na recuperação de compostos fenólicos [116]. Comparando com os convencionais, este método gera rendimentos maiores, não envolve a utilização de um solvente orgânico e acarreta um consumo de energia menor [117, 118]. Assim, o solvente usado neste tipo de extração é a água, com propriedades físicas alteradas [119]. Dado as propriedades únicas de dissolução que se podem alterar modificando a temperatura, a água é um solvente que tem recebido progressivamente mais atenção [119]. Além do mais, a água não é tóxica, é barata, é reciclada de imediato e, dado ser o único solvente utilizado neste tipo de extração, considera-se uma extração amiga do ser humano e do ambiente [108].

Este método, que assenta na estrutura molecular e nas propriedades termodinâmicas da água, envolve temperaturas entre o seu ponto de ebulição e o seu ponto crítico, sob pressões altas o suficiente para manter a água no estado líquido [120, 121]. Perante uma temperatura mais elevada, a água possui uma constante dielétrica inferior, o que provoca o enfraquecimento das pontes de hidrogénio e torna a água subcrítica mais idêntica a solventes orgânicos menos polares [109]. A constante dielétrica da água a uma temperatura de 200°C é equivalente à do acetoneitrilo, a 250°C equivalente à do metanol e a 300°C equivalente à do etanol (**Figura 6**) [122].

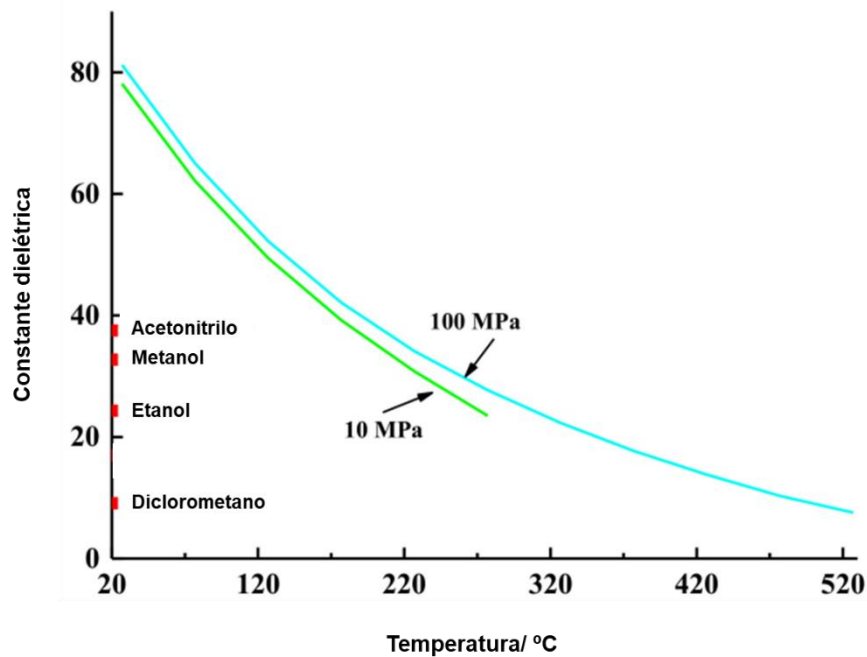


Figura 6- Constante dielétrica da água a temperaturas entre os 27 e os 527°C, a uma pressão de 10 a 100 Mpa e constante dielétrica do acetonitrilo, metanol, etanol e diclorometano a uma temperatura de 20°C e uma pressão de 0,1 Mpa, adaptado de [122].

A extração com água subcrítica tem-se mostrado uma metodologia eficiente na extração seletiva de diferentes classes de compostos, consoante a temperatura aplicada sendo que, a temperaturas mais elevadas são extraídos compostos menos polares e os mais polares, a temperaturas mais baixas [123].

Este tipo de metodologia de extração de compostos fenólicos tem sido aplicada em diversos subprodutos alimentares como, por exemplo, na casca da batata, na casca da manga, na casca da laranja, no bagaço de uva e nas cascas da castanha [124-128].

7. Compostos fenólicos extraíveis e não extraíveis

Os compostos fenólicos podem ser divididos em compostos fenólicos extraíveis e compostos fenólicos não extraíveis [129]. Apesar das metodologias verdes de extração de compostos fenólicos poderem aumentar a eficiência de extração, uma quantidade destes compostos fica retida nas matrizes vegetais [130, 131].

Dentro dos compostos fenólicos extraíveis estão incluídos os compostos com baixo peso molecular que são solúveis em solventes aquosos e orgânicos, enquanto, por sua vez, os compostos fenólicos não extraíveis, por possuírem uma estrutura polimérica

complexa, um alto peso molecular e também a ligação a macromoléculas, como polissacáridos ou proteínas, ficam retidos no resíduo sólido [131-134].

Nas frutas, os compostos fenólicos não extraíveis poderão representar mais de 24 % do conteúdo total em compostos fenólicos [135]. Encontram-se presentes, sobretudo, em resíduos de vegetais e frutas como é o caso do bagaço e das cascas [131].

Os tratamentos que têm sido mais aplicados com a finalidade de libertar os compostos fenólicos não extraíveis incluem as hidrólises alcalina e ácida [135]. No entanto, dada a complexidade destes compostos, as informações sobre a sua caracterização e análise são limitadas [135]. Assim, a grande parte das pesquisas atuais focam-se nas frações que contém compostos fenólicos extraíveis, encontrando-se muitas vezes negligenciadas as pesquisas sobre os compostos fenólicos não extraíveis [129].

8. Conjugados polissacáridos-compostos fenólicos

Os compostos fenólicos e as fibras alimentares representam dois dos componentes dos alimentos vegetais estando associados a diversos benefícios para a saúde [136]. Deste modo, a sua ingestão e seu uso como ingredientes funcionais tem vindo a expandir-se [136]. De uma forma geral, o interesse nas fibras alimentares encontra-se bastante associado ao importante papel que estas desempenham na redução de distúrbios de saúde [90]. Por exemplo, a pectina demonstrou possuir efeitos na redução do colesterol enquanto que a lignina, a celulose e a hemicelulose são conhecidas pelo seu papel na regulação intestinal [90]. Além disso, já se encontra descrito que a pectina cítrica reduziu a resistência à insulina e melhorou a tolerância à glucose [137].

As fibras alimentares encontram-se localizadas na parede celular vegetal sendo que a composição da mesma se altera entre tecidos e espécies (**Figura 7**) [138, 139].

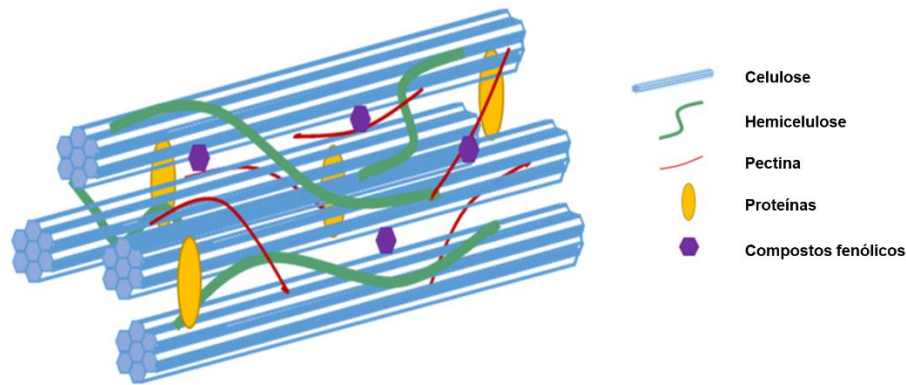


Figura 7- Esquemática da estrutura da parede celular primária e organização dos seus componentes, adaptado de [140].

As fibras alimentares podem dividir-se em duas categorias: fibras insolúveis (hemicelulose, celulose, lignina) e solúveis (pectinas, mucilagem) [139, 141].

Nos cereais, o composto fenólico principal ligado às fibras alimentares é o ácido ferúlico, seguido pelos ácidos sinápico, *p*-cumárico e cafeico [136]. Por sua vez, nas frutas, estes compostos são principalmente taninos poliméricos [136].

Normalmente, as interações entre os compostos fenólicos e os polissacáridos da parede celular envolvem ligações não covalentes que incluem essencialmente: interações eletrostáticas, pontes de hidrogénio, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals (**Figura 8**) [142]. As pontes de hidrogénio formam-se, normalmente, entre os átomos de oxigénio das ligações glicosídicas ou os grupos hidroxilo dos homogalacturonanos e os grupos hidroxilo dos compostos fenólicos [142]. Já no caso das interações hidrofóbicas, estas ligações formam-se entre os anéis aromáticos dos compostos fenólicos e as cavidades hidrofóbicas dos polissacáridos [142].

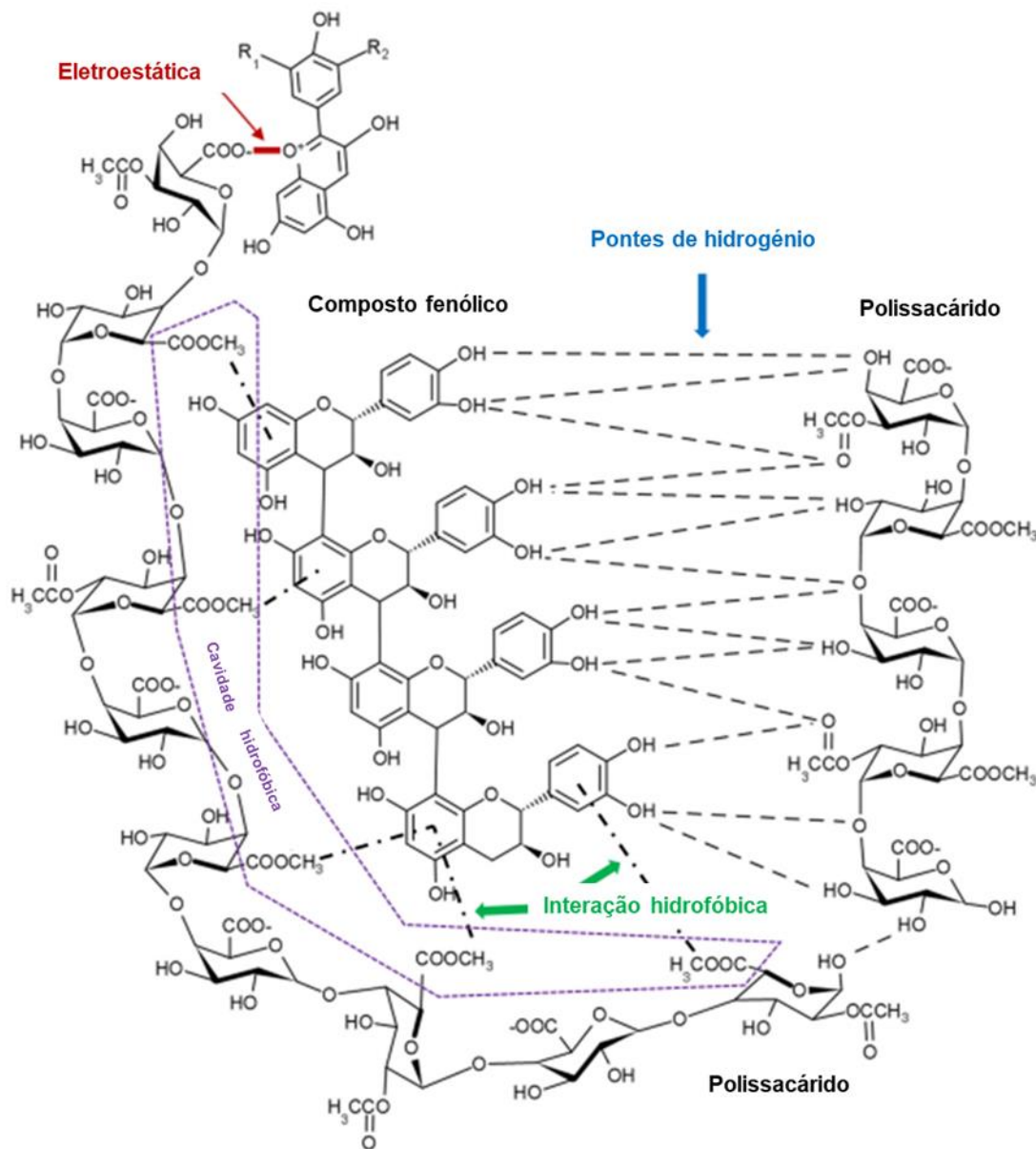


Figura 8- Potenciais mecanismos de interação entre os compostos fenólicos e os polissacáridos da parede celular, adaptado de [142].

Estima-se que, nas frutas, a percentagem do conteúdo de fibra alimentar que se encontra associado a compostos fenólicos é de aproximadamente 2,5 % [136].

Normalmente, nas extrações de compostos fenólicos, os resíduos sólidos são desprezados, não sendo considerados uma fonte de compostos bioativos [143]. Contudo, podem manter-se nestes mesmos resíduos, quantidades consideráveis de compostos fenólicos, associados à matriz das plantas, com os polissacáridos e as proteínas [143].

Deste modo, a atividade dos compostos fenólicos, de uma forma geral, encontra-se dependente não só da sua estrutura química e concentração como da interação com outros ingredientes (p.e. proteínas, lípidos e polissacáridos) e da estrutura da matriz [10, 142]. Assim, esta interação entre os vários tipos de compostos fenólicos e os polissacáridos da parede celular modificam não só a biodisponibilidade, mas também a sua bioacessibilidade e bioeficácia [142].

Nos últimos anos, a fração macromolecular presente nos frutos e vegetais, tais como os conjugados de polissacáridos-compostos fenólicos ou conjugados polissacáridos-proteínas-compostos fenólicos, tem despertado uma atenção considerável por parte da comunidade científica, uma vez que estes conjugados poderão combinar os efeitos fisiológicos distintos dos dois tipos de substâncias [144, 145].

Mais recentemente, as flores e folhas de várias plantas medicinais revelaram ser fontes valiosas de conjugados naturais polissacáridos-compostos fenólicos. Estes extratos exibem uma ampla variedade de propriedades biológicas, de acordo com os métodos de extração, das metodologias de purificação e da origem das plantas medicinais [146]. De entre os diversos efeitos biológicos que já se encontram descritos para estes conjugados, está a sua atividade antiplaquetária, anticoagulante, antioxidante, radioprotetora, antitússica e broncodilatadora [147-151].

9. Diabetes Mellitus

A maior parte dos alimentos possui carboidratos na sua composição sendo estes posteriormente decompostos com o objetivo de fornecer energia às células [152]. No sistema gastrointestinal, os carboidratos são decompostos em açúcares mais simples, como a glucose que, por sua vez, no intestino delgado, é absorvida pela corrente sanguínea e transportada para o fígado e células [152]. Os carboidratos representam cerca de 40-45 % da ingestão calórica total na dieta humana [153].

A Diabetes Mellitus é uma doença que se caracteriza pela presença de níveis elevados de açúcar no sangue, estando ainda associada a alterações metabólicas das proteínas, lípidos, eletrólitos ou sais minerais [154, 155]. Considera-se que se está perante condições de hiperglicemia quando a glucose na corrente sanguínea é superior 140 mg/dL (7,8 mmol/L) [156].

Em 2019, cerca de 463 milhões de pessoas com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos, foram diagnosticadas com Diabetes Mellitus [157]. Até 2030, este distúrbio complexo deve atingir um número de casos de 592 milhões, estando incluídos neste

valor os casos não diagnosticados [158, 159]. Assim, a sua prevalência encontra-se em expansão de uma forma rápida sendo que se prevê que os maiores aumentos sejam na América Central, Sudeste Asiático, África e Médio Oriente [160].

A Diabetes Mellitus encontra-se associada a diversas complicações crónicas como é o caso da retinopatia, da nefropatia e da angiopatia e os seus sinais e sintomas compreendem a perda de peso, a polifagia, a poliúria e a polidipsia [161, 162]. Contudo, a gravidade dos sintomas é devida à duração e ao tipo de diabetes apresentado havendo até determinados pacientes que são assintomáticos, particularmente, os que possuem Diabetes Mellitus tipo 2 nos primeiros anos [163].

A diabetes tipo 1, tipo 2 e a gestacional representam os três tipos que existem da doença, da qual, cerca de 90 % dos casos são do tipo 2 [3, 155]. Deste modo, a forma mais usual da doença é o tipo 2 e, entre os seus fatores de risco está a obesidade, a genética, a idade e o estilo de vida [164, 165]. Este tipo de diabetes é a consequência do efeito combinado de dois fatores: secreção insuficiente da hormona insulina por parte das células β pancreáticas e a resistência a esta hormona [166].

Tal como o glucagon, a insulina, auxilia na regulação dos níveis de glucose na corrente sanguínea [167]. Esta hormona é produzida pelo pâncreas como resposta a níveis de glucose elevados na corrente sanguínea e, na fase pós-prandial, facilita o transporte da glucose para as células [152].

As opções terapêuticas que se encontram à disposição para esta doença metabólica compreendem vários agentes antidiabéticos orais, para além da administração de insulina [168]. No entanto, muitos destes possuem diversos efeitos adversos graves, como lesão hepática e complicações gastrointestinais [1, 168, 169]. Assim, uma intervenção mais eficiente para muitos dos portadores desta doença pode passar por alterações no estilo de vida, sendo até considerados fatores-chave do controlo da DMT2, o aumento da atividade física e alterações da dieta [170, 171]. Certas escolhas alimentares podem provocar efeitos positivos na saúde, prevenindo a Diabetes Mellitus tipo 2 e atenuando os sintomas da doença [172].

9.1. Compostos fenólicos e a Diabetes Mellitus

Na Diabetes Mellitus tipo 2, o excesso de peso corresponde a um dos fatores de risco modificáveis mais relevantes para o desenvolvimento e progressão da doença [173]. Neste sentido, a nutrição e a alimentação possuem papéis fundamentais na prevenção da doença e na promoção da saúde a longo prazo [174].

Assim, o aumento do consumo de frutas e vegetais encontra-se no centro das recomendações para controlar e prevenir a DMT2 [175]. Tanto os vegetais como as frutas são considerados alimentos essenciais para a saúde e representam a forma mais simples de alimentos funcionais, uma vez que são ricos numa diversidade de componentes bioativos [176, 177]. A definição de alimento funcional foi criada no Japão, na década de 80 e na categoria de alimento funcional podem encontrar-se incluídos os alimentos que possuem propriedades funcionais (vegetais e frutas), alimentos fortificados e, ainda, alimentos modificados [1, 178]. Os alimentos funcionais bem como os seus compostos ativos, realizam, na prevenção de doenças crónicas, um papel essencial, prevenindo infeções e melhorando a imunidade [179].

As frutas e vegetais são fontes ricas de diversos compostos fenólicos que possuem efeitos promotores de saúde [180]. Apesar dos compostos fenólicos não serem considerados fundamentais para o metabolismo humano, estes podem diminuir o risco de doenças graves e causar uma melhoria na saúde, caso se encontrem presentes na dieta [102].

Nos últimos anos, o interesse pelos efeitos destes compostos na saúde, tem crescido de uma forma exponencial, sendo o potencial antidiabético, um dos efeitos biológicos mais estudado [181, 182].

O potencial antidiabético dos compostos fenólicos pode ser observado no facto destes compostos inibirem a atividade das enzimas digestivas [183]. A inibição das enzimas que metabolizam os carboidratos é um processo fundamental no controlo e prevenção da DMT2, devido ao seu impacto no balanço de glucose pós-prandial [1]. O sistema digestivo humano possui diferentes enzimas que atuam de modo sinérgico para digerir os carboidratos presentes na dieta [1].

As enzimas α -amilase e a α -glucosidase representam duas enzimas envolvidas na digestão dos carboidratos, localizadas no pâncreas e no intestino delgado, respetivamente [184, 185]. A α -amilase cliva as ligações glicosídicas α -1,4 originando oligossacarídeos (maltotriose, maltose) que, posteriormente, serão clivados na molécula de glucose, através da ação da α -glucosidase [186, 187]. De seguida, a glucose atravessa as membranas celulares intestinais através dos transportadores de glucose (GLUTs) [188]. Deste modo, uma forma de manter os níveis de glucose no sangue mais estáveis e baixos é através da inibição das enzimas responsáveis pela hidrólise dos carboidratos: α -amilase e α -glucosidase [189].

Na literatura já se encontra descrito a inibição da enzima α -amilase por parte de várias classes de compostos fenólicos como as antocianinas, ácidos fenólicos, flavonóis e flavan-3-óis [190-193]. Estas mesmas classes também se encontram descritas como inibidores da enzima α -glucosidase [191, 194-196].

Além disto, o potencial dos compostos fenólicos para regular e inibir as reações de glicação também tem sido considerado relevante na patogénese da Diabetes [197]. A glicação de proteínas compreende uma série de reações complexas entre proteínas e os açúcares redutores que resulta na formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) [198, 199]. A hiperglicemia acelera a acumulação destes produtos, onde a velocidade de glicação é bastante aumentada [200, 201]. Assim, elevados níveis de glucose, podem provocar a glicação de diversas proteínas funcionais e estruturais [202].

Tanto a glicação como a acumulação dos seus produtos finais de glicação avançada são fatores que contribuem para a Diabetes Mellitus e para a patogénese associada em pacientes portadores da doença [203]. Deste modo, há vários compostos fenólicos que possuem propriedades antioxidantes e, conseqüentemente, poderão influenciar a formação de produtos de glicação avançada [204].

Outro exemplo do seu potencial antidiabético é o facto dos compostos fenólicos poderem influenciar o transporte de glucose, interagindo diretamente com os transportadores de glucose [205]. O transporte de glucose através das membranas celulares, possui um papel essencial no controlo e regulação metabólica [206]. No intestino, o influxo de glucose para as células epiteliais é mediado pelo transportador SGLT1 (co-transportador de sódio-glucose 1) que se encontra na membrana apical e, posteriormente, a glucose flui para a corrente sanguínea através do transportador GLUT2 (transportador de glucose 2) que se encontra na membrana basolateral [207].

As antocianinas são uma das classes de flavonóides que podem influenciar o transporte de glucose, encontrando-se descrito que estes compostos podem interagir com os transportadores [208]. Isto pode ainda ser verificado com outros compostos fenólicos como é o caso dos flavonóis, mais especificamente a quercetina, que é um inibidor do *uptake* de glucose [209].

Para além dos compostos fenólicos, também tem sido descrita a atividade antidiabética dos polissacáridos, essencialmente associada à inibição da atividade de enzimas digestivas [210]. No entanto, o potencial antidiabético dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos é raramente reportado, tendo sido descrito apenas para os conjugados de polissacáridos-proteínas-compostos fenólicos obtidos a partir de

plantas medicinais ou para conjugados polissacáridos-compostos fenólicos sintéticos [145, 211].

Neste sentido, existe uma lacuna no potencial antidiabético dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos naturais. Estes conjugados poderão ser potenciais ingredientes funcionais para aplicação na prevenção e controlo da Diabetes Mellitus tipo 2.

Por outro lado, para além dos métodos convencionais de extração de compostos bioativos habitualmente aplicados, é importante estudar a extração verde como forma de se aplicar uma metodologia sustentável e contornar as desvantagens existentes nos métodos convencionais. Outro fator relevante é a extração dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos de subprodutos da indústria agro-alimentar pois estes resíduos ainda podem ser valorizados devido ao seu conteúdo em compostos bioativos. Assim, esta extração verde para se obter conjugados polissacáridos-compostos fenólicos a partir de subprodutos alimentares constitui uma boa fonte de exploração.

Design experimental

Dada a crescente procura por ingredientes e alimentos funcionais, o presente trabalho teve como objetivo a recuperação de compostos bioativos de um subproduto da indústria vitivinícola para potencial aplicação como ingredientes funcionais para a Diabetes Mellitus tipo 2. Assim, estudou-se a aplicabilidade de extratos ricos em compostos fenólicos e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos obtidos a partir de um subproduto da indústria vitivinícola, por extração sólido-líquido e extração com água subcrítica como potenciais agentes antidiabéticos. O procedimento experimental foi dividido nas seguintes etapas (**Figura 9**):

- I) Obtenção dos extratos ricos em compostos fenólicos livres e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos a partir de um subproduto da indústria vitivinícola, o bagaço de uvas tintas;
- II) Caracterização físico-química dos extratos;
- III) Estudos de inibição enzimática: impacto dos extratos na atividade das enzimas digestivas (α -amilase e α -glucosidase);
- IV) Estudo da atividade de antiglicação dos extratos;
- V) Impacto dos extratos na modelação do transporte da glucose transepitelial *in vitro* através de um modelo celular intestinal, C2BBel.

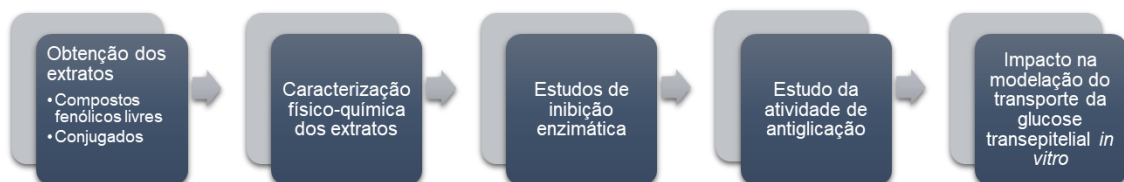


Figura 9- Representação esquemática das etapas realizadas no decorrer do procedimento experimental.

Materiais e métodos

1. Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram de qualidade analítica. Da Chem-Lab (EUA) foram adquiridos o acetonitrilo (ACN), o metanol (MeOH), o ácido fórmico e o ácido cítrico. O hidróxido de sódio (NaOH) e o hexano foram adquiridos da LabChem (Portugal). O reagente de Folin Ciocalteu, o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), a albumina de soro bovino (BSA), o reagente de Bradford, o bicarbonato de aminoguanidina (AG), o hexametildisilazano (HMDS), o ácido trifluoroacético (TFA), a enzima alfa α -amilase pancreática de porco (1710 U/mg), a enzima α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (24,12 U/mg), o substrato 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo, a acarbose, o ácido 4-(2-hidroxietil-1-piperazinil-etanosulfónico) (HEPES), o soro fetal de bovino, o piruvato de sódio, a penicilina, o glutamax, a anfotericina e a estreptomicina foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha). O éter dietílico foi adquirido da Fisher Scientific (Bélgica), a D-(+)-Glucose da Merck (Alemanha), o dimetilsulfóxido (DMSO) e o ácido clorídrico (HCl) da Honeywell Biedel-de-Haen™ (Portugal) e o tampão fosfato salino (PBS) da AppliChem ITW Reagents (Alemanha). O substrato etilideno-4-nitrofenil- α -D-maltoheptaosídeo (E-4-NP-G7) foi adquirido da Sorachim (Espanha).

2. Material vegetal

Os extratos de compostos fenólicos livres e de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos testados neste trabalho foram obtidos a partir do bagaço de uvas tintas desengaçado (*Vitis vinífera* L. cv.), gentilmente fornecido por um agricultor local. O bagaço foi recolhido em outubro de 2020, após a última etapa de fermentação alcoólica (7 dias), congelado a -20°C e liofilizado até posterior utilização. As grainhas que ainda se encontravam presentes no bagaço foram retiradas manualmente antes das extrações.

3. Extração de compostos fenólicos

A extração convencional de compostos fenólicos foi realizada por extração sólido-líquido, utilizando como solvente extrator uma mistura de água e etanol (1:1, v/v). 40 g de bagaço de uvas tintas liofilizado foram extraídas com 400 mL de solvente extrator, a pH 2,3, ajustado com ácido cítrico 73 %. Esta mistura foi deixada a macerar durante 2 horas e filtrada num filtro de tecido. De seguida, a fase líquida foi centrifugada a 11500 rpm, durante 5 minutos e o solvente orgânico foi evaporado num evaporador rotativo sob vácuo a 37°C. Para remoção dos açúcares simples e outras impurezas, este extrato

foi purificado por cromatografia líquida em funil em Büchner com gel sílica C18, evaporado num evaporador rotativo sob vácuo a 37°C, congelado e liofilizado até posterior utilização, designando-se por compostos fenólicos livres convencionais (CFLC).

4. Extração dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos

4.1. Extração alcalina convencional

A extração e purificação dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos foi realizada segundo o método descrito na literatura, com ligeiras modificações [212]. 5 g de bagaço de uvas tintas liofilizado foi disperso em 50 mL de NaOH 0,1 M e deixado em maceração durante 24 horas, à temperatura ambiente, sob agitação. De seguida, a mistura foi extraída, durante 6 horas, a 94°C, em refluxo. O sobrenadante foi recuperado, por centrifugação a 10000 rpm durante 10 minutos sendo o pH neutralizado com HCl 0,1 M.

Para a purificação deste extrato, o sobrenadante foi diluído para um volume final de 250 mL de água destilada e extraído com hexano (1:1, v/v), em refluxo, durante 6 horas, a uma temperatura de 69°C. Esta extração foi realizada duas vezes. A fase aquosa foi, de seguida, extraída com éter dietílico (1:1, v/v), em refluxo, durante 6 horas, a 34°C, tendo, também este passo, sido realizado duas vezes. A fase aquosa foi evaporada até à formação de uma pasta, adicionando-se, posteriormente, 100 mL de metanol. Após 24 horas, à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 10000 rpm, durante 10 minutos e o resíduo sólido deixado a secar, durante 24 horas, à temperatura ambiente. O resíduo seco foi redissolvido em 150 mL de água destilada e dialisado numa membrana de diálise 12-14 kDa, durante 72 horas, com pelo menos 6 mudanças de água. Por fim, o extrato foi congelado e liofilizado até posterior utilização, designando-se por extrato convencional alcalino (ECA).

4.2. Extração com água subcrítica

Os conjugados polissacáridos-compostos fenólicos foram também obtidos por extração com água subcrítica, através de uma adaptação dos procedimentos descritos na literatura [148, 213]. As extrações foram efetuadas durante 30 minutos (a partir do momento em que a temperatura foi atingida), em atmosfera inerte, a 5,5 bar e com

agitação de 145 rpm. Foram testadas duas temperaturas e dois rácios de extração, 120°C (água destilada a pH 2,3, ajustado com ácido cítrico 73 %, rácio 1:10) e 95°C (água destilada, rácio 1:30).

As extrações foram efetuadas num reator (*Parr Instrument Company*, pressure reactor 4545; reactor controller 4848; heater assembly A2256HC 12EE). No fim deste tempo, as amostras foram filtradas sob vácuo num filtro de vidro (*Whatman*, G-F/C) e centrifugadas a 10000 rpm, durante 10 minutos. Os sobrenadantes resultantes das extrações foram evaporados num evaporador rotativo sob vácuo a 37°C até à formação de uma pasta sendo, de seguida, ressuspensos em 100 mL de metanol. Estas misturas foram deixadas 24 horas à temperatura ambiente e os precipitados formados foram recolhidos após centrifugação a 10000 rpm, durante 10 minutos. Os resíduos secos foram redissolvidos em 150 mL de água destilada e dialisados numa membrana de diálise 12-14 kDa, durante 72 horas, com pelo menos 6 mudanças de água. Por fim, os extratos foram congelados e liofilizados até posterior utilização, designando-se por extratos subcríticos a 95°C (ES-95) e extratos subcríticos a 120°C (ES-120).

O sobrenadante resultante da precipitação com metanol da extração subcrítica a 95°C, foi purificado por cromatografia líquida em funil de Büchner com gel sílica C18 para remoção de açúcares simples e ácidos, evaporado num evaporador rotativo sob vácuo a 37°C, congelado e liofilizado até posterior utilização. Esta fração foi denominada de fração de compostos fenólicos livres subcríticos a 95°C (CFL-95).

5. Caracterização físico-química dos extratos de compostos fenólicos e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos

Para a caracterização físico-química dos extratos obtidos por extração sólido-líquido e com água subcrítica, extratos de compostos fenólicos livres e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos, foram preparadas soluções a uma concentração de 1 mg.mL⁻¹, utilizando como solvente a água destilada.

5.1. Doseamento de compostos fenólicos totais

O doseamento de compostos fenólicos foi efetuado de acordo com o método de Folin Ciocalteu, com ligeiras alterações [214]. Num micro-tubo, foram adicionados 15 µL de amostra ou água destilada (branco), 75 µL do reagente de Folin Ciocalteu e 500 µL de água destilada. Depois de uma breve agitação no vórtex, foram adicionados 300 µL de

carbonato de sódio 20 % e 610 µL de água destilada. As misturas foram novamente agitadas no vórtex e colocadas ao abrigo da luz durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Findo esse tempo, foi pipetado 350 µL da mistura, em triplicado, para uma placa de 96 poços e medida a absorvância a 750 nm, num leitor de placas *Powerwave XS, Bio-Tek Instruments Inc.* Este doseamento foi realizado em triplicado.

O resultado foi expresso em µg equivalentes de ácido gálgico.mg⁻¹ de extrato, a partir de uma reta de calibração de ácido gálgico, representada pela seguinte equação:

$$\text{Abs (750 nm)} = 0,055 \times |\text{ácido gálgico}| - 0,0501; R^2 = 0,9856$$

5.2. Doseamento de antocianinas monoglucósidas

O doseamento de antocianinas monoglucósidas dos extratos de compostos fenólicos livres foi efetuado em triplicado por HPLC-DAD, tal como descrito na literatura [215]. A análise foi efetuada num *HPLC ELITE-LACHROM* equipado com um detetor de díodos L-2455, um injetor automático L-2200 e uma bomba L-2130. A separação foi efetuada por injeção direta de 20 µL numa coluna *Merck C18* de fase reversa (*LiChrospher® 100, LiChroCART®*; 250x4 mm; d.i.: 5 µm), a um comprimento de onda de 520 nm e a uma temperatura de 25°C. Para esta análise, foram utilizados dois solventes, água/ácido fórmico (90:10, v/v) (solvente A) e água/ácido fórmico/acetonitrilo (60:10:30, v/v/v) (solvente B), com um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, de acordo com o seguinte gradiente: 80% A e 20% B durante os primeiros 70 minutos, 15 % A e 85 % B dos 70 aos 75 minutos, 0 % A e 100 % B dos 75 minutos aos 90 minutos e de seguida estabilizado nas condições iniciais.

O teor em antocianinas monoglucósidas foi expresso em µg equivalentes de malvidina-3-O-glucósido.mg⁻¹ de extrato, sendo determinado através de uma reta de calibração obtida a partir da malvidina-3-O-glucósido, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Abs} = 47026,5068 \times |\text{malvidina-3-O-glucósido}| - 19301,630; R^2 = 0,9961$$

5.3. Caracterização do perfil antociânico por HPLC-DAD/ESI-MS

A caracterização do perfil antociânico foi realizada de acordo com o procedimento descrito na literatura [216]. A caracterização foi efetuada num *HPLC Finnigan Surveyor*

com uma coluna de fase reversa C18 (*Hypersil Gold*, 150 mm; d.i.: 4,6 mm; tamanho do poro: 5 µm) termostaticada a 25°C. Como solventes, nesta análise, utilizou-se: água/ácido fórmico (99:1, v/v) (solvente A) e água/ácido fórmico/acetonitrilo (69:1:30, v/v/v) (solvente B), com o mesmo gradiente descrito na secção anterior.

O HPLC encontrava-se acoplado a um detetor de massa LCQ DECA XP MAX (*Finnigan Corp*) com uma fonte de ionização à pressão atmosférica, ESI (ionização por *electrospray*). A temperatura e as voltagens do capilar foram de 325°C e 4 V, respetivamente, e, por sua vez, as voltagens do vaporizador foram de 5 kV. Como gás de revestimento e gás auxiliar utilizou-se o azoto, a um fluxo de 40 e 15 (em unidades arbitrárias), respetivamente.

Os espetros de massa foram obtidos em modo positivo, com um intervalo de m/z de 100-2000.

5.4. Determinação da percentagem de cor polimérica

A determinação da percentagem de cor polimérica dos extratos foi realizada de acordo com o protocolo descrito na literatura [217]. Numa cuvete de 1 cm foi adicionado 2,8 mL de amostra e 0,2 mL de água (controlo) enquanto, por sua vez, a uma segunda cuvete foi adicionada 2,8 mL de amostra e 0,2 mL de bissulfito a 20 %. As misturas foram estabilizadas durante 15 minutos, ao fim dos quais, as absorvâncias foram medidas num espectrofotómetro UV-vis *Thermo Scientific Evolution Array* a 420, 520 e 700 nm.

A densidade de cor do controlo e a cor polimérica da amostra tratada com bissulfito foram determinadas de acordo com a equação (1):

$$\text{Densidade de cor / cor polimérica} = [(A_{420 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}}) + (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})] * \text{FD},$$

FD= fator de diluição eq. (1)

Por fim, a percentagem de cor polimérica dos extratos foi calculada através da equação (2):

$$\% \text{ de cor polimérica} = \frac{\text{cor polimérica}}{\text{densidade de cor}} * 100 \quad \text{eq. (2)}$$

5.5. Doseamento de compostos fenólicos de baixo peso molecular e proantocianidinas

Para o doseamento de compostos fenólicos de baixo peso molecular e proantocianidinas nos extratos de compostos fenólicos livres, efetuou-se uma extração líquido-líquido prévia [218]. Num micro-tubo, foram adicionados 600 μL de amostra, 600 μL de acetato de etilo e 300 μL de acetonitrilo. Depois de agitada no vórtex, durante 10 segundos, a mistura foi centrifugada a 8000 rpm, durante 5 minutos. A fase orgânica foi removida e a fase aquosa foi novamente extraída. As fases orgânicas foram combinadas e secas num *CentriVac Concentrator Labconco*, durante 3-4 horas, a 37°C. Posteriormente, a amostra foi ressuspensa em água:metanol (1:1, v/v) e analisada por HPLC-DAD.

5.5.1. Compostos fenólicos de baixo peso molecular

O doseamento de compostos fenólicos de baixo peso molecular foi realizado de acordo com o método descrito na literatura [219]. As amostras foram analisadas, em triplicado, num *HPLC Dionex Ultimate 3000*, com uma coluna de gel C18 (*Thermo Scientific*, 150 mm $\times$ 4,6 mm. d.i.: 5 μm). Para esta análise, foram utilizados dois solventes, água/ácido fórmico (99:1, v/v) (solvente A) e água/acetonitrilo/ácido acético (79:20:1, v/v/v) (solvente B), com um fluxo de 0,3 mL.min⁻¹, de acordo com o seguinte gradiente: 80-20 % A e 20-80 % B durante os primeiros 55 minutos, 20-10% A e 80-90 % dos 55 aos 70 minutos, 10-0 % A e 90-10 % B dos 70 aos 90 minutos. A deteção foi realizada entre os 200-800 nm, com recurso a um detetor DAD.

O teor em compostos fenólicos de baixo peso molecular foi expresso em μg equivalentes de ácido gálico.mg⁻¹ de extrato, cujo valor foi determinado através de uma reta de calibração obtida a partir do ácido gálico, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Abs (280 nm)} = 167099 \times |\text{ácido gálico}| + 1518,7 ; R^2 = 0,9874$$

5.5.2. Proantocianidinas

O doseamento de proantocianidinas foi realizado de acordo com o método descrito na literatura [220]. As amostras foram analisadas, em triplicado, num *HPLC Dionex Ultimate 3000*, com uma coluna de gel C18 (*Thermo Scientific*, 150 mm $\times$ 4,6 mm. d.i.: 5 μm). Para esta análise, foram utilizados dois solventes, solução aquosa de ácido fórmico 0,1% (v/v) (solvente A) e ácido fórmico em acetonitrilo 0,1% (v/v) (solvente B), com um

fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, com um gradiente de linear (0 minutos: 10 % solvente B a 50 minutos: 20 % solvente B).

O teor em proantocianidinas foi expresso em µg equivalentes de catequina.mg⁻¹ de extrato, cujo valor foi determinado através de uma reta de calibração obtida a partir da catequina, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Abs (280 nm)} = 68082 \times |\text{catequina}| + 84,845 ; R^2 = 0,9861$$

5.6. Recuperação e caracterização dos compostos fenólicos presentes nos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos

De modo a identificar os compostos fenólicos presentes nos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos, foi efetuada uma hidrólise ácida para a quebra da interação entre os compostos fenólicos e as fibras, de acordo com o descrito na literatura [221, 222].

Para a hidrólise ácida, 20 mg dos extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos obtidos por extração sólido-líquido convencional e por extração com água subcrítica foram dissolvidos em 1,5 mL de água destilada e 0,5 mL de HCl (37 %). Esta mistura foi levada a aquecimento num termobloco *Thermo Fisher*, a 85°C, durante 30 minutos. A mistura foi extraída com 1,5 mL de éter dietílico:acetato de etilo (1:1, v/v) e, após uma agitação de 45 segundos no vórtex, foi centrifugada a 10000 rpm, durante 10 minutos. Esta extração foi repetida mais duas vezes. As fases orgânicas foram combinadas e secas num *CentriVac Concentrator Labconco*. A fase aquosa foi congelada e liofilizada. Os resíduos obtidos foram redissolvidos em 0,100 mL de água ou metanol:água (75:25, v/v) e analisados por HPLC-DAD-ESI-MS, tal como descrito na secção 5.3.

5.6.1. Espectroscopia de UV-Vis

As amostras de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos sujeitas a hidrólise ácida foram analisadas por UV-Vis antes e após a mistura ser levada a aquecimento. As soluções foram colocadas em cuvetes de 1 cm e os espectros traçados num espectrofotómetro UV-Vis *Thermo Scientific Evolution Array* de 250 a 800 nm.

5.7. Doseamento de proteínas

O teor em proteínas dos extratos de compostos fenólicos livres e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos foi determinado pelo método de Bradford, com ligeiras modificações [223]. Numa placa de 96 poços foram adicionados 100 μL de amostra/branco/padrão e 200 μL do reagente de Bradford. A placa foi colocada ao abrigo da luz e ao fim de 10 minutos, a absorvância foi lida, em triplicado, a 595 nm, num leitor de placas *Powerwave XS, Bio-Tek Instruments Inc.*

O branco do ensaio foi realizado com água destilada e, nas amostras que possuíam cor foi, ainda, realizado um branco da amostra composto por 200 μL de água destilada e 100 μL de amostra. Como padrão foi utilizada a BSA sendo o resultado final expresso em μg equivalentes de BSA. mg^{-1} de extrato, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Abs (595 nm)} = 0,098 \times |\text{BSA}| + 0,1192; R^2 = 0,978$$

5.8. Doseamento de açúcares

5.8.1. Doseamento de açúcares simples

A quantificação de açúcares simples dos extratos de compostos fenólicos livres foi realizada por GC-MS [224]. Para esta quantificação foi realizada uma derivatização prévia, de acordo com os seguintes passos: num micro-tubo foi adicionado 20 μL de amostra/solução padrão juntamente com 300 μL acetonitrilo, 300 μL de HMDS e 2 μL de ácido trifluoroacético. Os micro-tubos abertos foram levados a aquecimento a 50°C, durante 30 minutos, a 420 rpm, num termobloco *Thermo Fisher*. No final desse tempo, foi adicionado 400 μL de HMDS e a temperatura elevada para os 80°C, durante 30 minutos. Depois do arrefecimento foram formadas duas fases, sendo a fase orgânica analisada por GC-MS/MS (1 μL).

A análise foi efetuada num cromatografo gasoso Trace 1300, equipado com um injetor *split-splitless*, *autosampler* 1310 e um *ISQ Single quadrupole MS* da *Thermo Fisher*, a uma temperatura do injetor e da linha de transferência de MS de 250°C e 300°C, respetivamente. As amostras foram injetadas em modo *splitless* e os compostos separados numa coluna capilar DB-17 (*Agilent Technologies*, 30 m x 0,25 mm (d.i.) x 0,25 μm) a um fluxo de hélio constante de 1,5 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Inicialmente, a temperatura da coluna foi de 110°C, sendo que, este valor foi mantido durante 5 minutos e, posteriormente, aumentado 6°C. min^{-1} até aos 300°C, mantidos igualmente por 5 minutos.

Os espetros foram obtidos em modo SCAN, com um intervalo de m/z de 40-1100, a uma energia de eletrão de 70 eV e temperatura da fonte de iões de 280°C.

A curva de calibração foi efetuada utilizando como padrão a D-(+)-glucose e o resultado final expresso em μg equivalentes de glucose. mg^{-1} de extrato.

5.8.2. Análise e quantificação do conteúdo em monossacáridos dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos

A quantificação de ácidos urónicos nos extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos foi realizada através de uma modificação do método colorimétrico 3-fenilfenol, usando o ácido D-galacturónico como padrão [225]. As amostras foram hidrolisadas durante 3 horas, com 0,2 mL de ácido sulfúrico, à temperatura ambiente seguido de 1 hora, a 100°C, também em ácido sulfúrico. Os açúcares neutros foram analisados após a conversão dos acetatos de alditol por GC-FID, usando como padrão a 2-desoxiglucose [226].

O resultado final do total de polissacáridos dos extratos foi expresso em g.kg^{-1} .

5.9. Avaliação das propriedades antioxidantes

5.9.1. Capacidade antiradicalar (DPPH)

A avaliação da capacidade antiradicalar dos extratos foi medida recorrendo ao radical livre DPPH [227]. Numa placa de 96 poços, foram adicionados 270 μL do radical DPPH (60 μM , em metanol) e 30 μL da amostra/branco, tendo sido utilizado como branco a água destilada. Nas amostras que possuíam cor foi, ainda, realizado um branco da amostra composto por 270 μL de água destilada e 30 μL de amostra.

O ensaio foi realizado em triplicado, para cada réplica, a um comprimento de onda de 515 nm, num leitor de placas *Powerwave XS, Bio-Tek Instruments Inc.*, no tempo 0, 5, 10, 15 e 20 minutos. O resultado final foi expresso em μM equivalentes de Trolox, de acordo com a seguinte reta de calibração:

$$\% \text{ capacidade antiradicalar} = 2,9894 \times |\text{Trolox}| - 24,93; R^2 = 0,9964$$

5.9.2. Poder redutor (FRAP)

O poder redutor dos extratos foi avaliado pelo método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), com ligeiras alterações [228]. O reagente FRAP foi preparado através da adição de 10 mL de tampão acetato 300 mM, 1 mL da solução de 2,4,6-tripiridiltriazina (TPTZ) em 40 mM de HCl e 1 mL da solução de cloreto de ferro (III) (FeCl_3) 20 mM. Esta mistura foi diluída a 1/3 do volume em tampão acetato e aquecida a 37°C. Numa placa de 96 poços, colocou-se 270 μL do reagente de FRAP diluído e 30 μL de amostra/branco, tendo sido utilizado como branco a água destilada. Nas amostras que possuíam cor foi, ainda, realizado um branco da amostra composto por 270 μL de tampão acetato e 30 μL de amostra.

A absorvância foi lida a um comprimento de onda de 593 nm, no tempo 0 e 4 minutos, num leitor de placas *Powerwave XS, Bio-Tek Instruments Inc.*, a 37°C. O ensaio foi realizado em triplicado e os resultados foram expressos em μM equivalentes de Trolox, de acordo com a seguinte equação da curva de calibração:

$$\% \text{ de poder redutor} = 0,0421 \times |\text{Trolox}| + 0,0158; R^2 = 0,9873$$

6. Ensaaios de inibição enzimática

6.1. Enzima pancreática α -amilase

A atividade inibitória dos extratos de compostos fenólicos livres e de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos foi avaliada com recurso à enzima α -amilase pancreática de porco, usando como substrato o etilideno-4-nitrofenil- α -D-maltoheptaosídeo. A α -amilase foi preparada a 15 U/mg e o substrato a 2,5 mM, em tampão PBS 10 mM (pH 6,8).

O ensaio de inibição enzimática foi realizado a 405 nm, durante 50 minutos, a 37°C, sendo a absorvância medida num leitor de placas *FlexStation® 3 Multi-Mode Microplate Reader* (Molecular Devices).

Os extratos CFLC e CFL-95, devido à sua solubilidade, foram preparados em DMSO e testados num intervalo de concentrações entre 10-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos ES-95 e ES-120 foram preparados em tampão PBS e testados num intervalo de concentrações entre 100-1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O extrato de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos obtido por extração sólido-

líquido (ECA), devido à sua solubilidade, foi preparado em água e testado num intervalo de concentrações entre 1000-2150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Como controlo positivo foi usada a acarbose (1-8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e como controlo foi considerada a reação da enzima com o substrato, sem a adição dos restantes componentes. Os resultados foram expressos em % de inibição (eq (3)) sendo o IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) determinado através de uma curva não linear dose-resposta. As 3 réplicas de cada extrato foram testadas em triplicado (n=9).

A percentagem de inibição foi calculada a partir da equação (3):

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{\Delta_{\text{abs extrato}}}{\Delta_{\text{abs controlo}}} \times 100 \right) \quad \text{eq (3)}$$

6.2. Enzima α -glucosidase

A atividade inibitória dos extratos de compostos fenólicos livres e de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos foi igualmente avaliada na atividade da α -glucosidase (*Saccharomyces cerevisiae*) usando como substrato o 4-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo. A α -glucosidase foi preparada a 0,01 U/mg e o substrato a 269 μM , em tampão PBS 10 mM (pH 6,8).

O ensaio de inibição enzimática foi realizado a 405 nm, durante 50 minutos, a 37°C e a absorvância medida num leitor de placas *FlexStation® 3 Multi-Mode Microplate Reader* (Molecular Devices).

Os extratos CFLC e CFL-95, devido à sua solubilidade, foram preparados em DMSO e testados num intervalo de concentrações entre 0,10-0,90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos ES-95 e ES-120 foram preparados em tampão PBS e testados num intervalo de concentrações entre 1-3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O extrato de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos obtido por extração sólido-líquido (ECA), devido à sua solubilidade, foi preparado em água e testado num intervalo de concentrações entre 1-7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Como controlo positivo foi usada a acarbose (20-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e como controlo foi considerada a reação da enzima com o substrato, sem a adição dos restantes componentes. Os resultados foram expressos em % de inibição (eq (4)) sendo o IC_{50}

($\mu\text{g.mL}^{-1}$) determinado através de uma curva não linear dose-resposta. As 3 réplicas de cada extrato foram testadas em triplicado ($n=9$).

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{\Delta_{\text{abs extrato}}}{\Delta_{\text{abs controlo}}} \times 100 \right) \quad \text{eq (4)}$$

7. Avaliação da atividade de antiglicação

A avaliação da atividade de antiglicação dos extratos de compostos fenólicos livres e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos foi efetuada segundo o método BSA-glucose, de acordo com o procedimento descrito na literatura, com ligeiras modificações [199]. Para um volume final de 50 mL, foi preparada uma mistura reacional contendo os reagentes descritos na **Tabela 8**.

Tabela 8- Constituintes da mistura reacional

Constituintes	Concentração
Azida de sódio	0,1% (m/v)
BSA	5% (m/v)
Glucose	500 mM
PBS	200 mM

Usando esta mistura reacional como solvente, foram preparadas soluções dos extratos de modo a se obter gamas de concentrações entre 250-2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato CFLC e 50-2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato CFL-95. Os extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos ECA e ES-95 foram testados num intervalo de concentrações entre 250-2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que, o extrato ES-120 foi testado num intervalo de 250-3500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

As misturas foram incubadas durante 15 dias, a 37°C, ao fim dos quais a foi medida fluorescência no par excitação/emissão 370/440 nm, num leitor de placas *FlexStation® 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices)*.

Como controlo positivo foi usada a aminoguanidina (50-2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e como controlo foi considerada a fluorescência da mistura reacional, sem a adição dos extratos. Os resultados foram expressos em % de inibição (eq (5)) com a determinação do IC_{50}

($\mu\text{g.mL}^{-1}$) através de uma curva não linear dose-resposta. As 3 réplicas de cada extrato foram testadas em triplicado ($n=9$).

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{\Delta \text{Fluorescência extrato}}{\Delta \text{Fluorescência controlo}} \times 100 \right) \quad \text{eq (5)}$$

8. Estudo de transporte: *uptake* de glucose

Os estudos de transporte de glucose foram realizados de acordo com o procedimento descrito na literatura, com algumas modificações [229]. A linha celular C2BBe1 (clone da Caco-2) foi cultivada num Meio Essencial Mínimo (MEM) desenvolvido por Harry Eagle que foi suplementado com os constituintes descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9- Constituintes utilizados na suplementação do meio

Constituintes	Concentração
HEPES	25 mM
Soro fetal de bovino	15% (v/v)
Piruvato de sódio	1% (v/v)
Glutamax	1% (v/v)
Anfotericina	0,25 mM
Estreptomicina	100 mg/mL
Penicilina	10 U/mL

As células foram mantidas a uma temperatura de 37°C, em atmosfera de 95 % de humidade relativa e 5 % de dióxido de carbono (CO_2), tendo o meio de cultura sido mudado a cada dois dias.

Para o estudo de transporte de glucose, a linha celular foi semeada numa placa de *transwell* com 12 inserts a $1,5 \times 10^5$ células/mL (*Corning*, membrana de policarbonato, tamanho do poro: 0,4 μm ; diâmetro: 24 mm), tendo ficado 21 dias em cultura após a inoculação. A resistência transepitelial elétrica dos poços foi medida usando um voltímetro epitelial *Millicell* (*Millipore Co.*) e apenas foram consideradas as monocamadas com valores superiores a 230 Ω . Posteriormente, o meio foi removido e

as células C2BBe1 lavadas com tampão Hanks (pH 7,4). Este ensaio foi realizado fazendo 8 réplicas.

No lado basolateral de cada poço foi adicionado 1500 μL de tampão Hanks (sem glucose) enquanto, no lado apical, foram adicionado 500 μL dos extratos obtidos por extração subcrítica a 95°C (CFL-95 e ES-95) dissolvidos em tampão Hanks e com uma concentração de glucose de 25 mM (simular o estado alimentado). O extrato de compostos fenólicos livres (CFL-95) foi testado a uma concentração de 0,26 mg.mL^{-1} e os conjugados polissacáridos-compostos fenólicos (ES-95) a uma concentração de 10 mg.mL^{-1} . As amostras foram incubadas durante 2 horas e, ao fim desse tempo, foi recolhido o volume total do lado apical e basolateral. O volume recolhido foi congelado a -18°C até posterior quantificação da glucose de acordo com o procedimento descrito na secção 5.8.1.

A eficiência de transporte foi calculada a partir da equação (6):

$$\text{Eficiência de transporte} = \frac{|\text{Glucose no lado basolateral no tempo 2 horas}|}{|\text{Glucose no tempo zero}|} \times 100 \quad \text{eq (6)}$$

Como forma de validar o estudo de transporte, realizou-se um ensaio de fluorescência, em que as células foram incubadas durante 30 minutos com uma sonda de passagem paracelular, *Lucifer yellow* (100 μM) no lado apical do poço, a uma temperatura de 37°C. Efetuou-se uma recolha do lado apical e basolateral no tempo 0 e 30 minutos. A fluorescência foi medida no par excitação/emissão 458/530 nm num leitor de placas *FlexStation® 3 Multi-Mode Microplate Reader* (Molecular Devices). Descartaram-se os poços que transportaram mais de 5 % de *Lucifer yellow* para o lado basolateral.

9. Análise estatística

A análise estatística e o cálculo dos IC_{50} foram realizados com recurso ao software *GraphPad Prisma* (versão 8) (*GraphPad, La Jolla, CA, USA*). Os resultados apresentados representam uma média $\pm$ EPM (erro padrão da média), tendo os ensaios sido realizados em triplicado para cada réplica (n=9). Para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre as amostras foi realizada uma análise de variância

(ANOVA) seguindo de um teste de *Tukey*. Considerou-se que as amostras eram estatisticamente diferentes para $p < 0,05$.

Resultados e discussão

1. Caracterização físico-química das frações de compostos fenólicos e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos

Os extratos de compostos fenólicos livres e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos foram obtidos por extração sólido-líquido alcalina e através de uma extração mais verde, a extração com água subcrítica. Uma avaliação preliminar permitiu verificar que os três extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos recuperados apresentavam um aspeto fibroso, característico da presença de polissacáridos. No entanto, as frações obtidas por extração com água subcrítica, apresentavam uma coloração mais avermelhada (mais notória para a fração recuperada a menor temperatura), comparativamente com a fração isolada por extração sólido-líquido alcalina (acastanhada) e sugerindo a presença de pigmentos antociânicos adsorvidos (**Figura 10**). O rendimento de extração dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos foi superior na extração com água subcrítica a 120°C (pH 2,3), comparativamente com a extração convencional (**Tabela 10**). A extração subcrítica efetuada a uma menor temperatura e a um rácio sólido-líquido superior (1:30) resultou num menor rendimento de extração. Relativamente às frações de compostos fenólicos livres, obtidas por extração sólido-líquido (1:10) e extração subcrítica a 95°C (1:30), o rendimento de extração foi semelhante (1,5 e 1,3 %, respetivamente).

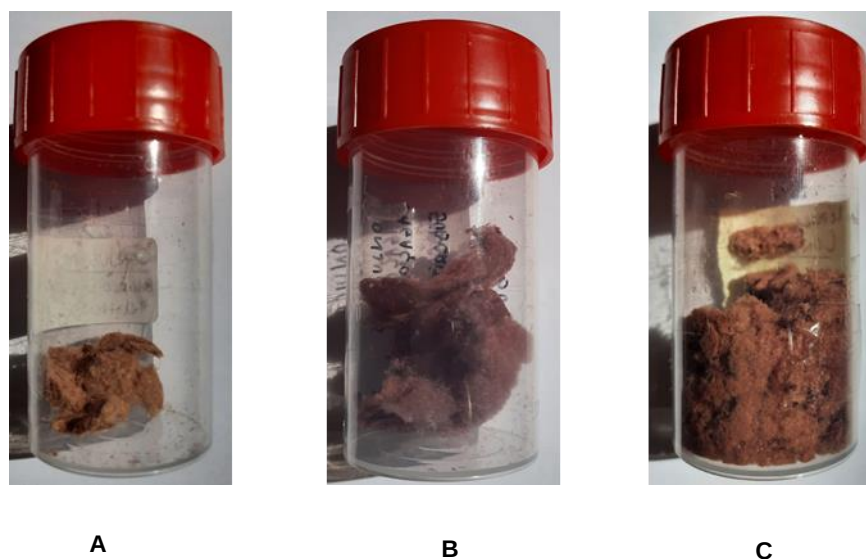


Figura 10- Extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos obtidos por extração sólido-líquido (A), extração subcrítica a 95°C (B) e extração subcrítica a 120°C (C).

Tabela 10- Rendimento de extração obtido para cada um dos extratos de compostos fenólicos livres e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos expressos em massa de extrato por massa de amostra seca liofilizada

Extrato	CFLC	CFL-95	ECA	ES-95	ES-120
Rendimento de extração (%)	1,5	1,3	2,6	1,2	3,4

O facto do rendimento de extração dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos ter sido superior na extração com água subcrítica a 120°C (pH 2,3), comparativamente com a extração convencional poderá ser resultado do aumento da permeabilidade do solvente nas células na extração com água subcrítica a temperatura e pressão superior, o que permitiu a obtenção de rendimentos de extração maiores [230]. Além disso, na extração com água subcrítica foi utilizado ácido, o que pode ter potenciado a hidrólise das ligações glicosídicas e, consequentemente, um maior rendimento de extração.

A composição química dos extratos de compostos fenólicos livres e dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos é apresentada na **Tabela 11**.

Tabela 11- Composição em compostos fenólicos, antocianinas, % de polimerização, compostos fenólicos de baixo peso molecular, proantocianidinas, proteínas, açúcares simples, DPPH e FRAP dos extratos de compostos fenólicos livres (CFLC e CFL-95) e dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos (ECA, ES-95 e ES-120). * $p < 0,05$, diferenças significativas entre os extratos de compostos fenólicos livres; ^a $p < 0,05$, diferenças significativas entre o extrato ECA e ES-120; ^b $p < 0,05$, diferenças significativas entre o extrato de ECA e os restantes extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos

	Extratos de compostos fenólicos livres		Extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos		
	CFLC	CFL-95	ECA	ES-95	ES-120
<u>Compostos fenólicos</u>					
(μg eq de ácido gálico. mg^{-1})	254 $\pm$ 8 *	427 $\pm$ 24 *	106 $\pm$ 2	108 $\pm$ 5	111 $\pm$ 2
<u>Antocianinas</u>					
(μg eq malvidina-3-O-glucósido. mg^{-1})	121 $\pm$ 14	101 $\pm$ 13	ND	ND	ND
<u>% de polimerização</u>					
	80,2 $\pm$ 0,2 *	30 $\pm$ 1 *	ND	ND	ND
<u>Compostos fenólicos de baixo peso molecular</u>					
(μg eq de ácido gálico. mg^{-1})	25 $\pm$ 2 *	76 $\pm$ 9 *	ND	ND	ND
<u>Proantocianidinas</u>					
(μg eq de catequina. mg^{-1})	187 $\pm$ 22 *	117 $\pm$ 6 *	ND	ND	ND
<u>Proteínas</u>					
(μg eq BSA. mg^{-1})	93 $\pm$ 3	105 $\pm$ 9	9 $\pm$ 2 ^a	10,4 $\pm$ 0,3	14,2 $\pm$ 0,5 ^a
<u>Açúcares simples</u>					
(μg eq de glucose. mg^{-1})	6,0 $\pm$ 0,3	7 $\pm$ 2	ND	ND	ND
<u>DPPH</u>					
(μM eq de Trolox)	13,7 $\pm$ 0,7 *	25 $\pm$ 2 *	16 $\pm$ 3 ^b	27 $\pm$ 1	25 $\pm$ 2
<u>FRAP</u>					
(μM eq de Trolox)	2,6 $\pm$ 0,7 *	6,2 $\pm$ 0,3 *	15 $\pm$ 2	12 $\pm$ 2	16 $\pm$ 2

1.1. Extratos de compostos fenólicos totais

1.1.1. Doseamento de compostos fenólicos

De acordo com os resultados presentes na **Tabela 11**, o teor em compostos fenólicos variou entre os 254 e os 427 μg equivalentes de ácido gálico por mg de extrato para o extrato de compostos fenólicos livres convencional (CFLC) e o extrato de compostos fenólicos livres subcrítico a 95°C (CFL-95), respetivamente ($p < 0,05$), demonstrando um aumento significativo da extração de compostos fenólicos com água subcrítica. Este resultado é consistente com um estudo realizado com outra matriz vegetal (*Hippophae rhamnoides*), em que o teor em compostos fenólicos recuperado por extração com água subcrítica foi superior ao teor obtido por maceração (método convencional) [231].

O maior teor em compostos fenólicos presente na fração obtida com água subcrítica pode ser explicado por esta extração ter sido realizada a alta temperatura e pressão, que poderá causar a rutura das paredes celulares, um consequente aumento da penetração do solvente nas células, criando, deste modo, uma elevada permeabilidade das células [232]. Assim, os compostos fenólicos foram libertados mais eficazmente comparativamente com a extração sólido-líquido com solventes hidroalcoólicos. O teor em compostos fenólicos obtido para o extrato subcrítico foi superior ao que se encontra descrito na literatura para o bagaço de uva tinta (temperatura 100°C e pressão de 25 bar) [233].

1.1.2. Caracterização e quantificação de pigmentos antociânicos

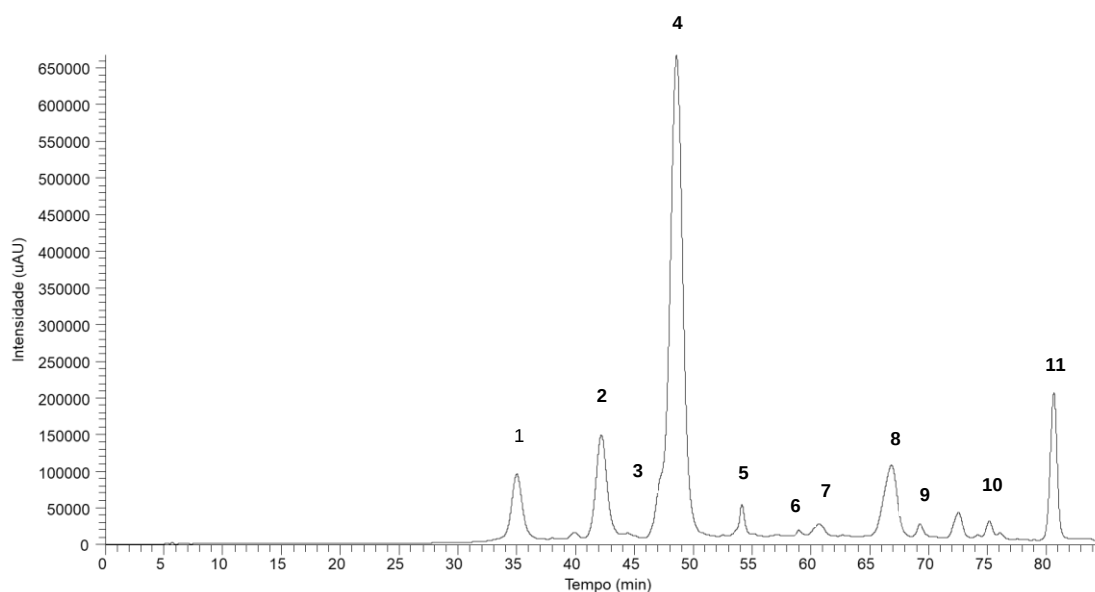
A caracterização e quantificação dos pigmentos antociânicos presentes nos extratos de compostos fenólicos livres foi efetuada por HPLC-DAD/ESI-MS e HPLC-DAD, respetivamente. O padrão de fragmentação dos iões moleculares principais e o tempo de retenção de cada pico cromatográfico, permitiu a identificação dos pigmentos antociânicos presentes (**Tabela 12**).

Os resultados obtidos revelaram um teor em antocianinas monoglucósidas semelhante nos dois extratos de compostos fenólicos livres (CFLC e CFL-95, $p > 0,05$), de 121 e 101 μg equivalentes de malvidina-3-O-glucósida por mg de extrato, respetivamente.

A malvidina-3-O-monoglucósida foi a antocianina presente em maior quantidade nos extratos de compostos fenólicos, correspondendo a cerca de 63 % da quantidade total de pigmentos. Este resultado está de acordo com o esperado pois a malvidina-3-O-monoglucósida é a antocianina maioritária nas uvas tintas. Adicionalmente, verificou-se

a presença de outros picos cromatográficos correspondentes a outras antocianinas, descritas na **Tabela 12**. Neste extrato foi ainda possível identificar pigmentos derivados de antocianinas (carboxipirano-malvidina-3-glucósido, carboxipirano-malvidina-3-acetilglucósido e carboxipirano-petunidina-3-acetilglucósido) correspondendo a cerca de 3 % do total das antocianinas.

Tabela 12- Tabela e cromatograma representativo da análise HPLC-DAD-ESI-MS de pigmentos antociânicos (modo positivo) nos extratos de compostos fenólicos.



Pico	Tempo de retenção (min)	m/z [M+H]	MS ²	λ (nm)	Antocianina e pigmentos derivados
1	35,00	465,60	303,07	523	Delfinidina-3-O-glucósido
2	42,19	479,93	317,12	526	Petunidina-3-O-glucósido
3	48,59	463,87	301,07	520	Peonidina-3- O-glucósido
4	48,59	493,60	331,07	526	Malvidina-3- O-glucósido
5	54,15	561,67	399,07	511	Carboxipirano-malvidina-3-glucósido
6	59,01	603,93	399,07	517	Carboxipirano-malvidina-3-acetilglucósido
7	60,71	521,80	317,13	529	Carboxipirano-petunidina-3-acetilglucósido
8	66,87	535,93	331,12	529	Malvidina-3- O-(6-acetil)-glucósido
9	69,30	612,80	303,16	529	Delfinidina-3-O-(6-cumaroil)-glucósido
10	75,19	629,40	317,13	529	Petunidina-3- O-(6-cumaroil)-glucósido
11	80,69	639,80	331,07	532	Malvidina-3-O-(6-cumaroil)-glucósido

m/z : ão molecular; MS²: respetivos fragmentos; λ : comprimento de onda máximo

1.1.3. Determinação da percentagem de cor polimérica

A percentagem de cor polimérica foi determinada através do rácio entre a proporção de cor polimérica e a densidade de cor e foi significativamente superior na fração CFLC (80 % *versus* 30 % na fração CFL-95), sugerindo a recuperação de uma maior percentagem de pigmentos polimerizados através da extração sólido-líquido hidroalcoólica, comparativamente com a extração com água subcrítica.

A maior percentagem de polimerização na fração CFLC tornou o extrato menos solúvel, facto que pode ser comprovado experimentalmente pois o extrato apresenta uma solubilidade em água bastante inferior comparativamente com o extrato CFL-95, o que por si só, já poderia ser um indicativo da existência de uma maior percentagem de pigmentos polimerizados.

1.1.4. Doseamento de compostos fenólicos de baixo peso molecular e proantocianidinas

De acordo com os resultados presentes na **Tabela 11**, o teor em compostos fenólicos de baixo peso molecular variou entre 25 e 76 µg equivalentes de ácido gálico por mg de extrato para os extratos CFLC e CFL-95, respetivamente ($p < 0,05$). Já o seu teor em proantocianidinas foi de 187 e 117 µg equivalentes de catequina por mg de extrato para os extratos CFLC e CFL-95, respetivamente ($p < 0,05$).

1.1.5. Determinação de proteínas e açúcares simples

As frações de compostos fenólicos livres apresentaram um teor em proteínas perto dos 10 % (93 e 105 µg equivalentes de BSA por mg de extrato, CFLC e CFL-95, respetivamente, $p > 0,05$).

Estas frações também evidenciam um teor muito reduzido em açúcares simples (< 1 %), possivelmente pelos processos de purificação a que foram sujeitos (purificação em gel de fase reversa C18).

1.1.6. Avaliação das propriedades antioxidantes

A avaliação das propriedades antioxidantes foi efetuada avaliando a sua capacidade antiradicalar e poder redutor. O extrato de compostos fenólicos livres obtido por extração

com água subcrítica (CFL-95) mostrou uma capacidade antirradicalar e um poder redutor significativamente superior comparativamente com os valores obtidos para o extrato obtido por extração sólido-líquido (CFLC) (25 e 6,2 μ M equivalentes de Trolox (DPPH e FRAP) *versus* 13,7 e 2,6 μ M equivalentes de Trolox (DPPH e FRAP) para os extratos CFL-95 e CFLC, respetivamente).

Este resultado está de acordo com o resultado obtido no doseamento de compostos fenólicos, onde, um maior teor em compostos fenólicos esteve associado a uma maior atividade antioxidante visto que se encontra descrito na literatura que estes compostos são conhecidos por possuírem atividades antioxidantes consideráveis [234].

1.2. Extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos

1.2.1. Análise e quantificação do conteúdo em monossacáridos dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos

A metodologia de extração é um aspeto fundamental para as características físico-químicas dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos, podendo afetar os rendimentos de extração, o peso molecular e a composição química dos conjugados.

A composição total em polissacáridos e a percentagem molar por monossacárido determinada nos extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos obtidos por extração sólido-líquido alcalina e extração com água subcrítica (ECA, ES-95 e ES-120) encontra-se resumida na **Tabela 13**.

Tabela 13- Composição total em polissacáridos e % mol por monossacárido dos extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos (ECA, ES-95 e ES-120)

Extrato	Composição em polissacáridos (% mol) ¹								g.kg ⁻¹
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	GalA	
ECA	1 ± 0	1 ± 0	9 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	79 ± 3	687 ± 4
ES-95	1 ± 0	-	20 ± 1	2 ± 0	5 ± 1	8 ± 1	7 ± 1	57 ± 2	648 ± 3
ES-120	1 ± 0	-	2 ± 0	-	9 ± 0	4 ± 0	27 ± 1	58 ± 1	608 ± 4

¹Rha: ramnose, fuc: fucose, ara: arabinose, xyl: xilose, man: manose, gal: galactose, glc: glucose, galA: ácido galacturónico

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que os extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos são constituídos maioritariamente por polissacáridos, entre os 61 e os 69 %, sendo o extrato obtido por extração convencional, o extrato com a maior quantidade de carboidratos, em massa de extrato. Para as 3 frações, o ácido galacturónico é o monossacárido mais abundante, seguido da arabinose e da galactose, característicos da presença de polissacáridos pécticos. Comparativamente com o extrato obtido por extração sólido-líquido alcalina, não foi detetado fucose na composição dos extratos obtidos por água subcrítica. Estes extratos apresentaram também uma % molar significativamente superior de monossacáridos neutros, nomeadamente arabinose no extrato ES-95 e glucose no extrato ES-120. A maior % molar de açúcares neutros (arabinose e galactose) comparativamente com a % molar de ácido galacturónico parece sugerir a maior proporção de cadeias laterais neutras nos extratos recuperados por extração com água subcrítica a 95°C (compatível com uma maior ramificação). A extração a temperaturas superiores e em condições acídicas parece ter promovido a hidrólise das ligações glicosídicas das cadeias laterais neutras (mais lábeis) que por serem solúveis em álcool, podem ter sido perdidas durante o processo de precipitação com metanol. Por outro lado, esta hidrólise promoveu a extração e recuperação de cadeias ricas em glucose.

1.2.2. Doseamento de compostos fenólicos

O teor em compostos fenólicos recuperados foi significativamente inferior do que se observou no caso dos extratos de compostos fenólicos livres, não se verificando diferenças significativas entre os três extratos (aproximadamente 10 %).

O valor obtido para o extrato ECA é inferior ao valor referenciado na literatura para conjugados polissacáridos-compostos fenólicos provenientes da planta *Pseuderanthemum palatiferum* obtidos com NaOH 0,1 M (aproximadamente 22 %) [148]. Também os valores dos extratos ES-95 e ES-120 são inferiores ao valor referenciado na literatura para conjugados obtidos por extração líquida pressurizada (extração realizada com água a 150°C) (aproximadamente 17 %) [148].

1.2.3. Determinação de proteínas

As frações de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos, apresentaram um teor muito reduzido em proteínas, cerca de 1 %, sendo este significativamente superior para o extrato ES-120, comparativamente com o extrato obtido por extração sólido-líquido alcalina.

O valor obtido para o extrato ECA é inferior ao valor referenciado na literatura para conjugados provenientes da planta *Pseuderanthemum palatiferum* através da metodologia convencional (aproximadamente 2,1 %) e o mesmo se verifica para os extratos ES-95 e ES-120 comparativamente com o valor descrito para estes mesmos conjugados obtidos por extração líquida pressurizada (extração com água, realizada a 150°C) (aproximadamente 1,3 %) [148].

1.2.4. Avaliação das propriedades antioxidantes

Os extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos evidenciaram uma atividade antioxidante superior comparativamente com os extratos de compostos fenólicos livres, possivelmente como resultado do teor em compostos fenólicos e polissacáridos presentes nestas frações. À semelhança dos compostos fenólicos, os polissacáridos também são conhecidos pelo seu poder antioxidante [235]. Relativamente à capacidade antiradicalar, o potencial de redução do radical DPPH foi semelhante para os extratos obtidos por extração subcrítica ($p > 0,05$) mas significativamente superior ao extrato obtido por extração sólido-líquido alcalina. Na

avaliação do poder redutor, todos os extratos apresentaram uma atividade significativamente semelhante entre si ($p > 0,05$).

1.2.5. Recuperação e caracterização dos compostos fenólicos presentes nos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos

De forma a caracterizar a fração fenólica presentes nos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos (ECA, ES-95 e ES-120), foi efetuada uma hidrólise ácida a 85°C. Os espectros UV-Vis antes e após o aquecimento encontram-se representados na **Figura 11**.

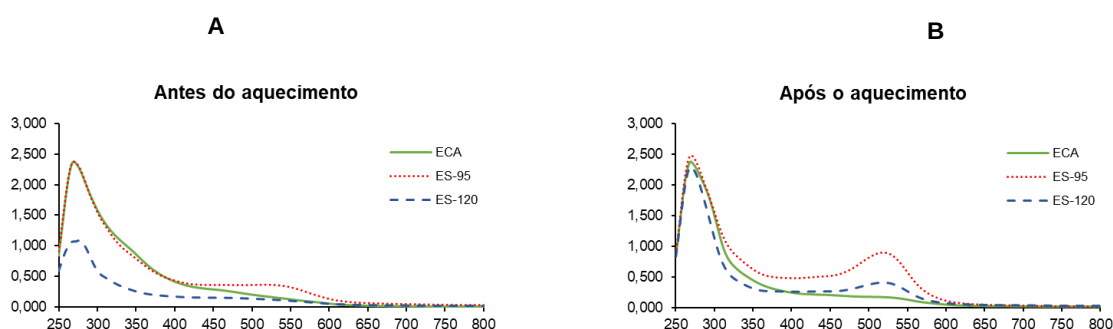


Figura 11- Espectros UV-Vis obtidos antes (A) e após o aquecimento (B) para o extrato alcalino convencional (ECA), extrato subcrítico a 95°C (ES-95) e extrato subcrítico a 120°C (ES-120).

Nos espectros UV-Vis obtidos, foi possível observar uma banda de absorção perto dos 280 nm por parte de todos os conjugados polissacáridos-compostos fenólicos, sendo estes mais intensos no caso dos extratos ECA e ES-95, antes do aquecimento. Esta banda é característica da presença de compostos fenólicos, nomeadamente, de flavanóis e ácidos hidroxibenzóicos [236]. Após o aquecimento, esta banda mantém-se para as frações ECA e ES-95, havendo, contudo, um aumento no extrato ES-120. Este aumento poderá indicar a libertação de compostos fenólicos mais fortemente adsorvidos com o aquecimento.

No espectro obtido antes do aquecimento, observa-se, ainda, uma banda na zona dos 520 nm no extrato ES-95 e ES-120 (menos significativa). Após o aquecimento, observou-se um aumento da intensidade desta banda, para os extratos obtidos por extração com água subcrítica. Este incremento poderá dever-se ao facto de, após

aquecimento, em meio ácido, ter ocorrido a decomposição das proantocianidinas, possivelmente também presentes nestes extratos, originando as antocianidinas correspondentes (cianidina e delphinidina) de cor vermelha [37]. Este resultado pode, ainda, ser confirmado visualmente (**Figura 12**), observando-se o aumento da cor vermelha das soluções obtidas por extração subcrítica, comparativamente com o que se observava antes do aquecimento.

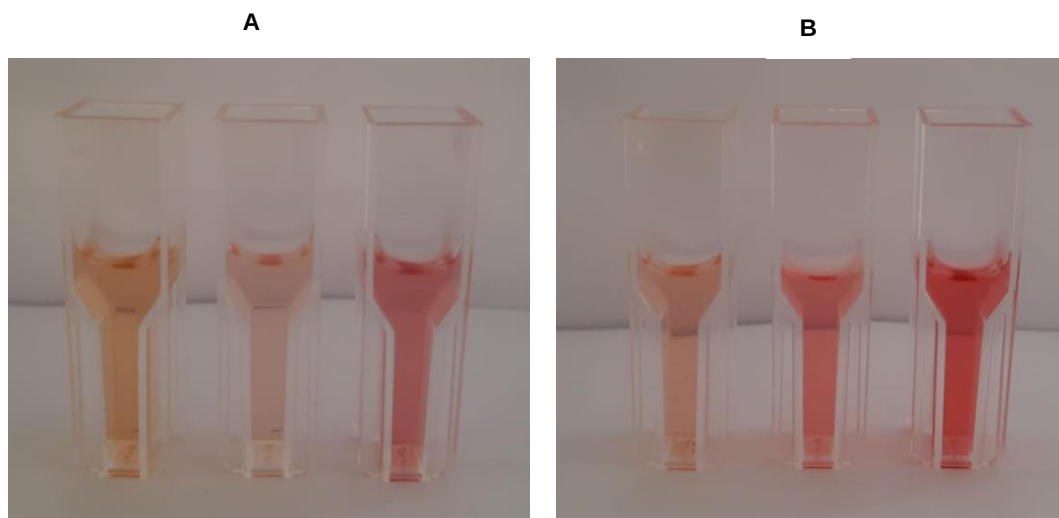


Figura 12- Extrato alcalino convencional (ECA), extrato subcrítico a 95°C (ES-95) e extrato subcrítico a 120°C (ES-120), antes (A) e após o aquecimento (B) na hidrólise ácida.

A análise por HPLC-DAD e LC-DAD/ESI-MS destas frações após o aquecimento mostrou o aparecimento de três picos cromatográficos, previamente ausentes (**Figura 13**). A análise de LC-DAD/ESI-MS revelou a presença das antocianidinas derivadas da delphinidina, cianidina e malvidina (ião molecular m/z 303, 287 e 331, respetivamente). Enquanto a presença das agliconas da cianidina e da delphinidina poderão ser um artefacto da hidrólise ácida, a presença da aglicona da malvidina é uma indicação da presença desta antocianina (ou de outras antocianinas aciladas derivadas desta) nos extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos.

Para o extrato obtido por extração sólido-líquido convencional (ECA), com o aquecimento não se verificou qualquer alteração do espectro UV-vis na zona dos 520 nm, surgindo apenas um pequeno pico cromatográfico na análise por HPLC-DAD, sugerindo a ausência de antocianinas neste extrato (**Figura 13**).

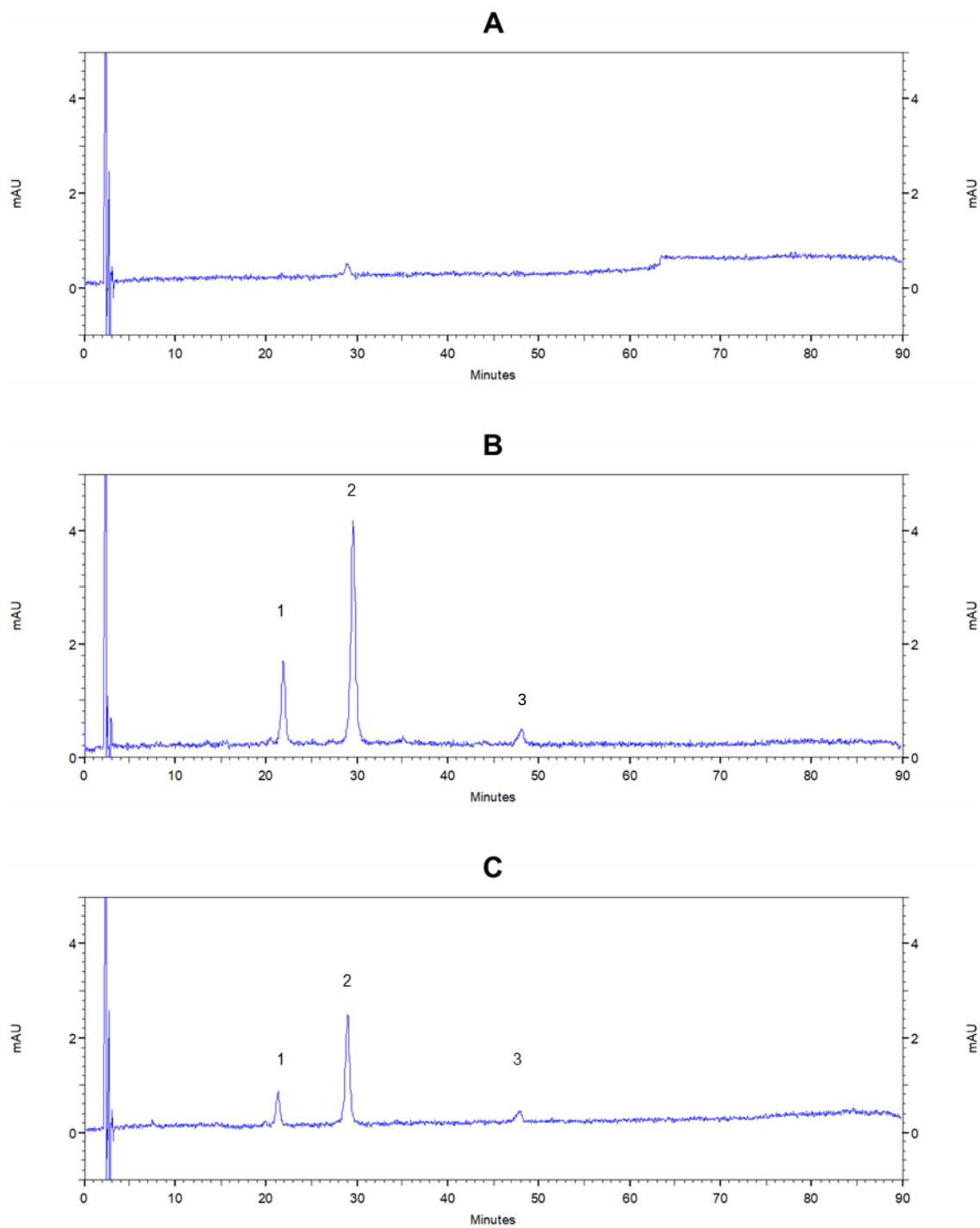


Figura 13- Cromatogramas de LC-DAD/ESI-MS dos extratos após hidrólise (A) ECA, (B) ES-95 e (C) ES-120, respetivamente, onde 1- delphinidina, 2- cianidina e 3- malvidina.

2. Avaliação do potencial antidiabético das frações

2.1. Ensaio de inibição enzimática

Uma das estratégias selecionadas para restringir as alterações metabólicas relacionadas com a hiperglicemia e a Diabetes Mellitus tipo 2 inclui a inibição de enzimas que metabolizam carboidratos, nomeadamente a α -amilase e a α -glucosidase. Neste sentido, foram realizados ensaios com estas duas enzimas de modo a estudar o impacto que os extratos obtidos tiveram na sua atividade. Como controlo positivo foi utilizada a acarbose, um inibidor competitivo de ambas as enzimas [237].

2.1.1. Enzima pancreática α -amilase

A percentagem de inibição da atividade da α -amilase foi determinada em função de diferentes concentrações de controlo positivo (acarbose) ou de extratos de compostos fenólicos livres ($10\text{--}100\ \mu\text{g.mL}^{-1}$) e de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos ($1000\text{--}2150\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ (ECA) e $100\text{--}1500\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ (ES-95 e ES-120)) (**Figura 14**), calculando os valores de IC_{50} através de uma curva de regressão logarítmica. Os valores determinados de IC_{50} encontram-se resumidos na **Tabela 14**.

Tabela 14- Valores de IC_{50} determinados na inibição enzimática da enzima pancreática α -amilase. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. *, $p < 0,05$, diferenças significativas entre o valor obtido para os extratos e o controlo positivo (acarbose); $p < 0,05$, letras diferentes entre tipos de extratos (compostos fenólicos livres ou conjugados polissacáridos-compostos fenólicos) representam diferenças estatisticamente significativas

	Acarbose	Extratos de compostos fenólicos		Extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos		
		CFLC	CFL-95	ECA	ES-95	ES-120
IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	$2,5 \pm 0,1$	$25 \pm 1^*, \text{a}$	$27,5 \pm 0,9^*, \text{a}$	$2139 \pm 13^*, \text{b}$	$572 \pm 22^*, \text{c}$	$939 \pm 37^*, \text{d}$

De um modo geral, os extratos de compostos fenólicos e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos apresentaram um efeito dependente da concentração testada. Os extratos CFLC e CFL-95 apresentaram um valor de IC_{50} de 25 e $27,5\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, respetivamente ($p > 0,05$), significativamente superior ao valor determinado para o

controlo positivo ($2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O valor obtido neste trabalho foi da mesma ordem de grandeza de outros estudos descritos na literatura (IC_{50} de $21 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para um extrato rico em compostos fenólicos proveniente da framboesa) [238].

A atividade inibitória que os compostos fenólicos possuem na enzima encontra-se fortemente associada à estrutura fenólica molecular e, particularmente, no caso da classe dos flavonóides, a presença nas posições 5, 6, 7 (anel A) e 4' (anel B) de grupos hidroxilo é capaz de elevar a inibição que os compostos possuem [239]. Tal resultados pode ser devido ao papel significativo que os grupos hidroxilo exercem na formação de pontes de hidrogénio no centro ativo da enzima [239].

Foi possível verificar que a extração com água subcrítica não modificou as propriedades inibitórias dos compostos fenólicos, comparativamente com o extrato recuperado por extração sólido-líquido, apesar do teor em compostos fenólicos totais presente no extrato CFL-95 ser superior. A semelhança na atividade inibitória por parte do extrato CFLC, apesar do teor em compostos fenólicos diferir, poderá estar relacionada com o seu grau de polimerização pois já se encontra descrito que os compostos fenólicos altamente polimerizados possuem uma forte inibição na enzima α -amilase [240].

Relativamente aos extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos ECA, ES-95 e ES-120, estes apresentaram um valor de IC_{50} significativamente superior (2139 , 572 e $939 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ECA, ES-95 e ES-120, respetivamente) aos valores obtidos para o controlo e para os extratos de compostos fenólicos livres (**Tabela 14**). Para além dos extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos possuírem um teor em compostos fenólicos inferior ao dos extratos de compostos fenólicos livres, o tipo de compostos adsorvidos nas frações de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos poderá ser diferente dos compostos fenólicos livres presentes nas frações livres, afetando deste modo, a sua capacidade sua inibição e, consequentemente, aumentando o valor de IC_{50} .

De uma forma geral, os extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos obtidos por extração subcrítica atuam como melhores inibidores comparativamente ao extrato alcalino convencional. Ao contrário do que se verificou com os extratos de compostos fenólicos livres, a metodologia de extração teve influência na atividade inibitória destes extratos e, dado que o método de extração afetou a proporção química de monossacáridos, esta diferença pode ter afetado a capacidade de interagir com a enzima. Ainda, a presença de famílias diferentes de compostos fenólicos adsorvidos ou

variações do peso molecular destas frações provocada pelos diferentes processos de extração poderá ter tido influência.

Num estudo publicado por Sun et al. (2017), foi avaliado o efeito que três polissacáridos solúveis teriam na atividade inibitória dos compostos fenólicos do chá na enzima α -amilase pancreática [241]. De acordo com este estudo, foi demonstrado que os polissacáridos diminuem a atividade inibitória dos compostos fenólicos para esta enzima [241]. Neste estudo, sugere-se que há um equilíbrio de interação entre os compostos fenólicos, os polissacáridos e a enzima, sendo que os compostos fenólicos do chá se podem ligar tanto à α -amilase como aos polissacáridos solúveis [241]. Neste sentido, a ligação dos compostos fenólicos aos polissacáridos também poderá ter afetado a ligação à centro ativo da enzima e consequentemente a atividade inibitória ser inferior.

A inibição da α -amilase por conjugados compostos fenólicos-proteínas-polissacáridos já se encontra descrita na literatura (IC_{50} varia entre de 69,98 e 509,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, consoante o método de extração aplicada aos conjugados extraídos da planta *Hovenia dulcis*, estando incluídas as extrações com água pressurizada, extração assistida por micro-ondas, ultrassom e água quente) [145]. Apesar do tipo de conjugados e da matriz vegetal não ser a mesma, o valor de IC_{50} obtido para o extrato ES-95 foi inferior aos resultados descritos, enquanto, os valores de IC_{50} obtidos para os extratos ECA e ES-120 são superiores, mostrando, mais uma vez, que a metodologia de extração teve influência na atividade inibitória destes extratos.

De um modo geral o efeito inibitório da atividade da α -amilase diminui na ordem acarbose > CFLC $\approx$ CFL-95 > ES95 > ES120 > ECA.

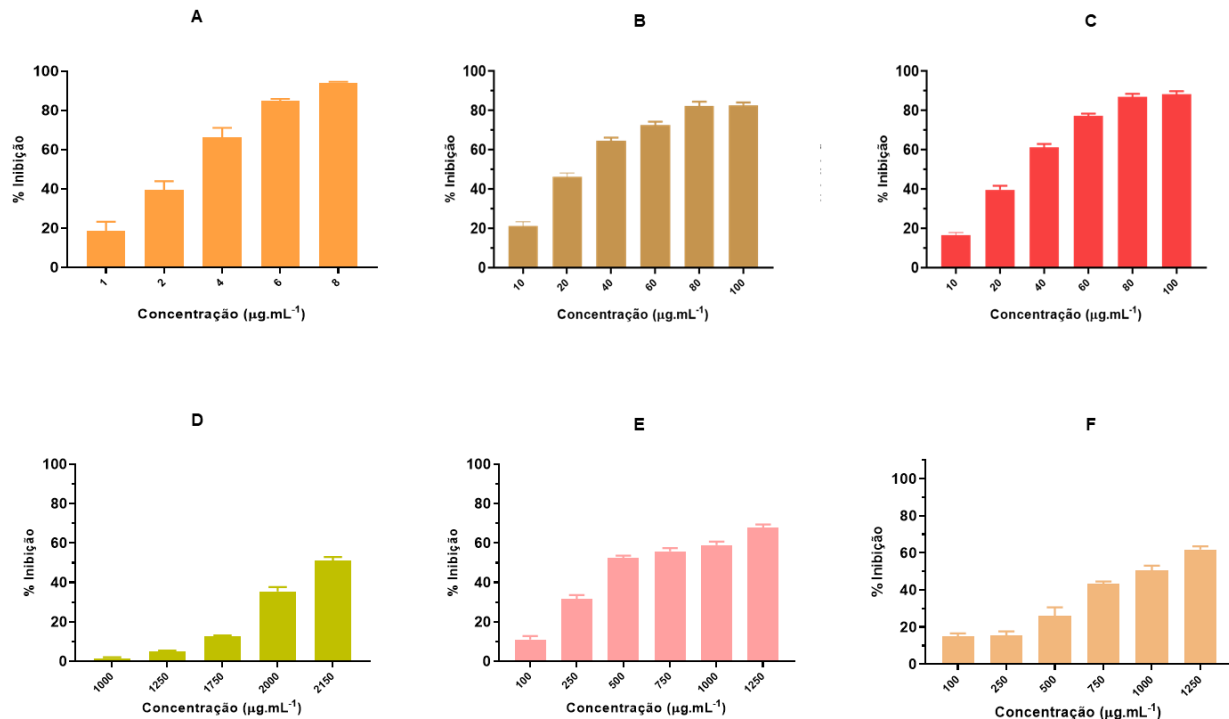


Figura 14- Percentagem de inibição enzimática (α -amilase) na presença do controlo positivo (A), CFLC (B), CFL-95 (C), ECA (D), ES-95 (E) e ES-120 (F). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM ($n=9$).

2.1.2. Enzima α -glucosidase

O efeito dos compostos fenólicos e dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos foi também testado na inibição da α -glucosidase, tendo estes extratos apresentado um efeito dependente da concentração testada. A percentagem de inibição da atividade da α -glucosidase foi determinada em função de diferentes concentrações de controlo positivo (acarbose) ou de extratos de compostos fenólicos livres (0,10-0,90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos (1-7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ECA) e 1-3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ES-95 e ES-120)) (**Figura 15**), calculando os valores de IC_{50} através de uma curva de regressão logarítmica. Os resultados referentes aos valores de IC_{50} obtidos para a inibição da α -glucosidase encontram-se na **Tabela 15**.

Tabela 15- Valores de IC_{50} determinados na inibição enzimática da enzima α -glucosidase. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. *, $p < 0,05$, diferenças significativas entre o valor obtido para o extrato e o controlo positivo (acarbose); $p < 0,05$, letras diferentes entre tipos de extratos (compostos fenólicos livres ou conjugados polissacáridos-compostos fenólicos), representam diferenças estatisticamente significativas.

	Acarbose	Extratos de compostos fenólicos		Extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos		
		CFLC	CFL-95	ECA	ES-95	ES-120
IC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	123 ± 7	$0,48 \pm 0,02$ *, a	$0,45 \pm 0,02$ *, a	$2,7 \pm 0,1$ *, b	$4,0 \pm 0,2$ *, c	$5,2 \pm 0,1$ *, d

De acordo com o valor de IC_{50} determinado, quando a enzima presente na mistura reacional é a α -glucosidase, em detrimento da α -amilase, é necessária uma concentração muito superior de acarbose para se atingir metade da concentração inibitória máxima e este resultado vai ao encontro do que tem sido descrito na literatura [199].

Os extratos CFLC e CFL-95 apresentaram um valor de IC_{50} de 0,48 e 0,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, valores esses significativamente mais baixos que o valor determinado para o controlo. O facto de ser necessária uma concentração inferior para inibir a enzima α -glucosidase comparativamente com a acarbose (fármaco habitual no controlo da hiperglicemia) releva o efeito acentuado de inibição destas frações, tornando-se um fator de valorização destes extratos. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na capacidade inibitória dos dois extratos obtidos por extração sólido-líquido e por água subcrítica. Os extratos terem inibido de forma mais eficiente a α -glucosidase do que a α -amilase, o que vai ao encontro do que já foi descrito na literatura [242].

À semelhança do que se encontra descrito para a α -amilase, a atividade inibitória de compostos fenólicos na atividade da α -glucosidase é igualmente conhecida (IC_{50} de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para um extrato rico em compostos fenólicos proveniente da groselha preta) [243]. Os valores de IC_{50} determinados neste trabalho são bastante inferiores ao valor determinado no trabalho referenciado.

Os extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos ECA, ES-95 e ES-120 apresentaram um valor de IC_{50} de 2,7, 4,0 e 5,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo estes valores significativamente inferiores ao valor obtido para o controlo (acarbose), mas mais

elevados que os valores de IC_{50} determinados para os compostos fenólicos. À semelhança do que se verificou com os extratos de compostos fenólicos livres, o facto de ser necessária uma concentração muito baixa para inibir a enzima α -glucosidase comparativamente com o controlo, constitui um fator de valorização para os extratos, demonstrando o seu potencial.

A inibição da α -glucosidase por conjugados compostos fenólicos-proteínas-polissacáridos já se encontra descrita na literatura com o IC_{50} determinado variando de 16,10 a 36,23 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, consoante o método de extração aplicado aos conjugados da planta *Hovenia dulcis* [145].

Tal como observado na atividade da α -amilase, os valores de IC_{50} determinados para os conjugados polissacáridos-compostos fenólicos são estatisticamente superiores aos obtidos para os extratos de compostos fenólicos livres. No entanto, neste estudo, o extrato que melhor atuou como inibidor da enzima α -glucosidase foi o extrato obtido por extração sólido-líquido alcalina (ECA), mostrando uma vez mais que a metodologia de extração afetou a bioatividade das frações.

De acordo com a literatura, um estudo realizado por Rasouli et al. (2017), demonstrou que relativamente à enzima α -glucosidase, compostos como a epicatequina, o ácido ferúlico, o ácido cafeico, a quercetina, a cianidina, a hesperetina, o resveratrol e o ácido siríngico, revelaram elevadas afinidades para interagir com o centro ativo da enzima α -glucosidase [244]. Relativamente à enzima α -amilase, dentro dos compostos fenólicos estudados, apenas a pelargonidina, a catequina, o kaempferol, a silibinina e a hesperetina revelou possuírem um elevado potencial para interagir com o centro ativo desta enzima [244].

Assim, o facto dos extratos obtidos neste trabalho possuírem uma atividade de inibição da α -glucosidase mais elevada que a α -amilase, poderá estar relacionado com o tipo de compostos fenólicos presentes nos extratos. Provavelmente, estes compostos pertencem às classes das antocianidinas, flavononas, flavan-3-óis e flavonóis, visto que são as classes mais favoráveis mencionadas no estudo referenciado anteriormente.

Outro facto relevante deste ensaio é os valores obtidos serem bastante inferiores ao do controlo positivo do ensaio, a acarbose, e estes extratos poderem atuar como melhores inibidores da α -glucosidase do que o fármaco disponível atualmente.

De um modo geral o efeito inibitório da atividade da α -glucosidase diminui na ordem CFL-95 $\approx$ CFLC > ECA > ES95 > ES120 > acarbose.

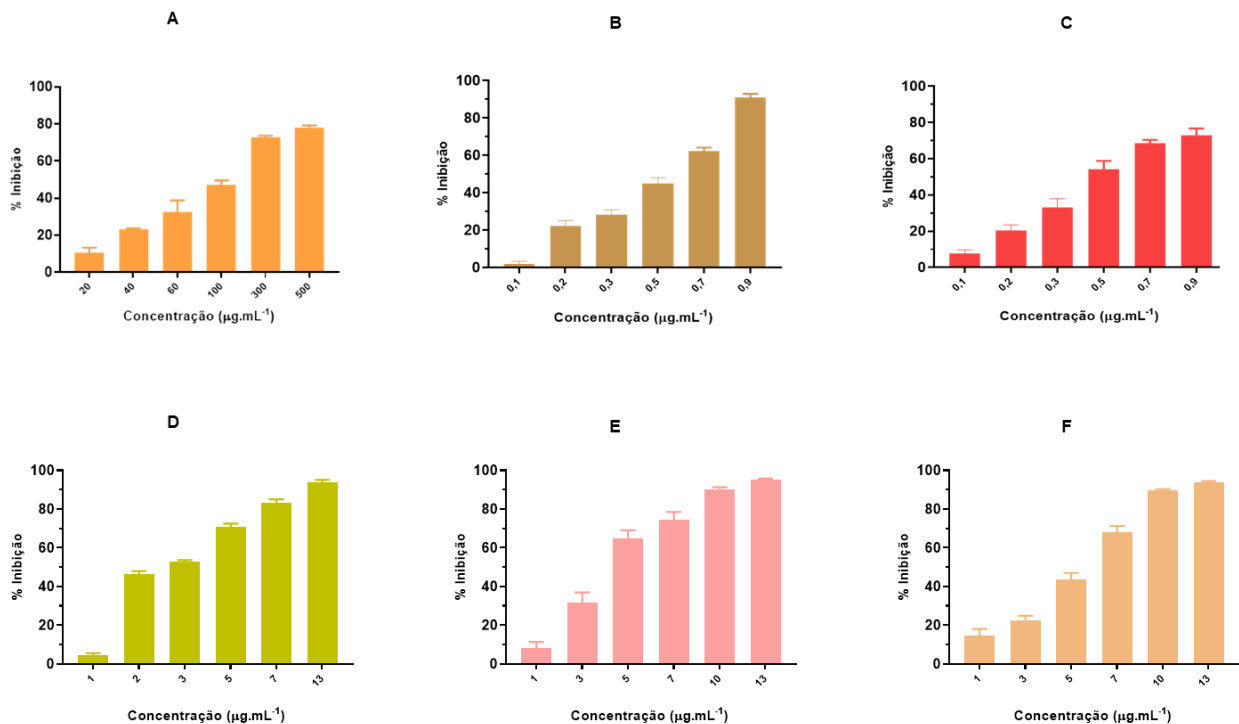


Figura 15- Percentagem de inibição enzimática (α -glucosidase) na presença do controlo positivo (A), CFLC (B), CFL-95 (C), ECA (D), ES-95 (E) e ES-120 (F). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=9)

2.2. Avaliação da atividade de antiglicação

A glicação de proteínas e a acumulação dos produtos finais de glicação contribuem para a patogénese associada a pacientes com Diabetes. Neste sentido, foi também avaliado o potencial de antiglicação dos extratos de compostos fenólicos livres e de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos obtidos por extração sólido-líquido e água subcrítica, como forma a controlar a produção destes produtos. A percentagem de inibição da formação de AGEs foi determinada em função de diferentes concentrações de controlo positivo (aminoguanidina) ou de extratos de compostos fenólicos livres (50-2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (CFLC) e 250-2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (CFL-95)) e de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos (250-2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ECA e ES-95) e 250-3500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ES-120)) (**Figura 16**), calculando os valores de IC_{50} através de uma curva de regressão logarítmica. Na **Tabela 16** encontram-se descritos os valores de IC_{50} obtidos nos ensaios de antiglicação.

Tabela 16- Valores de IC₅₀ determinados na inibição da formação de produtos de glicação avançada. Os resultados são expressos como média ± EPM. *, $p < 0,05$, diferenças significativas entre o valor obtido para o extrato e o controlo; ^{a, b}, $p < 0,05$, Letras diferente entre tipos de extratos de compostos fenólicos livres representam diferenças estatisticamente significativas; ^{c, d}, $p < 0,05$, Letras diferentes entre tipos de extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos, representam diferenças estatisticamente significativas

	Amino-guanidin a	Extratos de compostos fenólicos		Extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos		
		CFLC	CFL-95	ECA	ES-95	ES-120
IC ₅₀ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	230 ± 12	571 ± 32 *, a	209 ± 21 ^b	1036 ± 79 *, c	1270 ± 65 *, c	5129 ± 594 *, d

A inibição da formação dos produtos de glicação avançada foi inicialmente testada na presença de aminoguanidina (controlo positivo), um inibidor sintético da glicação [245]. O valor de IC₅₀ determinado (229,5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), a partir da % de inibição em função de concentrações crescentes de aminoguanidina (**Figura 16**) é ligeiramente menor que o valor descrito na literatura para conjugados da planta *Hovenia dulcis* (308 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) [199].

Os extratos CFLC e CFL-95 apresentaram um valor de IC₅₀ de 570,8 e 208,7 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respetivamente, sendo o valor determinado para o extrato CFL-95 semelhantes ao controlo positivo ($p > 0,05$).

Estes extratos de compostos fenólicos poderão ter um papel fundamental na inibição de formação dos AGEs. Para além das condições de hiperglicemia já mencionadas, há indícios crescentes que outras causas exercem papeis cruciais na formação dos AGEs, como é o caso dos níveis elevados de espécies reativas de oxigénio, oxidação e stress oxidativo [246]. Quando se está perante condições de stress oxidativo, a cascata de formação de espécies reativas de oxigénio provoca, dentro das células, um desequilíbrio na quantidade de oxidantes que estimula a auto-oxidação da glucose, levando à formação dos produtos finais de glicação avançada [247].

Os extratos CFLC e CFL-95 possuem uma grande quantidade de compostos fenólicos e encontra-se descrito que, *in vitro*, estes compostos possuem uma forte atividade antioxidante e têm a capacidade de eliminar uma vasta gama de espécies reativas e reduzir a sua atividade pró-oxidante [248]. Assim, o teor de compostos fenólicos nos extratos e a consequente capacidade antioxidante, poderá explicar o valor obtido neste ensaio. Este aspeto é particularmente relevante para a fração de compostos fenólicos livres obtida por extração com água subcrítica, cujo potencial de antiglicação poderá

estar associado à sua elevada atividade antioxidante em comparação com os restantes extratos.

O facto do valor obtido para o extrato CFL-95 não ser significativamente diferente da aminoguanidina constitui um fator de grande valorização do extrato visto que o seu valor de IC_{50} é o mesmo, mas o extrato é proveniente de uma fonte vegetal que foi obtido através de uma metodologia verde. O valor de IC_{50} descrito na literatura para um extrato de compostos fenólicos proveniente do gengibre foi de $285 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo este valor ligeiramente superior ao valor obtido para o extrato CFL-95 [249].

Os extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos ECA, ES-95 e ES-120 apresentaram um valor de IC_{50} estatisticamente superior ao valor obtido para o controlo positivo ($1036,0$, 1270 e $5129 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ECA, ES-95 e ES-120, respetivamente).

O facto dos extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos possuírem uma atividade de antiglicação inferior ao que foi observado para os extratos de compostos fenólicos livres poderá não estar relacionado com a sua atividade antioxidante, mas com outros mecanismos de antiglicação. De entre os mecanismos propostos para os compostos fenólicos encontra-se a redução da produção da base Schiff e produtos Amadori (produtos intermediários na formação de AGEs) e, consequentemente, a formação de grupos dicarbonil [204, 250]. A inibição da formação destes produtos intermediários também se verificou com polissacáridos, à semelhança dos compostos fenólicos [251, 252].

A formação de AGEs não é apenas intensificada na presença de stress oxidativo, mas também na presença de stress carbonílico [253]. A redução dos níveis de compostos carbonílicos ativos representa um dos principais mecanismos envolvidos na inibição da formação de AGEs [254]. Assim, este poderá ser um dos mecanismos responsável pela atividade de antiglicação apresentada pelos conjugados compostos fenólicos-polissacáridos.

A atividade de antiglicação por conjugados compostos fenólicos-proteínas-polissacáridos já se encontra descrita na literatura (IC_{50} varia entre 710 a $1490 \mu\text{g.mL}^{-1}$, consoante o método de extração aplicada aos conjugados da planta *Hovenia dulcis*) [145]. O valor dos extratos ECA e ES-95 encontram-se neste intervalo, mas o valor do extrato ES-120 é superior.

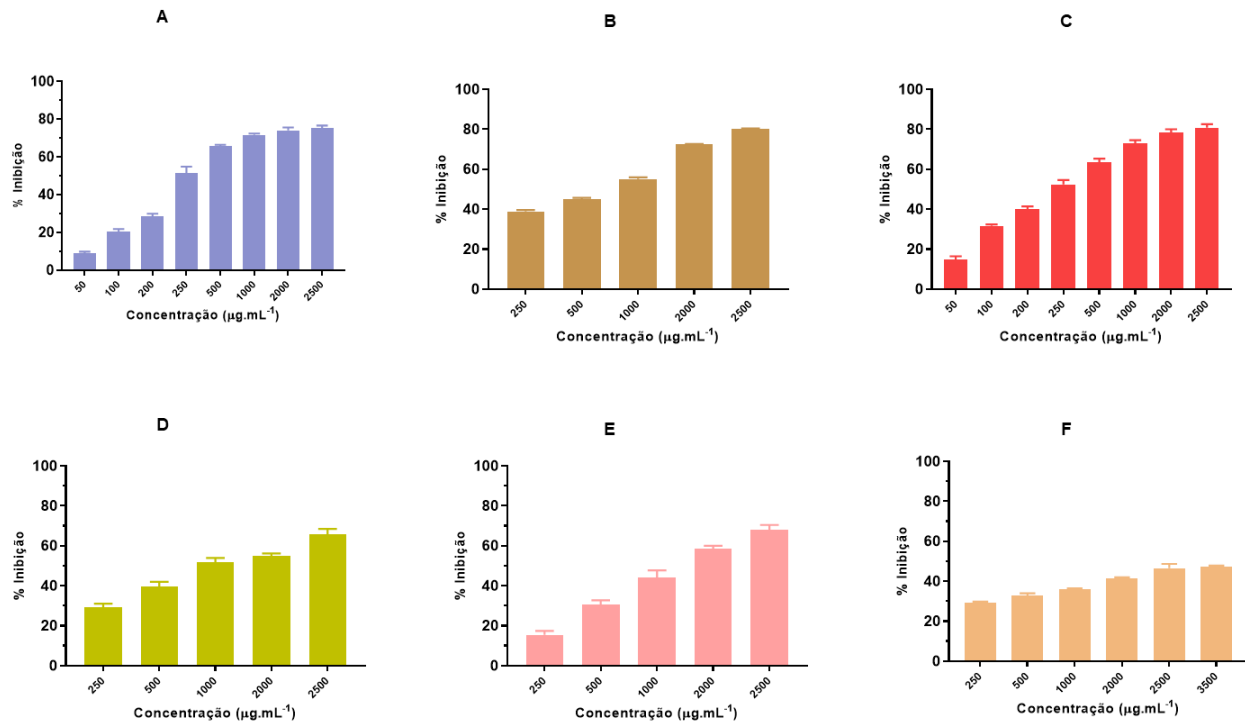


Figura 16- Percentagem de inibição da formação de produtos de glicação avançada na presença do controlo positivo (A), CFLC (B), CFL-95 (C), ECA (D), ES-95 (E) e ES-120 (F). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=9).

2.3. Estudo de transporte: *uptake* de glucose

O impacto dos extratos ricos em compostos fenólicos livres (CFL-95) e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos (ES-95), no transporte transepitelial de glucose foi avaliado simulando o estado alimentado (25 mM glucose), através de um modelo in vitro, usando a linha celular intestinal C2BBel, clone da Caco-2.

De forma a validar o estudo de transporte, realizou-se um ensaio de fluorescência, em que as células foram incubadas com uma sonda de passagem paracelular, *Lucifer yellow*. De acordo com o descrito, as células teriam de transportar menos de 5 % do *Lucifer yellow* para o lado basolateral para validar a barreira celular formada. O valor médio obtido foi de $0,55 \pm 0,04$ %, o permitiu validar todas as amostras [255].

Na ausência dos extratos de compostos fenólicos livres ou de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos (CFL-95 e ES-95, respetivamente) a eficiência de transporte da glucose foi de $8,1 \pm 0,8$ %. Este valor está de acordo com o valor determinado em estudos anteriores [256].

Na presença dos extratos, observou-se uma redução estatisticamente significativa da eficiência de transporte, comparativamente como o controlo (tampão Hanks), traduzindo-se num menor transporte de glucose (**Figura 17**). A eficiência de transporte obtida para os extratos de compostos fenólicos livres foi de $2,6 \pm 0,1$ %. Esta redução da bioacessibilidade de glucose, comparativamente com o controlo, foi de encontro ao esperado, pois já se encontra descrito que, *in vitro*, os compostos fenólicos inibem o transporte de glucose [257]. Mais especificamente, um estudo relatou que devido, essencialmente, à interação com o transportador GLUT2, estes compostos inibiram o transporte de glucose [258]. Além deste transportador, também há estudos com o transportador SGLT1 e os compostos fenólicos [259].

Já na presença do extrato de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos, a eficiência de transporte foi ainda menor, tendo-se observado um valor de $1,2 \pm 0,3$ %. Deste modo, os conjugados polissacáridos-compostos fenólicos poderão impedir a passagem de glucose devido à interação dos mesmos com as membranas celulares dado a complexidade deste extrato. Além disto, esta diminuição da eficiência de transporte poderá também ser resultado de um possível impedimento físico.

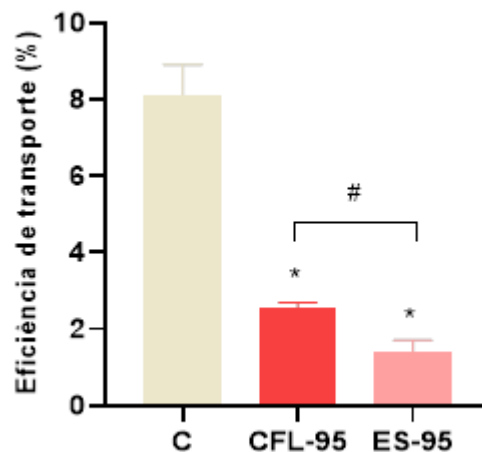


Figura 17- Eficiência de transporte (%) na ausência (controlo C) e na presença dos extratos ricos em compostos fenólicos livres (CFL-95) e em conjugados polissacáridos-compostos fenólicos (ES-95) obtidos por extração subcrítica a 95°C. Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. *, $p < 0,05$, diferenças estatisticamente significativas entre os extratos e o controlo. #, $p < 0,05$, diferenças estatisticamente significativas entre os extratos.

Conclusões e perspetivas futuras

Os alimentos funcionais têm sido cada vez mais procurados pelo consumidor, existindo assim, um interesse progressivo em identificar fontes ricas em compostos bioativos com o objetivo de desenvolver e produzir ingredientes e alimentos funcionais. Neste sentido, os subprodutos agroalimentares possuem um elevado potencial devido ao seu elevado teor em compostos bioativos. Estes subprodutos vegetais são muitas vezes desprezados, mas a extração de compostos destes resíduos, para além de constituir um reaproveitamento da matriz, evita o desperdício e a acumulação de resíduos.

Neste trabalho foi possível obter extratos ricos em compostos fenólicos livres e conjugados polissacáridos-compostos fenólicos a partir de um subproduto da indústria vitivinícola, o bagaço de uva tinta recorrendo à extração sólido-líquido e à extração com água subcrítica.

Os extratos de compostos fenólicos livres caracterizaram-se por possuírem um elevado teor em compostos fenólicos. Os extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos apresentaram uma percentagem elevada em polissacáridos, formados por ramnose, fucose, arabinose, xilose, manose, galactose, glucose e ácido galacturónico e cerca de 10% de compostos fenólicos.

Nos ensaios de inibição enzimática com a α -amilase, verificou-se uma atividade inibitória por parte de ambos os extratos. No entanto, os extratos de compostos fenólicos livres exibiram uma maior atividade inibitória, não tendo a metodologia de extração influenciado esta atividade, não se tendo verificado o mesmo nos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos. Assim, verificou-se que o efeito inibitório da atividade da α -amilase diminui na ordem acarbose > CFLC $\approx$ CFL-95 > ES95 > ES120 > ECA.

A inibição da α -glucosidase foi igualmente observada na presença dos extratos de compostos fenólicos livres cuja metodologia de extração não influenciou a sua atividade. O mesmo não se verificou com os extratos de conjugados polissacáridos-compostos fenólicos. Assim, verificou-se que o efeito inibitório da atividade da α -glucosidase diminui na ordem CFL-95 $\approx$ CFLC > ECA > ES95 > ES120 > acarbose. Uma observação relevante deste ensaio é que as concentrações dos extratos, em geral, são bastante inferiores às obtidas no ensaio com a α -amilase.

Nos ensaios de antiglicação, destacou-se o extrato de compostos fenólicos obtido por extração subcrítica, que possuiu um valor de antiglicação semelhante ao valor obtido

para o controlo positivo do ensaio, a aminoguanidina, sendo que, este resultado constitui um fator de valorização do extrato obtido.

Por sua vez, no ensaio de transporte de glucose realizado *in vitro*, tanto o extrato de compostos fenólicos livres como os conjugados polissacáridos-compostos fenólicos, exibiram uma redução na eficiência do transporte de glucose tendo sido mais notória a diminuição da eficiência de transporte no caso dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos, o que valoriza essa fração.

De um modo geral, a metodologia de extração com água subcrítica, permitiu obter dois tipos de frações com propriedades biológicas semelhantes ou melhores comparativamente com a extração sólido-líquido. Cada uma das frações pode ser aplicada com finalidades diferentes dado que a fração de compostos fenólicos livres atua como melhor inibidor enzimático e possui uma melhor atividade de antiglicação que os conjugados polissacáridos-compostos fenólicos e estes, por sua vez, possibilitam uma redução na eficiência do transporte de glucose.

Como experiências futuras, seria interessante determinar quais os compostos fenólicos individuais presentes nos extratos obtidos com o objetivo de perceber quais os compostos bioativos que possuem efeitos inibitórios nas enzimas digestivas. Como já foi realizado um estudo de transporte de glucose simulando o estado alimentado, seria interessante realizar um estudo de transporte simulando o estado de jejum. Seria, ainda, interessante realizar estudos sobre a bioacessibilidade de forma a perceber a fração dos compostos que é libertada durante a digestão que posterior se encontra disponível para absorção. Além disso, poderão ser realizados estudos de simulação do colon para entender o impacto do microbiota na degradação dos conjugados polissacáridos-compostos fenólicos e posterior caracterização após incubação.

Bibliografia

1. Oliveira, H., et al., *Anthocyanins as antidiabetic agents—in vitro and in silico approaches of preventive and therapeutic effects*. *Molecules*, 2020. **25**(17): p. 3813.
2. Bekele, H., et al., *Barriers and Strategies to Lifestyle and Dietary Pattern Interventions for Prevention and Management of TYPE-2 Diabetes in Africa, Systematic Review*. *Journal of Diabetes Research*, 2020. **2020**: p. 7948712.
3. Ard, D., N.-S. Tettey, and S. Feresu, *The Influence of Family History of Type 2 Diabetes Mellitus on Positive Health Behavior Changes among African Americans*. *International Journal of Chronic Diseases*, 2020. **2020**: p. 8016542.
4. Olokoba, A.B., O.A. Obateru, and L.B. Olokoba, *Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends*. *Oman medical journal*, 2012. **27**(4): p. 269.
5. Altobelli, E., et al., *Lifestyle Risk Factors for Type 2 Diabetes Mellitus and National Diabetes Care Systems in European Countries*. *Nutrients*, 2020. **12**(9): p. 2806.
6. Brugnara, L., et al., *Low Physical Activity and Its Association with Diabetes and Other Cardiovascular Risk Factors: A Nationwide, Population-Based Study*. *PLoS One*, 2016. **11**(8): p. e0160959.
7. Chong, S., et al., *Lifestyle Changes After a Diagnosis of Type 2 Diabetes*. *Diabetes Spectrum*, 2017. **30**(1): p. 43-50.
8. Miranda, J.M., et al., *Egg and egg-derived foods: effects on human health and use as functional foods*. *Nutrients*, 2015. **7**(1): p. 706-729.
9. Van Duyn, M.A.S. and E. Pivonka, *Overview of the Health Benefits of Fruit and Vegetable Consumption for the Dietetics Professional: Selected Literature*. *Journal of the American Dietetic Association*, 2000. **100**(12): p. 1511-1521.
10. de Araújo, F.F., et al., *Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential*. *Food Chemistry*, 2021. **338**: p. 127535.
11. Liu, R.H., *Dietary bioactive compounds and their health implications*. *Journal of Food Science*, 2013. **78**(s1): p. A18-25.
12. Andrade, R.M.S.d., et al., *Potential prebiotic effect of fruit and vegetable byproducts flour using in vitro gastrointestinal digestion*. *Food Research International*, 2020. **137**: p. 109354.
13. Ruiz Rodríguez, L.G., et al., *Fruits and fruit by-products as sources of bioactive compounds. Benefits and trends of lactic acid fermentation in the development of novel fruit-based functional beverages*. *Food Research International*, 2021. **140**: p. 109854.

14. Pandey, K.B. and S.I. Rizvi, *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2009. **2**: p. 897484.
15. Soares, S., et al., *Development of a New Cell-Based Oral Model To Study the Interaction of Oral Constituents with Food Polyphenols*. Journal of agricultural and food chemistry, 2019. **67**(46): p. 12833-12843.
16. Huang, Q., et al., *Dietary Polyphenol Intake in US Adults and 10-Year Trends: 2007-2016*. Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics, 2020. **120**(11): p. 1821-1833.
17. Vagiri, M., E. Johansson, and K. Rumpunen, *Phenolic compounds in black currant leaves—an interaction between the plant and foliar diseases?* Journal of Plant Interactions, 2017. **12**(1): p. 193-199.
18. Pinto, G., et al., *Quantification of polyphenols and metals in Chinese tea infusions by mass spectrometry*. Foods, 2020. **9**(6): p. 835.
19. Li, A.-N., et al., *Resources and biological activities of natural polyphenols*. Nutrients, 2014. **6**(12): p. 6020-6047.
20. Gorzynik-Debicka, M., et al., *Potential health benefits of olive oil and plant polyphenols*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(3): p. 686.
21. Ovaskainen, M.-L., et al., *Dietary intake and major food sources of polyphenols in Finnish adults*. The Journal of Nutrition, 2008. **138**(3): p. 562-566.
22. D'Archivio, M., et al., *Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies*. International journal of molecular sciences, 2010. **11**: p. 1321-42.
23. Manach, C., et al., *Polyphenols: food sources and bioavailability*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2004. **79**(5): p. 727-747.
24. Pérez-Jiménez, J., et al., *Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database*. European Journal of Clinical Nutrition, 2010. **64**(3): p. S112-S120.
25. Georgé, S., et al., *Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(5): p. 1370-1373.
26. Kondratyuk, T. and J. Pezzuto, *Natural Product Polyphenols of Relevance to Human Health*. Pharmaceutical Biology, 2004. **42**: p. 46 - 63.
27. Dabas, D., *Polyphenols as Colorants*. Advances in Food Technology and Nutritional Sciences - Open Journal, 2018: p. S1-S6.
28. Reynoso-Camacho, R., et al., *Berry by-products obtained from a decoction process are a rich source of low- and high-molecular weight extractable and non-*

- extractable polyphenols*. Food and Bioproducts Processing, 2021. **127**: p. 371-387.
29. Baião, D.D.S., et al., *Polyphenols from root, tubercles and grains cropped in Brazil: Chemical and nutritional characterization and their effects on human health and diseases*. Nutrients, 2017. **9**(9): p. 1044.
30. Godos, J., et al., *Dietary sources of polyphenols in the Mediterranean healthy Eating, Aging and Lifestyle (MEAL) study cohort*. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2017. **68**(6): p. 750-756.
31. El Gharras, H., *Polyphenols: food sources, properties and applications—a review*. International journal of food science & technology, 2009. **44**(12): p. 2512-2518.
32. Genwali, G.R., P.P. Acharya, and M. Rajbhandari, *Isolation of gallic acid and estimation of total phenolic content in some medicinal plants and their antioxidant activity*. Nepal Journal of Science and Technology, 2013. **14**(1): p. 95-102.
33. Tsao, R., *Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols*. Nutrients, 2010. **2**(12): p. 1231-1246.
34. Manassis, G., et al., *Plant-Derived Natural Antioxidants in Meat and Meat Products*. Antioxidants, 2020. **9**(12): p. 1215.
35. Rashmi, H.B. and P.S. Negi, *Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits*. Food Research International, 2020. **136**: p. 109298.
36. Bar-Ya'akov, I., et al., *Primary Metabolites, Anthocyanins, and Hydrolyzable Tannins in the Pomegranate Fruit*. Frontiers in Plant Science, 2019. **10**(620).
37. Cheynier, V., *Polyphenols in foods are more complex than often thought*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2005. **81**(1): p. 223S-229S.
38. Yao, L.H., et al., *Flavonoids in food and their health benefits*. Plant foods for human nutrition, 2004. **59**(3): p. 113-122.
39. Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, and D.J. Bobilya, *Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships*. The Journal of nutritional biochemistry, 2002. **13**(10): p. 572-584.
40. Chávez-González, M.L., et al., *Conventional and Emerging Extraction Processes of Flavonoids*. Processes, 2020. **8**(4): p. 434.
41. Haminiuk, C.W., et al., *Phenolic compounds in fruits—an overview*. International Journal of Food Science & Technology, 2012. **47**(10): p. 2023-2044.
42. Hollman, P.C., *Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids*. Pharmaceutical biology, 2004. **42**(sup1): p. 74-83.

43. Panche, A.N., A.D. Diwan, and S.R. Chandra, *Flavonoids: an overview*. Journal of Nutritional Science, 2016. **5**: p. e47.
44. Hostetler, G.L., R.A. Ralston, and S.J. Schwartz, *Flavones: Food Sources, Bioavailability, Metabolism, and Bioactivity*. Advances in Nutrition, 2017. **8**(3): p. 423-435.
45. Xia, E.Q., et al., *Biological activities of polyphenols from grapes*. International Journal of Molecular Sciences, 2010. **11**(2): p. 622-46.
46. Clifford, M.N., *Anthocyanins—nature, occurrence and dietary burden*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. **80**(7): p. 1063-1072.
47. Lorrain, B., et al., *Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines, and extracts*. Molecules, 2013. **18**(1): p. 1076-1100.
48. Victor de, F. and M. Nuno, *Protein/Polyphenol Interactions: Past and Present Contributions. Mechanisms of Astringency Perception*. Current Organic Chemistry, 2012. **16**(6): p. 724-746.
49. Oliveira, J., N. Mateus, and V. de Freitas, *Flavanols: Catechins and Proanthocyanidins*. 2013. p. 1753-1801.
50. Enomoto, H., et al., *Distribution of Flavan-3-ol Species in Ripe Strawberry Fruit Revealed by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry Imaging*. Molecules, 2020. **25**(1): p. 103.
51. Yang, Y.J., et al., *Dietary flavan-3-ols intake and metabolic syndrome risk in Korean adults*. Nutrition Research and Practice, 2012. **6**(1): p. 68-77.
52. Liu, Y., et al., *Anthocyanin biosynthesis and degradation mechanisms in Solanaceous vegetables: a review*. Frontiers in Chemistry, 2018. **6**: p. 52.
53. Li, R., et al., *Anthocyanin composition and content of the Vaccinium uliginosum berry*. Food Chemistry, 2011. **125**(1): p. 116-120.
54. Pervaiz, T., et al., *Naturally occurring anthocyanin, structure, functions and biosynthetic pathway in fruit plants*. Journal of Plant Biochemistry & Physiology, 2017. **5**(2): p. 1-9.
55. Horbowicz, M., et al., *Anthocyanins of fruits and vegetables-their occurrence, analysis and role in human nutrition*. Vegetable crops research bulletin, 2008. **68**(1): p. 5-22.
56. Chen, B.-H. and B. Stephen Inbaraj, *Nanoemulsion and nanoliposome based strategies for improving anthocyanin stability and bioavailability*. Nutrients, 2019. **11**(5): p. 1052.
57. Fallah, A.A., E. Sarmast, and T. Jafari, *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, 2020: p. 109379.
58. Khoo, H.E., et al., *Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits*. Food & nutrition research, 2017. **61**(1): p. 1361779.
59. Mattioli, R., et al., *Anthocyanins: A comprehensive review of their chemical properties and health effects on cardiovascular and neurodegenerative diseases*. Molecules, 2020. **25**(17): p. 3809.
60. Huang, G., et al., *Comparative transcriptome analysis of mulberry reveals anthocyanin biosynthesis mechanisms in black (Morus atropurpurea Roxb.) and white (Morus alba L.) fruit genotypes*. BMC Plant Biology, 2020. **20**(1): p. 279.
61. Ignat, I., I. Volf, and V.I. Popa, *A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables*. Food chemistry, 2011. **126**(4): p. 1821-1835.
62. He, J. and M.M. Giusti, *Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties*. Annual review of food science and technology, 2010. **1**: p. 163-187.
63. Eker, M.E., et al., *A review of factors affecting anthocyanin bioavailability: Possible implications for the inter-individual variability*. Foods, 2020. **9**(1): p. 2.
64. LAtti, A.K., et al., *Characterization of anthocyanins in Caucasian blueberries (Vaccinium arctostaphylos L.) native to Turkey*. Journal of agricultural and food chemistry, 2009. **57**(12): p. 5244-5249.
65. Kamiloglu, S., et al., *Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal Caco-2 cells—A review*. International journal of molecular sciences, 2015. **16**(9): p. 21555-21574.
66. de Pascual-Teresa, S. and M.T. Sanchez-Ballesta, *Anthocyanins: from plant to health*. Phytochemistry reviews, 2008. **7**(2): p. 281-299.
67. Giusti, M.M. and R.E. Wrolstad, *Acylation of anthocyanins from edible sources and their applications in food systems*. Biochemical engineering journal, 2003. **14**(3): p. 217-225.
68. Alappat, B. and J. Alappat, *Anthocyanin Pigments: Beyond Aesthetics*. Molecules, 2020. **25**(23): p. 5500.
69. Fernandes, I., V. de Freitas, and N. Mateus, *Anthocyanins and human health: how gastric absorption may influence acute human physiology*. Nutrition and Aging, 2014. **2**(1): p. 1-14.

70. Muche, B.M., R.A. Speers, and H. Rupasinghe, *Storage temperature impacts on anthocyanins degradation, color changes and haze development in juice of "Merlot" and "Ruby" grapes (Vitis vinifera)*. *Frontiers in nutrition*, 2018. **5**: p. 100.
71. Jamei, R. and F. Babaloo, *Stability of blueberry (Cornus mas–Yulyush) anthocyanin pigment under pH and co-pigment treatments*. *International Journal of Food Properties*, 2017. **20**(9): p. 2128-2133.
72. Moldovan, B. and L. David, *Influence of temperature and preserving agents on the stability of cornelian cherries anthocyanins*. *Molecules*, 2014. **19**(6): p. 8177-8188.
73. Sousa, A., et al., *Color stability and spectroscopic properties of deoxyvitisins in aqueous solution*. *New Journal of Chemistry*, 2014. **38**(2): p. 539-544.
74. de Freitas, V.A.P., et al., *A review of the current knowledge of red wine colour*. *Oeno One*, 2017. **51**(1): p. 1001-1021.
75. Leydet, Y., et al., *The effect of self-aggregation on the determination of the kinetic and thermodynamic constants of the network of chemical reactions in 3-glucoside anthocyanins*. *Phytochemistry*, 2012. **83**: p. 125-135.
76. Belwal, T., et al., *Dietary anthocyanins and insulin resistance: When food becomes a medicine*. *Nutrients*, 2017. **9**(10): p. 1111.
77. Zhu, F., *Anthocyanins in cereals: Composition and health effects*. *Food Research International*, 2018. **109**: p. 232-249.
78. Gonzali, S. and P. Perata, *Anthocyanins from Purple Tomatoes as Novel Antioxidants to Promote Human Health*. *Antioxidants*, 2020. **9**(10): p. 1017.
79. Krga, I. and D. Milenkovic, *Anthocyanins: From sources and bioavailability to cardiovascular-health benefits and molecular mechanisms of action*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2019. **67**(7): p. 1771-1783.
80. Kayesh, E., et al., *Fruit skin color and the role of anthocyanin*. *Acta physiologiae plantarum*, 2013. **35**(10): p. 2879-2890.
81. Karaaslan, N.M. and M. Yaman, *Anthocyanin profile of strawberry fruit as affected by extraction conditions*. *International journal of food properties*, 2017. **20**(sup3): p. S2313-S2322.
82. Shipp, J. and E.-S.M. Abdel-Aal, *Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients*. *The open food science journal*, 2010. **4**(1).
83. Cisowska, A., D. Wojnicz, and A.B. Hendrich, *Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin*. *Natural Product Communications*, 2011. **6**(1): p. 149-156.

84. Fukumoto, L. and G. Mazza, *Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds*. Journal of agricultural and food chemistry, 2000. **48**(8): p. 3597-3604.
85. Wang, J. and G. Mazza, *Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor α in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. **50**(15): p. 4183-4189.
86. Wu, L.-H., et al., *Protective Effect of Anthocyanins Extract from Blueberry on TNBS-Induced IBD Model of Mice*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011. **2011**: p. 525462.
87. Puupponen-Pimiä, R., et al., *Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries*. Journal of Applied Microbiology, 2001. **90**(4): p. 494-507.
88. Hou, D.-X., *Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins*. Current molecular medicine, 2003. **3**(2): p. 149-159.
89. Matsumoto, H., et al., *Stimulatory effect of cyanidin 3-glycosides on the regeneration of rhodopsin*. Journal of agricultural and food chemistry, 2003. **51**(12): p. 3560-3563.
90. Chaouch, M.A. and S. Benvenuti, *The Role of Fruit by-Products as Bioactive Compounds for Intestinal Health*. Foods, 2020. **9**(11): p. 1716.
91. Pereira, P., et al., *Grape Pomace: A Potential Ingredient for the Human Diet*. Foods, 2020. **9**(12): p. 1772.
92. Troilo, M., et al., *Bioactive Compounds from Vine Shoots, Grape Stalks, and Wine Lees: Their Potential Use in Agro-Food Chains*. Foods, 2021. **10**(2): p. 342.
93. Silva, L.M.L.R.d., *Caracterização dos subprodutos da vinificação*. Millenium, 2003: p. 123-133.
94. Spinei, M. and M. Oroian, *The Potential of Grape Pomace Varieties as a Dietary Source of Pectic Substances*. Foods, 2021. **10**(4): p. 867.
95. Brenes, A., et al., *Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review*. Animal Feed Science and Technology, 2016. **211**: p. 1-17.
96. Balli, D., et al., *Food by-products valorisation: Grape pomace and olive pomace (pâté) as sources of phenolic compounds and fiber for enrichment of tagliatelle pasta*. Food Chemistry, 2021. **355**: p. 129642.
97. Arboleda Mejia, J.A., et al., *Recovery of Phenolic Compounds from Red Grape Pomace Extract through Nanofiltration Membranes*. Foods, 2020. **9**(11): p. 1649.

98. Comunian, T.A., M.P. Silva, and C.J.F. Souza, *The use of food by-products as a novel for functional foods: Their use as ingredients and for the encapsulation process*. Trends in Food Science & Technology, 2021. **108**: p. 269-280.
99. Rodríguez-Pérez, C., et al., *Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from Moringa oleifera Lam leaves*. Industrial Crops and Products, 2015. **66**: p. 246-254.
100. Rocchetti, G., et al., *Impact of conventional/non-conventional extraction methods on the untargeted phenolic profile of Moringa oleifera leaves*. Food Research International, 2019. **115**: p. 319-327.
101. dos Santos, M.C.P., et al., *Optimization of chemical extraction of phenolic compounds from fruits and vegetable residue by UPLC-MSE*. International Journal of Food Properties, 2020. **23**(1): p. 2144-2159.
102. Osorio-Tobón, J.F., *Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds*. Journal of Food Science and Technology, 2020. **57**(12): p. 4299-4315.
103. Alara, O.R., N.H. Abdurahman, and C.I. Ukaegbu, *Extraction of phenolic compounds: A review*. Current Research in Food Science, 2021. **4**: p. 200-214.
104. Barba, F.J., et al., *Impact of conventional and non-conventional processing on prickly pear (Opuntia spp.) and their derived products: From preservation of beverages to valorization of by-products*. Trends in Food Science & Technology, 2017. **67**: p. 260-270.
105. Tanase, C., S. Coşarcă, and D.L. Muntean, *A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity*. Molecules, 2019. **24**(6).
106. Ranjha, M.M.A.N., et al., *Extraction of Polyphenols from Apple and Pomegranate Peels Employing Different Extraction Techniques for the Development of Functional Date Bars*. International Journal of Fruit Science, 2020. **20**(sup3): p. S1201-S1221.
107. Naviglio, D., et al., *Rapid Solid-Liquid Dynamic Extraction (RSLDE): A Powerful and Greener Alternative to the Latest Solid-Liquid Extraction Techniques*. Foods, 2019. **8**(7): p. 245.
108. Andres, A.I., et al., *Optimization of Extraction Conditions to Improve Phenolic Content and In Vitro Antioxidant Activity in Craft Brewers' Spent Grain Using Response Surface Methodology (RSM)*. Foods, 2020. **9**(10): p. 1398.

109. Ko, M.-J., H.-H. Nam, and M.-S. Chung, *Subcritical water extraction of bioactive compounds from Orostachys japonicus A. Berger (Crassulaceae)*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 10890.
110. Kala, H.K., et al., *Critical analysis of research trends and issues in microwave assisted extraction of phenolics: Have we really done enough*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. **85**: p. 140-152.
111. Garcia-Mendoza, M.P., et al., *Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from juçara (Euterpe edulis Mart.) residues using pressurized liquids and supercritical fluids*. The Journal of Supercritical Fluids, 2017. **119**: p. 9-16.
112. Grassino, A.N., et al., *Insight into High-Hydrostatic Pressure Extraction of Polyphenols from Tomato Peel Waste*. Plant Foods for Human Nutrition, 2020. **75**(3): p. 427-433.
113. Chemat, F., et al., *Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review*. Ultrasonics Sonochemistry, 2017. **34**: p. 540-560.
114. da Silva, R.P.F.F., T.A.P. Rocha-Santos, and A.C. Duarte, *Supercritical fluid extraction of bioactive compounds*. Trends in Analytical Chemistry, 2016. **76**: p. 40-51.
115. Barba, F.J., et al., *Potential use of pulsed electric technologies and ultrasounds to improve the recovery of high-added value compounds from blackberries*. Journal of Food Engineering, 2015. **167**: p. 38-44.
116. Gonçalves Rodrigues, L.G., et al., *Recovery of bioactive phenolic compounds from papaya seeds agroindustrial residue using subcritical water extraction*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019. **22**: p. 101367.
117. Munir, M.T., et al., *Subcritical water extraction of bioactive compounds from waste onion skin*. Journal of Cleaner Production, 2018. **183**: p. 487-494.
118. Alboofetileh, M., et al., *Subcritical water extraction as an efficient technique to isolate biologically-active fucoidans from Nizamuddinina zanardinii*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019. **128**: p. 244-253.
119. Hassas-Roudsari, M., et al., *Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction*. Food Chemistry, 2009. **114**(2): p. 717-726.
120. Gbashi, S., et al., *Subcritical Water Extraction of Biological Materials*. Separation & Purification Reviews, 2017. **46**(1): p. 21-34.

121. Yan, Z., et al., *Subcritical water extraction, identification, antioxidant and antiproliferative activity of polyphenols from lotus seedpod*. Separation and Purification Technology, 2020. **236**: p. 116217.
122. Cheng, Y., et al., *Subcritical Water Extraction of Natural Products*. Molecules, 2021. **26**(13): p. 4004.
123. Ibañez, E., et al., *Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(2): p. 375-382.
124. Singh, P.P. and M.D.A. Saldaña, *Subcritical water extraction of phenolic compounds from potato peel*. Food Research International, 2011. **44**(8): p. 2452-2458.
125. Tunchaiyaphum, S., M.N. Eshtiaghi, and N. Yoswathana, *Extraction of Bioactive Compounds from Mango Peels Using Green Technology*. International Journal of Chemical Engineering and Applications, 2013: p. 194-198.
126. Lachos-Perez, D., et al., *Subcritical water extraction of flavanones from defatted orange peel*. The Journal of Supercritical Fluids, 2018. **138**: p. 7-16.
127. Aliakbarian, B., et al., *Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water*. The Journal of Supercritical Fluids, 2012. **65**: p. 18-24.
128. Pinto, D., et al., *Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from chestnut shells by subcritical water extraction using response surface methodology*. Food Chemistry, 2021. **334**: p. 127521.
129. Sun, S., et al., *Extraction, isolation, characterization and antimicrobial activities of non-extractable polyphenols from pomegranate peel*. Food Chemistry, 2021. **351**: p. 129232.
130. Oktaviyanti, N.D., et al., *A green extraction design for enhancing flavonoid compounds from *Ixora javanica* flowers using a deep eutectic solvent*. Royal Society Open Science, 2020. **7**(10): p. 201116.
131. Ding, Y., et al., *Non-Extractable Polyphenols from Food By-Products: Current Knowledge on Recovery, Characterisation, and Potential Applications*. Processes, 2020. **8**(8): p. 925.
132. Saura-Calixto, F., *Concept and health-related properties of nonextractable polyphenols: the missing dietary polyphenols*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012. **60**(45): p. 11195-11200.
133. Azman, E.M., D. Charalampopoulos, and A. Chatzifragkou, *Acetic acid buffer as extraction medium for free and bound phenolics from dried blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) skins*. Journal of Food Science, 2020. **85**(11): p. 3745-3755.

134. Dzah, C.S., et al., *Latest developments in polyphenol recovery and purification from plant by-products: A review*. Trends in Food Science & Technology, 2020. **99**: p. 375-388.
135. Domínguez-Rodríguez, G., M. Plaza, and M.L. Marina, *High-performance thin-layer chromatography and direct analysis in real time-high resolution mass spectrometry of non-extractable polyphenols from tropical fruit peels*. Food Research International, 2021. **147**: p. 110455.
136. Quirós-Sauceda, A.E., et al., *Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion*. Food & Function journal, 2014. **5**(6): p. 1063-1072.
137. Liu, Y., et al., *Anti-diabetic effect of citrus pectin in diabetic rats and potential mechanism via PI3K/Akt signaling pathway*. International Journal of Biological Macromolecules, 2016. **89**: p. 484-488.
138. Alba, K., G.M. Campbell, and V. Kontogiorgos, *Dietary fibre from berry-processing waste and its impact on bread structure: a review*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2019. **99**(9): p. 4189-4199.
139. Amos, R.A. and D. Mohnen, *Critical Review of Plant Cell Wall Matrix Polysaccharide Glycosyltransferase Activities Verified by Heterologous Protein Expression*. Frontiers in Plant Science, 2019. **10**(915).
140. Holland, C., et al., *Plant Cell Walls: Impact on Nutrient Bioaccessibility and Digestibility*. Foods, 2020. **9**(2): p. 201.
141. Dhingra, D., et al., *Dietary fibre in foods: a review*. Journal of Food Science and Technology, 2012. **49**(3): p. 255-266.
142. Liu, X., C. Le Bourvellec, and C.M. Renard, *Interactions between cell wall polysaccharides and polyphenols: Effect of molecular internal structure*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020. **19**(6): p. 3574-3617.
143. Pérez-Jiménez, J. and J.L. Torres, *Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(24): p. 12713-12724.
144. Cirillo, G., et al., *Polyphenol Conjugates and Human Health: A Perspective Review*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016. **56**(2): p. 326-337.
145. Wu, D.-T., et al., *Polyphenolic-Protein-Polysaccharide Complexes from Hovenia dulcis: Insights into Extraction Methods on Their Physicochemical Properties and In Vitro Bioactivities*. Foods, 2020. **9**(4): p. 456.

146. Liu, J., et al., *Isolation, structural characterization and bioactivities of naturally occurring polysaccharide–polyphenolic conjugates from medicinal plants—a reivew*. International journal of biological macromolecules, 2018. **107**: p. 2242-2250.
147. Pawlaczyk, I., et al., *Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant Erigeron canadensis L*. Thrombosis Research, 2011. **127**(4): p. 328-340.
148. Ho, T.C., et al., *Green extraction of polyphenolic-polysaccharide conjugates from Pseudeanthemum palatiferum (Nees) Radlk.: Chemical profile and anticoagulant activity*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. **157**: p. 484-493.
149. Saluk-Juszczak, J., et al., *The effect of polyphenolic-polysaccharide conjugates from selected medicinal plants of Asteraceae family on the peroxynitrite-induced changes in blood platelet proteins*. International Journal of Biological Macromolecules, 2010. **47**(5): p. 700-705.
150. Zbikowska, H.M., et al., *Polyphenolic–polysaccharide conjugates from plants of Rosaceae/Asteraceae family as potential radioprotectors*. International Journal of Biological Macromolecules, 2016. **86**: p. 329-337.
151. Šutovská, M., et al., *Antitussive and bronchodilatory effects of Lythrum salicaria polysaccharide-polyphenolic conjugate*. International Journal of Biological Macromolecules, 2012. **51**(5): p. 794-799.
152. Mathew, T.K. and P. Tadi, *Blood glucose monitoring*. StatPearls [Internet], 2020.
153. Goodman, B.E., *Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans*. Advances in Physiology Education, 2010. **34**(2): p. 44-53.
154. Artasensi, A., et al., *Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs*. Molecules, 2020. **25**(8): p. 1987.
155. Les, F., et al., *The role of anthocyanins as antidiabetic agents: from molecular mechanisms to in vivo and human studies*. Journal of Physiology and Biochemistry, 2020.
156. Corsino, L., K. Dhatariya, and G. Umpierrez, *Management of diabetes and hyperglycemia in hospitalized patients*. 2015.
157. Saeedi, P., et al., *Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition*. Diabetes Research and Clinical Practice, 2019. **157**.

158. Kang, G.G., et al., *Dietary polyphenols and gene expression in molecular pathways associated with type 2 diabetes mellitus: A Review*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(1): p. 140.
159. Rasines-Perea, Z. and P.-L. Teissedre, *Grape polyphenols' effects in human cardiovascular diseases and diabetes*. Molecules, 2017. **22**(1): p. 68.
160. Mohan, V., et al., *Management of Type 2 Diabetes in Developing Countries: Balancing Optimal Glycaemic Control and Outcomes with Affordability and Accessibility to Treatment*. Diabetes Therapy, 2020. **11**(1): p. 15-35.
161. Muriach, M., et al., *Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2014. **2014**.
162. AL-Ishaq, R.K., et al., *Flavonoids and their anti-diabetic effects: cellular mechanisms and effects to improve blood sugar levels*. Biomolecules, 2019. **9**(9): p. 430.
163. Kharroubi, A.T. and H.M. Darwish, *Diabetes mellitus: The epidemic of the century*. World Journal of Diabetes, 2015. **6**(6): p. 850-867.
164. Burton-Freeman, B., et al., *A selective role of dietary anthocyanins and flavan-3-ols in reducing the risk of type 2 diabetes mellitus: A review of recent evidence*. Nutrients, 2019. **11**(4): p. 841.
165. Jiang, T., et al., *Protein-Bound Anthocyanin Compounds of Purple Sweet Potato Ameliorate Hyperglycemia by Regulating Hepatic Glucose Metabolism in High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Diabetic Mice*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020. **68**(6): p. 1596-1608.
166. Oza, M.J. and Y.A. Kulkarni, *Formononetin treatment in type 2 diabetic rats reduces insulin resistance and hyperglycemia*. Frontiers in pharmacology, 2018. **9**: p. 739.
167. Shirin, A., et al., *Optimal regulation of blood glucose level in Type I diabetes using insulin and glucagon*. PloS one, 2019. **14**(3): p. e0213665.
168. Jung, M., et al., *Antidiabetic agents from medicinal plants*. Current medicinal chemistry, 2006. **13**(10): p. 1203-1218.
169. Chaudhury, A., et al., *Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 6.
170. Hansen, A.H., S.C. Wangberg, and E. Årsand, *Lifestyle changes among people with type 2 diabetes are associated with participation in online groups and time since diagnosis*. BMC Health Services Research, 2021. **21**(1): p. 688.
171. Chen, L., et al., *Effect of lifestyle intervention in patients with type 2 diabetes: A meta-analysis*. Metabolism, 2015. **64**(2): p. 338-347.

172. Domínguez Avila, J.A., et al., *The antidiabetic mechanisms of polyphenols related to increased glucagon-like peptide-1 (GLP1) and insulin signaling*. Molecules, 2017. **22**(6): p. 903.
173. Pi-Sunyer, F.X., *How effective are lifestyle changes in the prevention of type 2 diabetes mellitus?* Nutrition Reviews, 2007. **65**(3): p. 101-110.
174. Lange, K.W., *Food science and COVID-19*. Food Science and Human Wellness, 2021. **10**(1): p. 1-5.
175. Edirisinghe, I. and B. Burton-Freeman, *Anti-diabetic actions of Berry polyphenols—Review on proposed mechanisms of action*. Journal of Berry Research, 2016. **6**(2): p. 237-250.
176. Singh, J.P., et al., *Composition, bioactive compounds and antioxidant activity of common Indian fruits and vegetables*. Journal of Food Science and Technology, 2016. **53**(11): p. 4056-4066.
177. Kumar, K., et al., *Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds*. Bioresources and Bioprocessing, 2017. **4**(1): p. 18.
178. Plaza, M., A. Cifuentes, and E. Ibáñez, *In the search of new functional food ingredients from algae*. Trends in Food Science & Technology, 2008. **19**(1): p. 31-39.
179. Natarajan, T.D., J.R. Ramasamy, and K. Palanisamy, *Nutraceutical potentials of synergic foods: A systematic review*. Journal of Ethnic Foods, 2019. **6**(1): p. 1-7.
180. Soquetta, M.B., L.d.M. Terra, and C.P. Bastos, *Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables*. CyTA - Journal of Food, 2018. **16**(1): p. 400-412.
181. Potì, F., et al., *Polyphenol health effects on cardiovascular and neurodegenerative disorders: A review and meta-analysis*. International journal of molecular sciences, 2019. **20**(2): p. 351.
182. Pandey, K.B. and S.I. Rizvi, *Role of red grape polyphenols as antidiabetic agents*. Integrative medicine research, 2014. **3**(3): p. 119-125.
183. Tan, Y. and S.K.C. Chang, *Digestive enzyme inhibition activity of the phenolic substances in selected fruits, vegetables and tea as compared to black legumes*. Journal of Functional Foods, 2017. **38**: p. 644-655.
184. Yang, C.-Y., et al., *Inhibitory effects of pu-erh tea on alpha glucosidase and alpha amylase: a systemic review*. Nutrition & Diabetes, 2019. **9**(1): p. 23.
185. Gericke, B., M. Amiri, and H.Y. Naim, *The multiple roles of sucrase-isomaltase in the intestinal physiology*. Molecular and Cellular Pediatrics, 2016. **3**(1): p. 2.

186. Poovitha, S. and M. Parani, *In vitro and in vivo α -amylase and α -glucosidase inhibiting activities of the protein extracts from two varieties of bitter gourd (*Momordica charantia* L.)*. BMC complementary and alternative medicine, 2016. **16**(1): p. 1-8.
187. Ali Asgar, M., *Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review*. International Journal of Food Properties, 2013. **16**(1): p. 91-103.
188. Barber, E., M.J. Houghton, and G. Williamson, *Flavonoids as Human Intestinal α -Glucosidase Inhibitors*. Foods, 2021. **10**(8): p. 1939.
189. Trinh, B.T., D. Staerk, and A.K. Jäger, *Screening for potential α -glucosidase and α -amylase inhibitory constituents from selected Vietnamese plants used to treat type 2 diabetes*. Journal of ethnopharmacology, 2016. **186**: p. 189-195.
190. Sui, X., Y. Zhang, and W. Zhou, *In vitro and in silico studies of the inhibition activity of anthocyanins against porcine pancreatic α -amylase*. Journal of Functional Foods, 2016. **21**: p. 50-57.
191. Oboh, G., et al., *Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): a comparative study*. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology, 2015. **26**(2): p. 165-170.
192. Oboh, G., et al., *Comparative effect of quercetin and rutin on α -amylase, α -glucosidase, and some pro-oxidant-induced lipid peroxidation in rat pancreas*. Comparative Clinical Pathology, 2015. **24**(5): p. 1103-1110.
193. Desseaux, V., et al., *The Mechanisms of Alpha-Amylase Inhibition by Flavan-3-Ols and the Possible Impacts of Drinking Green Tea on Starch Digestion*. Journal of Food Science, 2018. **83**(11): p. 2858-2865.
194. Adisakwattana, S., P. Charoenlertkul, and S. Yibchok-anun, *α -Glucosidase inhibitory activity of cyanidin-3-galactoside and synergistic effect with acarbose*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2009. **24**(1): p. 65-69.
195. Li, Y.Q., et al., *Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of alpha-glucosidase*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(24): p. 11463-11468.
196. Yang, Y., et al., *Flavan-3-ols and 2-diglycosyloxybenzoates from the leaves of *Averrhoa carambola**. Fitoterapia, 2020. **140**: p. 104442.
197. de Paulo Farias, D., et al., *Antidiabetic potential of dietary polyphenols: A mechanistic review*. Food Research International, 2021. **145**: p. 110383.
198. Wu, C.H., et al., *Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs*. Food & Function journal, 2011. **2**(5): p. 224-234.

199. Liu, W., et al., *Effects of drying methods on the physicochemical characteristics and bioactivities of polyphenolic-protein-polysaccharide conjugates from Hovenia dulcis*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. **148**: p. 1211-1221.
200. Kim, C.S., S. Park, and J. Kim, *The role of glycation in the pathogenesis of aging and its prevention through herbal products and physical exercise*. Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry, 2017. **21**(3): p. 55-61.
201. Singh, V.P., et al., *Advanced glycation end products and diabetic complications*. The Korean Journal of Physiology & Pharmacology, 2014. **18**(1): p. 1-14.
202. Mori, H., et al., *Association of accumulated advanced glycation end-products with a high prevalence of sarcopenia and dynapenia in patients with type 2 diabetes*. Journal of Diabetes Investigation, 2019. **10**(5): p. 1332-1340.
203. Anwar, S., et al., *A review on mechanism of inhibition of advanced glycation end products formation by plant derived polyphenolic compounds*. Molecular Biology Reports, 2021. **48**(1): p. 787-805.
204. Yeh, W.-J., et al., *Polyphenols with antiglycation activity and mechanisms of action: A review of recent findings*. Journal of Food and Drug Analysis, 2017. **25**(1): p. 84-92.
205. Alzaid, F., et al., *Regulation of Glucose Transporter Expression in Human Intestinal Caco-2 Cells following Exposure to an Anthocyanin-Rich Berry Extract*. PLOS ONE, 2013. **8**(11): p. e78932.
206. Manzano, S. and G. Williamson, *Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells*. Molecular Nutrition & Food Research, 2010. **54**(12): p. 1773-1780.
207. Sano, R., Y. Shinozaki, and T. Ohta, *Sodium-glucose cotransporters: Functional properties and pharmaceutical potential*. Journal of Diabetes Investigation, 2020. **11**(4): p. 770-782.
208. Castro-Acosta, M.L., et al., *Berries and anthocyanins: promising functional food ingredients with postprandial glycaemia-lowering effects*. Proceedings of the Nutrition Society, 2016. **75**(3): p. 342-355.
209. Hamilton, K.E., et al., *Quercetin inhibits glucose transport by binding to an exofacial site on GLUT1*. Biochimie, 2018. **151**: p. 107-114.
210. Meng, Q., et al., *Inhibitory effects of polysaccharide from Diaphragma juglandis fructus on α -amylase and α -d-glucosidase activity, streptozotocin-induced hyperglycemia model, advanced glycation end-products formation, and H₂O₂-*

- induced oxidative damage*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019. **124**: p. 1080-1089.
211. Zhu, W. and Z. Zhang, *Preparation and characterization of catechin-grafted chitosan with antioxidant and antidiabetic potential*. International Journal of Biological Macromolecules, 2014. **70**: p. 150-155.
212. Pawlaczyk-Graja, I., S. Balicki, and K.A. Wilk, *Effect of various extraction methods on the structure of polyphenolic-polysaccharide conjugates from Fragaria vesca L. leaf*. International Journal of Biological Macromolecules, 2019. **130**: p. 664-674.
213. Dorosh, O., et al., *Evaluation of the Extraction Temperature Influence on Polyphenolic Profiles of Vine-Canes (Vitis vinifera) Subcritical Water Extracts*. Foods, 2020. **9**(7): p. 872.
214. Singleton, V.L. and J.A. Rossi, *Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents*. American Journal of Enology and Viticulture, 1965. **16**(3): p. 144-158.
215. Oliveira, J., et al., *Structural characterization of a A-type linked trimeric anthocyanin derived pigment occurring in a young Port wine*. Food Chemistry, 2013. **141**(3): p. 1987-1996.
216. Azevedo, J., et al., *Migration of phenolic compounds from different cork stoppers to wine model solutions: antioxidant and biological relevance*. European Food Research and Technology, 2014. **239**(6): p. 951-960.
217. Giusti, M.M. and R.E. Wrolstad, *Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy*. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, 2001. **00**(1): p. F1.2.1-F1.2.13.
218. Yang, P., et al., *Dispersive liquid-liquid microextraction method for HPLC determination of phenolic compounds in wine*. Food Analytical Methods, 2017. **10**(7): p. 2383-2397.
219. Fernandes, A., et al., *Antioxidant and Biological Properties of Bioactive Phenolic Compounds from Quercus suber L.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57**(23): p. 11154-11160.
220. Teixeira, N., et al., *Wine industry by-product: Full polyphenolic characterization of grape stalks*. Food Chemistry, 2018. **268**: p. 110-117.
221. Ross, K.A., T. Beta, and S.D. Arntfield, *A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods*. Food Chemistry, 2009. **113**(1): p. 336-344.

222. Fernandes, P.A.R., et al., *The hydrophobic polysaccharides of apple pomace*. Carbohydrate polymers, 2019. **223**: p. 115132.
223. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1): p. 248-254.
224. Podolec, P., et al., *Direct silylation of Trypanosoma brucei metabolites in aqueous samples and their GC–MS/MS analysis*. Journal of Chromatography B, 2014. **967**: p. 134-138.
225. Blumenkrantz, N. and G. Asboe-Hansen, *New method for quantitative determination of uronic acids*. Analytical Biochemistry, 1973. **54**(2): p. 484-489.
226. Coimbra, M.A., et al., *Isolation and Analysis of Cell Wall Polymers from Olive Pulp*, in *Plant Cell Wall Analysis*, H.F. Linskens and J.F. Jackson, Editors. 1996, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 19-44.
227. Bondet, V., W. Brand-Williams, and C. Berset, *Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH.Free Radical Method*. LWT - Food Science and Technology, 1997. **30**(6): p. 609-615.
228. Benzie, I.F.F. and J.J. Strain, *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay*. Analytical Biochemistry, 1996. **239**(1): p. 70-76.
229. Oliveira, H., et al., *Comparison of the in vitro gastrointestinal bioavailability of acylated and non-acylated anthocyanins: Purple-fleshed sweet potato vs red wine*. Food Chemistry, 2019. **276**: p. 410-418.
230. Zakaria, S.M. and S.M.M. Kamal, *Subcritical Water Extraction of Bioactive Compounds from Plants and Algae: Applications in Pharmaceutical and Food Ingredients*. Food Engineering Reviews, 2016. **8**(1): p. 23-34.
231. Kumar, M.S.Y., et al., *Subcritical water extraction of antioxidant compounds from Seabuckthorn (Hippophae rhamnoides) leaves for the comparative evaluation of antioxidant activity*. Food Chemistry, 2011. **127**(3): p. 1309-1316.
232. Rodríguez De Luna, S.L., R.E. Ramírez-Garza, and S.O. Serna Saldívar, *Environmentally Friendly Methods for Flavonoid Extraction from Plant Material: Impact of Their Operating Conditions on Yield and Antioxidant Properties*. The Scientific World Journal, 2020. **2020**: p. 6792069-6792069.
233. Yammine, S., et al., *Characterisation of polyphenols and antioxidant potential of red and white pomace by-product extracts using subcritical water extraction*. Oeno One, 2020. **54**(2): p. 263-278.

234. Salta, J., et al., *Phenolic composition and antioxidant activity of Rocha pear and other pear cultivars – A comparative study*. Journal of Functional Foods, 2010. **2**(2): p. 153-157.
235. Liu, Y., Y. Sun, and G. Huang, *Preparation and antioxidant activities of important traditional plant polysaccharides*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. **111**: p. 780-786.
236. Aleixandre-Tudo, J.L. and W. Du Toit, *The role of UV-visible spectroscopy for phenolic compounds quantification in winemaking*. Frontiers and new trends in the science of fermented food and beverages, 2018: p. 1-21.
237. Yoon, S.-H. and J.F. Robyt, *Study of the inhibition of four alpha amylases by acarbose and its 4IV- α -maltohexaosyl and 4IV- α -maltododecaosyl analogues*. Carbohydrate Research, 2003. **338**(19): p. 1969-1980.
238. Grussu, D., D. Stewart, and G.J. McDougall, *Berry polyphenols inhibit α -amylase in vitro: identifying active components in rowanberry and raspberry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011. **59**(6): p. 2324-2331.
239. Sun, L., Y. Wang, and M. Miao, *Inhibition of α -amylase by polyphenolic compounds: Substrate digestion, binding interactions and nutritional intervention*. Trends in Food Science & Technology, 2020. **104**: p. 190-207.
240. Tsujita, T., T. Shintani, and H. Sato, *α -Amylase Inhibitory Activity from Nut Seed Skin Polyphenols. 1. Purification and Characterization of Almond Seed Skin Polyphenols*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013. **61**(19): p. 4570-4576.
241. Sun, L., F.J. Warren, and M.J. Gidley, *Soluble polysaccharides reduce binding and inhibitory activity of tea polyphenols against porcine pancreatic α -amylase*. Food Hydrocolloids, 2018. **79**: p. 63-70.
242. Ademiluyi, A.O., et al., *Antioxidant properties and in vitro α -amylase and α -glucosidase inhibitory properties of phenolics constituents from different varieties of Corchorus spp.* Journal of Taibah University Medical Sciences, 2015. **10**(3): p. 278-287.
243. Chen, J.-g., et al., *α -Glucosidase inhibitory effect of anthocyanins from Cinnamomum camphora fruit: Inhibition kinetics and mechanistic insights through in vitro and in silico studies*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. **143**: p. 696-703.
244. Rasouli, H., et al., *Differential α -amylase/ α -glucosidase inhibitory activities of plant-derived phenolic compounds: a virtual screening perspective for the treatment of obesity and diabetes*. Food & Function, 2017. **8**(5): p. 1942-1954.

245. Sugiura, S., et al., *Evaluation of Anti-glycation Activities of Phlorotannins in Human and Bovine Serum Albumin-glyceraldehyde Models*. Natural Product Communications, 2018. **13**(8): p. 1934578X1801300820.
246. Liu, W., et al., *Anti-glycation and anti-oxidative effects of a phenolic-enriched maple syrup extract and its protective effects on normal human colon cells*. Food & Function journal, 2017. **8**(2): p. 757-766.
247. Khangholi, S., et al., *The Mechanisms of Inhibition of Advanced Glycation End Products Formation through Polyphenols in Hyperglycemic Condition*. Planta Med, 2016. **82**(1-2): p. 32-45.
248. Denardin, C.C., et al., *Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits*. Journal of Food and Drug Analysis, 2015. **23**(3): p. 387-398.
249. Kazeem, M.I., et al., *Antiglycation, antioxidant and toxicological potential of polyphenol extracts of alligator pepper, ginger and nutmeg from Nigeria*. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 2012. **2**(9): p. 727-732.
250. Gill, V., et al., *Advanced Glycation End Products (AGEs) May Be a Striking Link Between Modern Diet and Health*. Biomolecules, 2019. **9**(12).
251. Zhang, L.-S., X. Wang, and L.-L. Dong, *Antioxidation and antiglycation of polysaccharides from Misgurnus anguillicaudatus*. Food chemistry, 2011. **124**(1): p. 183-187.
252. Lin, H., et al., *Effect of Pholiota nameko Polysaccharides Inhibiting Methylglyoxal-Induced Glycation Damage In Vitro*. Antioxidants, 2021. **10**(10): p. 1589.
253. Kalousová, M., et al., *Advanced glycation end products in clinical nephrology*. Kidney Blood Press Res, 2004. **27**(1): p. 18-28.
254. Song, Q., et al., *Novel advances in inhibiting advanced glycation end product formation using natural compounds*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021. **140**: p. 111750.
255. Santbergen, M.J.C., et al., *Dynamic in vitro intestinal barrier model coupled to chip-based liquid chromatography mass spectrometry for oral bioavailability studies*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020. **412**(5): p. 1111-1122.
256. Cai, H., et al., *Lycium barbarum L. Polysaccharide (LBP) Reduces Glucose Uptake via Down-Regulation of SGLT-1 in Caco2 Cell*. Molecules, 2017. **22**(2): p. 341.
257. Pico, J., et al., *Banana flour phenolics inhibit trans-epithelial glucose transport from wheat cakes in a coupled in vitro digestion/Caco-2 cell intestinal model*. Food & Function, 2019. **10**(10): p. 6300-6311.

258. Farrell, T.L., et al., *Attenuation of glucose transport across Caco-2 cell monolayers by a polyphenol-rich herbal extract: interactions with SGLT1 and GLUT2 transporters*. Biofactors, 2013. **39**(4): p. 448-56.
259. Cermak, R., S. Landgraf, and S. Wolfram, *Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum*. British Journal of Nutrition, 2004. **91**(6): p. 849-855.