

INSTITUTO FEDERAL DE SANTA CATARINA
CÂMPUS SÃO MIGUEL DO OESTE
TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

JEFERSON KOLLING
PALOMA ROCHA

COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIGLICÊMICA DO SUCO DA
GUABIROBA

São Miguel do Oeste – SC

2018

JEFERSON KOLLING

PALOMA ROCHA

COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIGLICÊMICA DO SUCO DA
GUABIROBA

Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado ao Curso
de Tecnologia em Alimentos
do Câmpus São Miguel do
Oeste do Instituto Federal de
Santa Catarina para a
obtenção do diploma de
Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Dr^a. Stefany
Grutzmann Arcari
Coorientador: Me. Tiago
Favero

São Miguel do Oeste – SC

2018

COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIGLICÊMICA DO SUCO DA
GUABIROBA

JEFERSON KOLLING
PALOMA ROCHA

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos e aprovado na sua forma final pela comissão avaliadora abaixo indicada.

São Miguel do Oeste, 05 de Dezembro de 2018.

Stefany Grutzmann Arcari
Doutora em Ciência de Alimentos

Cíntia Ladeira Handa
Doutora em Ciência de Alimentos

Aquidauana Miqueloto
Doutora em Fisiologia Vegetal

As assinaturas da banca estão devidamente registradas na ata de defesa, arquivada junto à Coordenação do Curso.

AGRADECIMENTOS

As pessoas que nos incentivaram a ir em busca do conhecimento e aperfeiçoamento profissional, nos apoiando a não desistir, mesmo nos momentos mais difíceis.

A nossa orientadora Dr^a Stefany Grutzmann Arcari por nos disponibilizar partes do seu projeto de pesquisa como tema do trabalho de conclusão de curso, pela confiança e paciência e por todo apoio durante o desenvolvimento do mesmo, obrigado!

Ao nosso coorientador Me. Tiago Favero por nos transmitir conhecimentos, enriquecendo o nosso aprendizado, obrigado!

Agradecemos as bolsistas Emanuelli Marchesan Maran e Micheli Ines Machado pelo auxílio na elaboração e extração enzimática do suco de guabiroba.

Agradecemos ao professor Dr Daniel Granato e a professora Dr^a Alice Fujita, pela prestatividade em sanar nossas dúvidas quanto ao método empregado na análise antiglicêmica, obrigado!

A EPAGRI pelo fornecimentos das guabirobas, o nosso muito obrigado!

Aos professores da banca, pelas considerações desde o início do trabalho, que o enriqueceram e aperfeiçoaram nosso aprendizado, obrigado!

Ao Instituto Federal de Santa Catarina que mesmo com orçamento limitado nos proporciona a possibilidade de executar uma pesquisa de importância tecnológica e que terá como resultados informações que poderão auxiliar futuros pesquisadores e a saúde da população.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para o nosso crescimento pessoal e profissional ao longo dessa jornada, bem como a elaboração desse trabalho, o nosso muito obrigada!

Gratidão!

1 **RESEARCH HIGHLIGHTS**

2

3 • Metodologia validada para determinação de 10 compostos fenólicos por CLAE-
4 DAD.

5 • Redução no uso dos solventes orgânicos na extração líquido-líquido.

6 • Correlação positiva entre compostos fenólicos e inibição enzimática.

7 • Reutilização de resíduo agroindustrial.

8 • Alta concentração de ácido vanílico em suco de *Campomanesia xanthocarpa*
9 Berg.

Manuscrito em preparo para submissão no periódico *Food Chemistry*

**Title: PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIGLYCEMIC ACTIVITY OF
GUABIROBA (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) JUICE**

**Running title: PHENOLIC COMPOUNDS AND ANTIGLYCEMIC ACTIVITY
OF GUABIROBA JUICE**

**Jeferson KOLLING, Paloma ROCHA, Tiago FAVERO and Stefany Grützmann
ARCARI***

Federal Institute of Santa Catarina (IFSC), Campus São Miguel do Oeste, 89900-000, São Miguel do Oeste, SC, Brazil.

E-mail addresses:

Jeferson Kolling: jeferson.k@aluno.ifsc.edu.br

Paloma Rocha: paloma.r17@aluno.ifsc.edu.br

Tiago Favero: tiago.favero@ifsc.edu.br

***Corresponding author:** Tel./ Fax: +55 49 3631-0463. E-mail: stefany.arcari@ifsc.edu.br (S. G. Arcari).

RESUMO

Este estudo objetivou otimizar o sistema de extração líquido-líquido para identificação e quantificação de compostos fenólicos e avaliação da atividade antiglicêmica do suco da polpa e do bagaço da guabiroba. Para o sistema otimizado, 50 % de água acidificada com 2% de ácido acético e 50 % de acetonitrila apresentou a melhor extração de compostos fenólicos. O método CLAE-DAD para determinação de compostos fenólicos em suco de guabiroba apresentou excelente precisão (1,03 a 9,61%) e baixos limites de detecção (0,0001 a 6,30 $\mu\text{g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$) e quantificação (0,02 a 1 $\text{mg}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$). Ácido gálico (2,82 $\text{mg}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$), catequina (18,63 $\text{mg}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$) e ácido sirínico (0,06 $\text{mg}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$) destacaram-se no suco do bagaço (SB) e epicatequina (42,47 $\text{mg}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$) e quercetina (1,38 $\text{mg}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$) no suco da polpa (SP). Maior inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase foi observada com o aumento do teor de compostos fenólicos.

Palavras-Chave: delineamento de misturas; CLAE-DAD; α -amilase; α -glicosidase.

Chemical compounds studied in this article

Gallic acid (PubChem CID: 24895304)

Caffeic acid (PubChem CID: 24278290)

Syringic acid (PubChem CID: 24899724)

p-Coumaric acid (PubChem CID: 24893127)

4-Hydroxybenzoic acid (PubChem CID: 24854406)

Ferulic acid (PubChem CID: 329749843)

Vanillic acid (PubChem CID: 329770384)

Catequina (PubChem CID: 9064)

(-)-Epicatechin (Pub Chem CID: 72276)

Quercetin (PubChem CID: 329823865)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Superfície de resposta (a) para extração de polifenóis totais de suco de guabiroba como função do uso dos solventes metanol (X_1), água acidificada com 2% de ácido acético (X_2) e acetonitrila (X_3) e, valores preditos e desejabilidade (b) como função dos solventes empregados para extração de polifenóis totais de suco de guabiroba.....32
- Figura 2- Cromatogramas nos comprimentos de onda 280 nm (A), 320 nm (B) e 360 nm (C). Compostos fenólicos: 1 (ácido gálico), 2 (4-hidroxibenzoico), 3 (catequina), 4 (ácido vanílico), 5 (ácido sirínico), 6 (epicatequina), 7 (ácido cafeico), 8 (ácido *p*-cumárico), 9 (ácido ferúlico) e 10 (quercetina).....33
- Figura 3- Atividade inibitória da α -amilase e α -glicosidase no suco de guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) proveniente do bagaço e da polpa.....34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Matriz do delineamento simplex-centroide para extração de compostos fenólicos totais de suco de guabiroba.....	35
Tabela 2- Faixa de concentração linear, coeficiente de determinação da curva analítica, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão intermediária, exatidão e desvio padrão relativo dos dados de exatidão para método proposto para determinação de compostos fenólicos em suco de guabiroba.....	36
Tabela 3- Concentrações médias dos compostos fenólicos nos sucos de guabiroba.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LDL- Lipoproteína de Baixa Densidade

CLAE-DAD- Cromatografia Líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

EPAGRI- Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

SB- Suco do Bagaço

SP- Suco da Polpa

ELL- Extração líquido-líquido

PTFE- Politetrafluoretileno

EAG- Equivalente em Ácido Gálico

nm- Nanômetros

DAD- Detector de Arranjo de Diodos

LD- Limite de Detecção

LQ- Limite de Quantificação

DPR- Desvio Padrão Relativo

UV-Vis- Ultravioleta-visível

DM2- Diabetes *mellitus* tipo 2

p-NPG- *p*-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo

μ L- microlitro

ANOVA- Análise de Variância

Abs- Absorbância

μ g- micrograma

mg- miligrama

mL- mililitro

rpm- Rotações por minutos

NaCl- Cloreto de Sódio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1	Amostra e reagentes	15
2.2	Preparo do suco	15
2.3	Extração líquido-líquido dos compostos fenólicos	16
2.4	Determinação dos compostos fenólicos	16
2.5	Validação do método	17
2.6	Inibição da α -amilase	18
2.7	Inibição da α -glicosidase	19
2.8	Análise estatística	20
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1	Otimização da extração dos compostos fenólicos	20
3.2	Validação do método cromatográfico	21
3.3	Identificação e quantificação dos compostos fenólicos	22
3.4	Atividade antiglicêmica	24
4	CONCLUSÕES	25
5	REFERÊNCIAS	27
6	FIGURE CAPTIONS	31
	Anexo 1	38

1 INTRODUÇÃO

A família botânica Myrtaceae encontrada na região Sul do Brasil, possui frutos silvestres como a guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) que normalmente é usada na medicina popular (M. C. Pereira et al., 2012). O interesse em frutas nativas está aumentando devido ao seu valor nutricional, sendo que a guabiroba apresenta teor elevado de vitamina C, sais minerais e compostos fenólicos (Da Silva Santos, Carneiro, Wosiacki, De Oliveira Petkowicz, & Carneiro, 2009; Oliveira, Lopes, Cabral, & Eberlin, 2006).

Devido a sua alta taxa respiratória, essa fruta possui vida útil curta, sendo o processamento uma alternativa para melhor aproveitamento do fruto. O interesse por essas alternativas advém da sua rica composição química (Da Silva Santos, 2011; Da Silva Santos et al., 2009). Um exemplo de processamento é a obtenção da polpa de frutas, visando aumentar a variedades de produtos existentes, agregar valor econômico e prolongar a vida útil, mantendo a qualidade. Esse processo resulta em um resíduo de alto valor nutricional, podendo ser empregado para o uso em novos produtos, minimizando impactos ambientais e agregando valor aos subprodutos (Filha, Araújo, Silva, & Canuto, 2016).

O consumo de frutas ricas em compostos bioativos fenólicos com alta atividade antioxidante está associado com o menor risco de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e suas complicações (Fujita, Sarkar, Genovese, & Shetty, 2017). Alimentos à base de plantas que são ricos em compostos fenólicos, possuem potencial para inibir enzimas α -amilase e α -glicosidase, as quais são um atrativo para o tratamento da hiperglicemia pós-prandial por meio da desaceleração do metabolismo dos carboidratos (Fujita et al., 2017; Hanhineva et al., 2010).

Estudos com infusão e decocção das folhas de guabiroba em ratos submetidos a dietas hipercalóricas e indução ao diabetes *mellitus*, indicou redução significativa de ganho de peso, diminuição de glicemia, dos níveis de glicose sanguínea, inibição da degradação do glicogênio hepático e prevenção de possíveis alterações histopatológicas no pâncreas e nos rins (Biavatti et al., 2004; Vinagre et al., 2010). Ainda, estudo clínico em humanos, com folhas de *Campomanesia xanthocarpa* encapsulada apresentaram diminuição no colesterol LDL e total em doentes hipercolesterolêmicos (Klafke et al., 2010).

Os alimentos vegetais, como frutas, verduras e legumes, são ricas fontes de compostos fenólicos, que são moléculas que podem atuar como antioxidantes para

prevenir doenças cardíacas, reduzir inflamação, diminuir incidência de cânceres e diabetes, bem como reduzir as taxas de mutagênese em células humanas. Ainda a presença desses compostos são associadas a outras atividades, como antimicrobianos e anti-obesidade, devido à inibição de enzimas-chave no metabolismo de carboidratos, como a α -glicosidase e α -amilase, bem como a atenuação de hiperglicemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia em jejum (Daniel Daza, Fujita, Granato, Silvia Fávaro-Trindade, & Inés Genovese, 2017; Khoddami, Wilkes, & Roberts, 2013).

Para a identificação e quantificação desses compostos fenólicos em alimentos, que são importantes para a saúde humana, existem alguns métodos, dentre eles, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizada para a separação e quantificação dos compostos em amostras complexas, como no suco de guabiroba, sendo utilizada em conjunto com instrumentos de detecção, como a espectrometria de massas e detector de arranjo de diodos (Arcari, Burin, Costa, Ogliari, & Bordignon-Luiz, 2012; Khoddami et al., 2013). Considerando a variedade de compostos e a grande quantidade de polissacarídeos presentes no fruto de guabiroba, é essencial um preparo da amostra para a extração adequada dos compostos de interesse (Da Silva Santos et al., 2009).

O nível de extração dos compostos fenólicos totais de uma matriz alimentar depende das interações entre amostra e solvente, como também da eficiência do sistema de solvente para extrair os compostos fenólicos predominantes do alimento analisado (Handa, De Lima, Guelfi, Georgetti, & Ida, 2016). Mesmo sendo de interesse a extração máxima de compostos fenólicos, os riscos à saúde e ao meio ambiente também devem ser considerados ao selecionar um solvente extrator e sua concentração. A otimização do processo de extração pode ser obtida com métodos estatísticos, como o método de superfície de resposta, que é frequentemente utilizada porque permite a avaliação da interação entre vários fatores (Arcari et al., 2012). Dentre os métodos empregados em frutas e derivados, a extração líquido-líquido apresenta boa precisão, repetibilidade e curto tempo de análise (Burin, Ferreira-Lima, Panceri, & Bordignon-Luiz, 2014).

Tendo em vista que ainda não há relatos na literatura sobre a caracterização do suco da guabiroba quanto aos compostos bioativos presentes e atividade antiglicêmica, o presente estudo teve como objetivo a elaboração de um suco de polpa (SP) e suco de bagaço (SB) de guabiroba a fim de se comparar as suas concentrações de compostos fenólicos e as suas correlações com a capacidade inibitória das enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos. Além de aperfeiçoar um sistema de extração com solventes para compostos fenólicos usando delineamento simplex-centroide, para identificação e

quantificação dos principais compostos fenólicos através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) e avaliou-se a atividade antiglicêmica do suco da polpa e do bagaço da guabiroba por meio da inibição da α -amilase e α -glicosidase.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostra e reagentes

Os frutos de guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) pertencente à safra 2017, foram fornecidos pela EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural, coletados em propriedades rurais do Oeste de Santa Catarina no mês de novembro de 2017, os quais foram congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até elaboração do suco.

Os padrões dos compostos fenólicos ácido gálico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido vanílico, catequina, epicatequina, quercetina, além da α -amilase de pâncreas suíno (Type VI-B), α -glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Type I), *p*-NPG (p-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo), ácido dinitrosalicílico e o reagente Folin-Ciocalteu foram obtidos da Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EUA). Os reagentes para extração líquido-líquido e para eluição em CLAE-DAD eram de grau cromatográfico. A solução estoque de cada composto fenólico ($2\text{ g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$) foi preparada com solução de etanol e água (50:50), com exceção da quercetina, para a qual utilizou-se somente metanol.

2.2 Preparo do suco

Os frutos foram selecionados pela uniformidade de cor e ausência de injúrias, higienizados com hipoclorito de sódio ($50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ por 15 minutos), seguido de sucessivas lavagens com água potável. Os frutos foram esmagados manualmente em uma peneira de poliamida com o auxílio de uma colher, e a partir dessa separação, obteve-se o bagaço de guabiroba, material que ficou retido na peneira e a polpa de guabiroba, material que passou pela peneira. Após, essas frações foram, separadamente, submetidas a tratamento enzimático com aplicação de enzimas pectolíticas (Novozymes) (Da Silva Santos, 2011). Utilizou-se $5\text{ mL}\cdot 100\text{ L}^{-1}$ de enzimas pectolíticas, durante 2 horas a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, com agitação manual. Posterior a essa reação enzimática, conseguiu-se o suco do bagaço (SB) e suco

da polpa (SP) de guabiroba.

Os sucos foram filtrados em filtro de malha com abertura de 150 μm , envasados em garrafas de vidro âmbar, fechados hermeticamente e submetidos a tratamento térmico a 90 °C por 5 minutos, seguido de resfriamento a 4 °C até as análises posteriores, conforme metodologia (Da Silva Santos, 2011). Sendo preparado três replicatas de cada suco.

2.3 Extração líquido-líquido dos compostos fenólicos

Para extração dos compostos fenólicos foi utilizada extração líquido-líquido (ELL) no suco de guabiroba, conforme metodologia (Burin et al., 2014) com modificações. Uma alíquota de 5 mL de suco de guabiroba foi misturada com 10 mL de solvente (metanol (X_1), água acidificada com 2 % de ácido acético (X_2) e acetonitrila (X_3)), em proporções variáveis de acordo com o delineamento simplex-centroide (Tabela 1). Foram realizadas 12 extrações, sendo as extrações 4, 5 e 6 combinações binárias, com o uso de apenas dois solventes, as extrações 7 a 12 foram combinações ternárias sendo que delas a 7,8 e 9 foram os pontos axiais com concentrações diferentes dos solventes e as extrações 10,11 e 12 foram os pontos centrais, com proporções iguais de solventes, sendo a triplicata do método. Para essa metodologia, a função resposta avaliada foi a concentração de compostos fenólicos totais (Tabela 1).

A mistura de amostra e solventes foi homogeneizada em mesa agitadora orbital (SL 180/D, SOLAB) por 15 minutos a 150 rpm, após submetida a um banho em cuba de ultrassom (Cuba de Ultrassom, Cristófoli) por 5 minutos a uma frequência de 42 kHz e centrifugada (80-2B, CENTRIBIO) por 10 minutos a 4000 rpm. A fase orgânica sobrenadante foi recolhida e filtrada em filtro de PTFE com poros de 0,2 μm (Hexis Científica, Jundiaí, SP, BR) para posterior análise de conteúdo de polifenóis totais e para caracterização pelo método cromatográfico.

2.4 Determinação dos compostos fenólicos

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado com a finalidade de avaliar a combinação de solventes a ser empregada na etapa de preparo da amostra por extração líquido-líquido. Para tanto, utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu, usando ácido gálico como padrão (Singleton & Rossi, 1965).

As amostras de suco de guabiroba foram caracterizadas quanto ao teor de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), empregando-se metodologia adaptada (Cadahía, Fernández de Simón, Sanz, Poveda, & Colio, 2009). A identificação e quantificação dos compostos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido vanílico, catequina, epicatequina, quercetina) foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido Agilent Technologies (St. Clara, CA, EUA) equipado com um sistema quaternário de bombas (modelo G1311C), pré-coluna e coluna (4,6 mm x 250 mm x 5 µm de tamanho de partícula) em fase reversa C₁₈ da Phenomenex (Torrance, CA, USA), um detector de arranjo de diodos (modelo G1316A) e um amostrador automático (modelo G7167A). O sistema era controlado pelo software Agilent Lab Advisor. A fase móvel consistiu da solução A [água ultra pura: ácido acético (98:2)] e solução B [água: acetonitrila: ácido acético (58:40:2)]. As amostras foram eluídas com gradiente linear de 100 a 50% de A, de 0 a 55 minutos; 50 a 20 % de A, de 55 a 70 minutos; 20 a 100 % de A, de 70 a 85 minutos. A vazão dos solventes foi de 0,9 mL.min⁻¹ e injetou-se um volume de 10 µL de amostra filtrada em filtro de PTFE com poros de 0,2 µm (Hexis Científica, Jundiaí, SP, BR). A temperatura da coluna e pré-coluna foi mantida em 25 °C (Cadahía et al., 2009). Os compostos fenólicos foram identificados através da pureza (espectro no DAD) do pico e tempo de retenção de cada composto e quantificados com o DAD na faixa de comprimento de onda 280 nm (ácido gálico, 4-hidroxibenzoico, catequina, ácido vanílico, ácido siríngico, epicatequina), 320 nm (ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico) e 360 nm (quercetina). A quantificação dos compostos foi realizada por padronização externa, com base na área dos picos cromatográficos.

2.5 Validação do método

O método foi validado para a determinação da concentração de 10 compostos fenólicos utilizando ELL em suco de guabiroba considerando o Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (Thompson, Ellison, & Wood, 2002).

A seletividade do método foi avaliada por comparação do cromatograma dos padrões preparados em solução hidroalcoólica a 50 % e do cromatograma da amostra adicionada de solução dos padrões. O espectro e a pureza de cada pico cromatográfico

foram avaliados por meio do DAD.

A linearidade do método foi analisada através da injeção de nove soluções de concentrações de 0,25 mg.100 mL⁻¹ a 60 mg.100 mL⁻¹ de calibração, em triplicata. Para a curva de calibração, as soluções dos padrões foram submetidas ao método otimizado de extração líquido-líquido. Todas as curvas analíticas foram determinadas separadamente pela plotagem da área do pico (y-axis) em comparação à concentração do padrão (x-axis). As curvas analíticas foram ajustadas por regressão linear de mínimos quadrados e os valores obtidos para coeficiente de correlação indicaram a linearidade do método na faixa de concentração estudada. Para avaliar a significância e o ajuste da curva analítica foi aplicada a análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$).

Os limites de detecção e quantificação (LD e LQ, respectivamente) foram calculados com base na relação entre o desvio padrão do ruído e a inclinação da curva analítica, para cada um dos compostos. O LD foi expresso como três vezes esta relação, enquanto o LQ foi determinado como o menor ponto da curva analítica.

A precisão *intra-day*, foi realizada no mesmo dia, com o mesmo analista, com a concentração mediana da curva de calibração e foi avaliada pelo desvio padrão relativo (DPR, %) calculado a partir de 6 injeções dos padrões cromatográficos sob as mesmas condições analíticas.

A exatidão foi determinada por meio do percentual de recuperação, com adição de solução padrão de cada composto em três diferentes concentrações na matriz de suco de guabiroba. As análises foram realizadas em triplicata, com um total de 9 injeções para cálculo deste parâmetro. O desvio padrão relativo (DPR, %) dos resultados de recuperação também foi determinado.

2.6 Inibição da α -amilase

A atividade inibitória da α -amilase foi realizada conforme descrito por (Worthington, 1993a). Uma alíquota de 500 μ L da amostra, em diferentes diluições (1:15; 1:20; 1:25 e 1:30), foi adicionada a 500 μ L de solução tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH 6,9) com 0,006 M de NaCl contendo 0,5 mg.mL⁻¹ de α -amilase em tubos de ensaio e incubado por 10 minutos a 25 °C. Ao término da incubação, adicionou-se 500 μ L da solução de amido (1% p/v em solução tampão fosfato de sódio) e incubou-se por 10 minutos a 25 °C. Uma alíquota de 1 mL de ácido dinitrosalicílico foi adicionada e a reação foi interrompida com incubação por 10 minutos a 100 °C. Os tubos foram posteriormente

resfriados (4 °C) e seu conteúdo diluído com 15 mL de água destilada, para medida da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, Q898U2M5). O branco da amostra (solução tampão no lugar de solução de enzima) e controle (solução tampão no lugar da amostra) foram analisados em paralelo ao teste da amostra.

O percentual de inibição da α -amilase foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs controle} - (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco da amostra})}{\text{Abs controle}} \times 100 \quad (1)$$

A atividade inibitória da α -amilase foi expressa como IC₅₀, ou seja, a quantidade necessária de suco de guabiroba para inibir 50% da enzima.

2.7 Inibição da α -glicosidase

A atividade inibitória da α -glicosidase foi realizada de acordo com (Worthington, 1993b). Uma alíquota de 500 μ L da amostra, em diferentes diluições (1:10; 1:15; 1:20 e 1:25) foi adicionada a 500 μ L de solução tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,9) e 1 mL de α -glicosidase (1.0 U.mL⁻¹ em solução tampão fosfato de potássio), e incubada por 10 minutos a 25 °C. Após incubação, 500 μ L de solução *p*-NPG preparado no mesmo tampão, foi adicionado. A reação foi mantida por 5 minutos a 25 °C. A absorbância foi mensurada antes e depois dessa incubação, a 405 nm, em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, Q898U2M5). A absorbância foi comparada com o controle, contendo tampão no lugar da amostra.

O percentual de inibição da α -glicosidase foi calculado com a Equação 2.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{AbsC5} - \text{AbsC0}) - (\text{AbsA5} - \text{AbsA0})}{(\text{AbsC5} - \text{AbsC0})} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

AbsC5 = absorbância do controle após 5 minutos de reação;

AbsC0 = absorbância do controle no tempo 0 minutos;

AbsA5 = absorbância da amostra após 5 minutos de reação;

AbsA0 = absorbância da amostra no tempo 0 minutos.

A atividade inibitória da α -glicosidase foi expressa como IC₅₀, ou seja, a quantidade necessária de suco de guabiroba para inibir 50% da enzima.

2.8 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata a partir das replicatas dos sucos. Análise de variância (ANOVA) ($p < 0,05$) foi aplicada aos dados experimentais. Metodologia de superfície de resposta e análise de desejabilidade foram empregadas para análises do delineamento simplex centroide. Teste t -Student foi aplicado para avaliar se as amostras (SB e SP) eram diferentes ao nível de significância de 5 % de probabilidade de erro. O método de correlação linear foi usado para determinar as correlações entre o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antiglicêmica das amostras estudadas e foi expresso como coeficiente de correlação de Pearson (r). O software Statistica versão 10 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) foi utilizado em todas as análises estatísticas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização da extração dos compostos fenólicos

O modelo cúbico especial, não apresentou falta de ajuste significativo e, ao ser ajustado aos dados experimentais significativos ao nível de 5% de significância, apresentou coeficiente de determinação (R^2) de 94,08%. Relativo à extração de compostos fenólicos do suco de guabiroba, os fatores metanol (X_1 ; coeficiente de regressão = 156,05), água acidificada com 2% de ácido acético (X_2 ; coeficiente de regressão = 239,29) e acetonitrila (X_3 ; coeficiente de regressão = 251,70) foram significativos ($p < 0,05$) para a função resposta concentração de polifenóis totais (mg EAG.100 mL⁻¹). A equação matemática para extração de compostos fenólicos de suco de guabiroba pode ser dada como $Compostos\ Fenólicos = X_1. 156,05 + X_2. 239,29 + X_3. 251,70$.

A resposta máxima (polifenóis totais = 255,42 mg GAE.100 mL⁻¹) foi estimada utilizando-se a combinação de solventes água acidificada com 2% de ácido acético e acetonitrila (0,25: 0,75, v:v) (Figura 1). Entretanto, ao empregar a combinação dos mesmos solventes (água acidificada com 2% de ácido acético: acetonitrila, 0,50: 0,50, v:v), a resposta estimada foi de 254,59 mg GAE.100 mL⁻¹ de polifenóis totais. Tendo em vista que os gráficos de desejabilidade (Figura 1b) mostram que ambas as condições podem ser aplicadas para a extração de compostos fenólicos do suco da guabiroba, optou-

se pela condição analítica mais amigável com o meio ambiente, utilizando-se a mistura de água acidificada com ácido acético a 2% e acetonitrila (50:50, v:v) para a extração dos compostos fenólicos. Os coeficientes de interação binária (metanol e água acidificada com 2 % de ácido acético/ metanol e acetonitrila) apresentaram baixos valores para a função resposta de polifenóis totais (Tabela 1). As interações binárias e ternárias com o uso de metanol influenciou negativamente esta resposta, visto que resultou nos valores mais baixos de polifenóis totais, em virtude dos compostos presentes na amostra terem diferentes polaridades.

A extração de compostos fenólicos de diferentes matrizes é influenciada pela polaridade dos solventes extratores e pela solubilidade das partículas no solvente utilizado (Abozed, El-kalyoubi, Abdelrashid, & Salama, 2014). Ao empregar misturas aquosas, o sistema de solventes se torna capaz de extrair compostos fenólicos de ambas as extremidades do intervalo de polaridade, bem como os compostos de polaridade média (Uma, Ho, & Wan Aida, 2010).

3.2 Validação do método cromatográfico

O método de preparo de amostra otimizado por meio de delineamento simplex-centroide, mais os parâmetros de separação, identificação e quantificação adaptados de Cadahía et al. (2009) foram validados e aplicado para determinação da concentração de 10 compostos fenólicos em suco de guabiroba. O desempenho do método com relação à linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão, é mostrado na tabela 2.

A seletividade deste método foi avaliada considerando o formato dos picos, tempo de retenção e pureza cromatográfica do espectro, de modo a detectar possíveis interferentes. Picos interferentes não foram observados no cromatograma da amostra adicionada de solução dos padrões nos tempos de retenção específicos para cada composto analisado e, em todos os casos, a pureza dos picos, comparada com a solução padrão pura, foi maior do que 99%. A linearidade do método foi avaliada por meio dos coeficientes de determinação (R^2), que variaram de 0,9990 para ácido siríngico e ácido 4-hidroxibenzoico até 0,9814 para ácido *p*-cumárico (Tabela 2). Os coeficientes de correlação superiores a 0,99 estão de acordo com a literatura (Mattonai, Parri, Querci, Degano, & Ribechini, 2016). Análise de Variância (ANOVA) demonstrou que a regressão linear foi significativa para as faixas de concentração estudadas ($p < 0,05$) e que

os modelos matemáticos não apresentaram evidência de falta de ajuste ($p < 0,05$).

Os limites de detecção (Tabela 2) dos analitos foram, em todos os casos, inferiores à faixa de concentração comumente encontrada em frutos nativos. Os valores de LD variaram de 0,0001 $\mu\text{g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$ para ácido *p*-cumárico até 6,30 $\mu\text{g}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$ para ácido ferúlico (Tabela 2). Os LQ variaram de 0,02 $\text{mg}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$ para o ácido siríngico, até 1 $\text{mg}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$ para catequina; ácido vanílico; epicatequina; ácido ferúlico e quercetina (Tabela 2). Os valores de LD foram semelhantes aos encontrados na literatura e LQ superiores aos encontrados em análises de sucos (Natividade, Corrêa, Souza, Pereira, & Lima, 2013; Padilha et al., 2017).

Os resultados relativos à precisão intermediária, expressos como desvio padrão relativo (DPR, %), variaram de 1,03 a 9,61 (Tabela 2). Esses dados demonstram-se satisfatórios e em acordo com a literatura (O. R. Pereira, Peres, Silva, Domingues, & Cardoso, 2013; Thompson et al., 2002; Zhang et al., 2019). A exatidão do método foi determinada por meio de ensaios de recuperação, com adição de três diferentes concentrações de padrões dos compostos fenólicos estudados. Os resultados variaram de 57,76 a 103,62, para ácido vanílico e ácido gálico e, os valores de desvio padrão relativo foram de 1,10 a 5,69. Os valores da recuperação estão em consonância com a literatura, pois dependendo da complexidade analítica e da amostra, o valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (Ribani, Grespan Bottoli, Collins, Fontes Jardim, & Costa Melo, 2004). Para os compostos que apresentaram baixa recuperação, como o ácido vanílico (57,76%); ácido siríngico (68,94%) e ácido ferúlico (62,47%), uma explicação é o fato de que a recuperação de compostos fenólicos em alimentos é influenciada pelo tempo de extração, que reflete as ações conflitantes de solubilização e degradação do analito, sendo importante considerar que muitos compostos são facilmente hidrolisados e oxidados (Caprioli, Nzekoue, Giusti, Vittori, & Sagratini, 2018).

3.3 Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

A identificação e quantificação de 10 compostos fenólicos presentes nos sucos da polpa e do bagaço da guabiroba foi realizada pelo método validado, utilizando CLAE-DAD (Figura 2). A Tabela 3 demonstra a concentração média e o desvio padrão dos compostos presentes nas amostras de suco. Dentre os compostos analisados, somente ácido vanílico, epicatequina e ácido ferúlico não apresentaram diferença significativa (p

< 0,05) entre os tipos de suco. Os compostos fenólicos majoritários foram o ácido vanílico, a epicatequina e a catequina, para ambos os sucos (Tabela 3).

Alguns compostos fenólicos, estiveram presentes em concentrações mais elevadas no suco do bagaço quando comparado com o suco da polpa (Tabela 3). Como por exemplo, o ácido gálico que esteve presente em concentrações de um terço a mais no suco do bagaço do que o suco da polpa e a catequina que esteve presente aproximadamente 2 vezes a mais no SB (Tabela 3). Isso está associado a maior síntese de compostos fenólicos nas plantas, em parte como resposta a pressões ecológicas e fisiológicas, como ataque de patógenos e insetos, radiação UV e ferimentos (Khoddami et al., 2013). Quando as plantas são submetidas a situações de estresse, como ataque de patógenos ou limitações nutricionais, ativam rotas de síntese dos metabólitos secundários resultando na produção desses compostos fenólicos. Ainda, dependendo das condições ambientais, podem favorecer essas situações de estresse, o que possivelmente justifica um acúmulo maior desses compostos nas partes externas dos frutos de gabirobeira, como o bagaço (Alves, Alves, Fernandes, NAVES, & NAVES, 2013).

Um estudo com suco de amora, apresentou concentração de ácido gálico (0,558 mg.100 mL⁻¹) aproximadamente 4 vezes inferior ao encontrado nos sucos de guabiroba; aproximadamente 127 vezes menos de ácido vanílico (0,43 mg.100 mL⁻¹); aproximadamente 1 vez menor para a catequina (10,934 mg.100 mL⁻¹) e 80 vezes menor para o ácido *p*-cumárico (0,014 mg.100 mL⁻¹) (Kwaw et al., 2018). O mesmo foi percebido em comparação com estudos sobre sucos de uvas da variedade BRS violeta que apresentou aproximadamente 6 vezes menos concentração de ácido gálico (0,402 mg.100 mL⁻¹) do que os sucos da guabiroba; em torno de 32 vezes menor teor de catequina (0,397 mg.100 mL⁻¹) e quase 43 vezes menos concentração de epicatequina (0,937 mg.100 mL⁻¹). A variedade *Vitis labrusca* apresentou cerca de 1 vez menor teor de ácido gálico (1,796 mg.100 mL⁻¹) e aproximadamente 3 vezes quantidade inferior de catequina (3,371 mg.100 mL⁻¹) (Dutra, Rodrigues, de Oliveira, Pereira, & Lima, 2018; Granato, Koot, Schnitzler, & van Ruth, 2015).

Esses valores denotam o potencial de aplicação deste fruto nativo na elaboração de suco, visto que apresentou teores de compostos fenólicos superiores a outros frutos já utilizados na elaboração de bebidas. Além disso, a presença desses compostos auxilia na inibição de enzimas associadas ao metabolismo de carboidratos pós-prandial.

3.4 Atividade antiglicêmica

Em relação aos valores de IC₅₀ (Figura 3), são necessários aproximadamente duas vezes menos suco de bagaço para inibir a mesma quantia de α -amilase quando comparado com o suco da polpa. Já para a inibição da enzima α -glicosidase, é preciso cerca de 1 vez menos suco de polpa do que o suco do bagaço.

Outros estudos que avaliaram a capacidade inibitória das enzimas α -glicosidase e α -amilase em frutos, previamente liofilizaram e/ ou utilizaram o método de *spray drying*, obtiveram a IC₅₀, com valores de 1129 a 7782 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para α -amilase e 5,13 a 10,83 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para α -glicosidase de pó camu-camu (*Myrciaria dúbia* Mc. Vaugh), respectivamente (Fujita et al., 2015). Já para o pó de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) obtida com liofilização e *spray drying*, encontrou-se valores de 20 a 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para α -amilase e 20 a 160 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para α -glicosidase (Daniel Daza et al., 2017).

Estudo com o extrato aquoso de red rooibos (*Aspalathus linearis*) demonstrou a IC₅₀ sendo alcançada quando o extrato liofilizado apresentava 5 a 6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a α -amilase e 0,5 a 0,6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para a α -glicosidase. Os compostos fenólicos responsáveis pela inibição da α -amilase e α -glicosidase foram isoquercitrina, luteolina, ácido salicílico e siringaldeído (Santos et al., 2016).

Correlação positiva significativa ($p < 0,05$) foi observada entre a concentração de quercetina (0,99), ácido vanílico (0,97), ácido cafeico (0,97) e epicatequina (0,97) e inibição da α -amilase. Para inibição da α -glicosidase, correlação positiva significativa ($p < 0,05$) foi observada para os compostos ácido vanílico (0,99), epicatequina (0,99), quercetina (0,98) e ácido ferúlico (0,97). As amostras apresentaram alta correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade de inibir α -amilase e α -glicosidase, enzimas que estão envolvidas no metabolismo dos carboidratos (Daniel Daza et al., 2017). Sendo assim, essa correlação positiva significativa indica que quanto maior a concentrações desses compostos fenólicos, maior a inibição dessas enzimas.

Extratos metanólicos das folhas de *Elaeagnus angustifolia* obtiveram inibição da atividade de α -amilase e α -glicosidase sendo atribuídos à presença de ácido vanílico e ácido 4-hidroxibenzoico, tendo correlação com a utilização tradicional no manejo da diabetes *mellitus* (Saltan, Okutucu, Canbay, & Ozel, 2017).

A correlação entre os compostos fenólicos existentes no suco do bagaço e da polpa de guabiroba, com a inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase, é importante, porque essa fruta nativa pode vir a ser aplicada como um agente anti-hiperglicêmico que seja

seguro e não tenha efeitos colaterais negativos para pessoas com diabetes, ou até mesmo, pode-se utilizar os compostos fenólicos presentes no suco para co-aplicação com inibidores enzimáticos sintéticos reduzindo a dose para controle de glicemia. Mas, vale ressaltar que são necessários estudos em humanos bem controlados e a longo prazo para determinar sua eficácia, dose ideal e segura como aplicação de inibidor e a funcionalidade dos ingredientes fenólicos na presença de outros componentes da dieta (Ali Asgar, 2013; Mccue, Kwon, & Shetty, 2005).

4 CONCLUSÕES

A elaboração do suco a partir do bagaço de guabiroba, foi possível devido a utilização de enzimas pectolíticas, conseguindo-se assim, extrair o suco dessa fração da fruta.

Uma metodologia para a determinação simultânea de 10 compostos fenólicos em suco de guabiroba por CLAE-DAD foi otimizada e validada nesse estudo. O método proposto oferece as seguintes vantagens: o preparo de amostra é realizado por extração líquido-líquido com uso de 50% de água acidificada com 2% de ácido acético combinada a acetonitrila, minimizando o uso de solventes orgânicos; o método mostrou excelente precisão, baixos limites de detecção e quantificação e valores de recuperação satisfatórios em se tratando da complexidade da amostra

Aplicando o método otimizado e validado a amostras de suco de guabiroba, verificou-se que os maiores níveis de compostos fenólicos foram encontrados no suco do bagaço quando comparado ao suco da polpa, o que demonstra a possibilidade de aplicação do resíduo agroindustrial na fabricação de sucos. De forma geral, o suco de guabiroba destacou-se quanto à concentração de ácido gálico, ácido vanílico, catequina, ácido *p*-cumárico e epicatequina. Este estudo destacou, ainda, a correlação existente entre a concentração dos compostos fenólicos (quercetina, ácido vanílico, ácido cafeico, epicatequina e ácido ferúlico) em suco de guabiroba e a capacidade de inibição das enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, além de que a inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase aconteceu em baixas concentrações de suco. Essa informação expande o conhecimento para pesquisas futuras a fim de se verificar doses seguras de consumo do suco de guabiroba na alimentação de pessoas com diabetes tipo 2 e possivelmente auxiliar na hiperglicemia pós-prandial. Desta forma, é perceptível que a industrialização dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg é um atrativo, visto que

o suco apresentou teores consideráveis de compostos fenólicos, com potencial para proteger indivíduos com DM2.

5 REFERÊNCIAS

- Abozed, S. S., El-kalyoubi, M., Abdelrashid, A., & Salama, M. F. (2014). Total phenolic contents and antioxidant activities of various solvent extracts from whole wheat and bran. *Annals of Agricultural Sciences*, 59(1), 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2014.06.009>
- Ali Asgar, M. (2013). Anti-diabetic potential of phenolic compounds: A review. *International Journal of Food Properties*, 16(1), 91–103. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.595864>
- Alves, A. M., Alves, M. S. O., Fernandes, T. de O., NAVES, R. V., & NAVES, M. M. V. (2013). Caracterização física e química, fenólicos totais e atividade antioxidante da polpa e resíduo de gabioba. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35, 837–844.
- Arcari, S. G., Burin, V. M., Costa, L. L. F., Ogliari, P. J., & Bordignon-Luiz, M. T. (2012). Optimization of solid-phase extraction of non-coloured phenolic compounds from fortified wines using response surface methodology. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, 8, 345–351.
- Biavatti, M. W., Farias, C., Curtius, F., Brasil, L. M., Hort, S., Schuster, L., ... Prado, S. R. T. (2004). Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: Weight control and biochemical parameters. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2–3), 385–389. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.04.015>
- Burin, V. M., Ferreira-Lima, N. E., Panceri, C. P., & Bordignon-Luiz, M. T. (2014). Bioactive compounds and antioxidant activity of *Vitis vinifera* and *Vitis labrusca* grapes: Evaluation of different extraction methods. *Microchemical Journal*, 114, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.12.014>
- Cadahía, E., Fernández de Simón, B., Sanz, M., Poveda, P., & Colio, J. (2009). Chemical and chromatic characteristics of Tempranillo, Cabernet Sauvignon and Merlot wines from DO Navarra aged in Spanish and French oak barrels. *Food Chemistry*, 115(2), 639–649. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.076>
- Caprioli, G., Nzekoue, F. K., Giusti, F., Vittori, S., & Sagratini, G. (2018). Optimization of an extraction method for the simultaneous quantification of sixteen polyphenols in thirty-one pulse samples by using HPLC-MS/MS dynamic-MRM triple quadrupole. *Food Chemistry*, 266(June), 490–497. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.049>
- Da Silva Santos, M. (2011). *IMPACTO DO PROCESSAMENTO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, REOLÓGICAS E FUNCIONAIS DE FRUTOS DA FÍSICO-QUÍMICAS, REOLÓGICAS E FUNCIONAIS DE FRUTOS DA GABIROBEIRA (Campomanesia xanthocarpa Berg)*. Universidade Federal do Paraná.
- Da Silva Santos, M., Carneiro, P. I. B., Wosiacki, G., De Oliveira Petkowicz, C. L., & Carneiro, E. B. B. (2009). Caracterização físico-química, extração e análise de pectinas de frutos de *Campomanesia Xanthocarpa* B. (Gabioba). *Semina: Ciências Agrárias*, 30(1), 101–106. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2009v30n1p101>
- Daniel Daza, L., Fujita, A., Granato, D., Silvia Fávaro-Trindade, C., & Inés Genovese, M. (2017). Functional properties of encapsulated Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extract. *Food Bioscience*, 18(June 2016), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.03.003>
- Dutra, M. da C. P., Rodrigues, L. L., de Oliveira, D., Pereira, G. E., & Lima, M. dos S. (2018). Integrated analyses of phenolic compounds and minerals of Brazilian

- organic and conventional grape juices and wines: Validation of a method for determination of Cu, Fe and Mn. *Food Chemistry*, 269(July), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.014>
- Filha, M. do C. de S. C., Araújo, S. C. De, Silva, G. M. de S., & Canuto, M. F. C. S. (2016). Cinética de secagem do resíduo da goiaba (*Psidium guajava* L.) em camada fina. *Revista Verde de Agroecologia E Desenvolvimento Sustentável*, 11, 99–104. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18378/rvads.v11i4.4546>
- Fujita, A., Sarkar, D., Genovese, M. I., & Shetty, K. (2017). Improving anti-hyperglycemic and anti-hypertensive properties of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) using lactic acid bacterial fermentation. *Process Biochemistry*, 59(May), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.05.017>
- Fujita, A., Sarkar, D., Wu, S., Kennelly, E., Shetty, K., & Genovese, M. I. (2015). Evaluation of phenolic-linked bioactives of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) for antihyperglycemia, antihypertension, antimicrobial properties and cellular rejuvenation. *Food Research International*, 77, 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.009>
- Granato, D., Koot, A., Schnitzler, E., & van Ruth, S. M. (2015). Authentication of geographical origin and crop system of grape juices by phenolic compounds and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of Food Science*, 80(3), C584–C593. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12794>
- Handa, C. L., De Lima, F. S., Guelfi, M. F. G., Georgetti, S. R., & Ida, E. I. (2016). Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. *Food Chemistry*, 197, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.124>
- Hanhineva, K., Törrönen, R., Bondia-Pons, I., Pekkinen, J., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., & Poutanen, K. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1365–1402. <https://doi.org/10.3390/ijms11041365>
- Khoddami, A., Wilkes, M. A., & Roberts, T. H. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18(2), 2328–2375. <https://doi.org/10.3390/molecules18022328>
- Klafke, J. Z., da Silva, M. A., Panigas, T. F., Belli, K. C., de Oliveira, M. F., Barichello, M. M., ... Viçeli, P. R. N. (2010). Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(2), 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.11.004>
- Kwaw, E., Ma, Y., Tchabo, W., Apaliya, M. T., Wu, M., Sackey, A. S., ... Tahir, H. E. (2018). Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *Food Chemistry*, 250(January), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.009>
- Mattonai, M., Parri, E., Querci, D., Degano, I., & Ribechini, E. (2016). Development and validation of an HPLC-DAD and HPLC/ESI-MS2 method for the determination of polyphenols in monofloral honeys from Tuscany (Italy). *Microchemical Journal*, 126, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.12.013>
- Mccue, P., Kwon, Y. I., & Shetty, K. (2005). Anti-amylase, anti-glucosidase and anti-angiotensin I-converting enzyme potential of selected foods. *Journal of Food Biochemistry*, 29(3), 278–294. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2005.00020.x>
- Natividade, M. M. P., Corrêa, L. C., Souza, S. V. C. de, Pereira, G. E., & Lima, L. C. de O. (2013). Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for

- HPLC: Method validation and characterization of São Francisco Valley samples. *Microchemical Journal*, 110, 665–674.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.08.010>
- Oliveira, A. L., Lopes, R. B., Cabral, F. A., & Eberlin, M. N. (2006). Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). *Food Chemistry*, 99(1), 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.012>
- Padilha, C. V. da S., Miskinis, G. A., de Souza, M. E. A. O., Pereira, G. E., de Oliveira, D., Bordignon-Luiz, M. T., & Lima, M. dos S. (2017). Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chemistry*, 228, 106–115.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.137>
- Pereira, M. C., Steffens, R. S., Jablonski, A., Hertz, P. F., De O. Rios, A., Vizzotto, M., & Flôres, S. H. (2012). Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3061–3067. <https://doi.org/10.1021/jf205263f>
- Pereira, O. R., Peres, A. M., Silva, A. M. S., Domingues, M. R. M., & Cardoso, S. M. (2013). Simultaneous characterization and quantification of phenolic compounds in *Thymus x citriodorus* using a validated HPLC-UV and ESI-MS combined method. *Food Research International*, 54(2), 1773–1780.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.016>
- Ribani, M., Grespan Bottoli, C. B., Collins, C. H., Fontes Jardim, I. C. S., & Costa Melo, L. F. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27(5), 771–780. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- Saltan, F. Z., Okutucu, B., Canbay, H. S., & Ozel, D. (2017). In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects in *Elaeagnus angustifolia* leaves extracts. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 12(2), 117–126.
<https://doi.org/10.12973/ejac.2017.00158a>
- Santos, J. S., Deolindo, C. T. P., Esmerino, L. A., Genovese, M. I., Fujita, A., Marques, M. B., ... Granato, D. (2016). Effects of time and extraction temperature on phenolic composition and functional properties of red rooibos (*Aspalathus linearis*). *Food Research International*, 89, 476–487.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.041>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158. <https://doi.org/10.12691/ijebb-2-1-5>
- Thompson, M., Ellison, S. L. R., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5). <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>
- Uma, D. B., Ho, C. W., & Wan Aida, W. M. (2010). Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malaysiana*, 39(1), 119–128.
- Vinagre, A. S., Rönnau, Â. D. S. R. O., Pereira, S. F., Da Silveira, L. U., Wiilland, E. D. F., & Suyenaga, E. S. (2010). Anti-diabetic effects of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg) leaf decoction. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(2), 167–177. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502010000200002>
- Worthington, V. (1993a). Worthington Enzyme Manual: alpha amylase. Retrieved October 19, 2018, from <http://www.worthington-biochem.com/AA/default.html>
- Worthington, V. (1993b). Worthington Enzyme Manual: Maltase-a-glucosidase.

Retrieved October 19, 2018, from <http://www.worthington-biochem.com/MALT/default.html>

Zhang, L., Li, Y., Liang, Y., Liang, K., Zhang, F., Xu, T., ... Lu, B. (2019). Determination of phenolic acid profiles by HPLC-MS in vegetables commonly consumed in China. *Food Chemistry*, 276(October 2018), 538–546. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.074>

6 FIGURE CAPTIONS

Figura 1. Superfície de resposta (a) para extração de polifenóis totais de suco de guabiroba como função do uso dos solventes metanol (X_1), água acidificada com 2% de ácido acético (X_2) e acetonitrila (X_3) e, valores preditos e desejabilidade (b) como função dos solventes empregados para extração de polifenóis totais de suco de guabiroba.

Figura 2. Cromatogramas nos comprimentos de onda 280 nm (A), 320 nm (B) e 360 nm (C). Compostos fenólicos: 1 (ácido gálico), 2 (4-hidroxibenzoico), 3 (catequina), 4 (ácido vanílico), 5 (ácido sirínico), 6 (epicatequina), 7 (ácido cafeico), 8 (ácido *p*-cumárico), 9 (ácido ferúlico) e 10 (quercetina).

Figura 3. Atividade inibitória da α -amilase e α -glicosidase no suco de guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) proveniente do bagaço e da polpa.

Figura 1. Superfície de resposta (a) para extração de polifenóis totais de suco de guabiroba como função do uso dos solventes metanol (X_1), água acidificada com 2% de ácido acético (X_2) e acetonitrila (X_3) e, valores preditos e deseabilidade (b) como função dos solventes empregados para extração de polifenóis totais de suco de guabiroba.

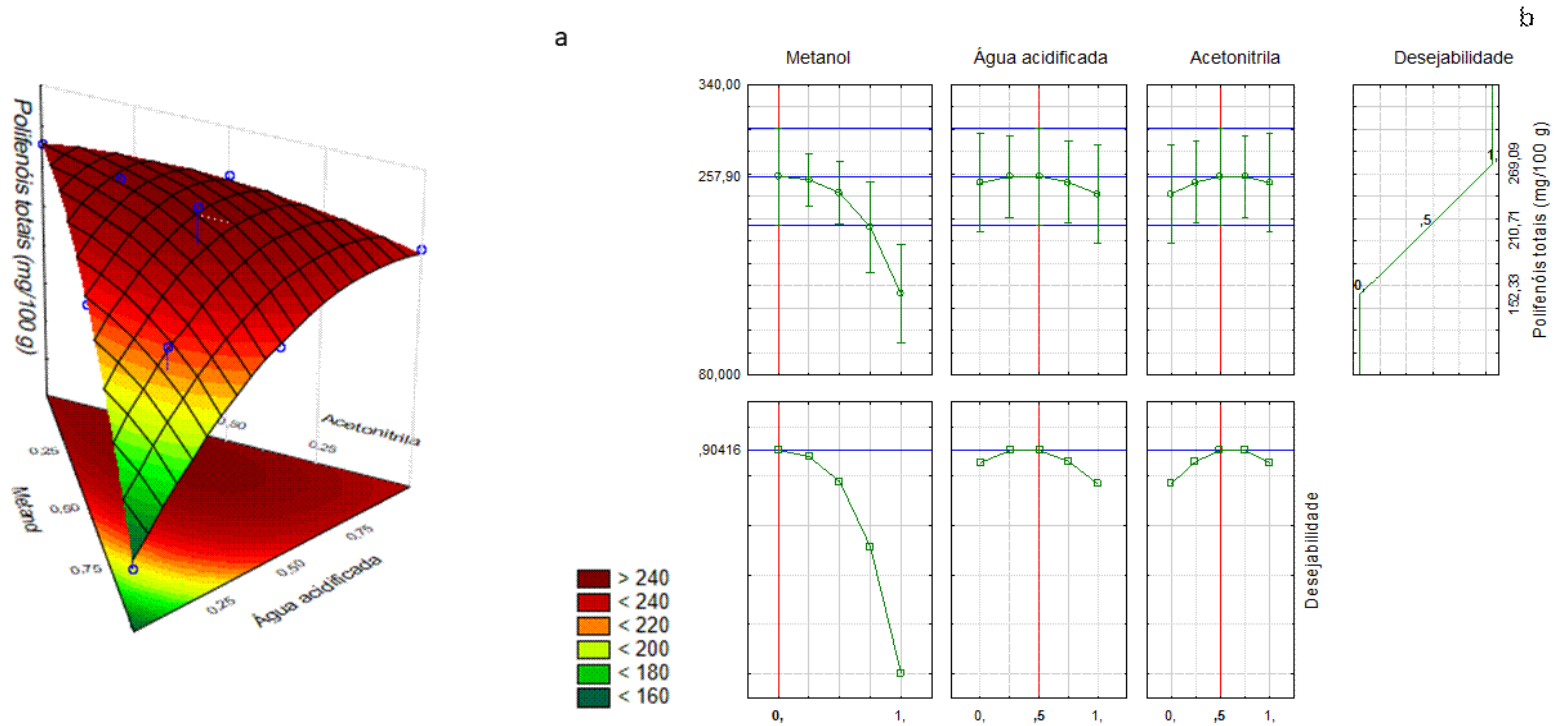


Figura 2. Cromatogramas nos comprimentos de onda 280 nm (A), 320 nm (B) e 360 nm (C). Compostos fenólicos: 1 (ácido gálico), 2 (4-hidroxibenzoico), 3 (catequina), 4 (ácido vanílico), 5 (ácido siríngico), 6 (epicatequina), 7 (ácido cafeico), 8 (ácido *p*-cumárico), 9 (ácido ferúlico) e 10 (quercetina).

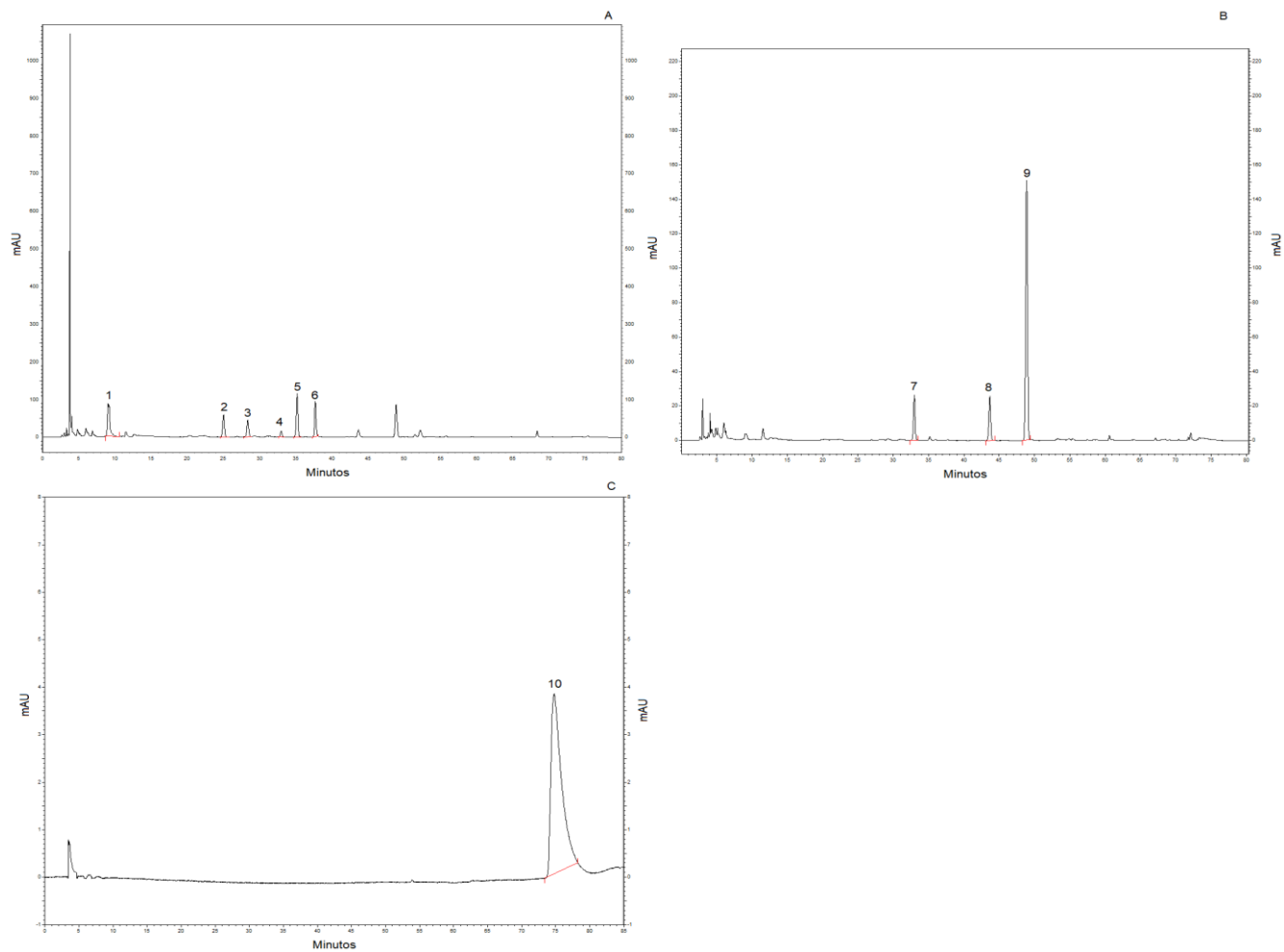


Figura 3. Atividade inibitória da α -amilase e α -glicosidase no suco de guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) proveniente do bagaço e da polpa.

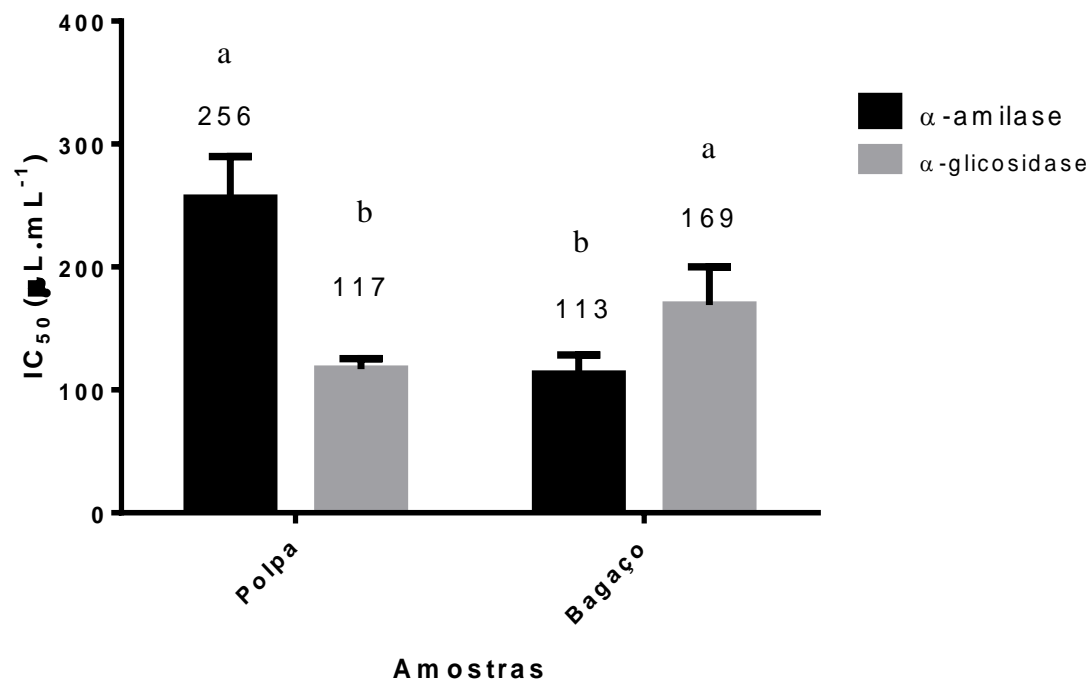


Tabela 1. Matriz do delineamento simplex-centroide para extração de compostos fenólicos totais de suco de guabiroba.

Extração	Metanol (X₁)	Água acidificada 2 % ácido acético (X₂)	Acetonitrila (X₃)	Polifenóis totais (mg EAG.100 mL⁻¹)
1	1	0	0	152,33
2	0	1	0	241,56
3	0	0	1	251,61
4	0,5	0,5	0	226,58
5	0,5	0	0,5	224,32
6	0	0,5	0,5	256,81
7	0,66	0,17	0,17	229,68
8	0,17	0,66	0,17	246,80
9	0,17	0,17	0,66	258,17
10	0,33	0,33	0,33	243,80
11	0,33	0,33	0,33	238,84
12	0,33	0,33	0,33	269,10

EAG – equivalente em ácido gálico

Tabela 2. Faixa de concentração linear, coeficiente de determinação da curva analítica, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão intermediária, exatidão e desvio padrão relativo dos dados de exatidão para método proposto para determinação de compostos fenólicos em suco de guabiroba.

Composto	Faixa de concentração (mg.100 mL ⁻¹)	Coeficiente de determinação (R ²)	LD (µg.100 mL ⁻¹)	LQ (mg.100 mL ⁻¹)	Precisão intermediária (DPR, %)	Recuperação (%)	DPR (%)
Ácido gálico	0,25- 30	0,9983	0,18	0,25	4,20	103,62	4,20
Ácido 4-hidroxibenzoico	0,25-30	0,9990	0,68	0,19	1,47	70,48	1,42
Catequina	1- 50	0,9986	4,34	1,00	3,30	79,58	5,69
Ácido vanílico	1-50	0,9942	1,04	1,00	9,61	57,76	4,30
Ácido cafeico	0,25-30	0,9971	0,002	0,20	1,03	91,26	1,10
Ácido sirínico	0,25-30	0,9990	0,01	0,02	3,22	68,94	1,56
Epicatequina	1-50	0,9916	2,99	1,00	2,30	94,29	4,73
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,25-30	0,9814	0,0001	0,25	4,52	89,21	2,69
Ácido ferúlico	1-30	0,9963	6,30	0,64	1,12	62,47	2,46
Quercetina	1-5	0,9912	0,0004	1,00	3,70	75,65	2,94

Tabela 3. Concentrações médias dos compostos fenólicos nos sucos de guabiroba.

Compostos (mg.100 mL⁻¹)	Suco do Bagaço (SB)	Suco da Polpa (SP)
*Ácido Gálico	2,82 ± 0,046	2,10 ± 0,084
*Ácido 4-hidroxibenzoico	0,25 ± 0,001	0,19 ± 0,004
*Catequina	18,63 ± 2,191	7,18 ± 0,538
Ácido Vanílico	52,71 ± 4,502	55,96 ± 0,414
*Ácido Cafeico	0,25 ± 0,001	0,20 ± 0,001
*Ácido Siríngico	0,06 ± 0,004	0,02 ± 0,004
Epicatequina	37,97 ± 4,354	42,47 ± 1,600
*Ácido <i>p</i> -cumárico	1,14 ± 0,002	1,11 ± 0,003
Ácido Ferúlico	0,64 ± 0,024	0,69 ± 0,060
*Quercetina	1,32 ± 0,010	1,38 ± 0,003

*Compostos com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na mesma linha, de acordo com ANOVA e teste *t*-Student.

Anexo 1- Normas da Revista “Food Chemistry” para qual o artigo será submetido

GUIDE FOR AUTHORS

Guide for Authors updated September 2017

INTRODUCTION

The Aims and Scope of Food Chemistry are assessed and modified on an annual basis to reflect developments in the field. This means that research topics which may have been deemed in scope in previous years may now fall outside of the scope of the journal as our scientific and technical understanding of the field evolves and topics become less novel, original or relevant to Food Chemistry.

Types of paper

1. Research papers - original full-length research papers that have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words from introduction to conclusion (not including references) (including no more than six tables and figures combined - additional tables and figures can be submitted as supplementary material). Research papers should not contain more than 40 references.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Article structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (*Introduction, Material and Methods, Results, Conclusion*), Acknowledgements, Appendix, References, Figure Captions. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard

or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 150 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core (most important) findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site. Do not use abbreviations in the highlights and ensure that highlights can be understood independent of the manuscript.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used. Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.); % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or might not be understood easily by an international readership, units should be spelled out in full. Statistics, appropriate application of statistical analysis should be applied throughout the article.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in

them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. See Types of Paper for reference number limits. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept.,

P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article.

Journal of Scientific Communications, 163, 51–59.

<https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>. Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article.

Heliyon, 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.