



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**ESTRATÉGIA PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE
ESTÉVIA MINIMAMENTE PROCESSADO E SUA
APLICAÇÃO NA FORMULAÇÃO DE IOGURTE**

Ana Carolina Petrangeli da Costa

Maringá
2022

Ana Carolina Petrangeli da Costa

**ESTRATÉGIA PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE
ESTÉVIA MINIMAMENTE PROCESSADO E SUA
APLICAÇÃO NA FORMULAÇÃO DE IOGURTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências de Alimentos.

Maringá

2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

C837e

Costa, Ana Carolina Petrangeli da

Estratégia para obtenção de extrato de estévia minimamente processado e sua aplicação na formulação de iogurte / Ana Carolina Petrangeli da Costa. -- Maringá, PR, 2022.

45 f.tabs.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Claudio da Costa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2022.

1. Stevia rebaudiana (Bert) Bertoni . 2. Extrato de Stevia Rebaudiana Bertoni - Iogurte. I. Costa, Silvio Claudio da, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDD 23.ed. 664.11

ANA CAROLINA PETRANGELI DA COSTA

**“ESTRATÉGIA PARA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE ESTÉVIA
MINIMAMENTE PROCESSADO E SUA APLICAÇÃO NA FORMULAÇÃO DE
IOGURTE”.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. Antonio Roberto Giriboni
Monteiro

Prof. Dr. Carlos Eduardo Barão

Prof. Dr. Silvio Claudio da Costa
Orientador

Maringá – 2022

Orientador
Silvio Claudio da Costa

BIOGRAFIA

Ana Carolina Petrangeli da Costa, nascida no interior de São Paulo, na cidade de Araçatuba-São Paulo, em 03 de setembro de 1992, possui graduação em Engenharia de Alimentos pela Universidade Estadual de Maringá (UEM), campus de Umuarama, finalizado em 2017. Durante o período de graduação participou de atividades como organização de eventos como semanas acadêmicas, palestras e workshops, referente à temas envolvendo a área de alimentos. Por dois anos integrou o Programa de Integração Estudantil (PROINTE), ministrando aulas sobre conteúdos das disciplinas de Física e Cálculo I, para alunos do Centro de Tecnologia (CTC), campus Umuarama, sendo bolsista da Fundação Araucária. Durante o período da graduação despertou-se o interesse sobre fabricação de bebidas, onde centralizou a realização de cursos na área e também o estágio obrigatório, realizado na empresa Latco Beverages, no setor de fabricação de sucos, carbonatados e bebidas proteicas. Em 2019 finalizou o curso de especialização (lato sensu) em Gestão da Segurança de Alimentos, pelo Centro universitário SENAC de São Paulo. Ainda no mesmo ano, atuou como assistente administrativa em uma empresa de nutraceuticos e encapsulados (Semprebom), na cidade de Maringá-PR, mais tarde, desligou-se para dedicar-se aos estudos, ingressando em disciplinas como aluna não regular do programa de pós graduação em Ciências de Alimentos da UEM, onde efetuou matrícula em início de 2020, pleiteando uma bolsa de pós-graduação pela agência de fomento da CAPES, sendo orientada pelo professor Dr. Silvio Claudio da Costa, que coordena o NEPRON (Núcleo de Estudos em Produtos Naturais), que têm como objeto de estudo central a planta Stevia Rebaudiana Bertoni e métodos de extração dos glicosídeos de esteviol. No decorrer dos anos de 2020 a 2022 pode adquirir grande conhecimento sobre temas que circundam a extração dos adoçantes naturais originários da Stevia, junto ao grupo NEPRON, e seus pesquisadores, como a Profa Dra. Paula Gimenez Milani e também o técnico Sérgio Dacome. Em 2021 paralelo ao mestrado atuou também como técnica, sendo representante de serviços da empresa ECOLAB, dentro do grupo Coca-Cola-FEMSA, onde suporta todas as atividades em relação ao gerenciamento dos químicos utilizados nos processos de lubrificação das esteiras transportadoras e também de sanitização, sendo este último tema, uma área de grande interesse, afinidade e desejo de desenvolvimento e aperfeiçoamento profissional contínuo.

Dedico
Aos meus pais, Cleonice e Vanderlei.
À minha irmã Ana Beatriz.

AGRADECIMENTOS

Para a concretização destes estudos, muitas pessoas me ajudaram. Primeiramente, Meu amado Deus, sou muito grata por este presente maravilhoso que é a vida! Agradeço também pelas pessoas que o Senhor colocou em meu caminho, para isto. Algumas delas me inspiram, me ajudam, me desafiam e me encorajam a ser cada dia melhor. Cada uma delas, ao seu modo, me fizeram chegar onde eu cheguei. Que as minhas preces e a minha gratidão cheguem ao Senhor.

Aos meus pais, que sempre fizeram do caminho dos estudos o primeiro a ser enxergado, por todo suporte financeiro dado nestes anos, pelo apoio às minhas decisões, e pelas experiências que a mim foram ofertadas, por meio de vossos esforços. Isto, é por vocês e para vocês. Que eu consiga retribuir tudo o que vocês fizeram e fazem ainda por mim.

À minha irmã, que durante todo esse tempo esteve junto em casa, me apoiando em palavras, em paciência e cuidados, juntamente com as nossas duas gatinhas Luz e Marrie, que sempre têm nos apoiando em momentos de estudos com suas presenças.

Ao meu namorado, que mesmo de longe muitas vezes, sempre esteve ao meu lado, mostrando o quanto sou capaz, me acalmando e me dando força para continuar.

Ao meu orientador, Professor Dr. Silvio Claudio, meu muito obrigada por toda sua paciência em me orientar, por sua educação, por sua compreensão diante de minha situação, tendo que trabalhar em paralelo ao mestrado, obrigada por ter ido até o fim deste desafio por mim. Serei eternamente grata.

À Professora Dra Paula Gimenez Milani, pelo apoio e por acreditar em mim e em minha pesquisa, me confortando em meio à ansiedade que muitas vezes aparecia e me fazia duvidar de minha capacidade. Obrigada Professora.

Ao técnico Sérgio Dacome, obrigada por todos os ensinamentos aqui compartilhados, por sua paciência e zelo ao nos ensinar, sempre fazendo tudo com muito cuidado. À uma grande amiga que puder fazer durante esta jornada, obrigada por tudo Maria Rosa, por me ensinar além das técnicas, que a ciência não se faz sozinha e que o apoio na jornada é essencial para torná-la menos árdua. Torço por ti e sei que chegarás longe. Obrigada Simone e Cler, gostaria de ter tido mais contato com ambas, mas infelizmente a pandemia restringiu essa parte de nossas vidas. Obrigada Lorena, Betanea, Letícia, Natani, por todas as vezes que puderam me ajudar, isto aqui, foi construído por vocês também.

À minha amiga Maria Eliana, uma amizade que ganhei de presente da faculdade e e que vou levar por toda a vida. Obrigada pelo apoio durante todo o processo, me apoiando desde minha entrada, me incentivando.

À todos, meu muito obrigada por acreditarem que eu era capaz.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada na forma de um artigo científico. O artigo foi submetido na revista Journal of Food Processing and Preservation, em 21 de Julho de 2022, com Qualis B1 para área de Ciências de Alimentos, com fator de impacto 2,19 (ano de 2022).

1 Ana Carolina P. da Costa, Maria Rosa T. Zorzenon, Antonio S. Dacome, Paula G. Milani, Jorge E. Pilau, Silvio C. Costa. Estratégia para obtenção de extrato de estévia minimamente processado e sua aplicação na formulação de iogurte. **Revista Journal of Food Processing and Preservation.**

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION

Excessive intake of foods rich in sugars can end up causing harm to health over time, triggering the development of chronic diseases such as diabetes and obesity. With the pandemic of thousands of lives, a living society of people alive and close to life habits are important and important and like the loss in the patient framework. With this to more natural foods, with the appeal of functional foods and then increased by increasing the space in search of various with, with stevia sweeteners. Foods such as yogurt, however, are consumed by a range and make up a food with good nutritional value, with probiotic benefits, often full of sugar. The natural ingredients of *Stevia rebaudiana* origin are known to be sweeter in the conventional way, being able to be added 300 sugar which sugar can be a great sweetener option. Several studies have suggested health benefits for those who choose to consume, such as antimicrobial, antihyperglycemic, immunomodulatory, antitumor, antioxidant effects. The plant, in addition to containing the main contents of interest, is a complex plant matrix, with elements, especially the matrix composed of phenolics, tannins, minerals, proteins, polysaccharides, organic compounds and pigments such as chlorophyll. For the extraction of sweeteners, the vast majority of methods employ hot water or organic solvents. Among the more conventional techniques are maceration, soxhlet, infusion, enzyme-assisted aqueous extraction, percolation, and reflux. Several of them require high volumes of solvents, so additional steps are necessary for solvent recovery, resulting in costs, in addition to other toxic benefits to us humans. These obstacles can be used in the unmanipulated techniques to be taken, such as through a pulsed electric field, sent by microwaves, by high voltage discharges and obtained with pressurization (liquid fluid subcritical and supercritical), green as a water, increasing all the resources of cost of implantation, being able to use studies close to its financial viability. The very perceptible residual bitterness of stevia sweeteners ends up being a limiting factor to spread and broaden its use, given its numerous benefits, so the objective of this work was to explore the technique of cold extraction, using water as a solvent. green, at a very low temperature (2-3°C), in order to minimize the extraction of high molecular weight compounds such as some diterpenes, including sterebins, which give evident bitterness to the extract, making use of the pre-ethanolic treatment of the leaves developed by NEPRON, which removes phenolics with an undesirable bitter taste as well, in order to obtain extracts with a more pleasant sensory profile and with the least possible aftertaste, in order to apply them as a potential source of natural sweeteners in a natural yogurt, in order to sensorially evaluate the acceptability of this fermented food.

AIMS

The objective of this study was to obtain different minimally processed stevia extracts (ESPM), with a more pleasant sensory profile and low residual bitterness, from the cold extraction by column percolation, using untreated leaves and pre-treated with ethanol according to, as well as carrying out the glycosidic characterization of the leaves and the aqueous and powdered

extracts, determining the extraction yield of each of them, quantifying the bioactive compounds, antioxidant potential, and applying them as an alternative to natural sweeteners, to sweeten a natural yogurt, in order to sensorially evaluate the acceptability of this fermented beverage sweetened with the crude extracts.

MATERIAL AND METHODS

The stevia leaves were harvested and then dried in ovens with air circulation, then they were separated from the stems, one part being ground in knife mills and the other stored the whole leaves. Aqueous extract was prepared for quantification of leaf glycosides untreated and with pretreatment. Quantitation analyzes were performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). For the pre-treatment of the ground leaves, they were eluted with absolute ethanol by column percolation, at room temperature, in a total of 14 fractions collected. For the cold extraction of leaves, the leaves (whole and ground) were packed in a glass column, in which an ice bath was implanted to cool the column coupled to a silicone hose that covered the entire length of the column externally and were collections 6 fractions of 100 mL. Subsequently, this extract was spray-dried to obtain the powdered extract. The total content of rebaudioside-A and C glycosidic composition, as well as stevioside, were quantified in the aqueous and powdered extracts by HPLC. The quantification of phenolics, flavonoids and antioxidant action were evaluated for the three powder extracts. The colorimetric analysis was performed according to the CIELAB color system and all had a strong tendency towards yellow color and tended towards white. To assess whether there was an influence on the sensory characteristics, the extracts were applied to a natural yogurt and subjected to sensory evaluation.

RESULTS AND DISCUSSION

The total glycosidic composition for pre-treated and untreated leaves differed very little, respectively 13.8% and 14.7%. The pre-treated ground leaf extract (FMPT) presented the highest extraction yield of 45.70%, then for pre-treated whole leaf (FIPT) 37.50% and untreated whole leaf (FINT) the lowest, 26.92%. After performing the extraction by cold column percolation, by HPLC, the glycoside content in the volume of aqueous extract, the glycoside content in each of the volumes of aqueous extracts (600 mL) was quantified, in which the three differed from each other, and the extract for FMPT had the highest sweeteners content, being 2.80 g/600 mL, 2.42 g/600 mL for FIPT and 1.83 g/600 mL for FINT. For the dry extract, obtained by drying the aqueous in a spray-dryer, the extract with the highest purity was FMPT, presenting 29.7 g/100g of total glycosides, which differed from the whole leaf extracts with and without treatment. The greatest extraction of sweeteners was from FMPT, whose bagasse remained only 0.6%, while FINT bagasse showed to have 5.1% of sweeteners in the leaf, which could not be extracted, demonstrating that the entire leaf area was disadvantageous for the extraction process promoting significant losses of sweeteners. The colorimetric analysis indicated little numerical variation between the results for the three extracts in relation to the HUE angle, in which all of them strongly tended to be yellow, with the FINT extract being the most yellow among the three with ($H^{\circ} = 91.00$), probably because the chlorophyll pigment is in a lower concentration than in pretreated leaf extracts. Extracts from pre-treated leaves had higher phenolic contents for the two expressed standards (Trolox and Gallic Acid). The same behavior was observed for Flavonoids content, being for FIPT and FMPT, respectively, 100.0

and 116.01 mg x EQ g⁻¹. For both antioxidant assays, the ESPM of the pre-treated leaves differed significantly from the ESPM of the untreated whole leaf, whose percentage of results demonstrate that leaf surface area and pretreatment were essential in optimizing the extraction of bioactives. The FMPT ESMP and its antioxidant potential can be explained by the 14 compounds out of the 35 found in this extract. The yogurt formulations formulated with the addition of the three extracts did not have significant differences between them, and the residual flavor aspect was evaluated as "neither much nor little bitter residual", evidencing that the extracts did have an improvement in the sensory profile, proven by the acceptance of the panelists, in the overall assessment as "probably would buy". Thus, the raw extracts obtained can be a viable option for natural sweeteners of stew, without negatively altering the sensory attributes of foods such as yogurt, in addition to providing functionality due to the content of bioactives found in these extracts.

CONCLUSIONS

It was possible to obtain three minimally processed stevia extracts using the conventional methodology of cold extraction by column percolation, with maximum extraction yield for pre-treated ground leaf of 45.7%, considered a high value for a conventional technique, whose yield demonstrated have been optimized due to the pre-treatment performed on the leaves, before the extraction step. The low water temperature and the associated pre-treatment contributed to the exclusion of compounds with an undesirable bitter taste, with this there was an excellent improvement in the final sensory profile of these extracts, which had no evident aftertaste. The natural yogurt formulations sweetened with the extracts were accepted by the panelists and they were not negatively influenced by the addition of extracts, in relation to the sensory characteristics evaluated. Therefore, minimally processed extracts can be a good alternative to natural sweeteners, ready to sweeten fermented beverages such as yogurt, and can be consumed by people with or without caloric intake restriction, in addition to providing functionality to foods due to the content of bioactives present in these extracts.

Key words: Stevia, extracts, sensory analysis, antioxidant activity.

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO

A ingestão demasiada de alimentos ricos em açúcares pode acabar gerando malefícios à saúde com o decorrer do tempo, desencadeando o desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes e obesidade. Com a pandemia e a perda de milhares de vidas, a sociedade viu de perto como os hábitos de alimentação são importantes e influenciam diretamente no quadro de pacientes. Com isto a procura por alimentos mais naturais, com apelo funcional despontaram e o portfólio das indústrias logo aumentou dando espaço à diversos alimentos adoçados com, com adoçantes de estévia. Alimentos como o iogurte são consumidos por uma extensa faixa etária e compõe um alimento com bom valor nutricional, com benefícios probióticos, no entanto muitas vezes cheios de açúcar. Os adoçantes naturais originados da planta *Stevia rebaudiana* Bertoni são conhecidos por serem moléculas doces que em forma de extrato podem apresentar dulçor de até 300 mais que o açúcar convencional, configurando uma ótima opção de adoçante. Várias pesquisas da literatura têm sugerido benefícios à saúde de quem opta por consumir, como efeitos antimicrobiano, anti-hiperglicêmico, imunomodulador, antitumoral, antioxidante. A planta além de conter os adoçantes como conteúdo principal de interesse, é uma matriz vegetal complexa, com inúmeros elementos, destacando-se compostos fenólicos, taninos, minerais, proteínas, polissacarídeos, ácidos orgânicos e pigmentos como a clorofila. Para extração dos adoçantes a imensa maioria dos métodos empregam água quente ou solventes orgânicos. Entre as técnicas convencionais mais utilizadas estão a maceração, soxhlet, infusão, extração assistida por enzimas, percolação e refluxo. Várias delas requerem elevados volumes de solventes com isto etapas adicionais se fazem necessárias para recuperação do solvente, acarretando em custos, além de alguns serem tóxicos à nós seres humanos. Esses obstáculos podem ser minimizados a partir do uso das técnicas não convencionais de extração, como extração por campo elétrico pulsado, extração assistida por ultrassom, extração por micro-ondas, extração por descargas elétricas de alta tensão e extração com líquido pressurizado (fluido subcrítico e supercrítico), que utilizam solventes verdes como a água, favorecem aumentos na eficiência de extração, porém apresentam altíssimos custos de implantação, sendo necessários estudos a cerca de sua viabilidade financeira. O amargor residual bastante perceptível sensorialmente, dos adoçantes da estévia acaba sendo um fator limitante para difundir e tornar mais amplo seu uso, visto seus inúmeros benefícios, assim, o objetivo deste trabalho foi explorar a técnica de extração a frio, utilizando água como um solvente verde, a uma temperatura muito baixa (2-3°C), com o propósito de minimizar a extração de compostos de alto peso molecular como alguns diterpenos, entre eles esterebinas, que dão amargor evidente ao extrato, fazendo uso da estratégia de pré-tratamento etanólico das folhas desenvolvida pelo NEPRON, que atua removendo fenólicos com sabor amargo indesejável também, para assim obter extratos com perfil sensorial mais agradável e com o mínimo de sabor residual possível, afim de de aplicá-los como potencial fonte de adoçantes naturais em um iogurte natural, com a finalidade de avaliar sensorialmente a aceitabilidade deste alimento fermentado.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi obter diferentes extratos de estévia minimamente processados (ESPM), com um perfil sensorial mais agradável e baixo residual amargo, a partir da extração a frio por percolação em coluna, utilizado folhas sem tratamento e pré-tratadas com etanol

consoante, bem como realizar a caracterização glicosídica das folhas e dos extratos aquoso e em pó, determinar o rendimento de extração de cada um deles, quantificar os compostos bioativos, potencial antioxidante, e aplicá-los como alternativa de adoçantes naturais, para adoçar um iogurte natural, com a finalidade de avaliar sensorialmente a aceitabilidade desta bebida fermentada adoçada com os extratos brutos.

MATERIAIS E MÉTODOS

As folhas de estêvia foram colhidas e posteriormente secas em estufas com circulação de ar, depois foram separadas dos caules, sendo uma parte moída em moinhos de facas e outra armazenada as folhas inteiras. Foi preparado o chá das folhas para quantificação dos glicosídeos da folha sem e com pré-tratamento. As análises de quantificação foram realizadas por Cromatografia líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para o pré-tratamento das folhas moídas, elas foram eluídas com etanol absoluto por percolação em coluna, a temperatura ambiente, num total de 14 frações coletadas. Para extração das folhas a frio, as folhas (inteiras e moídas) foram empacotadas em coluna de vidro, em que para o resfriamento da coluna foi implantado um banho de gelo acoplado a uma mangueira de silicone que revestiu todo o comprimento da coluna externamente e foram coletas 6 frações de 100 mL. Posteriormente este extrato foi seco em spray-dryer para obtenção do extrato em pó. A composição glicosídica total e de rebaudiosídeo-A e C, bem como esteviosídeo foram quantificadas no extrato aquoso e em pó por CLAE. A quantificação de fenólicos, flavonoides e ação antioxidante foram avaliadas para os três extratos em pó. A análise colorimétrica foi realizada de acordo com o sistema de cor CIELAB e todos tiveram forte tendência à cor amarelo e tenderam ao branco. Para avaliar se houve influência nas características sensoriais, os extratos foram aplicados em um iogurte natural e submetidos à avaliação sensorial.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição glicosídica total para as folhas pré-tratadas e não tratadas diferiram muito pouco, respectivamente 13,8% e 14,7%. O extrato da folha moída pré-tratada (FMPT) apresentou o maior rendimento de extração de 45,70%, em seguida para folha inteira pré-tratada (FIPT) 37,50% e folha inteira não tratada (FINT) o menor, 26,92%. Após realizada a extração a frio em coluna, por meio da CLAE quantificou-se o teor de glicosídeos em cada um dos volumes dos extratos aquosos (600 mL), em que os três diferiram entre si, sendo que o extrato para FMPT teve o maior teor de adoçantes, sendo 2,80 g/600 mL, 2,42 g/600 mL para FIPT e 1,83 g/600 mL para FINT. Para o extrato seco, obtido pela secagem do aquoso em spray-dryer, o extrato com maior pureza foi o de FMPT, apresentando 29,7 g/100g de glicosídeos totais, que diferiu dos extratos de folha inteira com e sem tratamento. A maior extração de adoçantes fora a partir da FMPT, cujo bagaço restou apenas 0,6 %, enquanto o bagaço da FINT mostrou ter 5,1% de adoçantes na folha, que não conseguiram ser extraídos, demonstrando que a área foliar sendo inteira foi desvantajosa para o processo de extração promovendo perdas significativas de adoçantes. A análise colorimétrica indicou pouca variação numérica entre os resultados para os três extratos em relação ao ângulo HUE, em que todos eles tenderam fortemente à cor amarela, sendo o extrato de FINT o mais amarelo dentre os três com ($H^{\circ} = 91,00$), provavelmente pelo pigmento clorofila estar em concentração menor que nos extratos de folhas pré-tratadas. Os extratos das folhas pré-tratadas tiveram maiores teores de fenólicos para os dois padrões expressos (Trolox e Ácido Gálico). O mesmo comportamento foi observado para teor de Flavonoides, sendo para FIPT e FMPT respectivamente, 100,0 e 116,01 mg x EQ g⁻¹. Para ambos ensaios antioxidantes, o ESPM das folhas pré-tratadas diferiram significativamente do ESPM de folha inteira não tratada, cujos percentuais de inibição foi o maior para FMPT (66%), FIPT (58%) e FINT (43%), estes resultados demonstram que a área superficial da folha e o pré-tratamento foram essenciais na otimização de extração dos bioativos. O ESPM da FMPT e seu

potencial antioxidante podem ser justificados pelos 14 compostos dentre os 35 encontrados neste extrato. As formulações de iogurtes formuladas com adição dos três extratos não tiveram diferenças significativas entre si, e o aspecto sabor residual ficou avaliado como “nem muito nem pouco residual amargo” evidenciando que os extratos tiveram sim uma melhora no perfil sensorial, comprovada pela aceitação dos painelistas, na avaliação geral como “provavelmente compraria”. Com isto os extratos brutos obtidos podem ser uma opção viável de adoçantes naturais da estevéia, sem alterar negativamente os atributos sensoriais de alimentos como o iogurte, além de conceder funcionalidade por conta do conteúdo de bioativos encontrados nestes extratos.

CONCLUSÕES

Foi possível obter três extratos de estevéia minimamente processados utilizando a metodologia convencional de extração a frio por percolação em coluna, com rendimento de extração máximo para folha moída pré-tratada de 45,7% considerado um alto valor para uma técnica convencional, cujo rendimento demonstrou ter sido otimizado devido ao pré-tratamento realizado nas folhas, antes da etapa de extração. A temperatura baixa da água e o pré-tratamento associados, contribuíram para a exclusão de compostos de sabor indesejável amargo, com isso houve uma excelente melhora do perfil sensorial final desses extratos obtidos, que não tiveram sabor residual evidente. As formulações de iogurte natural adoçadas com os extratos tiveram aceitabilidade pelos painelistas e as mesmas não foram influenciadas negativamente pela adição dos extratos, em relação às características sensoriais avaliadas. Portanto os extratos minimamente processados podem ser uma boa alternativa de adoçantes naturais, prontos para adoçar bebidas fermentadas como o iogurte, e podem ser consumidos por pessoas com ou não restrição de aporte calórico, além de conferir funcionalidade aos alimentos devido ao conteúdo de bioativos presentes nestes extratos.

Palavras chaves: Estevéia, extratos, análise sensorial, atividade antioxidante.

Artigo

Estratégia para obtenção de extrato de estévia minimamente processado e sua aplicação na formulação de iogurte

Ana Carolina Petrangeli da Costa^{a*}, Maria Rosa T. Zorzenon^a, Antonio S. Dacome^b, Paula G. Milani^b, Jorge E. Pilau^c, Silvio C. Costa^b.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPC), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

^bDepartamento de Bioquímica (DBQ), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

^cDepartamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, 87020-900 Maringá, PR, Brasil.

*Autor correspondente

E-mail: costanab@gmail.com (Ana Carolina P. da Costa)

Estratégia para obtenção de extrato de estévia minimamente processado e sua aplicação na formulação de iogurte

Resumo

O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento de uma estratégia para obtenção de extratos de estévia minimamente processados (ESMP) funcionais e com boas qualidades sensoriais, por meio de metodologias convencionais, com o emprego de equipamentos simples e baratos, com baixo custo operacional em alternativas aos processos não convencionais, bem como o desenvolvimento de i com por meio do processo de por percolação em coluna, utilizando como solvente água sob baixas temperaturas (2-3°C) baixas temperaturas, com utilização da água como solvente, a partir da variedade de elite Stevia UEM-13, com alto teor de rebaudiosídeo A, associado à metodologia do pré-tratamento com etanol absoluto, desenvolvida pelo NEPRON. Foi realizada a extração aquosa e posteriormente este extrato foi seco em spray-dryer, para obtenção do extrato em pó. As folhas pré-tratadas e sem tratamento foram caracterizadas em relação à sua composição glicosídica, assim como os três extratos obtidos, também foram estimados o rendimento de cada um dos extratos, cujo extrato da folha moída pré-tratada resultou maior rendimento mássico em comparação aos de folhas inteiras, demonstrando que o pré-tratamento e a área superficial da folha influenciaram no rendimento mais elevado. O extrato obtido da folha moída apresentou os maiores conteúdos de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. O pré-tratamento contribuiu para melhorar o perfil final dos extratos, favorecendo a remoção de compostos de sabor amargo, juntamente com a extração à baixa temperatura que promoveu a exclusão de algumas classes de diterpenos como as esterebinas, que não foram encontradas na identificação realizada por UHPLC-MS/MS-Qtof e que conferem

residual bastante intenso. Analisados de acordo com o sistema CIELAB, os três extratos tiveram forte coloração tendendo ao amarelo. A aplicação dos extratos no iogurte natural tiveram ótima intenção de compra geral, pelos painelistas, confirmando a boa aceitabilidade e não impactaram nas características sensoriais de forma negativa, sendo uma alternativa de adoçante em forma bruta, pronta para ser adicionada à bebidas fermentadas, ou outros alimentos, com efeito funcional devido ao conteúdo de bioativos presente nos extratos.

Palavras-chaves: Estévia, extratos, atividade antioxidante, análise sensorial.

1. Introdução

Hábitos de consumo relacionados à ingestão excessiva de açúcar trazem malefícios à saúde podendo causar doenças crônicas, dentre as quais destacam-se a obesidade e o diabetes *mellitus*, (SANTOS et al., 2020). Após a eclosão da pandemia do Coronavírus em março de 2020, e o fato das doenças crônicas representarem um risco adicional, estabeleceu-se uma forte correlação, entre hábitos saudáveis de alimentação com o aumento de chances de não desenvolver formas mais severas da doença (LAMY et al., 2022)

A produção e o consumo de alimentos ultra processados têm aumentado, em função da praticidade de consumo e sabor agradável. Geralmente tais alimentos são adicionados de gorduras, sais e diferentes tipos de açúcares (ASKARI et al., 2020; BAKER et al., 2020). Estudos têm associado o consumo elevado destes alimentos com a incidência de obesidade e diabetes (ASKARI et al., 2020; MARSOLA et al., 2021; PAGLIAI et al., 2021; BIELEMANN et al., 2015; KIM et al., 2019; SILVA et al., 2018, HALL et al., 2019; SROUR et al., 2019, RICO-CAMPÀ et al., 2019). O interesse por alimentos saudáveis e naturais com propriedades funcionais vem crescendo muito nos últimos anos (BUNIEWSKA et al., 2017; LLNAJ et al., 2020), e deve se intensificar ainda mais neste contexto de pós pandemia

O iogurte é um dos alimentos funcionais mais consumidos, rico em probióticos, e composição nutricional rica em proteínas, minerais, vitaminas, gorduras e flavorizantes, sendo na maioria das vezes adoçados com adoçantes sintéticos ou sacarose. (NARAYANAN et al., 2014) A demanda comercial referente aos laticínios com apelo funcional têm aumentado de forma expressiva, principalmente entre aqueles consumidores com restrição dietética e indivíduos que buscam alternativas mais saudáveis aliadas à nutrição (JAHANGIR CHUGHAI et al., 2020; GANDHI et al., 2018). Configurando uma opção de aumento no portfólio de produtos para a indústria alimentícia, um consumidor mais consciente e exigente com questões alimentares, os adoçantes de alta intensidade à base de plantas, como a estévia refletem uma excelente opção à substituição dos adoçantes artificiais e ao açúcar (BIN SAHARUDIN et al., 2020)

Os adoçantes obtidos a partir da planta *Stevia rebaudiana* Bertonii em especial das folhas, glicosídeos do esteviol, têm sido reconhecidos há anos como uma excelente opção à substituição ao açúcar de mesa e adoçantes sintéticos (CAPELLA et al., 2013). Da família Asteraceae, nativa da América do Sul, mais especificamente da região fronteira entre Brasil e Paraguai, denominada Serra do Amambai, a planta era bastante utilizada no preparo de bebidas com propriedades medicinais pelos guaranis (MARTINEZ et al., 2018).

Caracterizada por ter aporte calórico baixíssimo, os glicosídeos em forma de extrato podem apresentar dulçor até 300 vezes maior que a sacarose, o que viabiliza seu uso por pessoas diabéticas e/ou que fazem dietas com restrição de consumo ao açúcar convencional (PAREDES-LÓPEZ et al., 2019). Nos Estados Unidos o uso de adoçantes é regulamentado pelo FDA, órgão americano análogo a Anvisa no Brasil, os quais recomendam para os glicosídeos do esteviol uma ingestão diária aceitável (IDA) de 4,0 mg por quilograma de peso corporal (WHO, 2017). Pesquisas têm sugerido uma gama de efeitos benéficos à saúde para quem os consome, como efeitos anti-inflamatório, antimicrobiano, anti-hiperglicêmico, não cariogênico, diurético, imunomodulador, antitumoral, antioxidante e redução do colesterol. Por ser uma matriz vegetal complexa, além dos adoçantes, a planta apresenta outros bioativos, como flavonoides, taninos, minerais, compostos fenólicos, proteínas, polissacarídeos, ácidos orgânicos e pigmentos como a clorofila (LÓPEZ et al., 2019; RUIZ et al., 2019; HAZIRAH et al., 2017; MILANI et al., 2017).

Entre os glicosídeos presentes nas folhas de estévia, esteviosídeo, rebaudiosídeo-A e rebaudiosídeo-C e dulcosídeo A são os dois majoritários, apresentando ainda uma série de outros glicosídeos minoritários, como os rebaudiosídeos B, D, E, F e esteviolbiosídeo (SOUFI et al., 2016). O rebaudiosídeo-A é caracterizado por apresentar um gosto doce mais acentuado, já o esteviosídeo apresenta um gosto residual levemente amargo, conhecido como “*aftertaste*” (MARTINEZ et al., 2018). Constituintes fitoquímicos como os polifenóis, flavonoides, pigmentos foliares e impurezas também podem contribuir para o gosto amargo residual em extratos brutos ou semi-purificados de estévia (LIU et al., 2019).

Inúmeros estudos estão voltados para técnicas de extração dos adoçantes da estévia (LIU; LI; TANG, 2010). Para obtenção do extrato bruto de estévia e refino, a imensa maioria dos processos convencionais empregam água quente ou solventes orgânicos (KUTOWY et al, 1999). Tais extratos, dificilmente são utilizados diretamente como adoçantes, em função da presença de um grande número de substância presentes nos mesmos com gosto e odor desagradável. Normalmente, extratos brutos, obtidos por métodos de extração pouco seletivos, demandam uma série de etapas adicionais de purificação e refino para poderem ser empregados como agentes edulcorantes em bebidas e alimentos. Entre as principais técnicas estão a extração por solvente (percolação e refluxo) a temperatura ambiente ou submetida ao aquecimento, maceração, soxhlet, infusão e extração assistida por enzimas (GALANAKIS, 2020). Extração por solventes demandam elevados volumes, sobretudo orgânicos, com isto, são necessárias etapas adicionais ao processo para sua recuperação, resultando em aumento do custo de processo em função das demandas de tempo, temperatura, tratamento e disposição de resíduos (AHMAD et al., 2020)

Processos de extração e refino podem ser otimizados a partir da utilização de técnicas alternativas emergentes, também conhecidas por métodos não convencionais de extração (AHMAD et al., 2020). Dentre as técnicas emergentes aplicadas na extração e purificação de compostos importantes advindos de fontes vegetais as principais são: extração por campo elétrico pulsado, extração assistida por ultrassom, extração por micro-ondas, extração por descargas elétricas de alta tensão e extração com líquido pressurizado (fluido subcrítico e supercrítico). Apresentam como vantagem a utilização de solventes verdes como por exemplo, a água, redução quanto ao seu volume de uso, e têm exibido em estudos realizados um aumento na eficiência de extração em comparação aos métodos convencionais, como também elevando a pureza e qualidade do extrato final, embora, apesar das vantagens mencionadas, são indispensáveis estudos acerca dos custos de implantação e operacionais (GALANAKIS, 2020).

Métodos convencionais alternativos para obtenção de extratos brutos (minimamente processados) ou semi-purificados, de baixo custo e boa qualidade sensorial, tem sido desenvolvido, como é o caso do pré-tratamento de folhas de estévia com álcool desidratado, que remove seletivamente das folhas de stevia uma fração extremamente amarga, mantendo praticamente inalterado o conteúdo de glicosídeos do esteviol (FORMIGONI et al, 2018). Uma outra estratégia interessante, no entanto, pouco explorada para a Stevia desde que foi descrita pela primeira vez por (KUTOWY et al 1999), consiste na extração por percolação em coluna, tendo como solvente a água, sob baixas temperaturas, resultando em um extrato bruto com boas características sensoriais

Este trabalho teve como o objetivo a associação das duas estratégias, pré-tratamento com álcool e percolação a baixas temperaturas, tendo como solvente a água, visando a obtenção de extratos minimamente processados (ESMP), com características sensoriais que permitam o seu uso diretamente na formulação de alimentos e bebidas, sem a necessidade de etapas adicionais de purificação ou refino. Os extratos minimamente processados foram empregados para adoçar iogurte aspectos sensoriais dos mesmos foram determinados.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

Para realização trabalho foram utilizadas folhas da planta de stevia da variedade UEM-13, desenvolvida/cultivada no NEPRON (Núcleo de Estudo em Produtos Naturais) da Universidade Estadual de Maringá, Brasil. A colheita foi realizada no período de crescimento ótimo, com cerca de aproximadamente 60 dias após a última poda. O material foi seco em estufa com circulação de ar forçada a 50° C, até peso constante. As folhas serão devidamente separadas dos ramos, de forma manual e acondicionadas em sacos de polietileno limpos, de cor

escura, sob temperatura ambiente. Todos os solventes e reagentes utilizados nas análises são de grau analítico (P.A) com pureza > 99,5% ou 99,8%. Etanol absoluto (99,9%) adquirido da Synth (Diadema, SP, Brasil), a água utilizada nas análises é produzida pelo próprio NEPRON em um sistema composto inicialmente por um filtro de cerâmica/carvão ativo da marca 3M em seguida destilada em um destilador de vidro da marca Buchi e posteriormente deionizada em um deionizador da marca Permution. Os padrões de esteviosídeo e rebaudiosídeo-A e C foram produzidos no NEPRON de acordo com a metodologia de (PAYZANT et al, 1998).

2.2. Preparo do extrato aquoso (chá) a partir das folhas de estévia

Pesou-se 2,0 g de folhas de estévia moídas da variedade UEM-13. O material vegetal foi transferido para um becker de 250 mL, ao qual foi adicionado 10 mL de água deionizada e sob agitação constante foi levado ao aquecimento por cinco minutos. Após ferver, a mistura foi filtrada em filtro de papel sob vácuo, com auxílio de um funil de *buchner* e um *kitassato* e os resíduos da filtração foram retornados para o becker. Esse procedimento foi realizado por mais duas vezes, com a adição de 100 mL e 50 mL respectivamente de água deionizada. Aguardou-se a solução atingir a temperatura ambiente e em seguida, o extrato aquoso, foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL, ao qual foi adicionado água deionizada até completar o volume total do balão. O volume total do extrato obtido foi acondicionado em frasco âmbar, sendo utilizado para análise quantitativa dos adoçantes da folha de stevia, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.3. Pré-tratamento etanólico das folhas de stevia

As folhas da variedade UEM-13 foram previamente secas em estufa, e posteriormente cominuídas em moinho de facas da marca Tecnal, em seguida 300 g foram empacotadas em coluna de plástico. O etanol absoluto foi utilizado como solvente em modo percolação, tendo sido coletadas 14 frações etanólicas de 350 mL cada, conforme metodologia descrita-(FORMIGONI et al., 2018). As folhas pré -tratadas foram secas, analisadas por meio de CLAE e empregadas como material de partida para obtenção de extrato de estévia minimamente processado (ESMP).

2.4. Extração a baixas temperaturas em coluna das folhas de Stevia (obtenção do ESPM)

Foram pesadas 20 g respectivamente de folhas secas moídas pré-tratadas com etanol absoluto, de folhas inteiras pré-tratadas e folhas inteiras não tratadas. Os diferentes materiais de partida foram submetidas às mesmas condições de extração a baixas temperaturas em coluna. As amostras de folhas foram acondicionadas em uma coluna de vidro de dimensões: 50 cm de altura por 3 cm diâmetro interno. Para resfriamento do solvente de percolação foi acoplado à coluna um sistema de refrigeração, o qual permitiu que o solvente permanecesse com temperatura de 2 a 3°C. O solvente foi acidificado com ácido fosfórico. Foram coletadas 6 frações de 100 mL com vazão de 2 mL/min conforme metodologia estabelecida por (KUTOWY et al, 1999), com alterações.

2.5. Obtenção dos extratos de estêvia minimamente processados (ESMP) na forma de pó por secagem no spray-dryer

As frações coletadas dos extratos aquosos provenientes de cada material de partida foram reunidas totalizando um volume de 600 mL para cada extrato. Posteriormente os extratos foram secas em mini spray dryer (Buchi, modelo B-191), com vazão de água evaporada de 500 mL/min com temperatura de input (entrada) de 175°C e de output (saída) de 102 °C.

2.6. Análise colorimétrica

A análise da cor dos ESPM obtidos, foram avaliadas utilizando o colorímetro portátil Minolta Chroma Meter CR-400 (Minolta Co., Japan), e avaliados conforme o espaço de cor CIELAB (L^* , a^* , b^*), cujo método tem por objetivo expressar a cor de um determinado objeto utilizando de números para isto, onde L^* representa a diferença da luz, (0 = preto e 100 = branco), a^* e b^* são coordenadas para verde ($-a^*$) / vermelho ($+a^*$) e azul ($-b^*$) / amarelo ($+b^*$) (SAHIN; SUMNU, 2006). O ângulo HUE (H°) indica a cor da amostra (0 ou 360 = vermelho; 90 = amarelo; 180 = verde; 270 = azul). O Choma (C^*) indica saturação da cor (SAHIN; SUMNU, 2006).

2.6. Quantificação de fitoquímicos e atividade antioxidante

2.6.1 Determinação de compostos fenólicos

Para análise do conteúdo de compostos fenólicos dos ESMP obtidos das folhas de stevia extraídas em coluna a frio, utilizou-se o método espectrofotométrico, conforme metodologia de (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTO, 1999). Preparou-se para cada um dos extratos analisados uma solução de concentração da amostra de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. A técnica consistiu em adicionar em um tubo de ensaio, 0,2 mL da amostra, 1,0 mL do reagente *Folin-Ciocalteu*, os tubos foram homogeneizados no vortex e em seguida foi adicionado 0,8 mL de Na_2CO_3 (75 g/L). Os tubos foram acondicionados sob ausência de luz por cerca de 90 minutos, a temperatura ambiente e conseguinte fora lida as absorbâncias das amostras, em 760 nm, no espectrofotômetro (Cary, 50-Scan UV-Vis). Plotou-se uma curva padrão para ácido gálico ($0,05 - 100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$); ($y = 0,0054x - 0,00364$) e $R^2 = 0,99$. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG.g^{-1}). Foi plotada outra curva padrão para trolox, ($0 \text{ a } 250 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$); ($0,001x - 0,0481$), $R^2 = 0,99$, cujos resultados foram expressos em mg equivalente de trolox por grama de amostra (mg.ET.g^{-1}). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e todas as análises foram feitas em triplicata.

2.6.2 Quantificação de flavonoides

O teor de flavonoides totais foi determinado segundo o método descrito por (JIA; TANG; WU, 1999) e foi utilizada uma curva padrão de quercetina, onde a concentração variou de 0 a $200 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, ($y = 0,055x - 0,0405$) e $R^2 = 0,99$. Em um tubo adicionou-se 0,5 mL da amostra que fora previamente preparada, 0,3 mL de NaNO_2 a 5%, homogeneizaram-se os tubos por 5 minutos. Logo após, adicionou 0,3 mL de AlCl_3 a 10%, os tubos foram homogeneizados no vortex e submetidos a repouso por 6 minutos, sob ausência de luz, em temperatura ambiente. Por fim, foi adicionado em cada tubo 2,0 mL de uma solução de NaOH a 1M. A leitura foi realizada em 510 nm, no espectrofotômetro (Cary, 50-Scan UV-Vis).

A quantificação dos flavonoides foi estimada com base na curva padrão, onde os resultados foram expressos em miligrama equivalente à quercetina por grama de amostra (mg EQ.g^{-1}). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6.3 Atividade antioxidante – método ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico)

Para medir o potencial antioxidante dos ESMP utilizou-se o método de captura do radical ABTS, consoante metodologia descrita pela (RUFINO et al.,2007). Os extratos foram solubilizados a uma concentração de 1 mg.mL^{-1} e foram utilizados no protocolo da técnica. Durante toda a execução do protocolo a luz do ambiente foi mantida desligada. Para a técnica em um tubo adicionou-se $30 \mu\text{L}$ de cada um dos extratos previamente preparados e logo em seguida, $3,0 \text{ mL}$ do radical ABTS, contou-se 30 segundos entre um tubo e outro para adição do radical. As soluções foram homogeneizadas no agitador, por três vezes e em seguida, os tubos foram encapados e tampados, com papel alumínio, de modo individual. Após transcorridos seis minutos da primeira adição da alíquota do radical, a leitura das absorbâncias das amostras foi realizada em 734 nm , no espectrofotômetro (Cary,50-Scan UV-Vis), cujo equipamento foi zerado com o branco (etanol absoluto) previamente. O potencial antioxidante foi estimado com base na curva padrão de Ácido gálico construída ($0 - 500 \mu\text{g/mL}$); $(-0,005x+0,6935)$ e $R^2 0,99$, onde os resultados foram expressos em miligrama equivalente à Ácido gálico, por grama de amostra (mg EAG.g^{-1}). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6.4 Atividade antioxidante – método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A atividade antioxidante dos extratos foram determinadas pelo método de inibição do radical livre DPPH conforme (BRAND-WILLIANS, 1995). Para a técnica foram preparadas as soluções das amostras dos extratos à concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. Em um tubo adicionou-se $2,5 \text{ mL}$ da amostra, $1,0 \text{ mL}$ d radical orgânico DPPH. Os tubos foram mantidos sob abrigo da luz por 40 minutos a temperatura ambiente. Um controle negativo foi utilizado, contendo somente solvente (água) e o radical. E também os controles respectivos de cada uma das amostras estudadas. A absorbância das amostras foram lidas a 517 nm , no espectrofotômetro (Cary,50-Scan UV-Vis).

A quantificação dos flavonoides foi determianada com base nas curvas padrão obtidas, um para composto Trolox ($0 - 200 \mu\text{g/mL}$); $(y = -0,0007x+0,3608)$ e $R^2 = 0,99$. Outra curva foi construída para o padrão, Ácido gálico ($1 - 250 \mu\text{g/mL}$); $(y = -0,0061x+0,4429)$ e $R^2 = 0,99$, cujos resultados obtidos foram expressos respectivamente em miligrama equivalente de Trolox por grama de amostra (mg ET. g^{-1}), e por miligrama equivalente de Ácido gálico por grama de amostra (mg EAG. g^{-1}). Por último, a atividade antioxidante (AA) foi determinada em porcentagem de inibição do radical DPPH (%), por meio da equação abaixo:

$$AA (\%) = \frac{C^- - Abs_{real}}{C^-} \times 100$$

Onde, AA(%): atividade antioxidante referente à porcentagem de inibição do radical DPPH; C^- : controle negativo; Abs_{real} : absorbância lida pertinente à minha amostra.

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e as análises foram realizadas em triplicata.

2.8. Quantificação dos glicosídeos totais do extrato aquoso e do extrato etanólico das folhas de Stevia por CLAE

Para determinação dos glicosídeos das folhas, uma alíquota de 5 mL do extrato aquoso ou do etanólico foram concentradas em um evaporador rotativo e o produto obtido foi ressuspenso em uma mistura de 2,0 mL de água deionizada e 8,0 mL de acetonitrila, a qual foi utilizada como fase móvel, sendo a acetonitrila adquirida da J.T. Baker (USA) com pureza 99,99 %. A solução foi filtrada três vezes através de um filtro de seringa com elemento filtrante de 0,45 μ m, a qual foi empregada para determinação dos teores de esteviosídeo, rebaudiosídeo A e rebaudiosídeo C (glicosídeos totais) em cromatografo líquido de alta eficiência (CLAE) (Gilson, modelo 307), com bomba modelo 5SC sob condições isocráticas com uma proporção de solvente de 80:20, acoplado a detector de índice de refração (Gilson, modelo 133) S: 32, com coluna de NH_2 5 μ m de dimensões de 125 $\times$ 4,6 mm.

2.9. Identificação dos compostos por UHPLC-QTOF-MS/MS

Para identificação de outros compostos presentes no ESMP, obtido a partir da folha moída pré-tratada, uma amostra seca do extrato em spray dryer, foi dissolvido em 600 μ L de água/acetonitrila (1:1 v/v) e 5 μ L da amostra foi injetada e analisada utilizando um cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (Shimadzu, Nexera X2, Japão). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Acquity UPLC BEH C18 (Waters, EUA, 1,7 μ m, com 2.1x50 mm) com fluxo de 0,250 mL min⁻¹. A composição da fase móvel será, fase A (água) e fase B (acetonitrila), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico (v:v). A separação cromatográfica será realizada em 25 minutos, usando de 1 a 10 minutos 5% de B. De 10 a 16 minutos 50% B. De 16 a 18 minutos, 2% B. De 18 a 25 minutos, 95% B. A temperatura da coluna foi mantida por 40°C durante toda corrida. O espectrômetro de massa utilizado foi do tipo Q-TOF (Bruker, Alemanha), com uma fonte de ionização por electrospray (ESI) operada no modo de aquisição AutoMS / MS, onde os 5 íons mais intensos de cada pico

cromatográfico foram selecionados com 5 Hz (MS e MS / MS) e os equipamentos foram ajustados no intervalo de m/z 70-1300. As análises foram realizadas em modo de ionização positiva com tensão capilar de 4,50 kV. A temperatura da fonte foi de 200 °C, e o fluxo de gás de dessolvatação foi de 8 l.min⁻¹. O experimento foi realizado utilizando dissociação induzida por colisão (DIC) utilizando uma rampa de energia de colisão na gama de 15-40 eV e pressão de colisão de 3,06 e 10⁻³ mBar. O cromatograma de íons e os espectros MS e MS/MS obtidos foram visualizados com o software DataAnalysis 4.3, Bruker Daltonik GmbH, comparados à literatura e analisados por bancos de dados de espectrometria de massa de acesso livre, como o Massbank e Human Metabolome Database.

2.12. Análise sensorial

2.13. Formulações

O iogurte utilizado para preparação das formulações, foi adquirido no comércio local da cidade de Maringá-Paraná, do tipo natural integral, sem sabor e adição de conservantes. Sua lista de ingredientes continha leite pasteurizado integral e/ou leite em pó reconstituído, leite em pó desnatado, creme de leite e fermento lácteo.

As folhas de estêvia utilizadas para a extração sob baixas temperaturas (variedade UEM-13), foram coletadas no canteiro experimental de plantas de elite do NEPRON e submetidas previamente ao pré-tratamento com etanol absoluto, conforme metodologia desenvolvida por (FORMIGONI et al.,2018). Os ESMP obtidos a partir das folhas moídas e inteiras (pré-tratadas e não tratadas) foram empregados para adoçar as diferentes formulações produzidas.

Para definição de uma concentração ideal de extrato de estêvia, a ser utilizado como aditivo edulcorante, uma série de testes preliminares foram realizados, até a definição de uma concentração de 300 mg de extrato/100g de iogurte (3%). Os produtos formulados com ESMP e submetidos a análise sensorial foram denominados de: iogurte adoçado com extrato de folha moída pré-tratada (IFMPT), iogurte adoçado com extrato de folha inteira pré-tratada (IFIPT) e iogurte adoçado extrato de folha inteira sem tratamento (IFIST).

2.14. Análise sensorial – Teste de aceitação por escala hedônica

Os testes da análise sensorial foram realizados no NEPRON da Universidade Estadual de Maringá. A aplicação do teste foi efetuada dentro de cabine com partição individual, sob iluminação branca e ambiente com climatização adequada.

Os painelistas receberam três amostras codificadas com números de três dígitos, e foram dispostas aos provadores em copos descartáveis, devidamente codificados, contendo 10 g de amostra, servidas de acordo com a recomendação do fabricante, a uma temperatura de cerca de 10°C. Orientou-se aos provadores, que entre a prova de uma amostra e outra fosse ingerido água a temperatura ambiente, afim de minimizar interferências sensoriais. Os participantes receberam um formulário de avaliação (em anexo) para proceder seu preenchimento, de acordo com sua preferência para cada uma das amostras degustadas. Todos os participantes foram instruídos quanto ao preenchimento. O quadro de provadores foi composto por 13 pessoas não treinadas, com idades entre 20 a 60 anos, ambos sexos.

Com o objetivo de avaliar a aceitação do iogurte natural adoçado com os ESMP, as formulações foram submetidas ao teste afetivo de aceitação, por meio da escala hedônica de 9 pontos, onde (1= desgostei extremamente a 9= gostei extremamente), em que foram avaliados os atributos: aparência, dulçor e aroma. Para avaliação do sabor residual amargo utilizou-se a escala de 5 pontos, onde (0 = muito sabor residual a 3 = nenhum sabor residual) e para intenção de compra (1 – certamente não compraria a 5 – certamente compraria).

Os resultados da avaliação sensorial estão apresentados na Tabela 9 (em anexo) e os dados foram submetidos aos tratamentos estatísticos por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de significância de 5%.

2.11. Análises estatísticas

Todas as análises realizadas no presente trabalho foram submetidas a Análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), para distribuição normal. Os resultados das mesmas foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e para o tratamento estatístico dos dados, foi utilizado o programa PAST (Hammer, Ø., Harper, D.A.T., and P. D. Ryan, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1), 9 pp, versão 4.03).

3. Resultados e discussões

3.1. Caracterização das folhas de estévia e análises físico-químicas

A tabela 1 aborda os resultados obtidos da composição glicosídica das folhas de Stevia UEM-13 não tratadas e pré-tratadas com etanol absoluto.

Tabela 1: Composição das folhas da variedade seminal Stevia UEM-13 em relação aos seus principais glicosídeos.

Folhas	Teor total de glicosídeos (g/100g ⁻¹ folha seca)	Stv (g/100g ⁻¹)	Reb-C (g/100g ⁻¹)	Reb-A (g/100g ⁻¹)	Reb-A/Stv
Sem tratamento	14,7	5,2	2,2	7,3	1,40
Pré-tratada	13,8	4,6	2,0	7,2	1,56

Stv: Esteviosídeo; Reb-C: Rebaudiosídeo-C. Reb-A: Rebaudiosídeo-A.

De acordo com os resultados da análise glicosídica, o teor total não mostrou diferença expressiva entre a folha não tratada e pré-tratada, com ligeira diminuição na quantidade de adoçantes para a folha pré-tratada, o que indica o caráter seletivo do processo, possibilitando a remoção de outros constituintes da planta, como compostos fenólicos, flavonoides, sem, no entanto, alterar de forma expressa o conteúdo de adoçantes, como verificado em estudo realizado por (FORMIGONI et al., 2018). Os teores obtidos neste trabalho estão de acordo com os resultados reportados por outros autores para a Stevia UEM-13 (ZORZENON et al., 2019) (DA SILVA et al., 2020) (CIOTTA et al., 2022)

A razão Reb-A/Stv > 1, indica tratar-se de uma planta de elite, devido à presença majoritária do glicosídeo rebaudiosídeo-A, 1,5 vezes mais doce que o esteviosídeo, apresentando menor residual amargo. As folhas contém uma mistura heterogênea de diferentes glicosídeos do esteviol (BURSAĆ KOVAČEVIĆ et al., 2018), cujo conteúdo pode variar, dependendo da variedade da planta e condições de cultivo (KALAIARASAN; MIMI SAKINAH, 2016; JAHANGIR CHUGHTAI et al., 2020).

3.2. Caracterização glicosídica dos extratos na forma líquida e em forma de pó obtidos sob baixas temperaturas de extração

Extratos na forma líquida e em pó tiveram os teores de glicosídeos determinados, dados mostrados, respectivamente, na tabela 03 e 04.

Tabela 3: Teor de glicosídeos de esteviol dos extratos na forma líquida, obtidos das extrações sob baixas temperaturas por per em coluna de vidro.

Composição glicosídica do EA			
Glicosídeos (g/600mL)	FINT	FIPT	FMPT
Teor de glicosídeos totais	1,83 ^a ± 0,08	2,42 ^b ± 0,01	2,80 ^c ± 0,00
Stv	0,59 ^a ± 0,05	0,79 ^b ± 0,01	0,98 ^c ± 0,00
Reb-C	0,23 ^a ± 0,00	0,29 ^b ± 0,00	0,34 ^c ± 0,00

Reb-A	1,00 ^a ± 0,04	1,33 ^b ± 0,01	1,47 ^c ± 0,00
-------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

EA: Extrato aquoso. FINT: Folha inteira não tratada; FIPT: Folha inteira pré-tratada; FMPT: folha moída pré-tratada. Dados expressos por valor médio ± erro padrão da média. Os extratos foram avaliados quanto à diferença significativa entre eles, pela análise de variância ANOVA e pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Letras diferentes em uma mesma linha significa que há diferença significativa entre os tratamentos.

Estatisticamente a composição de glicosídeos presente nos três extratos diferiram entre si, no entanto os dados referentes aos extratos aquosos provenientes das folhas tratadas foram bastante semelhantes, mostrando influência do pré-tratamento no processo de extração, visto que a folha inteira sem tratamento teve teores reduzidos, provavelmente em função da menor superfície de contato. Entre os principais fatores que influenciam os rendimentos das extrações aquosas, estão, tempo de processo, granulometria do particulado, razão folha: solvente, temperatura do solvente, velocidade de agitação (MURUGESH et al., 2018; MOONGNGARM et al., 2022). Geralmente a granulometria da biomassa vegetal submetida à extração não é o único fator responsável por elevadas taxas de recuperação, faixas de 0,180 a 1µm são correlacionadas à bons rendimentos (GALANAKIS et al., 2013).

Temperatura ambiente ou abaixo são requeridas nos processos de extração a baixas temperaturas (MURUGESH; RASTOGI; SUBRAMANIAN, 2018), sendo que a temperatura ambiente pode ser preferível para operações em grande escala. Técnicas emergentes de extração por ultrassom, campo elétrico pulsado, entre outras, estão sendo estudadas com a finalidade de melhorar a extração de bioativos em baixa temperatura, já as técnicas convencionais como a percolação, maceração, refluxo dentre outras, devem ser projetadas para reduzir o tempo de operação e volume de solvente, ainda que apresentem vantagens como simples reprodução, baixo custo operacional e escalonável (YILDIZ-OZTURK et al., 2015)

A temperatura é um parâmetro muito importante para o processo de extração, pois favorece o aumento da energia interna do sistema e consequentemente influi na difusividade, melhorando a solubilidade dos analitos (MOONGNGARM et al., 2022), no entanto, elevadas temperaturas podem levar à degradação de compostos termolábeis, comprometendo o rendimento e gerando subprodutos às vezes não desejáveis ao processo e ainda reduzindo a seletividade, fazendo com que etapas adicionais sejam necessárias, afim de purificar o extrato devido às impurezas geradas, acarretando custos adicionais (AMEER et al., 2020). Diversos autores reportaram altos rendimentos de glicosídeos ao utilizarem temperaturas de processo mais elevadas (JAITAK et al., 2009; BURSAC KOVAČEVIĆ et al., 2018b; YILDIZ-OZTURK; TAG; YESIL-CELIK TAS, 2014; MUANDA et al., 2011; BUNIOWSKA et al., 2017).

Os resultados de rendimento de extração em massa (%) para os três extratos obtidos estão reportados na Tabela 4.

Tabela 4: Rendimentos de extração em massa (%), obtidos a partir da extração das folhas de estêvia por percolação, a frio, em coluna.

Tipo de ESPM	Rendimento (%)
FINT	26,92
FIPT	37,50
FMPT	45,70

ESPM: Extrato de estêvia minimamente processado. FINT: Folha inteira não tratada; FIPT: Folha inteira pré-tratada; FMPT: folha moída pré-tratada. Dados expressos em porcentagem de massa total extraída das folhas utilizadas na extração a frio.

Para as duas extrações realizadas com folhas pré-tratadas os rendimentos mássicos foram maiores. O ESPM obtido da FMPT resultou em um rendimento de 45,70%, demonstrando que a associação do pré tratamento com a extração por percolação sob baixas temperaturas para folha cominuída, permitiu rendimento similar ou superior aos obtidos por métodos convencionais e não convencionais para folhas de estevia da variedade Stevia UEM-13. FORMIGONI et al (2018) alcançaram rendimento de 40%, sob temperatura de 60°C. (CIOTTA et al, 2022) fazendo uso da técnica de percolação semi-contínua com água quente obteve 41%, e (RASPE et al., 2021) reportou rendimento de 41,88%.

A composição glicosídica dos três ESMP obtidos pela secagem do extrato aquoso em spray-dryer de bancada, estão reportados na Tabela 5.

Tabela 5: Teor de glicosídeos de esteviol (pureza), dos ESPM.

Tipos de ESMP			
Glicosídeos (g/100g⁻¹)	FINT	FIPT	FMPT
Glicosídeos totais	26,7 ^a ± 0,17	26,1 ^a ± 0,20	29,7 ^b ± 0,64
Stv	10,8 ^a ± 0,10	10,5 ^a ± 0,04	10,9 ^a ± 0,17
Reb-C	3,2 ^a ± 0,06	3,1 ^a ± 0,05	4,4 ^b ± 0,07
Reb-A	12,7 ^a ± 0,23	12,5 ^a ± 0,16	14,4 ^b ± 0,73

ESPM: Extrato de estêvia minimamente processado. Stv: Esteviosídeo; Reb-C: Rebaudiosídeo-C e Reb-A: Rebaudiosídeo A. FINT: Folha inteira não tratada; FIPT: Folha inteira pré-tratada; FMPT: folha moída pré-tratada. Dados expressos por valor médio ± erro padrão da média. Os extratos foram avaliados quanto à diferença significativa entre eles, pela análise de variância ANOVA e pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância (p < 0,05).

Letras diferentes em uma mesma linha significa que há diferença significativa entre os tratamentos.

Observa-se que o maior teor de glicosídeos foi encontrado no ESMP de folha moída pré-tratada (FMPT), apresentando diferença significativa em relação a ambo ESPM obtidos a partir de folha inteira, com e sem tratamento. O conteúdo de esteviosídeo permaneceu o mesmo para todos os extratos. Sendo assim, as ligeiras diferenças observadas em relação aos teores de glicosídeos para os três extratos, reforça a hipótese de que o pré-tratamento das folhas (FORMIGONI et al., 2018), não interfere de forma expressiva na recuperação de glicosídeos, mas sim em relação a outras classes de compostos, o que pode ser fundamental para a qualidade sensorial e funcional dos ESMP.

A eficiência do processo de extração pode ser monitorada também pela análise dos teores de glicosídeos remanescentes no bagaço da folha extraída.

A Tabela 6 mostra os teores residuais que ficaram nos bagaços (folhas após extração).

Tabela 6: Teor de glicosídeos de esteviol residual, contido nos bagaços gerados após a extração das folhas a frio, por percolação, em coluna de vidro.

Teor de glicosídeos	Bagaços		
	FINT	FIPT	FMPT
Glicosídeos totais (g/100g ⁻¹)	5,1 ^a ± 0,03	2,1 ^b ± 0,05	0,6 ^b ± 0,15
Stv (g/100g ⁻¹)	1,8 ^a ± 0,05	0,8 ^b ± 0,03	0,2 ^b ± 0,05
Reb-C (g/100g ⁻¹)	0,7 ^a ± 0,02	0,2 ^b ± 0,00	0,1 ^b ± 0,01
Reb-A (g/100g ⁻¹)	2,6 ^a ± 0,01	1,1 ^b ± 0,02	0,3 ^b ± 0,09

FINT: Folha inteira não tratada; FIPT: Folha inteira pré-tratada; FMPT: folha moída pré-tratada. Dados expressos por valor médio ± erro padrão da média. Os extratos foram avaliados quanto à diferença significativa entre eles, pela análise de variância ANOVA e pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Letras diferentes em uma mesma linha significa que há diferença significativa entre os tratamentos.

Diferença significativa foi observada para o bagaço da FINT em relação aos teores glicosídicos. Nota-se que para o bagaço da folha moída pré-tratada o residual de glicosídeo foi muito menor em comparação aos de folhas inteiras, demonstrando que a extração foi eficiente em extrair os adoçantes das folhas. Já o bagaço da FINT apresentou um teor total extremamente elevado de glicosídeos totais (5,1%), correlacionado de forma direta com o baixo nível de recuperação de glicosídeos.

Ficou demonstrado que a moagem de folhas de estévia em comparação com as folhas inteiras contribuiu para um maior rendimento mássico, recuperação de glicosídeos e consequentemente menor residual de glicosídeos no bagaço. A análise por meio UHPLC (figura 9) indica o potencial funcional do extrato obtido em função da presença de uma série de compostos fenólicos para os quais existe na literatura uma série de alegações funcionais. A ausência de diterpenos labdanicos é extremamente importante, uma vez que a presença dos mesmos em muitos extratos disponíveis comerciais com altos níveis de pureza está associada a características sensoriais desagradáveis, exigindo etapas de refino e purificação complexas e onerosas

3.4. Análise Colorimétrica

A tabela 7 abaixo, reporta os resultados obtidos pela análise colorimétrica dos ESPM obtidos neste estudo e que foram comparados entre si, em relação aos parâmetros do espaço de cor CIELAB, onde L* = luminosidade; a* = variação entre verde (-a*) e vermelho (+a*); b* = variação entre azul (-b*) e amarelo (+b*); C* = saturação e H° = ângulo HUE denominado, ângulo de tonalidade. As análises realizadas para cada um dos parâmetros foram feitas em triplicata.

Tabela 7: Dados obtidos da análise colorimétrica dos ESPM.

Parâmetro	ESPM		
	FIPT	FMPT	FINT
L*	66,53 ^a ± 0,65	69,17 ^b ± 0,35	74,25 ^b ± 1,90
a*	-1,40 ^a ± 0,13	-1,54 ^a ± 0,05	-0,41 ^b ± 0,19
b*	25,65 ^a ± 0,32	25,20 ^a ± 0,10	23,62 ^b ± 0,15
C*	25,69 ^a ± 0,30	25,24 ^a ± 0,10	23,62 ^b ± 0,15
H°	93,14 ^a ± 0,34	93,48 ^a ± 0,14	91,00 ^b ± 0,47

ESPM: Extrato de estévia minimamente processado. FINT: Folha inteira não tratada; FIPT: Folha inteira pré-tratada; FMPT: folha moída pré-tratada. Dados expressos por valor médio ± erro padrão da média. Os extratos foram avaliados quanto à diferença significativa entre eles, pela análise de variância ANOVA e pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Letras diferentes em uma mesma linha significa que há diferença significativa entre os tratamentos.

A cor dos ESMP obtidos foram comparadas entre si. Houve diferenças entre eles. De modo geral o ESPM obtido da folha inteira não tratada diferiu a 5% de significância para todos os parâmetros avaliados. O mesmo, resultou em um extrato mais claro, com alto valor para L*

= 74,25, em comparação aos de folhas pré-tratadas e diferiu significativamente em relação ao de folha inteira pré-tratada. Para a^* , os três extratos mostraram valores bem baixos, indicando propensão à cor verde. Já para b^* , todos os extratos demonstram tendência à coloração amarelo. A coloração amarela dos extratos pode ser justificada pela presença do pigmento clorofila (a e b), em especial da clorofila b, de cor característica amarela, performando maior solubilidade em solventes polares como etanol, metanol, acetona, água, do que a clorofila a, de coloração verde, cujo aumento da polaridade deve-se à presença do grupo carbonila em sua estrutura química (VON ELBE, 2000).

As ligações não-covalentes presentes entre as moléculas de clorofila são muito instáveis, rompendo-se com facilidade ao utilizarem técnicas como maceração do tecido vegetal, e solventes orgânicos (VON ELBE, 2000). Utilizando o mesmo material de partida, folhas da variedade Stevia UEM-13 (ZORZENON et al., 2019) encontrou clorofila a e b, respectivamente 1,25 e 1,70 mg/g. Resultado muito similar foi reportado por (DA SILVA et al., 2020), que usando a mesma variedade, obteve para clorofila a e b, 1,30 e 1,70 mg/g. O que corrobora com os resultados obtidos, já que os extratos tiveram cor geral com forte tendência ao amarelo, revelando que a técnica de percolação associada ao solvente polar (água), provavelmente extraiu maior quantidade de clorofilas do tipo b, mantendo a integridade dessas moléculas, fornecendo a cor amarelo aos extratos.

A saturação, representada por C^* é designada como a distância radial a partir do centro do espaço, até o ponto da cor, e está correlacionada à concentração do elemento colorante de forma quantitativa, portanto quanto maior seu valor, maior será a percepção da cor pelos nossos olhos, assim, cores mais puras possuem alta saturação, enquanto claras, mais baixas (CIELAB, 1976). Diferindo significativamente o ESPM de folha inteira não tratada (23,62) demonstrou menor saturação em relação aos demais, apresentando coloração com baixa saturação, portanto mais clara, que pode ser explicado pela possível presença em maiores quantidades das clorofilas do tipo b, como já mencionado anteriormente

O ângulo HUE corresponde qualitativamente às definições de cor, e pode variar de 0° a 360° . Graficamente considera-se 0° para vermelho, 90° amarelo, 180° verde e 360° para cor azul. De acordo com o sistema CIELAB 1976, se o ângulo HUE estiver entre 90° a 180° , quanto maior ele for, mais a cor verde o caracteriza e quanto menor, mais amarelo (CIELAB, 1976). Os resultados aqui obtidos indicaram numericamente pouca variação entre as amostras para o ângulo HUE, onde todas foram tendenciosas a faixa amarelo-verde, mais fortemente ao amarelo, sendo o extrato de folha inteira não tratada caracterizado o mais amarelo ($H^\circ = 91,00$), diferindo significativamente dos demais, com leve tendência à cor verde. A diferença entre o extrato de folha inteira (mais claro) para os de folhas pré-tratadas podem estar relacionadas às

maiores concentrações de fenólicos nestes dois últimos, portanto maiores concentrações de clorofila, pigmento este, que confere a coloração amarelada e também, bem como, à presença do flavonóide rutina de cor amarela e que fora identificado neste estudo, mencionado na Tabela 9 (RAMIREZ-RODRIGUES et al., 2011). Estudando extrato aquoso e etanólico (BUNIOWSKA et al., 2017) observou que o extrato aquoso continha maior rendimento de clorofila b, enquanto o etanólico recuperou mais clorofila a, caracterizado o aquoso por ser mais amarelo.

Em seu estudo, (SUSUKI et al., 1976) isolaram o pigmento rutina de folhas e calos de estévia., tal flavonoide têm benefícios associados à aplicações terapêuticas, agindo no fortalecimento de vasos capilares, além de propriedades cardiotônicas (SUSUKI et al., 1976).

3.4. Constituintes fitoquímicos e potencial antioxidante dos ESPM

Os resultados referentes à quantificação dos compostos bioativos estudados no presente trabalho e a capacidade antioxidante em porcentagem, de cada um dos extratos secos obtidos a partir de extração em coluna a frio de folhas de Stevia pré-tratadas e não tratadas, estão discriminados na Tabela 8.

Tabela 8: Tipos de extratos secos (pós), e respectiva quantificação dos bioativos e potencial antioxidante dos mesmos.

Análise	ESPM (folha inteira pré-tratada)	ESPM (folha moída pré-tratada)	ESPM (folha inteira não tratada)
Compostos fenólicos (mg × ET g ⁻¹)	313,30 ^a ± 0,60	275,95 ^b ± 3,45	248,05 ^b ± 1,65
Compostos fenólicos (mg × EAG g ⁻¹)	73,67 ^a ± 0,11	66,75 ^b ± 0,63	61,58 ^b ± 0,30
Flavonoides (mg x EQ g ⁻¹)	100,60 ^a ± 0,45	116,01 ^b ± 0,77	76,16 ^b ± 0,36
ABTS+ (mg EAG g ⁻¹)	60,12 ^a ± 0,00	66,12 ^b ± 0,95	55,86 ^a ± 0,98
DPPH (mg ET g ⁻¹)	219,07 ^a ± 0,92	275,50 ^a ± 2,35	115,57 ^b ± 4,14
DPPH (mg EAG g ⁻¹)	38,59 ^a ± 0,10	44,29 ^a ± 0,50	26,72 ^b ± 0,47
DPPH – (%)	58 ^a ± 0,13	66 ^a ± 0,33	43 ^b ± 0,58

Dados expressos por valor médio ± erro padrão da média. Os extratos foram avaliados quanto à diferença significativa entre eles, pela análise de variância ANOVA e pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância (p < 0,05). Letras diferentes em uma mesma linha significa que há diferença significativa entre os tratamentos. ESMP = extrato de stevia minimamente

processado; ($\text{mg} \times \text{ET g}^{-1}$) = miligrama de equivalente Trolox por grama de extrato); ($\text{mg} \times \text{EAG g}^{-1}$) = miligrama de equivalente de Ácido Gálico por grama de extrato); ($\text{mg} \times \text{EQ g}^{-1}$) = miligrama de equivalente de Quercetina por grama de extrato); (%) – porcentagem de inibição do radical DPPH.

Os compostos fenólicos compõem um grupo de grande relevância funcional e estão muito presentes em nosso dia-a-dia, pois muitos dos odores, sabores e as cores de uma imensa variedade de vegetais e frutas que consumimos, são atribuídos à essa classe de substâncias. Originados do metabolismo secundário das plantas, são divididos em três grupos majoritários: compostos fenólicos, terpenos e alcalóides (SILVA, F. S et al.,2022). São caracterizados por possuírem em sua estrutura química ao menos, um anel aromático em que pelo menos um dos hidrogênios sofre substituição por um grupo hidroxila. Sua síntese pode ocorrer por duas vias metabólicas, via do ácido chiquímico, como também pela via do ácido mevalônico (SILVA, F. S et al.,2022)

A busca por alimentos funcionais que auxiliam no bem estar e ajudam a prevenir enfermidades, promovendo benefícios à saúde, têm ganhado notório interesse frente aos últimos anos, em especial com o advento da pandemia do Coronavírus no ano de 2020. Os benefícios adquiridos por meio do consumo dos glicosídeos de esteviol e sua importância na indústria de alimentos e bebidas podem ser associados também, pela existência dos fenólicos nos extratos de Stevia comercializados, ainda que em menores concentrações (CIULU et al., 2017).

Os extratos em pó obtidos através da secagem do extrato aquoso pelo spray-dryer de bancada no NEPRON, foram quantificados quanto ao teor de fenólicos para padrão Trolox e Ácido Gálico. Os extratos provenientes de folhas pré-tratadas com etanol apresentaram maiores teores de fenólicos totais, para ambos padrões estimados e diferiu significativamente em comparação aos demais. Não foram encontrados até então, dados na literatura que correlacionem a quantificação de fenólicos de extratos de Stevia, obtidos por percolação com água, a baixas temperaturas, como performado no presente estudo. Embora, um estudo recente realizado por pesquisadores do NEPRON ao utilizarem Stevia UEM-13 pré-tratada, alcançaram resultados similares aos obtidos neste trabalho para fenólicos totais, através do método não convencional de extração assistida por ultrassom, utilizando mistura binária de solventes (água/etanol), variando a potência do equipamento, na faixa de 0 – 100 W, em que para folhas sem tratamento o teor encontrado foi de $262,98 \text{ mg} \times \text{EAG g}^{-1}$, enquanto que para folhas pré-tratadas a faixa obtida fora de (0 W – $240,41 \text{ mg} \times \text{EAG g}^{-1}$; 50 W – $258,57 \text{ mg} \times \text{EAG g}^{-1}$ e 100 W – $269,41 \text{ mg} \times \text{EAG g}^{-1}$) (RASPE et al., 2021).

Os extratos obtidos a partir de folhas pré-tratadas, tiveram o maior conteúdo de flavonoides, cuja folha moída resultou no maior conteúdo, dentre os três e diferiu significativamente do extrato seco da folha inteira pré-tratada. As quantidades de flavonoides obtidas neste estudo foram muito superiores às encontradas na literatura, em pesquisas realizadas por outros autores, utilizando extração aquosa das folhas (GAWEŁ-BĘBEN et al., 2015; KIM et al., 2011).

Visando otimizar as condições de extração (YILDIZ-OZTURK; TAG; YESIL-CELIK TAS, 2014) utilizaram o método de extração aquosa subcrítica, e encontraram valores para flavonoides nos extratos obtidos de, 24,27 mg x EQ g⁻¹ e 29,81 mg x EQ g⁻¹, este último para o extrato com maior rendimento. Em um novo estudo (YILDIZ-OZTURK et al., 2015), reportaram flavonoides quantificados em 111,16 e 126,70 mg x EQ g⁻¹, explorando técnicas de extração assistida por ultrassom e micro-ondas, respectivamente. A justificativa para os altos teores de flavonoides encontrados neste estudo, pode estar baseada no fato de que esse tipo de fenólico apresenta solubilidade elevada perante o etanol, elevando a extração dessas substâncias (YILDIZ-OZTURK et al., 2015). Além disso, a área superficial da folha (moída) por ser maior, pode ter contribuído para maximizar o acesso do solvente nas etapas de pré-tratamento, e de extração, enriquecendo o teor de fenólicos no extrato final, levando em consideração que a folha possui uma mistura de fenólicos com polaridades diferentes (RODRIGUES; GUIMARÃES; BOGO, 2021).

Depois de realizadas as análises para detectar o potencial antioxidante dos extratos em pó, obtidos da extração a frio, foram identificados por UHPLC – MS/MS no extrato em pó, da folha moída pré-tratada, 35 compostos, cujo extrato fora o maior de rendimento em extração. Os compostos identificados estão listados na Tabela 9, dos quais 14 deles estão entre fenólicos e flavonoides. A presença dessa variedade de fenólicos e flavonoides auxilia na contribuição geral da atividade antioxidante total dos extratos, em especial os de folhas pré-tratadas que resultaram em maiores quantificações.

Pesquisas indicam uma série de benefícios à saúde, relacionados aos fitoquímicos presentes na estévia que ajudam a minimizar a ação dos radicais livres, como no auxílio à prevenção contra o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, contra alguns tipos de câncer, sendo assim um aditivo alimentar multi benefícios, além dos efeitos anti-diabéticos, anti-obesidade, anti-bacterial (PAREDES-LÓPEZ et al., 2019; GANDHI et al., 2018; SHUKLA et al., 2009; CHE et al., 2016; JAHANGIR CHUGHTAI et al., 2020; AMEER et al., 2020).

Aplicações industriais têm ganho notório interesse, ao passo que materiais ricos em fenólicos tem colaborado para retardar a oxidação lipídica em alimentos, ajudando a preservar

as características sensoriais, na manutenção do shelf-life e no valor nutricional dos alimentos (SHUKLA et al.,2009)

Tabela 9: Identificação de compostos e seus principais parâmetros de identificação do ESMP obtido a frio em coluna a partir de folhas moídas pré-tratadas de *Stevia Rebaudiana Bertoni*.

Family	Compound	Molecular Formula	RT (min)	Adduct	Error	Fragments
Phenolic Compounds/Flavonoids	Catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	7.54	[M-H]	-2.99	333
	Apigenin-7-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	8.17	[M+H]	-4.16	271
	Kaempferol-3-rhamnoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	8.017	[M+H]	-4.16	129
	Luteolin-7-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	7.15	[M+H]	-5.34	287, 449
	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	7.66	[M+H]	-4.95	85,109, 287,303
	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	6.95	[M+H]	-4.58	85,303
	Quercetin 3-O-rhamnoside – Quercetrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	7.15	[M+H]	-5.34	129,303, 613
	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	8.2	[M+H]	-5.57	287
	Kaempferol-3-O-rutinoside – Biorobin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	7.21	[M+H]	-4.54	85, 287
	Kaempferol 3-O-glucoside - Astragalin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	7.15	[M+H]	-5.34	287
Cinnamic acids and derivatives	Caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	7.26	[M+H]	-2.33	163
	Quinic acid	C ₇ H ₁₂ O ₆	1.34	[M+H]	-3.63	127, 147, 193
	1-O-Caffeoylquinic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	6.24	[M+H]	-4.22	135, 145, 163
	5-Caffeoylquinic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	6.15	[M+H]	-4.51	135, 145, 163
	1-5-Dicaffeoylquinic acid – cynarine	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	7.89	[M+H]	-5.41	163, 499
	Chlorogenic acid – 3-Caffeoylquinic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	6.24	[M+H]	-4.22	129, 340
Alcohols and polyols	3-5-Dicapheoylquinic acid	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	8.14	[M+H]	-5.22	163, 499
	3-4-Dicapheoylquinic acid	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	8.08	[M+H]	-4.83	163, 499
Terpenoids – Diterpenoids	Steviol	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	8.84	[M+H]	-3.45	255, 273, 301
	Stevioside	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	8.76	[M+H]	3.10	163,319, 481
	Rebaudioside A	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	8.81	[M+H]	2.58	163, 319, 625
	Rebaudioside B	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	8.76	[M+H]	3.10	145, 163, 319
	Rebaudioside C	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	9.08	[M+H]	-5.36	147, 309, 627
	Rebaudioside D	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	7.93	[M+H]	-4.60	163, 325, 481

	Rebaudioside E	C44H70O23	8.81	[M+H]	3.10	145, 163, 479
	Rebaudioside F	C43H68O22	9	[M+H]	-4.69	163,319,325
	Steviobioside	C32H50O13	8.82	[M+H]	7.15	145, 163, 319
	Dulcoside A	C38H60O17	9.09	[M+H]	3,67	147, 163, 465
Amino acids	L-Isoleucine	C6H13NO2	1.55	[M+H]	-6.81	86
	L-Valine	C5H11NO2	1.08	[M+H]	-7.62	72,118
	L-Phenylalanine	C9H11NO2		[M+H]	-4.21	120, 131, 149
	L-Proline	C5H9NO2	1.04	[M+H]	-7.75	70, 115
	L-Serine	C3H7NO3	0.9	[M+H]	-5.66	88, 106
	L-Threonine	C4H9NO3	0.94	[M+H]	-5.83	74, 102, 119
	L-Glutamine	C5H10N2O3	0.93	[M+H]	-5.44	84, 130

Afim de garantir maior acurácia e confiabilidade na apresentação de resultados sobre a ação antioxidante de matrizes complexas, sendo a *Stevia Rebaudiana Bertoni* uma delas, aconselha-se a reprodução de diferentes ensaios, já que estes diferem em relação ao princípio e condições experimentais.

Para estimar o potencial antioxidante dos extratos estudados, os radicais livres ABTS•+ - 2,2'-azino-bis (3-etilbenzoatiazolina-6-ácido sulfônico) e o DPPH• (2,2 – difenil-1-pieril-hidrazila) foram utilizados e são os mais comuns de serem aplicados para tal mensuração. As análises tem como base o sequestro desses radicais livres pelo composto antioxidante presente no meio.

A metodologia do radical ABTS•+, possibilita medir a atividade de compostos de natureza tanto lipofílica, quanto hidrofílica, pois o radical pode ser capturado por estas duas classes de antioxidantes (RUFINO et al., 2007). Neste método, mensura-se atividade dos extratos de acordo com o descoramento da solução contendo o radical ABTS•+, com auxílio da espectrometria (RUFINO et al., 2007). O extrato da folha moída pré-tratada apresentou maior atividade antioxidante (66,12 mg EAG g⁻¹) e diferiu significativamente, aos de folhas inteiras. Resultado similar foi obtido por (PHANSAWAN; POUNGBANGPHO, 2007). Possivelmente a capacidade antioxidante maior para o extrato da folha moída em comparação aos outros tratamentos pode ter sido, devido à utilização da variedade (*Stevia UEM-13*) empregada, ademais com, o pré-tratamento das folhas realizado antes da extração, além de poder ter sido favorecido pelo tamanho das partículas das folha moídas, tendo esta maior área de acesso ao solvente, promovendo um aumento na extração de fenólicos como mostram os dados, e que consequentemente refletiu no aumento da ação antioxidante para este extrato, no entanto, o tamanho do particulado não deve ser considerado um fator determinante de influência nos processos de extração (GALANAKIS, 2013), mas sim o conjunto de variáveis como temperatura, polaridade, tipo de solvente, tipo de matriz vegetal, método de extração, (GIACOMETTI et al., 2018)

O método do DPPH• é considerado preciso, simples, de alta sensibilidade capaz de detectar compostos naturais em baixas concentração (LEMUS-MONDACA et al., 2012), fácil reprodução e econômico, já que uma vantagem deste método em relação ao ABTS+• é que o radical livre é disponibilizado comercialmente, não tendo necessidade de gerar o radical, como no caso do ABTS+•, o que simplifica seu uso (OLIVEIRA, 2015). E tem como fundamento a redução do radical DPPH pela remoção de H• do antioxidante em estudo, fazendo com que a absorbância diminua de acordo com sua eliminação, alterando a cor da mistura de roxo para amarelo, proporcionalmente à concentração e ao potencial antioxidante da amostra (BRAND-WILLIAMS, 1995; OLIVEIRA, 2015).

Os resultados obtidos através da técnica do sequestro do radical DPPH•, seguiram a mesma tendência à do ensaio ABTS+•, ambos extratos obtidos a partir da folha pré-tratada com etanol absoluto, resultaram em maiores atividades antioxidantes, e pode ser explicado devido às maiores quantidades de fenólicos nesses extratos. Expresso por dois padrões, (Trolox e Ácido gálico) e % de inibição, o extrato da folha inteira não tratada mostrou estatisticamente diferença significativa em relação aos demais. Para ESPM de folha moída a porcentagem de inibição foi de 66%, ou seja, na concentração de 1 mg/mL, 66% dos radicais livres serão inibidos. Enquanto para o ESPM da folha inteira sem tratamento, o efeito foi de apenas 43%, e que pode ser justificado devido a utilização de folhas inteiras, juntamente com a baixa temperatura da água, estes fatores, podem não ter sido suficientes romper de forma efetiva a membrana plasmática, a qual isola os componentes da célula vegetal, o que pode ter impactou na transferência de massa dos constituintes solúveis para o solvente e do solvente aos materiais celulares (GIACOMETTI et al., 2018).

Os resultados encontrados neste trabalho, para os três extratos obtidos, estão de acordo com outras pesquisas da literatura. Para extrato etanólico (AHMAD et al., 2010), reportou inibição de 67,07%,. Já no extrato aquoso da folha (SHUKLA et al., 2011) obteve 64,26%. Resultado semelhante ao encontrado para o extrato seco, obtido da folha moída pré-tratada neste estudo.

Ao utilizar Stevia UEM-13, (MILANI et al., 2017) teve como objetivo determinar o potencial antioxidante da variedade Stevia UEM-13, e encontrou elevadas porcentagens de inibição, principalmente nas frações metanólica (93,5%) e de etil acetato (97,32%), já no extrato aquoso o valor reportado foi de (42,26%), utilizando extratos obtidos a partir de folhas moídas Posteriormente (ZORZENON et al., 2019) também reportou porcentagem de 42,26% para extrato aquoso, e 85,6% para etanólico, a partir da mesma variedade. Resultado semelhante ao obtido nesta pesquisa, para extrato de folha inteira sem tratamento (43%). Investigando a atividade antioxidante a partir de diferentes partes da planta stevia de outra cultivar,

(TADHANI; PATEL; SUBHASH, 2007) usou folhas de estévia e caule, moídos e encontraram inibição de 39,86% no extrato aquoso das folhas e 55,42% no extrato preparado a partir do caule, enquanto para extrato metanólico de folha e caule, reportaram respectivamente 33,17% e 56,82%. Em estudo similar (MUANDA et al., 2010) realizou extração metanólica, seguida de aquosa das folhas, porém obteve percentual de inibição significativo de 96,91% no extrato final, muito maiores que os obtidos aqui. Diferenças encontradas podem estar atribuídas ao tipo variedade utilizadas, métodos de extração, tipo do solvente, entre outros fatores que podem influenciar na capacidade de extração total em massa das folhas.

O pré-tratamento das folhas de estévia com etanol absoluto, antes de realizar a extração por percolação a frio, demonstrou ser uma estratégia eficiente para otimizar a extração de componentes bioativos, resultando em maiores teores de fenólicos, bem como da capacidade antioxidantes dos extratos obtidos das folhas pré-tratadas, quando comparadas à folha inteira sem pré-tratamento. A menor área superficial da folha inteira, pode ter influenciado de modo a dificultar o acesso do solvente aos constituintes bioativos da planta responsáveis pela atividade antioxidante, já que o extrato obtido da extração de folhas inteiras teve menor ação antioxidante. Posto isto, podemos considerar que o método de extração a baixas temperaturas associado ao pré-tratamento das folhas de estévia cominuída atuaram de forma sinérgica, resultando em extratos minimamente processados com ação antioxidante, reduzido sabor residual amargo e herbáceo, apresentando potencial de ser empregado diretamente como agente edulcorante de bebidas e alimentos diversos, como o iogurte.

Avaliação sensorial das formulações

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a aceitação de um iogurte natural adoçado com diferentes tipos de extratos de estévia, obtidos a frio, a partir de folhas pré-tratadas e não tratadas. Os resultados da análise sensorial aplicada estão reportados na Tabela 10. O teste demonstrou estatisticamente que não houve diferença significativa em relação aos quesitos avaliados, nem diferença entre as médias obtidas referente aos três extratos investigados.

Estudos sensoriais foram desenvolvidos por pesquisadores do NEPRON, entre eles, o desenvolvimento de geléias dietéticas, bebidas à base de soja sabor uva e pêssego adoçadas com Rebaudiosídeo-A, barra de cereal adoçada com folhas pré-tratadas, *whey protein* concentrado adoçado com Reb-A (DE CARVALHO et al., 2013; NALESSO-LEÃO et al., 2020; DA SILVA et al., 2020; MILANI et al., 2016). No entanto, este trabalho é pioneiro no grupo em utilizar extração a frio em coluna a temperatura muito baixa, para obtenção de extratos de estévia minimamente processados, bem como sua aplicação em alimentos.

Tabela 10: Atributos analisados na análise sensorial realizada com iogurte natural adoçado com os ESPM.

Aspecto avaliado	Amostras		
	Iogurte + ESMP (FMPT)	Iogurte + ESPM (FIPT)	Iogurte + ESPM (FINT)
Aparência	8,0 ^a ± 0,39	8,0 ^a ± 0,37	8,15 ^a ± 0,27
Dulçor	7,38 ^a ± 0,24	7,30 ^a ± 0,45	7,0 ^a ± 0,39
Aroma	8,30 ^a ± 0,25	8,23 ^a ± 0,29	7,92 ^a ± 0,36
Sabor residual	2,15 ^a ± 0,33	2,07 ^a ± 0,28	2,23 ^a ± 0,23
Intenção de compra	3,69 ^a ± 0,23	3,84 ^a ± 0,22	3,69 ^a ± 0,23

Dados expressos por valor médio ± erro padrão da média. Os extratos foram avaliados quanto à diferença significativa entre eles, pela análise de variância ANOVA e pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Letras diferentes em uma mesma linha significa que há diferença significativa entre os tratamentos.

As três formulações de iogurte foram preparadas a partir da mesma marca de iogurte, sob condições refrigeradas. A coloração levemente amarelo claro dos extratos não influenciou o aspecto visual final, assemelhando-se à cor do produto natural. A concentração de 3% utilizada performou boa solubilidade, mesmo o iogurte estando a baixas temperaturas e não ocasionou a formação de grânulos de extrato no produto, possibilitando um aspecto de homogeneidade, o que pode ter contribuído para uma boa aceitação da aparência geral do produto, onde todas as amostras corresponderam a “gostei muito” e apenas ESPM de folha inteira sem tratamento diferiu numericamente das demais. Ao avaliarem o dulçor, “gostei moderadamente” fora atribuído à todas amostras. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que, dentro do grupo de painelistas participantes, podem existir consumidores que tenham maior preferência por gostos mais azedos, o que neste caso é sinalizado pelo pH ácido do iogurte. Isto pode ter causado um leve nível de insatisfação para este tipo de consumidor, devido ao gosto doce incorporado ao iogurte. Preferências por gostos diferentes culminam em características muito pessoais e estas, podem ser justificadas pelas pontuações, que variaram de 1 a 9 na escala hedônica.

O quesito aroma obteve grande aceitação pelos consumidores, onde para todas as amostras, os iogurtes adoçados de extratos a frio corresponderam a “gostei muito”. A concentração de 3% não foi suficiente para provocar alterações olfativas de modo a gerar o odor “herbáceo” característico das folhas de estévia, mantendo o aroma praticamente original ao iogurte natural sem adição dos extratos. Portanto, em relação ao aroma, o mesmo fora

favorecido muito provavelmente pela baixa concentração adicionada às amostras, pois os resultados demonstram que as pequenas quantidades dosadas nas formulações, podem ter influenciado positivamente para o não evidenciamento do odor herbáceo, ainda mais por se tratar de um extrato bruto.

Quanto ao sabor residual, as duas amostras adoçadas com ESPM de folhas pré-tratadas tiveram notas numericamente um pouco maiores, possivelmente por conta dos extratos apresentarem maiores quantidades de compostos fenólicos, representados pelos flavonoides, em especial pelos derivados de ácido caféico, como rosmarínico, quinico e clorogênicos, todos eles identificados por UHPLC-QTOF-MS/MS, neste trabalho, além da existência de outros compostos, mencionados na Tabela 9. Os painelistas consideraram o aspecto de sabor residual das amostras como “nem muito e nem pouco sabor residual”. Um bom resultado, já que o amargor residual que se mostra bastante característico dos adoçantes de estévia, não fora acentuado para nenhuma das amostras adoçadas com ESPM obtidos a frio.

Em trabalho parecido, extrato a frio obtido também por metodologia de (KUTOWY et al., 1999), os pesquisadores (NARAYANAN et al., 2014) adoçaram um iogurte sabor baunilha com 4% de extrato aquoso a frio e dados do teste sensorial aplicado demonstraram que os adoçantes influenciaram principalmente na percepção da acidez e doçura, de modo geral não impactaram na cor e no flavor, porém não tiveram boa aceitação pelo quadro de provadores.

Portanto, supostamente a associação do pré-tratamento das folhas (FORMIGONI et al., 2018) com a técnica técnica convencional de extração (percolação), utilizando solvente (água) a baixas temperaturas, podem ter auxiliado a melhorar o perfil sensorial dos extratos obtidos neste trabalho, minimizando a extração de alguns classes de substâncias que conferem amargor, como as esterebinas, austroinulina, giberelinas, janol, não foram detectados no ESPM da folha moída pré-tratada, por UHPLC o que conferiu mais qualidade sensorial ao extrato e baixo residual amargo

A intenção de compra para as amostras de iogurte adoçadas com os ESPM teve aceitação geral de “provavelmente compraria”. Tais resultados indicaram a boa aceitabilidade pelos provadores, com alta intenção de compra do produto, portanto os ESPM podem ser considerados uma ótima opção de adoçantes naturais, prontos para serem adicionados em bebidas fermentadas como iogurtes, sem comprometer negativamente seus atributos sensoriais, além de fornecer funcionalidade ao alimento, devido ao conteúdo de bioativos presentes nos extratos.

5. Conclusões

Conclui-se a extração por percolação em coluna, sob baixas temperaturas, de folhas da variedade stevia UEM-13, permite a obtenção de extratos de stevia minimamente processados funcionais, tendo como glicosídeo majoritário o rebaudiosídeo-A, rico em compostos antioxidantes e isento de diterpenos ladanínicos, os quais podem ser empregados como adoçantes naturais e funcionais na concentração de 3% para adoçar iogurte apresentando boa aceitabilidade e nível de intenção de compra. Os resultados obtidos demonstram que o método convencional de extração a partir de folhas pré-tratadas, constitui-se em uma alternativa simples e barata aos métodos não convencionais, permitindo de forma seletiva a recuperação de alto níveis de glicosídeos e compostos fenólicos, com potencial de ser empregado na formulação de bebidas e alimentos como adoçante natural e funcional, com excelentes propriedades sensoriais

6. Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

7. Conflito de interesses

Os autores declararam que não há conflito de interesses.

8. Referências

- AHMAD, J. et al. Stevia rebaudiana Bertoni.: an updated review of its health benefits, industrial applications and safety. **Trends in Food Science and Technology**, v. 100, n. April, p. 177–189, 2020.
- ASKARI, M. et al. Ultra-processed food and the risk of overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **International Journal of Obesity**, v. 44, n. 10, p. 2080–2091, 2020.
- BAKER, P. et al. Ultra-processed foods and the nutrition transition: Global, regional and national trends, food systems transformations and political economy drivers. **Obesity Reviews**, v. 21, n. 12, p. 1–22, 2020.
- BIN SAHARUDIN, A. M. et al. Acceptance of stevia as a sugar substitute and its determinants among health educated individuals. **Current Research in Nutrition and Food Science**, v. 8, n. 1, p. 226–237, 2020.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel – Wissenschaft und -Technologie**, v. 22, p. 25–30, 1995.
- BUNIOWSKA, M. et al. Bioaccessibility of bioactive compounds after non-thermal processing of an exotic fruit juice blend sweetened with Stevia rebaudiana. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1834–1842, 2017.
- BURSAC KOVAČEVIĆ, D. et al. Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from Stevia rebaudiana Bertoni leaves: A review. **Food Chemistry**, v. 268, n. June, p. 513–521, 2018.
- CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. High-pressure processing of fruit juice mixture sweetened with Stevia rebaudiana Bertoni: Optimal retention of physical and nutritional quality. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 18, p. 48–56, 2013.
- CIULU, M. et al. Evaluation of new extraction approaches to obtain phenolic compound-rich extracts from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 108, n. June, p. 106–112, 2017.
- CIOTTA, S. R. et al. Extraction of sweeteners from Stevia rebaudiana by semicontinuous percolation of untreated leaves and leaves pretreated with ethanol. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 3, p. e16303, 1 mar. 2022.
- DA SILVA, S. B. et al. Development of diet cereal bar sweetened with stevia leaves pre-treated with ethanol. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, p. 894–901, 2020.
- DE CARVALHO, A. C. G. et al. Evaluation of the potential use of rebaudioside-A as sweetener for diet jam. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 3, p. 555–560, 2013.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry, Washington-DC**, v. 28, n. 3, p.350–356, 1956.
- FORMIGONI, M. et al. Pretreatment with ethanol as an alternative to improve steviol glycosides extraction and purification from a new variety of stevia. **Food Chemistry**, v. 241, n. September 2017, p. 452–459, 2018.
- GALANAKIS, C.M **Steviol glycosides production, properties, and applications**. Conventional extraction techniques, v. 53, 2020.
- GANDHI, S. et al. Natural sweeteners: Health benefits of stevia. **Foods and Raw Materials**, v. 6, n. 2, p. 392–402, 2018.
- GAWEL-BĘBEN, K. et al. Stevia rebaudiana Bert. leaf extracts as a multifunctional source of natural antioxidants. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5468–5486, 2015.
- GIACOMETTI, J. et al. Extraction of bioactive compounds and essential oils from mediterranean herbs by conventional and green innovative techniques: A review. **Food Research International**, v. 113, n. March, p. 245–262, 2018.

- HALL, K. D. et al. **Ultra-Processed Diets Cause Excess Calorie Intake and Weight Gain: An Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake.** *Cell Metabolism*, v. 30, n. 1, p. 67- 77, 2019.
- HAZIRAH, A.R. et al. **Total phenolic content and antioxidant activities of Corchorus capsularis and Stevia rebaudiana extracts.** *The International Journal of medicine and Sciences* 2(1): 41-48, 2017.
- JAHANGIR CHUGHTAI, M. F. et al. Nutritional and therapeutic perspectives of Stevia rebaudiana as emerging sweetener; a way forward for sweetener industry. **CYTA - Journal of Food**, v. 18, n. 1, p. 164–177, 2020.
- JIA, Z; TANG, M; WU, J. **The determination of flavonoid contentes in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals.** *Food Chemistry*, 64, 555–55, 1999.
- KALAIARASAN, M.; MIMI SAKINAH, A. Determination of Factors Affecting Extraction of Rebaudioside A & Stevioside from Stevia Leaves. **International Journal of Engineering Technology And Sciences (IJETS)**, v. 6, n. 1, p. 120–130, 2016.
- KIM, I. S. et al. The antioxidant activity and the bioactive compound content of Stevia rebaudiana water extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 5, p. 1328–1332, 2011.
- KUTOWY, et al. **Extraction of sweet compounds from Stevia rebaudiana Bertoni, US Patent No. 5972120**, 1999.
- LAMY, E. et al. Changes in food behavior during the first lockdown of COVID-19 pandemic: A multi-country study about changes in eating habits, motivations, and food-related behaviors. **Food Quality and Preference**, v. 99, n. January, 2022.
- LEMUS-MONDACA, R. et al. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1121–1132, 2012.
- LLANAJ, E.; HANLEY-COOK, G. T. **Adherence to Healthy and Sustainable Diets Is Not Differentiated by Cost, but Rather Source of Foods among Young Adults in Albania.** *British Journal of Nutrition*, n. 23, p. 1–9, 2020.
- LIU, Y. et al. Purification of the mother liquor sugar from industrial stevia production through one-step adsorption by non-polar macroporous resin. **Food Chemistry**, v. 274, n. August 2018, p. 337–344, 2019.
- MARSOLA, C. DE M. et al. Perceptions of risk and benefit of different foods consumed in Brazil and the optimism about chronic diseases. **Food Research International**, v. 143, n. March, p. 110227, 2021.
- MARTINS, P. M. et al. Green extraction of glycosides from Stevia rebaudiana (Bert.) with low solvent consumption: A desirability approach. **Resource-Efficient Technologies**, v. 2, n. 4, p. 247–253, 2016.
- MILANI, P. G. et al. Functional properties and sensory testing of whey protein concentrate sweetened with rebaudioside A. **Revista de Nutricao**, v. 29, n. 1, p. 125–137, 2016.
- MILANI, P. G. et al. New seminal variety of Stevia rebaudiana: Obtaining fractions with high antioxidant potential of leaves. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 89, n. 3, p. 1841–1850, 2017.
- MUANDA, F. et al. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. **LWT – Food Science and Technology**, 2010.
- MURUGESH, C. S.; RASTOGI, N. K.; SUBRAMANIAN, R. Athermal extraction of green tea: Optimisation and kinetics of extraction of polyphenolic compounds. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 50, n. May, p. 207–216, 2018.
- MUTHUSAMY et al. Investigation of factors affecting extraction of rebaudioside A & stevioside from Stevia leaves. **Int. J. Eng. Technol. Science**, V.6, p.120-130, 2019.
- NALESSO-LEÃO, C. C. F. et al. Substituting sucralose with rebaudioside a in soy foods: Equivalent sweetness, physicochemical analysis, microbiological assessment and acceptance test. **Food Science and Technology**, v. 40, n. December, p. 410–414, 2020.

- NARAYANAN, P. et al. Use of just-about-right scales and penalty analysis to determine appropriate concentrations of stevia sweeteners for vanilla yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 6, p. 3262–3272, 2014.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph•: Estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015.
- PAGLIAI, G. et al. Consumption of ultra-processed foods and health status: A systematic review and meta-Analysis. *British Journal of Nutrition*, 125(3), p.308–318, 2021.
- PAYZANT, J.D. et al. **Method of extracting selected sweet glycosides from the Stevia rebaudiana plant**. US Patent 5,962,678,1998.
- PAREDES-LÓPEZ, D. M.; ROBLES-HUAYNATE, R. A.; CARRIÓN-MOLINA, M. E. Effect of stevia rebaudiana bertonni leaves powder on lipid profiles and productive parameters of laying hens. **Scientia Agropecuaria**, v. 10, n. 2, p. 275–282, 2019.
- PHANSAWAN, B.; POUNGBANGPHO, S. Antioxidant capacities of Pueraria mirifica, Stevia rebaudiana Bertoni, Curcuma longa Linn., Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees. and Cassia alata Linn. for the development of dietary supplement. **Kasetsart Journal - Natural Science**, v. 41, n. 3, p. 548–554, 2007.
- PIZZI, A. Advanced wood adhesives technology. **New York: Marcell Dekker**, p.289. 1994.
- RASPE, D. T. et al. Ultrasound-assisted extraction of compounds from Stevia leaf pretreated with ethanol. **Industrial Crops and Products**, v. 172, n. September, p. 1–9, 2021.
- RICO-CAMPÀ, A. et al. Association between consumption of ultra-processed foods and all cause mortality: SUN prospective cohort study. **The BMJ**, v. 365, 2019.
- RUFINO, et al. [Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS•+](#). **Comunicado técnico online**, v.128, 2007.
- RUIZ, J. C. R., & Campos, M. R. S. Development of nopal-pineapple marmalade formulated with stevia aqueous extract: Effect on physicochemical properties, inhibition of α -amylase, and glycemic response. **Nutricion Hospitalaria**, 36(5), 1081–1086, 2019.
- SAHIN, S.; SUMNU, S. G. **Physical properties of foods**. Springer: New York, p.272, 2006.
<http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30808-3>
- SANTOS, F. S. et al. **Processamento de alimentos e fatores de risco cardiometabólicos: revisão sistemática**. *Revista de Saúde Pública*, v. 54, n. 70, p. 1–15, 2020.
- SHUKLA, A. et al. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert., **Food and Chemical Toxicology**, n. 47, p. 2338–2343, 2009.
- SHUKLA, S et al. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. **Exp. Toxicol. Pathology**, n. 64, p. 807–811, 2012.
- SILVA, F. S et al. **Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review**. *Microchemical Journal*, v. 177, January, 2022.
- SOUFI, S. et al. Steviol glycosides targeted analysis in leaves of Stevia rebaudiana (Bertoni) from plants cultivated under chilling stress conditions. **Food Chemistry**, v. 190, p. 572–580, 2016.
- SROUR, B. et al. Ultra-processed food intake and risk of cardiovascular disease: **Prospective cohort study (NutriNet-Santé)**. *The BMJ*, v. 365, 2019.
- SUSUKI, H.; IKEDA, T.; MATSUMOTO, T. & NOGUSHI, M., 1976 “**Isolation and Identification of Rutin from Culture Cells of Stevia rebaudiana Bertoni**” *Agric. Biol. Chem.*, n. 40, v. 4, pp. 819-820.

TADHANI, M. B.; PATEL, V. H.; SUBHASH, R. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3–4, p. 323–329, 2007.

VON ELBE J.H. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Wisconsin - Madison, 2000. Cap.10, p.782-799.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Evaluation of certain food additives. In World Health Organization technical report series (Vol. 928).**

<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259483/9789241210164-eng.pdf#page=79>, 2017.

YILMAZ, F. M. et al. Steviol glycosides and polyphenols extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves using maceration, microwave-, and ultrasound-assisted techniques. **Separation Science and Technology (Philadelphia)**, v. 56, n. 5, p. 936–948, 2021.

ZENG, J et al. Antioxidant abilities, phenolics and flavonoids contents in the ethanolic extracts of the stems and leaves of different *Stevia rebaudiana* Bert. lines. **Sugar Tech**, 15, p. 209–213, 2013.

ZORZENON, M.R.et al. As Ciências Exatas e da Terra e a Interface com vários Saberes: **Estudo Fitoquímico de clones de elite da Stevia**. Editora Atena. Cap. 11, p. 93-99, 2019.

Nome:

Idade:

Sexo: ()M ()F

Você está recebendo amostras codificadas de iogurte natural adoçadas com extratos de estévia minimamente processados (ESPM).

Avalie cada uma das amostras e utilize a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou da amostra. Após degustar uma amostra, beba um pouco de água para que não ocorra interferência na percepção sensorial entre elas.

Código da amostra: _____

- 9 – gostei extremamente
- 8 – gostei muito
- 7 – gostei moderadamente
- 6 – gostei ligeiramente
- 5 – nem gostei / nem desgostei
- 4 – desgostei ligeiramente
- 3 – desgostei moderadamente
- 2 – desgostei muito
- 1 – desgostei extremamente

Código da amostra				
Características avaliadas	Nota	Nota	Nota	Nota
Aparência				
Dulçor				
Aroma				

Em relação às amostras avaliadas, demonstre sua percepção sensorial quanto ao atributo abaixo:

- 3 – Nenhum sabor residual amargo
- 2 – Nem muito e nem pouco sabor residual amargo
- 1 – Pouco sabor residual amargo
- 0 - Muito sabor residual amargo

Código da amostra	Sabor residual amargo (Nota)

Em relação à intenção de compra das amostras provadas, qual sua atitude:

- 5 – Certamente compraria
- 4 – Provavelmente compraria
- 3 – Talvez compraria
- 2 – Provavelmente não compraria
- 1 – Certamente não compraria

Código da amostra	Intenção de compra (Nota)