

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

THAINARA CONEGLIAN

**CAULES DE *STEVIA REBAUDIANA* COMO FONTE DE
OBTENÇÃO DE UM EXTRATO COM ALTO TEOR ANTIOXIDANTE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2019

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

THAINARA CONEGLIAN

**CAULES DE *STEVIA REBAUDIANA* COMO FONTE DE
OBTENÇÃO DE UM EXTRATO COM ALTO TEOR ANTIOXIDANTE**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso II, do Curso Superior de Engenharia de Alimentos, do Departamento Acadêmico de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Campo Mourão, como requisito parcial para obtenção do título de Engenheira de Alimentos.

Orientador: Prof. Msc. Maysa Formigoni

CAMPO MOURÃO

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

CAULES DE *STEVIA REBAUDIANA* COMO FONTE DE OBTENÇÃO DE UM EXTRATO COM ALTO TEOR ANTIOXIDANTE

THAINARA CONEGLIAN

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado em 24 de novembro de 2019 como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Msc. Maysa Formigoni
Profª Orientadora

Profª Drª Leila Larisa Medeiros Marques
Banca examinadora

Profª Drª Adriana Droval
Banca examinadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a minha família e aos
amigos que fizeram parte desta
caminhada.

RESUMO

CONEGLIAN, Thainara. **Caules de *Stevia rebaudiana* como fonte de obtenção de um extrato com alto teor antioxidante**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológico Federal do Paraná. Campo Mourão, 2019.

A estévia tem sido usada desde os tempos antigos para vários fins em todo o mundo. Durante séculos, as tribos Guarani do Paraguai e do Brasil usaram espécies de estévia como adoçante em erva-mate e chás medicinais para o tratamento de azias e outras doenças pois há na composição da planta uma mistura heterogênea de compostos já identificados. Estes compostos, além da doçura também podem oferecer benefícios terapêuticos, uma vez que apresentam efeitos anti-hiperglicêmicos, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, anti-tumorais, antidiarréicos, diuréticos e imunomoduladores. Embora o caule de estévia possua um teor inferior de glicosídeos de esteviol quando comparado com as folhas, pode ser uma fonte de fitoquímicos com capacidade antioxidantes e antimicrobiana. Desta forma este estudo buscou analisar a capacidade antioxidante, compostos fenólicos e flavonoides presentes no extrato hidroalcolico do caule de estévia em um extrato obtido por meio de planejamento experimental composto no ponto central (3^2) variando concentração de solvente (etanol:água) teor de material vegetal usando como variável de resposta o rendimento de extração em massa e a porcentagem de atividade antioxidante. Observou-se por meio do planejamento e tratamento dos dados que quanto maior a concentração de água no solvente, melhor o rendimento de extração em massa, no entanto, o contrário se aplica ao teor de antioxidantes, que teve seu máximo na proporção etanol:água (90:10) e 1:5 p/v em relação ao material vegetal. Desta maneira, o extrato obtido com a otimização dos dados, apresentou 76,52% de inibição da atividade antioxidante; 4,65 mgEAG/mL de compostos fenólicos e 1,33 mgEQ/mL de flavonoides.

Palavras-chave: resíduos, caules de estévia, extração hidroalcolica, atividade antioxidante.

ABSTRACT

CONEGLIAN, Thainara. **Caules de *Stevia rebaudiana* como fonte de obtenção de um extrato com alto teor antioxidante.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológico Federal do Paraná. Campo Mourão, 2019.

Stevia has been used since ancient times for various purposes around the world. For centuries, the Guarani tribes of Paraguay and Brazil have used stevia species as a sweetener in yerba mate and medicinal teas for the treatment of heartburn and other diseases as there is a heterogeneous mixture of compounds already identified in the plant composition. These compounds, in addition to sweetness, may also offer therapeutic benefits as they have antihyperglycemic, antihypertensive, antiinflammatory, anti-tumor, antidiarrheal, diuretic and immunomodulatory effects. Although stevia stem has a lower steviol glycoside content when compared to leaves, it can be a source of antioxidant and antimicrobial phytochemicals. Thus this study sought to analyze the antioxidant capacity, phenolic compounds and flavonoids present in the stevia stem hydroalcolic extract in an extract obtained through experimental design composed at the central point (3^2) varying solvent concentration (ethanol: water) material content using as a response variable the mass extraction yield and the percentage of antioxidant activity. It was observed through the planning and treatment of the data that the higher the water concentration in the solvent, the better the mass extraction yield, however, the opposite applies to the antioxidant content, which had its maximum in the ethanol: water ratio. (90:10) and 1: 5 w / v relative to plant material. Thus, the extract obtained with data optimization showed 76.52% inhibition of antioxidant activity; 4.65 mgEAG / mL phenolic compounds and 1.33 mgEQ / mL flavonoids.

Keywords: residues, stevia stems, hidroalcolic extraction, antioxidant activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição centesimal das folhas de estévia em diferentes estudos (g/100g).....	15
Tabela 2: Composição de aminoácidos nas folhas de estévia.....	16
Tabela 3: Composição de minerais (mg/100g) e ácidos graxos (g/100g) nas folhas de estévia.....	16
Tabela 4: Planejamento experimental (3^2).	23
Tabela 5: Delineamento experimental do experimento fatorial completo com a distribuição das variáveis estudadas e valores das variáveis de resposta para todas as extrações.....	26
Tabela 6: Análises do extrato otimizado de caules de estévia.....	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Coeficientes do modelo de regressão para o rendimento em massa (g) da extração do caule de estévia.....	27
Figura 2: Gráfico de contorno para a variável rendimento em massa do extrato de caule de estévia.	28
Figura 3: Valores experimentais x valores preditos para a atividade antioxidante	29
Figura 4: Gráfico de contorno para a variável atividade antioxidante do extrato de caule de estévia.	30
Figura 5: Gráfico de influência da concentração da solução etanol:água e da relação peso:volume na obtenção do rendimento em massa (g) e da atividade antioxidante (%).	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. <i>Objetivo geral</i>	13
2.2. <i>Objetivo específico.....</i>	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1. <i>Histórico da planta.....</i>	14
3.2. <i>Características da planta.....</i>	14
3.3. <i>Composição da planta.....</i>	15
3.3.1. Carboidratos	16
3.3.2. Proteínas	17
3.3.3. Minerais	17
3.3.4. Vitaminas.....	18
3.3.5. Glicosídeos e outros constituintes	18
3.4. <i>Atividade biológica dos compostos</i>	19
3.4.1. Atividade antioxidante.....	19
3.4.2. Atividade antidiabética.....	20
3.4.3. Atividade anti-hipertensiva.....	20
3.4.4. Atividade anti-inflamatória e anticancerígena	21
3.5. <i>Caule como resíduo</i>	21
3.6. <i>Métodos de extração.....</i>	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. <i>Seleção da planta.....</i>	23
4.2. <i>Método de extração.....</i>	23
4.3. <i>Atividade antioxidante</i>	24
4.4. <i>Compostos fenólicos</i>	24
4.5. <i>Flavonoides.....</i>	25

4.6.	<i>Análise estatística</i>	25
4.7.	<i>Obtenção do extrato otimizado</i>	25
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
5.1.	<i>Análise estatística do planejamento experimental</i>	26
5.1.1.	<i>Análise do rendimento em massa (g)</i>	27
5.1.2.	<i>Análise de atividade antioxidante (%)</i>	28
5.1.3.	<i>Análise do ponto ótimo</i>	30
5.2.	<i>Extrato otimizado</i>	31
6.	CONCLUSÃO	33
7.	REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE	38
	<i>Apêndice I – ANOVA para rendimento em massa (g)</i>	38
	<i>Apêndice II – ANOVA para atividade antioxidante (%)</i>	39

1. INTRODUÇÃO

O processamento de produtos de origem vegetal gera quantidades substanciais de resíduos/subprodutos. Estes, podem ser uma fonte abundante de polifenóis com capacidade antioxidante. Atualmente, estes resíduos são frequentemente descartados a um custo para o fabricante. Portanto, sua utilização como fonte de polifenóis de baixo custo pode ser um benefício econômico considerável para os processadores de alimentos (WIJNGAARD; RÖßLE; BRUNTON, 2009).

A *Stevia rebaudiana* tem sido usada desde os tempos antigos para vários fins em todo o mundo. Durante séculos, as tribos Guarani do Paraguai e do Brasil usaram espécies de estévia como adoçante em erva-mate e chás medicinais para o tratamento de azias e outras doenças, embora os relatos oficiais e emprego como fonte de obtenção de edulcorantes de origem natural tenha se desenvolvido apenas em 1900 (LEMUS-MONDACA et al., 2011).

Além dos glicosídeos de esteviol, há na composição da planta uma mistura heterogênea de compostos já identificados, dentre eles compostos fenólicos, terpenóides, ácidos graxos, vitaminas, minerais, dentre outros. Devido a essa composição, é possível ver que em seus extratos, além da doçura, o esteviosídeo juntamente com compostos relacionados que incluem rebaudiosídeo A e C, esteviol e isosteviol, também podem oferecer benefícios terapêuticos, uma vez que apresentam efeitos anti-hiperglicêmicos, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, anti-tumorais, antidiarréicos, diuréticos e imunomoduladores (CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009).

As folhas de estévia foram extensamente estudadas nos últimos 100 anos. No entanto, outros componentes da planta como caules, ramos, folhas e sementes não possuem o mesmo destaque. Embora possua um teor inferior de glicosídeos de esteviol quando comparado com as folhas, os caules podem ser uma fonte de fitoquímicos com capacidade antioxidantes e antimicrobiana, e devido ao fato de em alguns casos não ser empregado no processo de extração, caracteriza-se como um subproduto de valor agregado (ABOU-ARAB et al., 2010; YU et al., 2017).

Para isso, uma das formas mais comuns para a obtenção de componentes a partir de plantas é a técnica de extração sólido-líquido. Esta técnica consiste em realizar a imersão da planta em um determinado solvente, realizando agitação a uma

determinada temperatura controlada, por um período de tempo. A separação ocorre quimicamente e o solvente é removido por evaporação a vácuo (SANTOS, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo utilizar o caule, um resíduo da cadeia produtiva de estévia, para a obtenção de um extrato natural com alta capacidade antioxidante a partir da técnica de extração sólido-líquido com agitação e temperatura.

2.2. Objetivo específico

- Realizar um planejamento experimental composto por um ponto central (3^2) para definir o ponto ótimo de extração variando a concentração de solvente e a relação peso/volume durante a extração tendo como variável de resposta o rendimento em massa e a atividade antioxidante;
- Obter o extrato bruto utilizando as condições otimizadas;
- Analisar atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e flavonoides do extrato obtido nas condições otimizadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Histórico da planta

Stevia rebaudiana foi classificada botanicamente por Moisés Santiago Bertoni em meados de 1900. A planta é nativa da região de Amambay, fronteira do Paraguai com o Brasil. Ela também é cultivada em diversas outras regiões do mundo como em algumas partes da Ásia e Europa. Na matéria seca da folha de *Stevia* está presente um alto teor de terpenoides, além disso, a planta contém glicosídeos diterpênicos (glicosídeos do esteviol), sendo estes, responsáveis pelo potente sabor doce (LEMUS-MONDACA et al., 2011).

Em 1909, o princípio do doce foi isolado pela primeira vez e apenas em 1931 o extrato foi purificado para produzir o esteviosídeo, cuja estrutura química foi estabelecida em 1952 como um glicosídeo diterpênico. Durante os anos 70 outros compostos foram isolados, incluindo o rebaudiosídeo A o qual proporciona um potencial mais doce do que o esteviosídeo bem como características sensoriais superiores (LEMUS-MONDACA et al., 2011). Este último é em média de 300-400 vezes mais doce que a sacarose e pode ter um benefício para aquelas pessoas que sofrem de obesidade, diabetes, doenças cardíacas e cáries dentária (GHANTA et al., 2007).

Estudos revelaram que a estévia tem sido usada desde os tempos antigos para vários fins em todo o mundo. Durante séculos, as tribos Guarani do Paraguai e do Brasil usaram espécies de estévia como adoçante em erva-mate e chás medicinais para o tratamento de azias e outras doenças (LEMUS-MONDACA et al., 2011). Ainda, vários estudos sugeriram que, além da doçura, o esteviosídeo, juntamente com compostos relacionados que incluem rebaudiosídeo A, esteviol e isosteviol, também podem oferecer benefícios terapêuticos, uma vez que apresentam efeitos anti-hiperglicêmicos, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, anti-tumorais, antidiarréicos, diuréticos e imunomoduladores (CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009).

3.2. Características da planta

Existem cerca de 90 variedades de *S. rebaudiana* desenvolvidas em todo o mundo, dependendo dos diferentes requisitos climáticos. *Stevia* é um semi-arbusto com até 30 cm de altura e tem um extenso sistema radicular produzindo folhas pequenas e elípticas. Essas folhas podem ser lanceoladas e alongadas ou em forma

de espátula com lâmina de ponta romba e margem serrilhada do meio para a ponta com aproximadamente 4 cm de comprimento. A superfície da folha é ligeiramente granular, o caule é amadeirado, o rizoma tem raízes ramificadas e as flores são pequenas e brancas (MADAN et al., 2010).

A planta pode ser cultivada em solo relativamente pobre e tem um crescimento rápido em vários tipos de solos e em temperaturas em torno de 24°C e normalmente não tolera temperaturas inferiores a 9°C, portanto pode ser cultivada como uma erva anual durante o final da primavera e verão e em regiões de média e alta latitude onde os dias são mais longos o que favorecem o teor de esteviosídeo. Além disso, as folhas e caule da *Stevia* podem murchar muito rápido, desta forma ela precisa de uma considerável quantidade de água (LEMUS-MONDACA et al., 2011).

As plantas podem ser usadas para produção comercial por 8 anos, no período em que a colheita de partes vegetativas ocorre seis vezes por ano. As raízes permanecem no local e a planta se regenera rapidamente. Podem ser colhidas em torno de 15 a 35 g de folhas secas por planta (LEMUS-MONDACA et al., 2011).

3.3. Composição da planta

Além dos glicosídeos de esteviol, há na composição da planta uma mistura heterogênea de compostos já identificados, dentre eles compostos fenólicos, terpenóides, ácidos graxos, vitaminas, minerais, dentre outros. Esta composição variada é responsável por diversos benefícios a saúde reportados na literatura, caracterizando assim, um potencial adicional a planta não atribuído apenas aos glicosídeos de esteviol (MOLLINA-CALLE, 2018; FORMIGONI et al., 2018; GAWEŁ-BĘBEN et al., 2015).

Diversos autores realizaram análises da composição centesimal da planta obtendo valores de umidade, cinzas, fibra bruta, proteína, gordura e carboidratos. A Tabela 1 abaixo mostra os valores presentes na literatura

Tabela 1: Composição centesimal das folhas de estévia em diferentes estudos (g/100g).

Componentes	Mishra et al. (2010)	Abou-Arab et al. (2010)	Goyal et al. (2010)
Umidade	7	5,37	4,65
Cinzas	11	7,41	6,3
Fibra bruta	18	15,5	15,2
Proteína	10	11,4	11,2
Gordura	3	3,73	1,9
Carboidratos	52	61,9	ND

Abou-Arab et al. (2010) também determinou a composição de aminoácidos essenciais e não-essenciais na *Stevia rebaudiana*. A quantidade determinada está descrita na Tabela 2.

Tabela 2: Composição de aminoácidos nas folhas de estévia.

Aminoácidos essenciais	g/100g	Aminoácidos não-essenciais	g/100g
Arginina	0,45	Aspartato	0,37
Lisina	0,70	Serina	0,46
Histidina	1,13	Glutâmico	0,43
Leucina	0,98	Prolina	0,17
Metionina	1,45	Glicina	0,25
Valina	0,64	Alanina	0,56
Isoleucina	0,42	Cisteína	0,40
Fenilalaina	0,77	Tirosina	1,08
Treonina	1,13		

Diversos autores também determinaram as quantidades dos diversos minerais e ácidos graxos presentes na estévia. Os valores encontrados na literatura estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3: Composição de minerais (mg/100g) e ácidos graxos (g/100g) nas folhas de estévia

Aminoácidos essenciais	Mishra et al. (2010)	Abou-Arab et al. (2010)	Goyal et al. (2010)	Ácidos graxos (g/100g)	Tadhani e Subhash (2006)
Cálcio	464,4	17,7	544	Ácido palmítico	27,51
Fósforo	11,4	ND	318	Ácido palmitoléico	1,27
Sódio	190	14,93	89,2	Ácido esteárico	1,18
Potássio	1800	21,15	1780	Ácido oleico	4,36
Ferro	55,3	5,89	3,9	Ácido linoleico	12,40
Magnésio	349	3,26	349	Ácido lenolênico	21,59
Zinco	1,5	1,26	1,5		

3.3.1. Carboidratos

Os carboidratos desempenham papéis essenciais nos seres vivos. Assim, os monossacarídeos são a principal fonte de energia no metabolismo humano, enquanto os polissacarídeos servem como armazenamento de energia e podem atuar como componentes estruturais. Os benefícios associados à folha de *S. rebaudiana* são devidos principalmente à sua composição nutricional, que é uma boa fonte de carboidratos, proteínas e fibras brutas, que promove o bem-estar e reduz o risco de certas doenças. Nas raízes e folhas de *S. rebaudiana*, os frutooligossacarídeos do tipo inulina, um polissacarídeo vegetal natural com importantes propriedades funcionais relacionadas a prebióticos, fibras alimentares, metabolismo lipídico e

controle do diabetes, foram isolados por Oliveira et al. (2011). Eles obtiveram das raízes e folhas da planta um rendimento de frutooligossacarídeos purificados de 4,6% e 0,46%, respectivamente. Isso indica uma possível aplicação de extratos como suplemento alimentar (OLIVEIRA et al., 2011).

3.3.2. Proteínas

Proteínas são encontradas em uma grande variedade de matrizes, incluindo animais, fungos, vegetais, cereais, etc. (BERNAL et al., 2011). As proteínas são moléculas compostas de aminoácidos necessários para o crescimento e reparo dos tecidos do corpo. Sua importância reside principalmente no fato de serem constituintes essenciais das células e precisarem ser substituídos ao longo do tempo, o que torna a ingestão de proteínas algo indispensável. No total, dezessete aminoácidos foram determinados e classificados como aminoácidos essenciais e não essenciais. De acordo com estudos realizados, os aminoácidos indispensáveis são leucina, isoleucina, valina, lisina, treonina, triptofano, metionina, fenilalanina e histidina. A partir desses estudos é possível afirmar que as folhas de Stevia contém quase todos os aminoácidos indispensáveis, incluindo tirosina e cisteína. Falta apenas o aminoácido triptofano. Isso significa que, após a extração do esteviosídeo das folhas, o resíduo pode ser uma fonte valiosa de aminoácidos indispensáveis para produtos de saúde (LEMUS-MONDACA et al., 2011).

3.3.3. Minerais

Os minerais têm muitas funções importantes no corpo humano. Alguns minerais são necessários apenas em quantidades muito pequenas nas dietas humanas, mas são vitais para fins metabólicos. Os minerais considerados essenciais ou necessários para o funcionamento normal do corpo são classificados de acordo com suas quantidades ou exigências relativas. Os principais são sódio, magnésio, fósforo, enxofre, cloro, potássio e cálcio, classificados como macro nutrientes e os elementos menores, considerados micronutrientes, são cromo, manganês, ferro, cobalto, cobre, zinco, selênio, molibdênio e iodo. A Stevia contém quantidades substanciais desses nutrientes importantes, que a estabelecem como um ingrediente carregado de minerais necessários para proteger o corpo, regular e manter os vários processos metabólicos. Potássio, cálcio, magnésio e sódio, importantes para a nutrição, foram

encontrados em quantidade razoável nas folhas de Stevia. A alta concentração desses minerais seria muito benéfica para a saúde (KAR; CHOUDHARY; BANDYOPADHYAY, 1999).

O zinco e o ferro são encontrados em alimentos de origem vegetal e animal e estão presentes nas folhas de Stevia. De acordo com Wu et al. (2005), o zinco é um mineral que atua como antioxidante não enzimático, de modo que seu consumo ajudaria na prevenção de danos oxidativos da célula. A principal função biológica do ferro é o transporte de oxigênio para o corpo e, conseqüentemente, a falta desse mineral na dieta leva à anemia. A alta quantidade de ferro nas folhas de Stevia pode novamente ser útil para contribuir para a manutenção de um nível normal de hemoglobina no organismo.

3.3.4. Vitaminas

As vitaminas são substâncias orgânicas presentes em quantidades muito pequenas nos alimentos, mas necessárias para o metabolismo. Eles são agrupados porque são fatores vitais na dieta e todos foram descobertos em conexão com as doenças causadas por sua deficiência. Eles são classificados como solúveis em água ou solúveis em gordura. Existem 13 vitaminas: 4 lipossolúveis (A, D, E e K) e 9 hidrossolúveis (8 vitaminas do grupo B e vitamina C). Os efeitos protetores dos produtos vegetais são devidos à presença de vários componentes que possuem mecanismos de ação distintos; alguns são enzimas e proteínas e outros são compostos de baixo peso molecular, como vitaminas (LEMUS-MONDACA et al., 2011).

Kim et al. (2011) estudaram as quantidades de vitaminas hidrossolúveis nos extratos de folhas e calos de Stevia e determinaram que o conteúdo de ácido fólico, vitamina C e vitamina B2 nos extratos foliares era significativamente maior que os extratos de calo. No extrato da folha, o ácido fólico foi considerado o principal composto, seguido pela vitamina C. No extrato de calos, a vitamina C foi o principal composto, seguido pela vitamina B.

3.3.5. Glicosídeos e outros constituintes

Glicosídeos são compostos que contêm uma molécula de carboidrato (açúcar) ligada a uma fração não-carboidrato. Estes compostos são encontrados

principalmente em plantas e podem ser convertidos, por clivagem hidrolítica, em um componente de açúcar e não de açúcar (aglicona). Eles são nomeados especificamente pelo tipo de açúcar que contêm, como glicosídeos (glicose), pentosídeos (pentose), frutosídeos (frutose), etc (BERNAL et al., 2011).

Os adoçantes naturais das folhas de *S. rebaudiana*, denominados glicosídeos de esteviol, são diterpenos, isolados e identificados como esteviosídeo, esteviolbiosídeo, rebaudiosídeo A, B, C, D, E, F e dulcosídeo (GEUNS, 2003). Foi relatado que o esteviosídeo é o glicosídeo de estévia mais abundante encontrado nas folhas da planta e é responsável pelas propriedades edulcorantes. É seguido pelo rebaudiosídeo A, rebaudiosídeo C e dulcosídeo A (LEMUS-MONDACA et al., 2011).

3.4. Atividade biológica dos compostos

3.4.1. Atividade antioxidante

Antioxidantes são compostos que ganharam importância nos últimos anos devido à sua capacidade de neutralizar os radicais livres. Estes têm sido relatados para evitar danos oxidativos causados pelos radicais livres. Podem interferir no processo de oxidação, reagindo com os radicais livres, quelando metais catalíticos e também atuando como eliminadores de oxigênio. Sabe-se que muitas das substâncias biologicamente ativas encontradas nas plantas, incluindo compostos fenólicos (flavonoides, fenólicos), possuem propriedades antioxidantes em potencial. A atividade antioxidante das plantas medicinais depende da concentração do antioxidante individual que entra na composição (LEMUS-MONDACA et al., 2011).

Recentemente, houve um aumento de interesse nos potenciais terapêuticos das plantas, como antioxidantes na redução de lesões teciduais induzidas por radicais livres. Embora vários antioxidantes sintéticos, como o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT), estejam disponíveis comercialmente, eles são bastante inseguros e sua toxicidade é um problema de preocupação. Portanto, fortes restrições foram impostas à sua aplicação e há uma tendência para substituí-las por antioxidantes naturais. Antioxidantes naturais à base de plantas, especialmente fenólicos e flavonoides, têm sido explorados comercialmente como aditivos antioxidantes ou como suplementos nutricionais (LEMUS-MONDACA et al., 2011).

3.4.2. Atividade antidiabética

Atualmente, com o envelhecimento, hábitos alimentares e diminuição das atividades físicas, há um aumento acentuado na incidência de diabetes mellitus tipo 2 e obesidade. Diabetes mellitus tipo 2 é um distúrbio metabólico crônico resultante de defeitos na secreção de insulina das células β e ação da insulina. Além das anormalidades da insulina, estão envolvidas disfunção das células α pancreáticas e excesso relativo de glucagon. A hiperglicemia pós-prandial observada no diabetes tipo 2 é geralmente devida a um aumento na produção basal de glicose hepática e uma diminuição no descarte periférico de glicose. Portanto, a correção desse desequilíbrio na etapa de entrada ou saída da glicose no plasma deve ajudar a corrigir essa condição patológica (CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009).

Atualmente, existe um uso popular da medicina herbal e alternativa para o tratamento do diabetes. De fato, o extrato de *S. rebaudiana* é utilizado no tratamento da diabetes na América do Sul. Além disso, o esteviosídeo, o principal componente do extrato, possui uma doçura alta, sem calorias e apenas uma pequena quantidade é necessária para fins de adoçante. Portanto, deve ser uma boa alternativa ao açúcar para pacientes diabéticos (KINGHORN; SOEJARTO, 2002).

3.4.3. Atividade anti-hipertensiva

Em estado patológico, a hipertensão arterial é resultado de uma relação inadequada entre capacidade/resistência da vasculatura e volume sanguíneo (CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009).

O efeito anti-hipertensivo do extrato bruto de estévia tomado por via oral é dependente do tempo e requer administração prolongada. Isto é indicado pela observação de que, após a administração oral de extrato em ratos normais e hipertensos, não há alteração significativa na pressão arterial nos primeiros 20 dias. De fato, o efeito hipotensor do extrato foi observado 40 e 60 dias após a administração. Por outro lado, a infusão intravenosa de esteviosídeo reduz a pressão arterial em ratos normais e hipertensos sem demora. Além disso, a injeção intravenosa de esteviosídeo em ratos espontaneamente hipertensos conscientes produz uma redução na pressão arterial sistólica e diastólica de maneira dependente da dose. Assim, o efeito hipotensor agudo do esteviosídeo só pode ser observado quando administrado diretamente na circulação sistêmica (CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009).

Estudos em humanos também mostraram o efeito do esteviosídeo no sistema cardiovascular. O esteviosídeo causa bradicardia e hipotensão. Da mesma forma, um leve efeito hipotensor foi observado em seres humanos que receberam um chá preparado a partir de *S. rebaudiana* (extrato de Stevia) diariamente por 30 dias. Nesses estudos, o esteviosídeo também foi sugerido como tendo efeito inotrópico, diminuindo a duração da sístole. Isso reduziria o volume do curso e, em seguida, reduziria a pressão arterial. Assim, os extratos de esteviosídeo e estévia parecem ter efeito anti-hipertensivo (CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009).

3.4.4. Atividade anti-inflamatória e anticancerígena

A inflamação é uma reação imune inata dos tecidos vasculares a estímulos nocivos, como patógeno, célula lesada ou irritante. Vários tipos de células, como células imunes, epiteliais e endoteliais, participam interativamente desse processo para remover os estímulos prejudiciais e iniciar o processo de cicatrização. No entanto, a inflamação também está associada a uma variedade de distúrbios, como doenças autoimunes, doença inflamatória intestinal, aterosclerose e câncer (CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009).

Existem amplas evidências mostrando que o esteviosídeo tem um efeito anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente, foi mostrado que a inflamação da pele induzida localmente por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) foi inibido por glicosídeos de esteviol incluindo esteviosídeo. Além disso, o efeito antitumoral do esteviosídeo foi investigado, pois o TPA também é conhecido por induzir a formação de câncer em células mamárias. O esteviosídeo inibe a promoção de tumores induzidos por TPA em um modelo de câncer de pele da carcinogênese em dois estágios em camundongos. Mizushina et al. (2005) mostraram que o isosteviol inibe a polimerase do DNA e a topoisomerase II do DNA humano, alvos celulares para a farmacoterapia do câncer e também para doenças inflamatórias. Além disso, o isosteviol também retarda o crescimento de três tipos diferentes de células cancerígenas humanas e inibe a inflamação induzida pelo TPA.

3.5. Caule como resíduo

Os polifenóis são constituintes comuns da dieta humana, sendo as frutas e os vegetais a principal fonte alimentar desses compostos bioativos. Sugere-se que os

possíveis benefícios à saúde do consumo de polifenóis derivem de suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (JOSEPH; SHUKITT-HALE; CASADESUS, 2005; MERTENS-TALCOTT et al., 2006). Estão surgindo evidências de seu papel na prevenção de doenças degenerativas. Estudos experimentais em animais e linhas de células humanas demonstraram que os polifenóis podem desempenhar um papel na prevenção de câncer e doenças cardiovasculares (SCALBERT et al., 2005).

Yu et al. (2017) obtiveram um extrato aquoso de caules e folhas de estêvia e avaliaram o seu potencial em inibir a oxidação lipídica em óleo de peixe. Estes autores verificaram que o extrato de caule apresentava atividade antioxidante significativamente maior que o das folhas para oxidação lipídica, embora o teor de antioxidantes totais tenha sido inferior em testes como DPPH e ORAC, e ainda, os compostos responsáveis por tal atividade foram como identificados ácido vanílico, ácido protocatecúico, ácido cafeico, ácido clorogênico e ácido criptoclorogênico.

3.6. Métodos de extração

A técnica de extração sólido-líquido é mais comum para a obtenção de componentes a partir de plantas. Esta técnica consiste em realizar a imersão da planta em um determinado solvente, realizando agitação a uma determinada temperatura controlada, por um período de tempo. A separação ocorre quimicamente e o solvente é removido por evaporação a vácuo (SANTOS, 2015).

Na extração sólido-líquido existe um impasse que é a remoção completa do solvente utilizado sem grandes custos e gastos energéticos. A sobra desse solvente pode ocasionar alterações químicas e provocar efeitos indesejados nos consumidores (MELECCHI, 2005).

A utilização desta técnica depende de alguns fatores como a proporção e distribuição do solvente no sólido, e a natureza dos sólidos. Alguns parâmetros podem influenciar na velocidade de extração, como a dimensão das partículas sólidas, o solvente utilizado e a viscosidade. A agitação ajuda no contato do solvente com o sólido e a solubilidade do soluto aumenta com o aumento da temperatura (SANTOS, 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Seleção da planta

Caules e ramos de *Stevia rebaudiana* foram gentilmente cedidos pelo Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais – NEPRON pertencente a Universidade Estadual de Maringá. As plantas cultivadas em um canteiro central foram colhidas antes da abertura dos botões florais (48-52 dias), onde há o máximo de desenvolvimento e acúmulo de glicosídeos do esteviol nas folhas. Após, foram secas em estufa de circulação forçada até que o teor de umidade atingisse aproximadamente 10%. Na sequência, foram separadas as folhas dos caules e ramos. As folhas, seguiram para o processo de extração e purificação para obtenção dos glicosídeos de esteviol. Os caules e ramos foram moídos e armazenados a -20°C para posterior análises.

4.2. Método de extração

Primeiramente pesou-se 2g da amostra de caules e ramos de *Stevia* secos e moídos em um erlenmeyer. Esse procedimento foi realizado 10 vezes e em duplicata para desenvolvimento do planejamento experimental, como demonstrado no Tabela 4.

Tabela 4: Planejamento experimental (3²).

Variáveis		Planejamento	
(%) etanol-água	Relação peso amostra seca:volume de solvente	Combinação	Códigos
90:10 (-1)	1:5 (-1)	-1 -1	1A 1B
		-1 0	2A 2B
		-1 1	3A 3B
80:20 (0)	1:6 (0)	0 -1	4A 4B
		0 0	5A 5B
		0 1	6A 6B
70:30 (1)	1:7 (1)	1 -1	7A 7B
		1 0	8A 8B
		1 1	9A 9B

Após preparou-se todas as amostras do planejamento experimental, respeitando as combinações propostas no Quadro 01, as mesmas foram levadas até a incubadora a uma temperatura de 55°C e agitação de 180 rpm. Realizou-se 3 ciclos de extração, cada um com 1h. Em cada ciclo, adicionou-se o volume de solvente relacionado em cada combinação. Ao término dos três ciclos, as amostras foram filtradas, transferidas para balões de secagem e secas individualmente em evaporador

rotativo. Em seguida, obteve-se a massa extraída em miligramas e preparou-se uma solução mãe a partir do material seco, na concentração de 5 mg/ml de etanol:água (1:1).

4.3. Atividade antioxidante

A atividade de eliminação de radicais livres dos extratos foi medida pela capacidade de eliminar os radicais DPPH (BLOIS, 1958). Para tal, 0,1mL dos extratos preparado em etanol:água (50:50) na concentração de (2,0 mg/mL) foi adicionado a 3,9 mL do reagente DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) 60 µmol. Na sequência, as amostras foram armazenadas no escuro durante 30 minutos. Para remover a interferência da cor nas leituras, adicionará 0,1mL dos extratos em 3,9mL de etanol:água (50:50). O controle negativo é realizado com 0,1mL de etanol:água (50:50) acrescido de 3,9mL do reagente DPPH. Dado o tempo, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 515 nm. Os resultados são expressos como percentagem de inibição de radicais livres (equação 01).

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{\text{Absorbância}_{\text{controle negativo}} - \text{Absorbância}_{\text{amostra}}}{\text{Absorbância}_{\text{controle negativo}}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 01})$$

Onde:

Absorbância_{controle(-)} = absorbância da solução de DPPH sem a amostra;

Absorbância_{amostra} = absorbância da amostra com o DPPH.

4.4. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com o método descrito por Singleton et al. (1999). Um total de 30µL de amostra (2,0mg/mL) foi adicionado a 2370µL de solução etanol:água (50:50). Após, acrescentou-se 125µL do reagente Folin-Ciocateau. Deixou por cinco minutos em equilíbrio e adicionou-se 450µL de carbonato de sódio a 15%. As amostras permaneceram em repouso por 2 horas. Após esse tempo, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 765 nm. A concentração fenólica é expressa como mg de equivalente de ácido gálico (EAG)/mL de extrato por intermédio da equação 02 que foi obtida pela a curva de calibração desta técnica, tendo esta um R² igual a 0,9903.

$$y = 0,0002x + 0,03 \quad (\text{Equação 02})$$

4.5. Flavonoides

A determinação dos índices de flavonoides totais pelo método espectrofotométrico, segundo Jia et al. (1999). Deste modo, 250µL da amostra (2mg/mL) foi adicionado a 1000µL de solução etanol:água (50:50) e 75µL uma solução de nitrato de sódio (5%). Agitou-se a mistura por 5 minutos e acrescentou-se 75µL de uma solução de cloreto de alumínio (10%). Manteve-se as amostras em repouso por 5 minutos e por fim, acrescentou-se 500µL de solução de hidróxido de sódio (1M) e procedeu-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 510nm, utilizando a quercetina (marca SIGMA, Q4951-10G) como padrão de referência. A concentração de flavonóides é expressa como mg de equivalente de quercetina (EAQ)/mL de extrato por intermédio da equação 03 obtida pela curva de calibração desta técnica, tendo esta um R² igual a 0,9931.

$$y = 0,0003x + 0,0074 \quad (\text{Equação 03})$$

4.6. Análise estatística

O procedimento de extração foi realizado em duplicata e os resultados de rendimento em massa e atividade antioxidante foram analisados com auxílio do programa estatístico IBM SPSS Statistics Base 22.0 para construção dos gráficos de superfície de resposta, avaliação da influência das variáveis empregadas e identificação do ponto ótimo de extração resultante da combinação das variáveis. As demais análises foram realizadas em triplicata os resultados expressos como a média ± erro padrão da média foram submetidos à análise de variância usando o teste de Tukey (p < 0,05).

4.7. Obtenção do extrato otimizado

Após avaliação dos dados referentes ao planejamento experimental composto no ponto central e as condições otimizadas definidas, um extrato bruto foi obtido e analisado seguindo os itens 4.3, 4.4, e 4.5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Análise estatística do planejamento experimental

Para a análises das extrações foi realizado o teste da Análise de variância com nível de significância de 5%. Os testes constantes da Tabela 6 e determinadas segundo o delineamento fatorial completo do tipo 3² com três níveis e dois fatores e com uma repetição no ponto central. O teste de rendimento em massa (g) foi realizado em duplicata e o de atividade antioxidante (%) foi realizada em triplicata. Os resultados das médias e os desvios encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5: Delineamento experimental do experimento fatorial completo com a distribuição das variáveis estudadas e valores das variáveis de resposta para todas as extrações

Amostras	x ₁	x ₂	Solução etanol:água	Relação peso:volume	Rendimento em massa (g)	Atividade antioxidante (%)
A1	-1	-1	90:10	1:5	0,189 ^c ±0,001	90,551 ^a ±1,203
A2	-1	0	90:10	1:6	0,205 ^{bc} ±0,006	89,239 ^{ab} ±0,946
A3	-1	+1	90:10	1:7	0,194 ^c ±0,009	88,967 ^{ab} ±2,406
A4	0	-1	80:20	1:5	0,234 ^b ±0,001	86,614 ^{abc} ±1,639
A5	0	0	80:20	1:6	0,233 ^b ±0,005	86,348 ^{abc} ±3,290
A6	0	+1	80:20	1:7	0,289 ^d ±0,007	89,239 ^{ab} ±1,050
A7	+1	-1	70:30	1:5	0,286 ^d ±0,008	78,540 ^c ±1,829
A8	+1	0	70:30	1:6	0,304 ^{ad} ±0,003	81,365 ^{bc} ±1,837
A9	+1	+1	70:30	1:7	0,329 ^a ±0,006	87,139 ^{abc} ±1,144
A10	0	0	80:20	1:6	0,280 ^d ±0,005	84,525 ^{abc} ±1,045

Médias na mesma coluna, seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Pelos resultados é possível verificar que houveram diferenças significativas para as dez amostras com relação às análises de rendimento em massa e atividade antioxidante. Para o rendimento, as amostras A9 e A1 foram as que tiveram o maior e o menor valor, respectivamente.

Para a determinação da atividade antioxidante, o maior valor apresentado foi para a amostra A1 e o menor valor para a amostra A7. As amostras A4, A5, A9 e A10 não apresentaram diferença de médias significativas.

A análise de variância das respostas de interesse em relação às variáveis independentes do processo de extração também objetivou analisar a significância dos efeitos destas nas variáveis de resposta, bem como, o ajuste dos dados experimentais a um modelo de regressão que expressasse matematicamente a extração. A seguir são comentadas as respostas estudadas neste trabalho.

5.1.1. Análise do rendimento em massa (g)

A seguir, apresenta-se os dados referentes à análise de variância para os dados experimentais obtidos para a resposta rendimento em massa. A variável solvente (etanol:água) foram significantes na Anova. Os termos de relação peso:volume, bem como as interações entre este e o solução, foram eliminados nesta análise por não atender ao nível de significância e objetivando um melhor valor para R^2_{adj} (Apêndice I). Com isso, verificou-se um bom ajuste para o modelo, que foi de 92,779%. Na Figura 1 pode-se ver a relação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo ajustado.

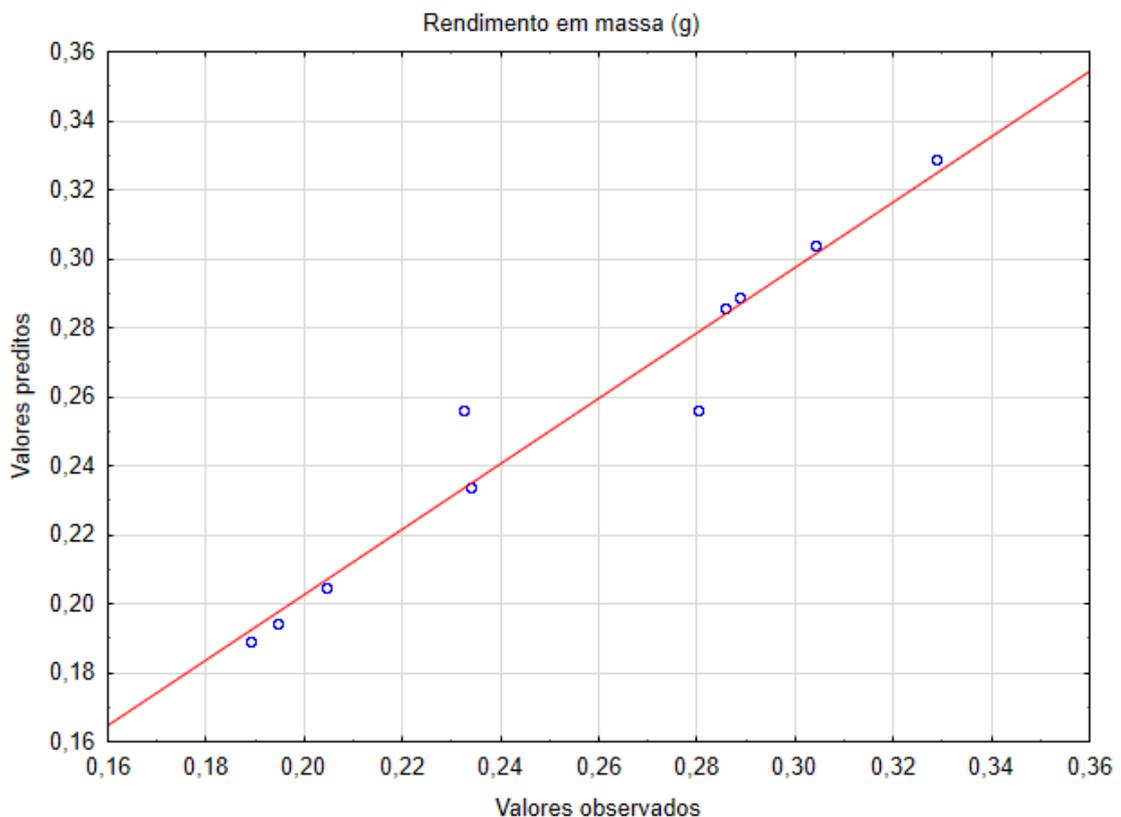


Figura 1: Coeficientes do modelo de regressão para o rendimento em massa (g) da extração do caule de estêvia.

Objetivando-se rendimento em massa, a variável independente solução etanol:água apresentou efeito significativo positivo, ou seja, o seu aumento contribuiu para o aumento do rendimento, conforme se verifica na Figura 2.

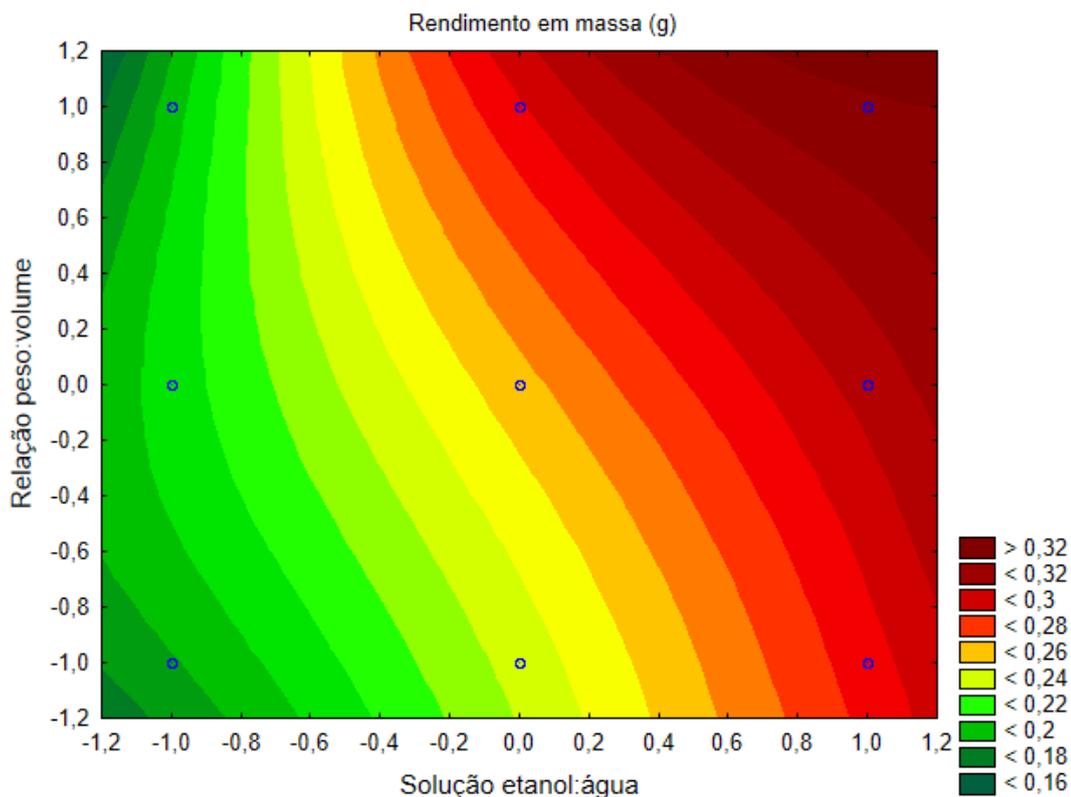


Figura 2: Gráfico de contorno para a variável rendimento em massa do extrato de caule de estévia.

É possível ver ilustrativamente este comportamento, quanto maior a concentração de água na relação etanol:água (70:30) e maior a relação peso:volume, maior é o valor obtido para o rendimento. Esta tendência se inicia entre os níveis 0,0 e +1,0 para ambas as variáveis.

Um estudo realizado por Oliveira et al. (2016) para avaliar o rendimento em massa da extração de xaxim por diferentes métodos de extração mostra que o solvente hidroalcoólico a 70% possui melhor rendimento em praticamente todos os métodos extrativos, pois o solvente é mais seletivo para a extração dos metabólitos presentes. Isso explica o melhor rendimento em massa quando a concentração de água é maior (etanol:água (70:30)).

5.1.2. Análise de atividade antioxidante (%)

Avaliando a resposta atividade antioxidante (%), as variáveis solução (etanol:água) e relação peso:volume foram efeitos significantes na Anova, ou seja, foram significativas para que o ajuste no modelo fosse bastante satisfatório: 97,332% (Apêndice II). A interação entre ambas as variáveis não foi significativa. Na Figura 3

pode-se ver a relação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo ajustado.

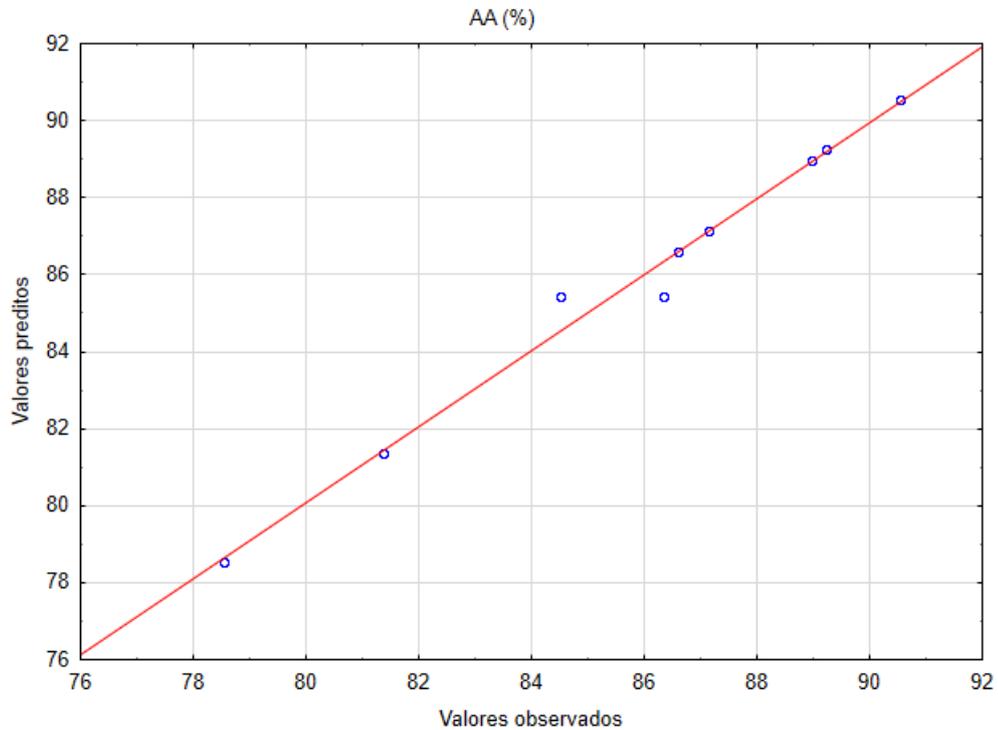


Figura 3: Valores experimentais x valores preditos para a atividade antioxidante

Analisando a Figura 4, nota-se que maiores valores da atividade antioxidante se destacaram para valores menores da água na relação etanol:água (-1,0), combinados com valores menores da relação peso:volume (-1,0), assim como valores intermediários para a solução etanol:água e valores maiores para a relação peso;volume (+1,0).

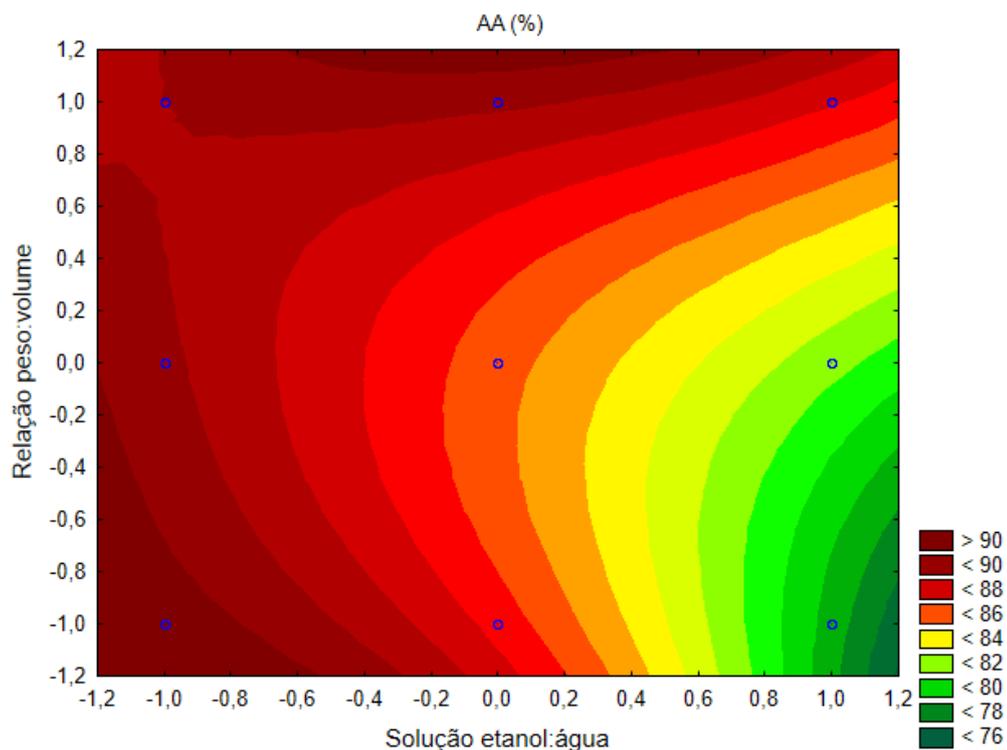


Figura 4: Gráfico de contorno para a variável atividade antioxidante do extrato de caule de estévia.

5.1.3. Análise do ponto ótimo

Com base nas respostas obtidas, almejou-se determinar qual a solução ideal entre etanol e água, bem como a relação peso:volume ideal. Ainda mais considerando que, para o processo de extração, tanto a atividade antioxidante como o rendimento em massa devem ter seus valores maximizados.

Pela Figura 5 é possível verificar que valores ótimos (75,532%) para o rendimento em massa (g) e para a atividade antioxidante (%) são obtidos quando se opta pela proporção 75:25 da solução etanol:água e a relação peso:volume 1:7. Caso opte-se por trabalhar os níveis (+1,0) para ambas as variáveis, os valores otimizados terão uma queda de 6,492%.

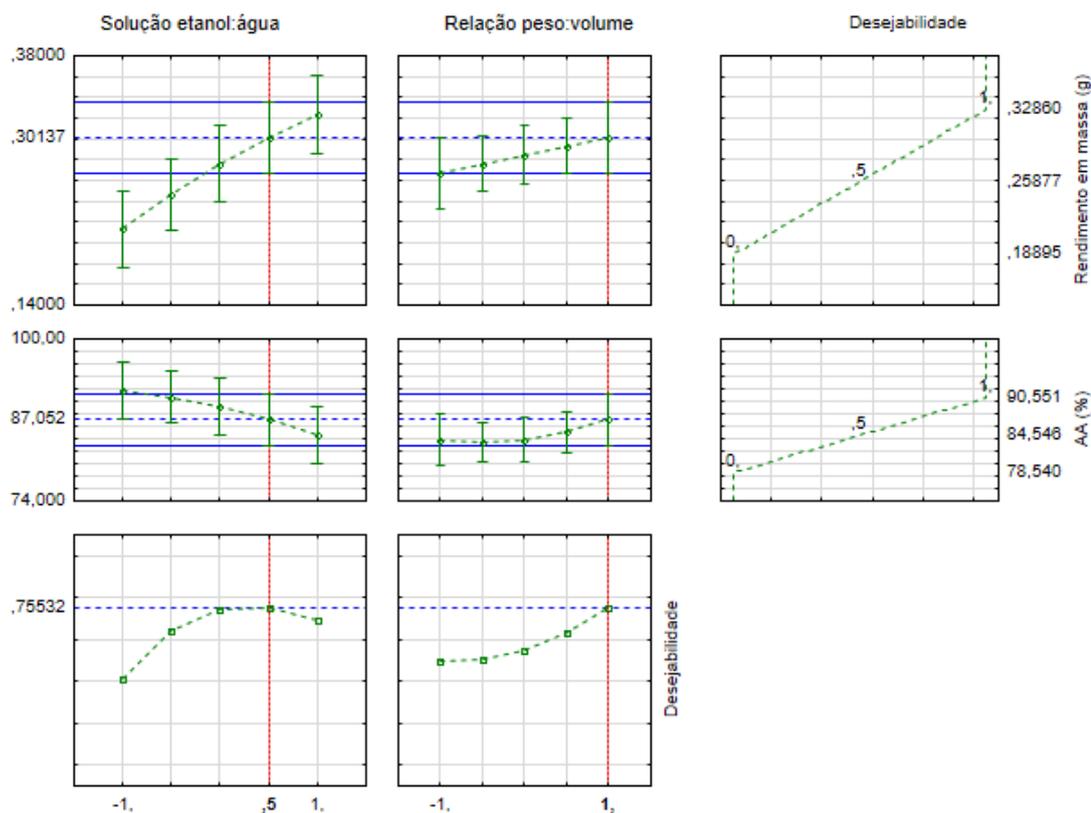


Figura 5: Gráfico de influência da concentração da solução etanol:água e da relação peso:volume na obtenção do rendimento em massa (g) e da atividade antioxidante (%).

5.2. Extrato otimizado

A partir da análise estatística realizada foi possível obter o extrato otimizado no ponto ótimo de extração. A partir deste extrato foram realizadas as análises de atividade antioxidante, compostos fenólicos e flavonoides sendo os resultados obtidos mostrados na Tabela 6.

Tabela 6: Análises do extrato otimizado de caules de estévia.

Análises	Resultados
Atividade antioxidante (%inibição)	76,52
Compostos fenólicos (mgEAG/mL)	4,65
Flavonoides (mgEQ/mL)	1,33

Muanda et al. (2011) avaliaram atividade antioxidante das folhas de estévia em extrato aquoso e obteve 82,86% de inibição.

Gawel-Bęben et al. (2015) estimaram os valores para compostos fenólicos e flavonoides, respectivamente, em 3,85 mgEAG/g de folha seca e 2,03 mgEQ/g de folha seca.

Formigoni et al. (2018) trataram as folhas de estévia com etanol e obteve 94,55% de inibição da atividade antioxidante, 6,72mgEAG/g de folha seca para compostos fenólicos e 1,68 mgEQ/g de folha seca para flavonoides.

Existem estudos realizados também com erva-mate, como é o caso da erva-mate. Ferrera et al. 2016 realizaram um planejamento experimental variando a proporção de etanol:água para verificar qual seria o melhor ponto de extração e analisaram os resultados em estações diferentes e com sombreamento diferente. A partir do resultado quantificou os compostos fenólicos, flavonoides e a atividade antioxidante. Os maiores valores obtidos foram, 150,35 mgEAG/L para compostos fenólicos; 286,04 mgECA/L para flavonoides e 4,35 mMTRLOX/ L para atividade antioxidante. Os autores ainda explicam que a variação dos resultados pode se dar devido as altas temperaturas do verão, que degradam as enzimas inibindo o metabolismo.

Schafranski (2019) realizou uma extração de folhas de amoreira preta a 50°C por 10 minutos em banho Ultratermostático e obteve um valor de 2,67 mgEQ/ g para flavonoides, 0,94 IC₅₀ mg/mL.

A partir dos resultados destes estudos é possível observar que os flavonoides contribuem diretamente para as propriedades antioxidantes e sugerem que desempenham um papel preventivo contra diversas doenças, como já foi citado anteriormente, e estão presentes em diversas plantas.

6. CONCLUSÃO

Com os resultados deste estudo, pode-se obter condições otimizadas para obtenção de um extrato de caule de *stevia rebaudiana* que objetive rendimento em massa e atividade antioxidante. Ainda, verifica-se que o caule de estévia, que mesmo sendo uma parte da planta com pouco interesse comercial, e sendo assim, caracterizado como um resíduo, tem grande abundância de compostos com alta capacidade antioxidante assim como nas folhas e, portanto, a sua utilização no processamento de alimentos pode ser economicamente considerada. Além disso, seria uma boa opção para obtenção de extratos que visam a substituição de antioxidantes artificiais, embora estudos mais aprofundados sobre sua composição e testes em alimentos devem ser executados.

7. REFERÊNCIAS

ABOU-ARAB, A. Esmat et al., Evaluation of bioactive compounds of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. **African Journal of Food Science**, Cairo, v. 4, p.627-634, out. 2010.

BERNAL, J. et al. Advanced analysis of nutraceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 55, n. 4, p.758-774, jun. 2011.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature** v.26, p.1199-1200, 1958.

CHATSUDTHIPONG, Varanuj; MUANPRASAT, Chatchai. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 121, n. 1, p.41-54, jan. 2009. Elsevier BV.

FERRERA, T.s. et al. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidante em erva-mate sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. **Revista Brasileira de Plantas Medicináveis**, [s.l.], v. 18, n. 21, p.588-596, 2016.

FORMIGONI, Maysa 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, p. 452-459, 2018.

GAWEL-BEBEN, Katarzyna et al., *Stevia rebaudiana* Bert. leaf extracts as a multifunctional source of natural antioxidants. **Molecules**, p. 5468-5486, 2015.

GHANTA, Srijani et al. Oxidative DNA Damage Preventive Activity and Antioxidant Potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a Natural Sweetener. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 55, n. 26, p.10962-10967, dez. 2007.

GEUNS, Jan M.c. Stevioside. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 64, n. 5, p.913-921, nov. 2003.

GOYAL, S. K.; SAMSHER; GOYAL, R. K.. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, [s.l.], v. 61, n. 1, p.1-10, 6 dez. 2009.

JIA, Zhishen; TANG, Mengcheng; WU, Jianming. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

JOSEPH, James A; SHUKITT-HALE, Barbara; CASADESUS, Gemma. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. **The American Journal of Clinical Nutrition**, [s.l.], v. 81, n. 1, p.313-316, 1 jan. 2005.

KAR, Ajit; CHOUDHARY, B.k; BANDYOPADHYAY, N.g. Preliminary studies on the inorganic constituents of some indigenous hypoglycaemic herbs on oral glucose tolerance test. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 64, n. 2, p.179-184, fev. 1999.

KIM, Il-suk et al. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. **Lwt - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 44, n. 5, p.1328-1332, jun. 2011

KINGHORN, A. Douglas; SOEJARTO, Djaja Djendoel. Discovery of terpenoid and phenolic sweeteners from plants. **Pure and Applied Chemistry**, [s.l.], v. 74, n. 7, p.1169-1179, 1 jan. 2002.

LEMUS-MONDACA, Roberto et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**. Santiago, v.132, p. 1121-1132. dez. 2011.

MADAN, Swati et al. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni - A review. **Indian Journal of Natural Products and Resources**. Índia, v. 1, p. 267-286. set. 2010.

MELECCHI, Maria Ines Soares. **Caracterização química de extratos de Hibiscus tiliaceus : estudo comparativo de métodos de extração**. 2005. 218 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Química. Programa de Pós-graduação em Química, Porto Alegre.

MERTENS-TALCOTT, Susanne U. et al. Absorption, Metabolism, and Antioxidant Effects of Pomegranate (*Punica granatum*L.) Polyphenols after Ingestion of a Standardized Extract in Healthy Human Volunteers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s.l.], v. 54, n. 23, p.8956-8961, nov. 2006.

MISHRA, P. et al. “*Stevia rebaudiana* - A magical sweetener”, **Global Journal Biotechnol Biochem**, v. 5, p. 62-74, 2010.

MIZUSHINA, Yoshiyuki. et al. Structural analysis of isosteviol and related compounds as DNA polymerase and DNA topoisomerase inhibitors. **Life Sciences**. v. 77, p. 2127–2140, set. 2005.

MOLINA-CALLE, Maria, PRIEGO-CAPOTE, Feliciano; LUQUE DE CASTRO, Maria D. Characterization of Stevia by LC-QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts. **Food Chemistry**, v. 219, p. 329-338, 2017.

MUANDA, François N. et al. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Lwt - Food Science and Technology**, [s.l.], v. 44, n. 9, p.1865-1872, nov. 2011.

OLIVEIRA, Arildo José Braz de et al. Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 129, n. 2, p.305-311, nov. 2011.

OLIVEIRA, V.b. et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de dicksonia sellowiana (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, [s.l.], v. 18, n. 1, p.230-239, 2016.

SANTOS, Rogério Pitanga. **Extração, caracterização e avaliação bioativa do extrato de ARRABIDAEA CHICA**. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN.

SCALBERT, Augustin et al. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. **Critical Reviews In Food Science and Nutrition**, [s.l.], v. 45, n. 4, p.287-306, jun. 2005.

SCHAFRANSKI, Kathlyn. **Extração e caracterização de compostos fenólicos de folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.) e encapsulamento em esferas de alginato**. 2019. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

SINGLETON, Vernon L.; ORTHOFER, Rudolf; LAMUELA-RAVENTOS, Rosa M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means folin-ciocalteu reagents. **Methods in Enzymology**. v.299, p. 152–178, 1999.

TADHANI, Manish; SUBHASH, Rema. Preliminary Studies on Stevia rebaudiana Leaves: Proximal Composition, Mineral Analysis and Phytochemical Screening. **Journal of Medical Sciences (faisalabad)**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.321-326, 1 mar. 2006.

WIJNGAARD, Hilde H.; RÖßLE, Christian; BRUNTON, Nigel. A survey of Irish fruit and vegetable waste and by-products as a source of polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 116, n. 1, p.202-207, set. 2009.

WU, Sue-jing et al. Antioxidant Activities of Physalis peruviana. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.963-966, 2005.

YU, Hui et al. Antioxidant activities of aqueous extract from *Stevia rebaudiana* stem waste to inhibit fish oil oxidation and identification of its phenolic compounds. **Food Chemistry**. China, p. 379-386. abr. 2017.

APÊNDICE

Apêndice I – ANOVA para rendimento em massa (g).

Tabela 1: Anova para o modelo de resposta do rendimento em massa (g)

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média de quadrados	F_{calculado}	p-valor
(1) Solução etanol:água(L)	0,018200	1	0,018200	45,68986	0,002498
Solução etanol:água(Q)	0,000141	1	0,000141	0,35281	0,584490
(2) Relação peso:volume(L)	0,001773	1	0,001773	4,45191	0,102496
Relação peso:volume(Q)	0,000001	1	0,000001	0,00218	0,964960
1L by 2L	0,000351	1	0,000351	0,88024	0,401253
Erro	0,001593	4	0,000398		
Total SS	0,022066	9			

Tabela 2: Coeficientes do modelo de regressão para o rendimento em massa (g)

Fatores	Coeficientes	p-valor
Mean/Interc.	0,253612	0,000002
(1) Solução etanol:água(L)	0,055075	0,002498
Solução etanol:água(Q)	0,003880	0,584490
(2) Relação peso:volume(L)	0,017192	0,102496
Relação peso:volume(Q)	0,000305	0,964960
1L by 2L	0,009362	0,401253
R²		92,779
R²_{ajus}		83,754

Apêndice II – ANOVA para atividade antioxidante (%).

Tabela 1: Anova para o modelo de resposta de atividade antioxidante (%)

	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média de quadrados	F_{calculado}	p-valor
(1) Solução etanol:água(L)	78,6457	1	78,64571	90,00548	0,000689
Solução etanol:água(Q)	2,2690	1	2,26901	2,59675	0,182375
(2) Relação peso:volume(L)	15,5161	1	15,51613	17,75731	0,013543
Relação peso:volume(Q)	6,2646	1	6,26462	7,16950	0,055367
1L by 2L	25,8742	1	25,87418	29,61150	0,005537
Erro	3,4952	4	0,87379		
Total SS	131,0160	9			

Tabela 2: Coeficientes do modelo de regressão para a atividade antioxidante (%)

Fatores	Coeficientes	p-valor
Mean/Interc.	86,29726	0,000000
(1) Solução etanol:água(L)	-3,62044	0,000689
Solução etanol:água(Q)	0,49306	0,182375
(2) Relação peso:volume(L)	1,60811	0,013543
Relação peso:volume(Q)	-0,81927	0,055367
1L by 2L	2,54333	0,005537
R²		97,332
R²_{ajus}		93,998