

ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL E SUSTENTÁVEL

Anne Karynne da Silva Barbosa
(Organizadora)



ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL E SUSTENTÁVEL

Anne Karynne da Silva Barbosa
(Organizadora)



Editora chefe

Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Editora executiva

Natalia Oliveira

Assistente editorial

Flávia Roberta Barão

Bibliotecária

Janaina Ramos

Projeto gráfico

Bruno Oliveira

Camila Alves de Cremo

Daphynny Pamplona

Gabriel Motomu Teshima

Luiza Alves Batista

Natália Sandrini de Azevedo

Imagens da capa

iStock

Edição de arte

Luiza Alves Batista

2022 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do texto © 2022 Os autores

Copyright da edição © 2022 Atena Editora

Direitos para esta edição cedidos à Atena Editora pelos autores.

Open access publication by Atena Editora



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição-Não-Comercial-NãoDerivativos 4.0 Internacional (CC BY-NC-ND 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores, inclusive não representam necessariamente a posição oficial da Atena Editora. Permitido o *download* da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Todos os manuscritos foram previamente submetidos à avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta Editora, tendo sido aprovados para a publicação com base em critérios de neutralidade e imparcialidade acadêmica.

A Atena Editora é comprometida em garantir a integridade editorial em todas as etapas do processo de publicação, evitando plágio, dados ou resultados fraudulentos e impedindo que interesses financeiros comprometam os padrões éticos da publicação. Situações suspeitas de má conduta científica serão investigadas sob o mais alto padrão de rigor acadêmico e ético.

Conselho Editorial**Ciências Biológicas e da Saúde**

Profª Drª Aline Silva da Fonte Santa Rosa de Oliveira – Hospital Federal de Bonsucesso

Profª Drª Ana Beatriz Duarte Vieira – Universidade de Brasília

Profª Drª Ana Paula Peron – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília

Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás



Prof. Dr. Cirênio de Almeida Barbosa – Universidade Federal de Ouro Preto
Profª Drª Daniela Reis Joaquim de Freitas – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Débora Luana Ribeiro Pessoa – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Elizabeth Cordeiro Fernandes – Faculdade Integrada Medicina
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Fernanda Miguel de Andrade – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Dr. Fernando Mendes – Instituto Politécnico de Coimbra – Escola Superior de Saúde de Coimbra
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Helio Franklin Rodrigues de Almeida – Universidade Federal de Rondônia
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Jefferson Thiago Souza – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Jesus Rodrigues Lemos – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Jônatas de França Barros – Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. José Aderval Aragão – Universidade Federal de Sergipe
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Profª Drª Juliana Santana de Curcio – Universidade Federal de Goiás
Profª Drª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Maria Tatiane Gonçalves Sá – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Maurilio Antonio Varavallo – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Prof. Dr. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Regiane Luz Carvalho – Centro Universitário das Faculdades Associadas de Ensino
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Sheyla Mara Silva de Oliveira – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Suely Lopes de Azevedo – Universidade Federal Fluminense
Profª Drª Vanessa da Fontoura Custódio Monteiro – Universidade do Vale do Sapucaí
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Welma Emídio da Silva – Universidade Federal Rural de Pernambuco



Alimentação saudável e sustentável

Diagramação: Daphynny Pamplona
Correção: Maiara Ferreira
Indexação: Amanda Kelly da Costa Veiga
Revisão: Os autores
Organizadora: Anne Karynne da Silva Barbosa

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A411 Alimentação saudável e sustentável / Organizadora Anne Karynne da Silva Barbosa. – Ponta Grossa - PR: Atena, 2022.

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-65-258-0162-9

DOI: <https://doi.org/10.22533/at.ed.629221304>

1. Alimentação. 2. Nutrição. I. Barbosa, Anne Karynne da Silva (Organizadora). II. Título.

CDD 613.2

Elaborado por Bibliotecária Janaina Ramos – CRB-8/9166

Atena Editora

Ponta Grossa – Paraná – Brasil

Telefone: +55 (42) 3323-5493

www.atenaeditora.com.br

contato@atenaeditora.com.br



DECLARAÇÃO DOS AUTORES

Os autores desta obra: 1. Atestam não possuir qualquer interesse comercial que constitua um conflito de interesses em relação ao artigo científico publicado; 2. Declaram que participaram ativamente da construção dos respectivos manuscritos, preferencialmente na: a) Concepção do estudo, e/ou aquisição de dados, e/ou análise e interpretação de dados; b) Elaboração do artigo ou revisão com vistas a tornar o material intelectualmente relevante; c) Aprovação final do manuscrito para submissão.; 3. Certificam que os artigos científicos publicados estão completamente isentos de dados e/ou resultados fraudulentos; 4. Confirmam a citação e a referência correta de todos os dados e de interpretações de dados de outras pesquisas; 5. Reconhecem terem informado todas as fontes de financiamento recebidas para a consecução da pesquisa; 6. Autorizam a edição da obra, que incluem os registros de ficha catalográfica, ISBN, DOI e demais indexadores, projeto visual e criação de capa, diagramação de miolo, assim como lançamento e divulgação da mesma conforme critérios da Atena Editora.



DECLARAÇÃO DA EDITORA

A Atena Editora declara, para os devidos fins de direito, que: 1. A presente publicação constitui apenas transferência temporária dos direitos autorais, direito sobre a publicação, inclusive não constitui responsabilidade solidária na criação dos manuscritos publicados, nos termos previstos na Lei sobre direitos autorais (Lei 9610/98), no art. 184 do Código Penal e no art. 927 do Código Civil; 2. Autoriza e incentiva os autores a assinarem contratos com repositórios institucionais, com fins exclusivos de divulgação da obra, desde que com o devido reconhecimento de autoria e edição e sem qualquer finalidade comercial; 3. Todos os e-book são *open access*, *desta forma* não os comercializa em seu site, sites parceiros, plataformas de *e-commerce*, ou qualquer outro meio virtual ou físico, portanto, está isenta de repasses de direitos autorais aos autores; 4. Todos os membros do conselho editorial são doutores e vinculados a instituições de ensino superior públicas, conforme recomendação da CAPES para obtenção do Qualis livro; 5. Não cede, comercializa ou autoriza a utilização dos nomes e e-mails dos autores, bem como nenhum outro dado dos mesmos, para qualquer finalidade que não o escopo da divulgação desta obra.



APRESENTAÇÃO

A coleção “Alimentação saudável e sustentável” é um conjunto que possui principal objetivo de incorporar pesquisas resultantes de artigos em diversos campos que fazem parte da Nutrição. Esse volume aborda de forma interdisciplinar com trabalhos, artigos, relatos de experiência e/ou revisões.

A principal característica desse volume, foi partilhar de forma clara os trabalhos que foram desenvolvidos em diversas instituições e núcleos de ensino e pesquisa de graduação e pós-graduação do país. Nestes trabalhos selecionados a partir de revisão criteriosa, a principal característica foi o aspecto relacionado com as áreas que compõem a nutrição e a saúde em geral.

Foram escolhidos os temas considerados relevantes sobre a área de nutrição e da saúde são partilhados aqui com o intuito de contribuir com o conhecimento de discentes e para a promoção e a troca de experiências de docentes entre as diversas instituições e aumentar o aprendizado de todos aqueles que se interessam pela saúde e pela pesquisa na área de nutrição. Posto que, esse volume traz pesquisas atuais, com muitas temáticas que irão dar suporte para a prática de profissionais da área da saúde em geral.

Portanto, aqui se traz o resultado de inúmeros artigos que são fundamentados em teoria e prática, que foram produzidos e compartilhados por docentes e discentes. Sabe-se a importância de uma divulgação adequada da literatura científica, por isso a melhor escolha foi a Atena Editora, visto que possui uma plataforma didática e relevante para todos os pesquisadores que queiram compartilhar os resultados de seus estudos.

Boa leitura!

Anne Karyne da Silva Barbosa

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1..... 1

AVALIAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE COOKIE DIETÉTICOS

Nathália Letícia Hernandez Brito


Fernanda Vitória Leimann

Flávia Aparecida Reitz Cardoso

Adriana Aparecida Droval

Leila Larisa Medeiros Marques

Renata Hernandez Barros Fuchs

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.6292213041>

CAPÍTULO 2..... 8

BROWNIE DE FEIJÃO ENRIQUECIDO COM ORA-PRO-NOBIS: UMA ALTERNATIVA PARA CELÍACOS

Lauanda Dal Molin de Almeida Lara


Kelly Viviane de Vasconcelos Vieira

Josiane Martins Hanke

Michelle Silveira dos Santos Schuster

Thainara Batista Reis Vieira

Cássia Regina Bruno Nascimento


 <https://doi.org/10.22533/at.ed.6292213042>

CAPÍTULO 3..... 18

A IMPORTÂNCIA DA CAÇA COMO CULTURA E SUA SUSTENTABILIDADE AMBIENTAL – UM ESTUDO SOBRE A ALIMENTAÇÃO DA COMUNIDADE INDÍGENA POTIGUARA “MENDONÇA” DO AMARELÃO (JOÃO CÂMARA, RIO GRANDE DO NORTE)

Leandro Flávio Restrepo Frota

Eveline de Alencar Costa

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.6292213043>


CAPÍTULO 4..... 31

ANSIEDADE E COMPORTAMENTO ALIMENTAR: UMA REVISÃO INTEGRATIVA

Gabrielly Maria de Lima Almeida Rocha

Cléres Lino da Silva Cleios

Fabiana Palmeira Melo Costa

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.6292213044>


CAPÍTULO 5..... 44

CONSUMO ALIMENTAR E ESTADO NUTRICIONAL DE CRIANÇAS MENORES DE 36 MESES DE VIDA DA CIDADE DE CAMPINAS-SP

Sandy Chagas Galvani Lima

Adriana Pavesi Arisseto Bragotto

Renata Elisa Faustino de Almeida Marques

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.6292213045>

CAPÍTULO 6..... 58

APROVEITAMENTO DA CASCA DE INGÁ: FONTE DE PROTEÍNA E FIBRA ALIMENTAR


Déborah Cristina Barcelos Flores

Caroline Pagnossim Boeira

Daniela Rigo Guerra

Tatiana Emanuelli

Claudia Severo da Rosa


 <https://doi.org/10.22533/at.ed.6292213046>

CAPÍTULO 7..... 68

DESENVOLVIMENTO DE UMA CERVEJA ARTESANAL NO ESTILO *FRUIT BEER* COM DIFERENTES PARTES DO FRUTO DE FEIJOA

Jociel da Rosa Surdi

Giliani Veloso Sartori


 <https://doi.org/10.22533/at.ed.6292213047>

CAPÍTULO 8..... 81

DESENVOLVIMENTO DE UMA BEBIDA A BASE DA LEGUMINOSA FAVA (*Vicia faba L.*): ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL

Janaina de Fatima Feil de Oliveira

Valmor Ziegler

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.6292213048>

CAPÍTULO 9..... 95


ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO DE SORVETE A BASE DE GELEIA DE BUTIÁ

Thais Alexandra Rodrigues

Silvia Benedetti

Ana Elisa da Costa Ruiz

Elisângela Serenato Madalozzo

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.6292213049>

CAPÍTULO 10..... 106


SISTEMA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GLÚCOSIDOS DE ESTEVIOL EN UN CULTIVO DE RAÍCES DE *Stevia rebaudiana*

David Paniagua Vega

Huerta-Heredia, Ariana Arlene

Itzel Vianney Alvarado-Orea

Norma Cecilia Cavazos-Rocha

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.62922130410>







CAPÍTULO 11..... 113

ELABORAÇÃO DE PAÇOCA DIET COM ADIÇÃO DE FARINHA DE CASCA DE JABUTICABA (*Myrciaria cauliflora*)


Jheisi Tainá Martins

Silvia Benedetti

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.62922130411>

CAPÍTULO 12	125
O DIREITO À ALIMENTAÇÃO ESCOLAR NO ENSINO INFANTIL: ESTUDO REALIZADO EM UMA ESCOLA MUNICIPAL DE IMPERATRIZ - MA	
Lidianne Kelly Nascimento Rodrigues de Aguiar Lopes Lo-Ruama Barros Curado	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.62922130412	
CAPÍTULO 13	137
IMPLEMENTAÇÃO DO PROGRAMA 5 S NO AGRONEGOCIO: ESTUDO DE CASO EM CULTIVO DE TOMATE	
Flaviane Aparecida da Cruz	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.62922130413	
CAPÍTULO 14	151
SEGURANÇA ALIMENTAR: SITUAÇÃO DOS SERVIÇOS DE ALIMENTAÇÃO NO BAIRRO VILA ESPERANÇA, SÃO LUÍS (MA), BRASIL	
Adenilde Nascimento Mouchrek Eulália Cristina Costa de Carvalho	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.62922130414	
CAPÍTULO 15	170
FORMAS DE MACERAÇÃO E MÉTODOS DE REMONTAGEM	
Carlos Alberto Araripe Josane Cavalheiro	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.62922130415	
CAPÍTULO 16	183
GOMA DE CAJUEIRO: APROVEITAMENTO SUSTENTÁVEL E APLICAÇÕES NA ÁREA DE ALIMENTOS	
Jaqueline Souza de Freitas Cheila Gonçalves Mothé (<i>in memoriam</i>) Michelle Gonçalves Mothé	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.62922130416	
CAPÍTULO 17	198
HÁBITOS DE CONSUMO DE PRODUTOS ALIMENTARES CONTENDO CAFEÍNA NUMA POPULAÇÃO DE JOVENS ESTUDANTES ATIVOS	
Filomena Sousa Calixto Diana Eustáquio Maura Alves	
 https://doi.org/10.22533/at.ed.62922130417	
CAPÍTULO 18	212
SÍNDROME METABÓLICA IDENTIFICANDO FATORES DE RISCO EM ADULTOS: UMA REVISÃO DE LITERATURA	
Nayara Lúcia Guimarães Costa	


Naylana Thais Ferreira de Morais
Isabela Letícia Rosa dos Santos
Elizandra Soraia da Costa Cardoso
Thalita Mendes de Oliveira
Ana Eliza Sá de Souza
Yasmin Silva Lemos

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.62922130418>

CAPÍTULO 19..... 218

TRAJETÓRIA POLÍTICA DA SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL NO BRASIL


Joice de Paula Del Esposte
Esley Lopes Faria

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.62922130419>

CAPÍTULO 20..... 230

UM ESTUDO SOBRE OS ALIMENTOS E A INTERAÇÃO COM A VARFARINA EM PACIENTE ANTICOAGULADOS

Amanda Miranda de Lima
Ana Cristina Viana
José Carlos de Sales Ferreira

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.62922130420>

SOBRE A ORGANIZADORA..... 243

ÍNDICE REMISSIVO..... 244

CAPÍTULO 10

SISTEMA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE GLÚCOSIDOS DE ESTEVIOL EN UN CULTIVO DE RAÍCES DE *STEVIA REBAUDIANA*

Data de aceite: 01/02/2022

David Paniagua Vega

CONACyT-UANL. Facultad de Medicina.
Universidad Autónoma de Nuevo León.
Monterrey, Nuevo León, México
ORCID: 0000-0002-2207-580X

Huerta-Heredia, Ariana Arlene

CONACyT-UNPA. Instituto de Biotecnología.
Universidad del Papaloapan. Tuxtepec,
Oaxaca, México
ORCID: 0000-0003-4182-1529

Itzel Vianney Alvarado-Orea

División de Estudios de Posgrado. Instituto de
Biotecnología. Universidad del Papaloapan.
Tuxtepec, Oaxaca, México
ORCID: 0000-0002-3240-1170

Norma Cecilia Cavazos-Rocha

Departamento de Química Analítica. Facultad
de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo
León. Monterrey, Nuevo León, México
ORCID: 0000-0002-6626-3044

RESUMEN: Los glucósidos de esteviol (GEs) son edulcorantes naturales no calóricos con demanda comercial creciente. A nivel mundial se ha confirmado que su uso general es seguro. La principal fuente de obtención de GEs son las hojas de *Stevia rebaudiana*. Las raíces de las plantas son capaces de producir GEs, pero en el cultivo de raíces adventicias in vitro en suspensión (CRAIS) se discute sobre su

capacidad biosintética. Una estrategia adecuada de manejo y preparación de la muestra es fundamental para resolver controversias en cuanto a la producción de compuestos de interés. El objetivo del presente trabajo fue establecer una metodología de extracción, limpieza y análisis por infusión directa al módulo de masas en tándem con trampa de iones y ionización por electroespray (DFI-ESI-IT-MSⁿ) que permitió confirmar la capacidad biosintética de GEs en una línea de CRAIS de *S. rebaudiana*. Se estableció un sistema de extracción hidrometanólica, seguido de una limpieza del extracto crudo por extracción sólido líquido (SPE) con acetonitrilo-agua y el análisis de los extractos limpios por espectrometría de masas permitió identificar los siguientes GEs: esteviósido, rebaudiósido A y esteviol/isoesteviol. Estos resultados confirmaron la capacidad de biosíntesis de GEs en CRAIS de *Stevia rebaudiana*.

PALABRAS CLAVE: Glucósidos de esteviol, SPE, DFI-ESI-IT-MSⁿ, cultivo de raíces adventicias in vitro en suspensión.

SYSTEM FOR THE IDENTIFICATION OF STEVIOL GLYCOSIDES IN A CULTURE OF *STEVIA REBAUDIANA* ROOTS

ABSTRACT: Steviol glycosides (GEs) are natural, non-caloric sweeteners with increasing commercial demand. Worldwide, it has been confirmed that its general use is safe. The main source for obtaining GEs is the leaves of *Stevia rebaudiana*. Plant roots are capable of producing GEs, but in the in vitro suspension cultivation of adventitious roots (CRAIS) their biosynthetic capacity is discussed. An adequate strategy for

managing and preparing the sample is essential to resolve controversies in the production of interest components. The objective of the present work was to establish a methodology for extraction, cleaning and analysis by direct infusion into the mass module in tandem with ion strain and ionization by electrospray (DFI-ESI-IT-MSn) that allowed confirming the biosynthetic capacity of GEs in A line of CRAIS from *S. rebaudiana*. A hydromethanolic extraction system was established, followed by cleaning of the raw extract by solid-liquid extraction (SPE) with acetonitrile-water and the analysis of the clean extracts by mass spectrometry allowed the identification of the following GEs: stevioside, rebaudioside A and steviol/isosteviol. These results confirmed the capacity of GEs biosynthesis in *Stevia rebaudiana* CRAIS

KEYWORDS: Steviol glucosides, SPE, DFI-ESI-IT-MSn, in vitro suspension cultivation of adventitious roots.

INTRODUCCIÓN

Los glucósidos de esteviol (GEs) son edulcorantes naturales no calóricos. A nivel mundial se ha confirmado que su uso general es seguro (JECFA, 2016) y se pronostica que en 2022 el mercado de GEs será de alrededor de USD 506 millones (ASKCI, 2017). Adicionalmente, se han reportado diferentes actividades biológicas de los GEs como glucoreguladora, hipotensora, anti-inflamatoria y anticancerígena (Momtazi-Borojeni et al. 2017). La principal fuente de obtención de GEs son las hojas de *Stevia rebaudiana*. Debido a la importancia de la producción de GEs a partir de *S. rebaudiana*, diferentes estudios han reportado el uso de cultivos in vitro en raíces como lo son: raíces transformadas es suspensión (Pandey et al. 2016) y raíces adventicias en suspensión (Reis et al. 2011; Lopes et al. 2016; Reis et al. 2017; Ghazal et al. 2018; Ahmad et al. 2018). Sin embargo, para el cultivo de raíces adventicias in vitro en suspensión (CRAIS) se discute sobre su capacidad biosintética.

El interés en la producción de GEs en CRAIS es debido a que facilitaría el control de calidad (al mantener un perfil de producción estable), ayudaría a la inocuidad del producto (al evitar las contaminaciones propias del cultivo agrícola o convencional) y podría ser escalado a cultivo en biorreactor. Por tanto, es importante evaluar una estrategia de extracción y análisis que aporte información sobre la producción GEs en CRAIS de raíces de *S. rebaudiana*.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue establecer una metodología de extracción, limpieza y análisis por cromatografía de capa fina e infusión directa al módulo de masas en tándem con trampa de iones y ionización por electrospray (DFI-ESI-IT-MSⁿ) que permita confirmar la capacidad biosintética de GEs en un CRAIS de *S. rebaudiana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento del cultivo de raíces adventicias in vitro en suspensión

Para el establecimiento de las raíces en medio líquido se colocaron 1.2 g (peso fresco) de explantes de las raíces provenientes de plántulas in vitro de *S. rebaudiana* (Sánchez-Cordova et al. 2019) en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio Murashige & Skoog (MS) a la mitad de concentración (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 2% (p/v) de sacarosa y 0.5 mg/L de ácido indolbutírico (IBA), se ajustó el pH a 6.3 previo a la esterilización. Las raíces se mantuvieron en fotoperiodo 16/8 (luz/oscuridad) a $25 \pm 2^\circ \text{C}$ a 110 rpm de agitación orbital.

Extracción y limpieza de glucósidos de esteviol

La extracción de GEs a partir de CRAIS de *S. rebaudiana* se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Bondarev *et al.* (2001). La biomasa se liofilizó, se pulverizó y los GEs se extrajeron dos veces de forma sucesiva con metanol-agua (80:20 v/v), en una relación de 10 mL por cada gramo de biomasa (10:1) y se sonicó por 30 min. Posteriormente, se centrifugó por 15 min a 3500 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se llevó a sequedad. Para la limpieza del extracto de GEs se utilizaron cartuchos Chromabond® C₁₈ ec (500 mg), siguiendo la metodología de Wöelwer-Rieck *et al.* (2010) con algunas modificaciones. Los cartuchos se limpiaron con 3 mL de metanol, se acondicionaron con 6 mL de agua y la muestra disuelta en acetonitrilo:agua (10:90) se incorporó al cartucho, se eluyó con 3 mL de agua, 3 mL de acetonitrilo:agua (10:90), se llevó a sequedad por flujo de aire durante 15 min. Los GEs se recuperaron eluyendo con 3 mL de acetonitrilo:agua 80:20. Esta fracción se llevó a sequedad hasta llegar a peso constante.

Cromatografía de capa fina

Los extractos de raíces de *Stevia rebaudiana* fueron suspendidos en metanol:agua (80:20 v/v), se aplicaron en placa de sílica gel 60 F254. Se utilizaron como estándares el rebaudiósido A (1432- Sigma Aldrich) y esteviosido (50956-Sigma Aldrich). Con una fase móvil de acetato de etilo-etanol-acetona-agua (15:3:6:6) (Londhe y Nanaware, 2013). Las placas se asperjaron con ácido fosfomolibdico diluido, seguido de un calentamiento de 2 a 4 min. La identificación de los GEs en las muestras se llevó a cabo por comparación de los factores de retención con los estándares.

Análisis de GEs por DFI-ESI-IT-MSn

Los datos espectrales de masas fueron obtenidos por la técnica de infusión directa de los extractos limpios a 10, 20 y 30 ppm en un espectrómetro de masas con trampa de

iones LCQ Fleet (Thermo, San Jose, CA, USA) y una interface por electrospray (Thermo, San Jose, CA, USA) (DFI-ESI-IT-MSⁿ) en modo negativo. A una temperatura de capilar de 280 °C, voltaje de spray de 5.00 kV, votaje del capilar de -35 V, lentes de enfoque a -100 V, a un flujo de 10 µL/min y una energía de colisión de entre 20 y 30 %. Las muestras se analizaron adicionalmente mediante experimentos MS/MS con energía de colisión de entre 20-30% y un tiempo de activación de 30 ms hasta que ceso la fragmentación. A continuación, los iones producto se sometieron a una mayor fragmentación en las mismas condiciones, hasta que no se observaron más fragmentos. Las sustancias se identificaron tentativamente utilizando las pérdidas características y la comparación con el patrón de fragmentación descrito en la literatura y la biblioteca de espectros de masas de MoNA (MassBank of North América, EE. UU.) y la de European MassBank (NORMAN MassBank) y finalmente, fueron identificados utilizando sus espectros de masas en comparación con estándares de interés.

RESULTADOS

En este trabajo se establecieron condiciones de crecimiento para el cultivo de raíces adventicias in vitro en suspensión (CRAIS) de *S. rebaudiana* Figura 1A. Se observó que las raíces tomaron una coloración verde debido a las condiciones de crecimiento en fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad, además se observó que la producción de biomasa máxima alcanzada durante los 25 días de la cinética de crecimiento fue de 10 g_{p.s.}/L.

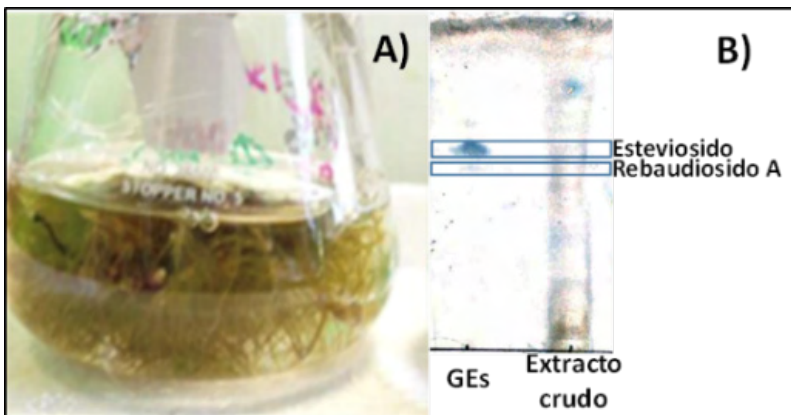


Figura 1. Cultivo in vitro y análisis por cromatografía de capa fina (TLC) donde; A) cultivo de raíces adventicias in vitro en suspensión (CRAIS) de *Stevia rebaudiana* a los 25 días de cultivo y B) identificación por TLC de glucósidos de esteviol (GEs) en el extracto crudo de CRAIS de *Stevia rebaudiana*.

En un primer análisis del extracto crudo de CRAIS de *Stevia rebaudiana* por espectrometría de masas no fue posible verificar la producción de GEs, debido a la baja

intensidad observada de los iones de interés. Como una estrategia complementaria que permitiera evaluar mayor cantidad de extracto crudo. Se procedió a realizar un análisis por cromatografía de capa fina (TLC) donde se comparó el factor de retención de los estándares esteviosido y rebaudiosido A con señales del extracto crudo. La estrategia, fue ir incrementando la masa del extracto crudo colocada en los carriles de las placas y fue posible ver señales que correspondían a los estándares de GEs al cargar la placa de TLC con 48 µg de extracto crudo (Figura 1B).

[M-H] ⁻	Fragmentos mayores			Sustancia
	MS ²	MS ³	MS ⁴	
803	641; 624; 461; 317	479; 413; 521; 593	317	esteviosido ^a
965	803	ND	ND	rebaudiosido ^a
317	249; 273; 299; 231	180; 113; 205	ND	estevioli/isoestevioli ^b

Tabla 1. Análisis de iones precursores y sus fragmentos correspondientes obtenidos por DFI-ESI-IT-MSⁿ de extractos de cultivo de raíces adventicias in vitro en suspensión de *Stevia rebaudiana* (modificado de Alvarado-Orea et al., 2020).

^a Compuestos identificados conclusivamente por comparación con estándares.

^b Compuestos identificados tentativamente con referencias: Gardana *et al.* 2010; Shafii *et al.* 2012 y bibliotecas.

ND no determinado.

Estos resultados evidenciaron la producción de GEs en CRAIS de *Stevia rebaudiana*, mostrando también que estos estaban presentes en baja cantidad. Para confirmar estos resultados por espectrometría de masas fue necesario implementar una estrategia para disminuir interferencias propias del extracto crudo, para lo cual, se realizó la limpieza del extracto crudo por medio de extracción en fase sólida (SPE) y finalmente, para alcanzar la intensidad de los fragmentos [M-H]⁻ necesaria para la identificación en el análisis por DFI-ESI-IT-MSⁿ, fue necesario incrementar la concentración de la muestra de 10 ppm (concentración habitual en este experimento) a 30 ppm. Con este sistema, que consistió de la estrategia combinada de espectrometría de masas y limpieza del extracto crudo por SPE se logró identificar los GEs; esteviósido, el rebaudiósido A y estevioli/isoestevioli (Tabla 1) a partir de un extracto hidroalcohólico de CRAIS de *Stevia rebaudiana*.

Estos resultados, aportan un sistema de análisis para CRAIS de *Stevia rebaudiana* con potencial aplicación en otros sistemas de cultivo con problemas similares en la identificación de GEs. Aunado a las ventajas del cultivo de raíces, como la posibilidad de llevar a escalamiento, también cabe mencionar que el cultivo de raíces es capaz de incrementar la producción de compuestos de interés en respuesta a diferentes condiciones de estrés, como se observó por Alvarado-Orea et al. (2020) con la adición de H₂O₂.

En un panorama general se ha observado un interés creciente en los cultivos in vitro de *Stevia rebaudiana*, de acuerdo a Pastrana-Reyes et al. (2021) quienes revisaron el avance en el número de publicaciones al respecto hasta principios del 2021 encontró que de un total de 68 reportes de cultivos de plántulas, brotes, raíces, raíces pilosas y callos de *S. rebaudiana*, de forma general se encontró que el 48.5% de los casos reportó un aumento en la producción de Ges.

CONCLUSIONES

El sistema implementado en este trabajo, que consistió en la extracción, limpieza y análisis por cromatografía de capa fina y espectrometría de masas permitió validar la capacidad de biosíntesis de GEs en el cultivo de raíces en suspensión de *S. rebaudiana*. Se recomienda evaluar diferentes condiciones de cultivo, adición de agentes que induzcan una mayor producción de GEs y su establecimiento en biorreactor; lo que permitirá establecer un sistema con una producción estable e inocuo para la obtención de GEs. Por otra parte, realizar la validación del método establecido y continuar con la etapa de cuantificación también se recomienda.

AGRADECIMIENTOS

A los proyectos de investigadores 3212 y 1028 de Cátedras-CONACyT. Y a los proyectos de financiamiento INFRA2015-01-255514, CB-2016- 284813 e INFRA-2015-01-252013.

REFERENCIAS

Ahmad N, Rab A, Ahmad N, Fazal H (2018) Differential pH-induced biosynthesis of steviol glycosides and biochemical parameters in submerge root cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). Sugar Tech 20: 100-104.

Alvarado-Orea, I V, Paniagua-Vega, D, Capataz-Tafur, J, Torres-López, A, Vera-Reyes, I, García-López, E, Huerta-Heredia, AA (2020). Photoperiod and elicitors increase steviol glycosides, phenolics, and flavonoid contents in root cultures of *Stevia rebaudiana*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant 56(3): 298-306.

ASKCI Consulting Co. Ltd. (2017) Research and Markets. Market Research on Stevioside in China 2017-2022.

Bondarev N, Reshetnyak O, Nosov A (2001) Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in vitro cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Sci 161(1):155-163.

Ghazal B, Saif S, Farid K, Khan A, Rehman S, Reshma A, Fazal H, Ai M, Rahman L, Ahmad N (2018) Stimulation of secondary metabolites by copper and gold nanoparticles in submerge adventitious root cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.). IET nanobiotechnology 12(5): 569-573.

JECFA: The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2017) Compendium of Food Additive Specifications of the 84th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).

Londhe SV and Nanaware SM (2013) HPTLC method for simultaneous analysis of stevioside and rebaudioside-A in *Stevia rebaudiana*. J AOAC Int 96(1): 24-6.

Lopes SMS, Francisco MG, Higashi B, de Almeida RTR, Krausová G, Pilau EJ, Gonçalves JE, Gonçalves RAC, de Oliveira AJB (2016) Chemical characterization and prebiotic activity of fructo-oligosaccharides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) roots and in vitro adventitious root cultures. Carbohydr polym 152: 718-725.

Momtazi-Borojeni AA, Esmaeili SA, Abdollahi E, Sahebkar A (2017) A review on the pharmacology and toxicology of steviol glycosides extracted from *Stevia rebaudiana*. Curr Pharm Des 23: 1616-1622.

Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tissue culture. Physiol Plant 15: 473-49.

Pandey H, Pandey P, Pandey SS, Singh S, Banerjee S (2016) Meeting the challenge of stevioside production in the hairy roots of *Stevia rebaudiana* by probing the underlying process. Plant Cell Tissue Organ Cult 126: 511-521.

Reis RV, Borges APPL, Chierrito TPC, de Souto ER, de Souza LM, Iacomini M, Gonçalves RAC (2011) Establishment of adventitious root culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni in a roller bottle system. Plant Cell Tissue and Organ Cult 106(2): 329-335.

Reis RV, Chierrito TPC, Silva TFO, Albiero ALM, Souza LA, Gonçalves JE, Oliveira AJB, Gonçalves RAC (2017). Morpho- anatomical study of *Stevia rebaudiana* roots grown in vitro and in vivo. Rev Bras Farmacogn 27: 34-39.

Pastrana-Reyes A M, Robledo-Narváez P N, Huerta-Heredia AA, Paniagua-Vega D (2021) Producción de glucosidos de esteviol por cultivo in vitro de *Stevia rebaudiana*- una revisión. Congreso internacional CUCCAL 13. ISSN-2007-9613.

Sánchez-Cordova Á, Capataz-Tafur J, Barrera-Figueroa B, López-Torres A, Sanchez-Ocampo PM, García-López E, Huerta-Heredia AA (2019) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation enhances steviol glycosides production and growth in *Stevia rebaudiana* plantlets. Sugar Tech 21(3): 398-406.

Wöelwer-Rieck U, Lankes C, Pawrzun A, Wust M (2010). Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. Eur Food Res Technol 231(4): 581-588.

ÍNDICE REMISSIVO

A

Advertencias in vitro en suspensión 106, 107, 108, 109, 110
Alimentação infantil 44
Alimento funcional 183, 194
Alimento saudável 58
Análise sensorial 6, 7, 12, 13, 78, 81, 87, 89, 91, 99, 100, 105, 191, 192
Análise térmica 183, 191, 196
Anemia ferropriva 8
Ansiedade 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43
Anticoagulante varfarina 230, 232, 233, 235, 241
Antitumor 183, 197
Antropometria 44

B

Bebidas 46, 47, 68, 70, 75, 78, 79, 81, 83, 86, 88, 89, 90, 91, 153, 164, 171, 192, 196, 198, 199, 201, 202, 203, 204
Butiá 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105

C

Caça 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30
Características físicas 1, 6
Cerveja artesanal 68, 70, 72, 73, 75, 77, 79, 80
Comportamento alimentar 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 41, 42, 204
Cultivo de raízes 106, 107, 108, 109, 110, 111
Cultura 18, 19, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 39, 79, 81, 130, 131, 137, 139, 142, 214, 223, 226

D

Delestage 170, 177, 178, 179, 180, 181
Desenvolvimento de produto 16, 95
Diet 2, 57, 113, 114, 115, 116, 117, 120, 122, 231
Doença celíaca 8, 9, 10, 12, 15, 17

E

Edulcorantes 1, 2, 3, 6, 7, 106, 107
Estado nutricional 44, 45, 46, 47, 53, 55, 56, 239

F

Fibra dietética 58, 63

Fruta 7, 10, 48, 64, 69, 70, 71, 74, 75, 95, 97, 115, 238

Frutas nativas 68, 79

G

Gastronomia 18, 21, 28

Geleia 95, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 123, 236

Glucósidos de esteviol 106, 107, 108, 109

Glúten 8, 9, 10, 12, 13, 15, 16

Goma do cajueiro 183

Grão fava 81, 84, 86, 88

I

Índios 18, 19, 20, 21, 30

Interação 39, 45, 93, 230, 231, 232, 238, 239, 241

J

Jabuticaba 75, 79, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123

M

Maceração 170, 171, 172, 173, 174, 175, 179, 181, 182

N

Nutrição 8, 15, 16, 44, 51, 55, 57, 58, 65, 66, 81, 82, 122, 123, 130, 131, 152, 164, 165, 166, 198, 216, 218, 219, 220, 222, 224, 225, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 239, 240, 241, 243

P

Paçoca 113, 114, 115, 116, 117, 120, 121, 122, 123, 124

Panificação 1, 16

Patologias 40, 119, 213

Pigeage 170, 179, 180, 181

Políticas públicas 54, 218, 219, 220, 224, 226, 227

R

Reaproveitamento 113

Remontagem 170, 171, 174, 175, 176, 177, 179, 180, 181

S

Saúde ambiental 151, 157

Sorvete 7, 95, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105

Spe 106, 107, 110

Sub-produto 58

Suplementos 198, 201, 202

Sustentabilidade 18, 28, 68, 82, 131, 132, 138

T

Transtorno da alimentação 31

V

Vicia faba I 81, 82, 90

ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL E SUSTENTÁVEL

-  www.arenaeditora.com.br
-  contato@arenaeditora.com.br
-  [@arenaeditora](https://www.instagram.com/arenaeditora)
-  www.facebook.com/arenaeditora.com.br



ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL E SUSTENTÁVEL



- 🌐 www.arenaeditora.com.br
- ✉ contato@arenaeditora.com.br
- 📷 [@arenaeditora](https://www.instagram.com/arenaeditora)
- 📘 www.facebook.com/arenaeditora.com.br