

# EXTRATOS E FRAÇÕES FUNCIONAIS DE STEVIA REBAUDIANA: IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS, AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIDIABÉTICA E ANTILIPÍDICA

Data de submissão: 06/08/2024

Data de aceite: 01/10/2024

### Milena Kazue Enokida

Biochemistry Department, State University of Maringá (UEM),  
Maringá – Paraná, Brazil  
<https://orcid.org/0009-0002-0229-5642>

### Cynthia Letícia Serra Cabeça

Postgraduate Program in Biochemistry,  
Biochemistry Department, Biological Sciences Center, State University of Maringá (UEM)  
Biochemistry Department, State University of Maringá (UEM), Maringá – Paraná, Brazil  
<https://orcid.org/0000-0002-9303-8643>

### Natani Caroline Nogueira

Postgraduate Program in Biochemistry,  
Biochemistry Department, Biological Sciences Center, State University of Maringá (UEM)  
Biochemistry Department, State University of Maringá (UEM), Maringá – Paraná, Brazil  
<https://orcid.org/0009-0008-2248-7979>

### Paulo Leonardo Marotti Siciliano

Postgraduate Program in Biochemistry,  
Biochemistry Department, Biological Sciences Center, State University of Maringá (UEM)  
Biochemistry Department, State University of Maringá (UEM), Maringá – Paraná, Brazil  
<https://orcid.org/0000-0003-0441-350X>

### Paula Gimenez Milani Fernandes

Postgraduate Program in Biochemistry,  
Biochemistry Department, Biological Sciences Center, State University of Maringá (UEM)  
Biochemistry Department, State University of Maringá (UEM), Maringá – Paraná, Brazil  
<https://orcid.org/0000-0003-0851-6872>

**RESUMO:** As folhas e caules de *Stevia rebaudiana* são muito procurados para a produção de adoçantes, pois fornecem edulcorantes naturais e que podem auxiliar no controle de síndromes metabólicas como o diabetes mellitus. O crescente número de pessoas com comorbidades como diabetes e a obesidade fez com que a busca por alimentos e bebidas com baixos teores de açúcar e gordura também cresça. Pesquisadores vêm demonstrando que a planta estévia possui compostos bioativos, além dos glicosídeos com poder adoçante, que podem apresentar propriedades e efeitos adjuvantes nestas e em outras doenças, e que muitas vezes são perdidos conforme o processo de purificação, ou são considerados resíduos de processo. Outro subproduto desta planta que merece destaque são seus caules,

estes representam cerca de 30% de sua biomassa total, e são considerados um desafio para a indústria de adoçantes, se moídos junto com as folhas ou se descartados, representam custos adicionais, e se reaproveitados não estão inseridos na alimentação humana. Dessa forma, este capítulo revisou e reuniu dados publicados e dados experimentais de extratos e frações de estévia, com potencial bioativo para serem utilizados como possíveis adjuvantes no tratamento de diabetes e de obesidade. Esses extratos e frações são geralmente subprodutos ou resíduos e desta forma este trabalho pode acrescentar à literatura resultados importantes que podem contribuir para o desenvolvimento e a consolidação da cadeia produtiva de Stevia de forma sustentável e ainda contribuir para as áreas da saúde, farmacêutica e de alimentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Compostos fenólicos, UHPLC-MS/MS, amilase, lipase, extratos de estévia.

**ABSTRACT:** The leaves and stems of *Stevia rebaudiana* are highly sought after for the production of sweeteners, as they provide natural sweeteners that can help control metabolic syndromes such as diabetes mellitus. The growing number of people with comorbidities such as diabetes and obesity has also led to a growing demand for foods and beverages with low sugar and fat content. Researchers have been demonstrating that the stevia plant has bioactive compounds, in addition to glycosides with sweetening power, which can have adjuvant properties and effects in these and other diseases, and which are often lost during the purification process, or are considered processing waste. Another byproduct of this plant that deserves attention is its stems, which represent approximately 30% of its total biomass and are considered a challenge for the sweetener industry. If ground together with the leaves or discarded, they represent additional costs, and if reused, they are not included in the human diet. Thus, this chapter reviewed and gathered published data and experimental data on stevia extracts and fractions, with bioactive potential to be used as possible adjuvants in the treatment of diabetes and obesity. These extracts and fractions are generally by-products or residues and thus this work can add important results to the literature that can contribute to the development and consolidation of the stevia production chain in a sustainable way and also contribute to the health, pharmaceutical and food sectors.

**KEYWORDS:** Phenolic compounds, UHPLC-MS/MS, amylase, lipase, stevia extracts.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

**ABTS<sup>+</sup>** - Cation 2,2-Azino-Bis(2-Ethylbenzeno-thiazoline-6-Sulfonic Acid) Diammonium Salt

**ABTS** - 2,2-Azino-Bis(2-Ethylbenzeno-thiazoline-6-Sulfonic Acid) Diammonium Salt

**DPPH** - 2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil

**EEF** - Extrato Etanólico a partir das Folhas

**EHC** - Extrato Hidroetanólico a partir dos Caules

**EHF** - Extrato Hidroetanólico a partir das Folhas

**EMC** - Extrato Metanólico a partir dos Caules

**EMF** - Extrato Metanólico a partir das Folhas

**FAE ETF** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Etanólico das Folhas

**FAE METC** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico do Caule

**FAE METF** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico das Folhas

**FAS** - Fração Antioxidante de Stévia

**HPLC** - High Performance Liquid Chromatography

**LC** - Cromatografia líquida

**Mn(VII)** - Permanganato de potássio

**NA** - Não analisado

**ND** - Não detectado, inferior a 0,0001%

**UHPLC-HRMS** - Ultra-High Performance Liquid Chromatography - High Resolution Mass Spectrometry

**TRIS-HCL** - Tris(hidroximetil)aminometano-Ácido Clorídrico

## 1 | INTRODUÇÃO

A planta estévia que tem como nome científico *Stevia rebaudiana* Bertoni é uma arbuscula da família *Asteraceae* nativa do nordeste paraguaio na América do Sul, e é muito conhecida pelos povos indígenas que a chamam de ka'a he'e ("erva doce"). Estas plantas podem atingir até 90 cm de altura com folhas que medem de 3 a 5 cm de comprimento e 1 a 1,5 cm de largura; suas flores são brancas com as pétalas agrupadas em racemos terminais ou axilares (Magalhães et al., 2000). É muito conhecida pelos seus adoçantes, os glicosídeos de esteviol extraídos da folhagem da planta que possuem um poder adoçante de até 450 vezes maior que o poder do açúcar comum, a sacarose. O Núcleo de Estudos em Produtos Naturais da Universidade Estadual de Maringá, o NEPRON, produziu uma variante conhecida como Stevia UEM-13 que contém como glicosídeo majoritário o rebaudiosídeo A (Ciotta et al., 2022; Milani et al., 2017).

As plantas possuem uma enorme capacidade de produzir e acumular metabólitos secundários para que realizem todas as suas funções fisiológicas. Os metabólitos secundários representam uma grande estratégia adaptativa das plantas desenvolvida para interação com o meio ambiente e para garantir a sobrevivência, especialmente em condições adversas. Esses compostos são uma expressão da complexidade bioquímica das plantas, sendo produzidos com os propósitos de dissuadir animais, proteção contra microrganismos patogênicos e atrair polinizadores (Pacífico et al., 2019; Durnic e Blache, 2012). Atualmente tem havido elevado interesse em explorar as propriedades bioativas desses metabólitos secundários, visando não apenas a prevenção de doenças, mas também seus potenciais efeitos farmacológicos e alimentícios, tornando-se aditivos alimentares (Durnic e Blache, 2012).

No Brasil, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2024), um aditivo alimentar é qualquer substância adicionada com intenção de alterar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais dos alimentos sem a finalidade de nutrir, podem ser adicionados durante seu processamento até chegar ao consumidor final.

Muitas doenças crônicas como diabetes, obesidade e muitas outras patologias podem ter seus sintomas associados com excesso de radicais livres no organismo (Sies, 2015). Esse excesso de espécies reativas de oxigênio, podem oxidar biomoléculas como

proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos. Um mecanismo de defesa contra essas substâncias são os antioxidantes. Essas substâncias e mecanismos são usados para controlar e prevenir o dano oxidativo molecular desequilibrado por essas comorbidades. Além das patologias, milhares de fatores internos e externos no organismo, como processos metabólicos, estilo de vida, consumo de alimentos ricos em oxidantes, ou que favorecem processos oxidativos precisam ser controlados ou minimizados pelos antioxidantes que podem melhorar o desequilíbrio do organismo. Nesse sentido, alimentos dietéticos, ricos em compostos bioativos, são uma importante fonte de vários metabólitos antioxidantes (Rammohan et al., 2023).

Diabetes mellitus (DM) é uma enfermidade causada pela falta ou má absorção de um hormônio, a insulina, principal hormônio que regula o nível glicêmico no sangue e garante a energia para o organismo. A falta de insulina ou sua má absorção pode causar aumento da glicemia. Altas taxas podem ainda levar a complicações no coração, nas artérias, nos olhos, rins e nos nervos e em casos mais extremos, a morte. De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes mais de 13 milhões de pessoas vivem com a doença, representando 6,9% da população nacional (ANATEL, 2021).

Outra doença crônica que pode ser consequência de uma alimentação desequilibrada é a obesidade que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é causada pelo excesso de gordura corporal que pode gerar prejuízos à saúde, afetando, em diferentes proporções, pessoas de todas as idades e grupos sociais. No mundo, cerca de 650 milhões de pessoas em todo o mundo são afetados pela obesidade. Uma estratégia importante para controlar e reduzir esta doença é o consumo de alimentos saudáveis ou que sejam fonte de compostos bioativos (Ministério da Saúde, 2022).

As folhas de estévia são frequentemente utilizadas como matéria-prima para obtenção de diversos extratos, tanto para fins comerciais quanto de pesquisa. A maioria dos estudos sobre *Stevia rebaudiana* concentra-se no fracionamento dos extratos obtidos dessa folhagem. No processamento de extração, o principal objetivo é obter a maior taxa de recuperação de adoçante, utilizando a menor relação solvente/folha de estévia possível (Koubaa et al., 2015). O pré-tratamento com solventes apolares tem sido utilizado para obter extratos de melhor qualidade sensorial e facilitar as etapas de purificação empregando processos de separação por membranas (Ciotta et al., 2022). Formigoni et al. (2018) realizaram o pré-tratamento etanólico e caracterizam o extrato etanólico por cromatografia acoplada à espectrometria de massas, determinando a presença de várias classes de substância, dentre eles fenólicos e esterebinas importantes. Os resultados mostraram que apesar de ser considerado um subproduto do processamento e purificação dos adoçantes de estévia, este extrato apresenta importantes compostos com potencial bioativo, com potencial antioxidante e que precisa ser estudado como fonte importante de adjuvantes no tratamento de comorbidades como DM e obesidade.

O extrato etanólico obtido a partir do pré-tratamento pode ser fracionado por diferentes

metodologias e os resultados podem gerar compostos diferentes com rendimentos distintos. Assim a busca por metodologias eficientes e inovadoras torna-se muito importante. Dacome et al., 2005 obteve importantes resultados com Stevia, isolando os compostos de interesse, glicosídeos de esteviol, por meio de fracionamento cromatográfico com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Moreira et al., 2008 também avaliou o potencial bioativo de extratos metanólicos e etanólicos fracionados de citronela. Nosso grupo de pesquisa obteve uma fração rica em compostos fenólicos a partir do fracionamento do extrato etanólico do pré-tratamento de folhas de Stevia UEM-13, de acordo com a metodologia desenvolvida por Milani et al. (2017a). Alguns estudos também apontam a obtenção de frações de acetato de etila em outras plantas que apresentam atividade antioxidante. Como mostrado por Saravanakumar et al., 2021, que obtiveram a fração a partir do extrato metanólico de *Stachys riederivar japonica* (Miq.) seguindo o fracionamento com hexano e logo depois acetato de etila. Enquanto Tijani et al., 2020 obtiveram uma fração a partir do extrato aquoso das sementes de *Daucuscarota L.* e posteriormente fracionado com acetato de etila por 3 vezes, produto que também demonstrou compostos com atividade antioxidante. Nota-se que em variados materiais vegetais o solvente acetato de etila, posteriormente a solventes como hexano e clorofórmio, é capaz de promover a obtenção de produtos contendo compostos antioxidantes.

Milani et al. (2017) e Cabeça et al. (2023) obtiveram uma fração antioxidante de Stevia (FAS) por meio do fracionamento do extrato metanólico de folhas de *Stevia rebaudiana*. FAS, com elevado teor de polifenóis, apresentou alto potencial antidiabético e antioxidante *in vitro* e *in vivo* e restaurou parte da função pancreática de animais diabéticos, modulando a secreção de insulina, principalmente quando a concentração plasmática de glicose nesses animais foi maior (Milani et al., 2017b; Piovan et al., 2018; Milani et al., 2020). Encontramos melhores resultados quando adicionamos o FAS a um suplemento de proteína de soro de leite conhecido como whey protein, um isolado de proteína de soro de leite (WPI).

A maioria dos estudos para a obtenção de compostos bioativos e adoçantes se concentram nas folhas de estêvia, há escassos relatos de estudos sobre essa matéria prima. Os caules de estêvia correspondem a aproximadamente 30% da biomassa total da planta sendo um componente significativo de biomassa e contém cerca de 3% de glicosídeos de esteviol (Atteh et al., 2011; Nogueira et al., 2024). Eles geralmente são moídos juntamente com as folhas, o que é ruim para a obtenção e purificação dos adoçantes. Quando são separados das folhas tornam-se resíduos e costumam ser utilizados como complemento na alimentação animal (Atteh et al., 2011). Entretanto Yu et al., (2017) e Nogueira et al., 2024 extraíram e isolaram compostos antioxidantes dos caules, de extratos aquosos e alcoólicos de caules, respectivamente, e o potencial antioxidante desses extratos foi significativamente maior do que de extratos das folhas. Dessa forma, torna-se uma importante tarefa avaliar extratos e frações, ainda não estudados a partir de caules de estêvia, com o objetivo de

propor um destino adequado a este subproduto.

Pelo exposto acima, o NEPRON vem pesquisando a obtenção de extratos e frações funcionais, ricas em compostos bioativos, na maioria remanescentes de etapas do processo de obtenção dos adoçantes ou provenientes de resíduos deste processo, a fim de contribuir para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva e industrial de estévia, agregando valor e ainda fornecendo opções para o reaproveitamento de subprodutos e trazendo benefícios à saúde. O objetivo deste capítulo foi realizar a compilação de dados experimentais de estudos já publicados ou inéditos do Núcleo de Estudos em Produtos Naturais (NEPRON), da Universidade Estadual de Maringá, referência há mais de 20 anos em estudos de *Stevia*. Resultados e discussões sobre a obtenção desses extratos e frações, sobre seus constituintes, avaliação de seu potencial antioxidante, antihiperlipidêmico e antihiperlipídico serão descritos, comparados com a literatura, objetivando contribuir para encontrar um extrato ou fração mais promissor para futuramente atuar como adjuvante no tratamento de doenças como diabetes e obesidade.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

Os arbusculos de *Stevia rebaudiana* da variedade Stevia UEM-13 foram cultivados em um canteiro do Núcleo de Estudos de Produtos Naturais, NEPRON, localizado na Universidade Estadual de Maringá. A poda foi feita quando houve o máximo de crescimento vegetativo, que foi em aproximadamente 50 a 60 dias após a última colheita. Os ramos coletados foram secos em um forno de circulação de ar a 60 °C até que o teor de umidade atingiu níveis inferiores a 10 %. Em seguida os caules e as folhas foram separados manualmente, para então serem moídos em um moedor de lâminas de aço inoxidável com abertura de peneira de 2 mm, sendo posteriormente acondicionados para o processo de extração e análise subsequente.

### 2.2 Processo de extração

A **tabela 1** traz um resumo dos processos de extração de folhas ou caules de *Stevia rebaudiana*, para a obtenção de extratos e frações.

Extrato/ Fração	Resumo do processo de extração	Referência
<b>EEF</b>	Folhas de <i>Stevia</i> previamente secas e moídas (300g) foram embebidas com etanol absoluto em uma coluna (temperatura ambiente). Este mesmo solvente eluiu através da coluna e a coleta de 14 frações de 300 ml foi realizada. Essas frações foram reunidas perfazendo o extrato etanólico, que foi seco a 50 °C em rotaevaporador.	<b>Formigoni et al., 2018</b>
<b>EHF</b>	Na obtenção do extrato hidroetanólico, folhas de <i>Stevia</i> secas e moídas (100 g), foram submetidas à extração em aparato <i>soxhlet</i> usando etanol e água até a exaustão (700 mL), na proporção 70:30 (v/v). O processo foi repetido. Após esse procedimento o extrato obtido foi seco em rotaevaporador a 50 °C	<b>DNP*</b>
<b>EMF</b>	Folhas secas (100 g) de <i>Stevia rebaudiana</i> , previamente moídas e secas, foram adicionadas de 600 ml de metanol P.A. e acondicionadas ao sistema usando o aparelho <i>soxhlet</i> . O extrato obtido foi filtrado e evaporado no rotaevaporador (marca Buchi), a temperatura de 50°C e à vácuo.	<b>Milani et al., 2017a</b>
<b>FAE ETF</b>	Esta fração foi obtida a partir do extrato etanólico, um subproduto do pré-tratamento das folhas de <i>Stevia</i> UEM-13 (Formigoni et al., 2018). O fracionamento foi realizado de acordo com Milani et al., 2017a.	<b>Cabeça et al., 2024</b>
<b>FAE METF</b>	O extrato metanólico (EMF) seco foi hidratado e posteriormente adicionado de hexano. A fração hexânica foi retirada e a fração aquosa remanescente foi adicionada de clorofórmio. Esta última foi separada e a fração aquosa restante extraída acetato de etila. A mistura foi separada em funil de separação e a fração obtida em acetato de etila (orgânico) foi seca no rotaevaporador (marca Buchi), à temperatura de 50°C e a vácuo.	<b>Milani et al., 2017a</b>
<b>EMC</b>	Caules de <i>Stevia</i> UEM-13 secos e moídos (100g), foram submetidos à extração em aparato <i>soxhlet</i> usando metanol (700 mL) até a exaustão (8 horas). Após esse procedimento o extrato metanólico foi seco em rotaevaporador a 50 °C.	<b>Nogueira et al., 2024</b>
<b>EHC</b>	Na obtenção do extrato hidroetanólico, caules de <i>Stevia</i> secos e moídos (100 g), foram extraídos em aparato <i>soxhlet</i> usando etanol e água até a exaustão (700 mL), na proporção 70:30 (v/v). Após o extrato obtido foi seco em rotaevaporador a 50 °C	<b>Nogueira et al., 2024</b>
<b>FAE METC</b>	O pó obtido no EMC foi fracionado com diferentes solventes (hexano, clorofórmio e acetato de etila) de polaridade crescente para obtenção das frações polifenólicas (Milani et al 2017a). A fração em acetato de etila foi seca em rotaevaporador e foi analisada.	<b>Nogueira et al., 2024</b>

**DNP\*** - dados inéditos, publicados neste capítulo; **EEF** - Extrato Etanólico a partir das Folhas; **EHC** - Extrato Hidroetanólico a partir dos Caules; **EHF** - Extrato Hidroetanólico a partir das Folhas; **EMC** - Extrato Metanólico a partir dos Caules; **EMF** - Extrato Metanólico a partir das Folhas; **FAE ETF** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Etanólico das Folhas; **FAE METC** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico do Caule; **FAE METF** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico das Folhas; **NA** - Não analisado; **ND** - Não detectado, inferior a 0,0001%.

**Tabela 1.** Resumo dos processos de obtenção dos extratos e frações funcionais de *Stevia rebaudiana*

### 2.3 Teor de glicosídeos

Para quantificação de esteviosídeo, rebaudiosídeo A e C as amostras secas foram ressuspendidas em 10 mL da fase móvel composta por água deionizada e acetonitrila (J. T. Baker grau HPLC, concentração 99,9%) na proporção 1:4 (v/v). A solução foi agitada em

vortex e colocada em ultrassom por 5 minutos. Foram realizadas 5 filtrações e o filtrado final foi analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), marca Gilson, modelo 307, acoplado a detector IR, coluna NH<sub>2</sub>, vazão de 0,5 mL/min. O tempo de análise foi de 30 minutos (DACOME, et al. 2005).

## 2.4 Quantificação de compostos fenólicos

Segundo a metodologia de Ahmad et al, (2018), foram utilizados 150 uL do reagente Folin-Ciocalteu a 0,25 N, 150 uL de cada amostra, 2,4 mL de água deionizada, a solução foi agitada em vortex por 3 minutos, adicionamos 300 uL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A solução foi incubada durante 2 horas em temperatura ambiente em ausência de luz. Foi medido em 725,0 nm no espectrofotômetro e o resultado foi expresso em ug de equivalente de ácido gálico por mg de amostra utilizando curva padrão de ácido gálico.

## 2.5 Quantificação de flavonoides

A quantificação de flavonoides para os extratos e frações foi realizada segundo Ruiz-Ruiz et al, (2015) que indica que deveria primeiro ser preparados os reagentes cloreto de alumínio a 10% e acetato de potássio 1,0 M. Em tubos de ensaios foram preparados 0,5 mL de amostra, 1,5 mL de metanol, 0,1 mL de reagente cloreto de alumínio e 0,1 mL de acetato de potássio preparados previamente, e 2,8 mL de água destilada, a solução foi homogeneizada em vortex, deixando em repouso longe da luz em temperatura ambiente por 30 minutos, após passado o tempo a solução foi lida em espectrofotômetro sob absorvância de 415,0 nm expressando os dados obtidos em equivalentes de quercetina usando curva padrão.

## 2.6 Atividade Antioxidante - método ABTS+ (radical 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))

A determinação da atividade antioxidante pela captura do radical ABTS foi realizada seguindo a metodologia descrita pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (2007). O preparo do radical foi realizado com o preparo do reagente persulfato de potássio para a preparação do radical ABTS, adicionando 1,76 mL do persulfato a solução com ABTS, aguardamos 16 horas no escuro à temperatura ambiente. Após as 16 horas, diluímos 1 mL em etanol absoluto até atingir uma absorvância de 0,70 nm a 734 nm. Com o radical finalizado foi adicionado 30 uL de amostra e 3,0 do radical, essa solução após agitada em um agitador de tubos. Aguardamos mais 6 minutos no escuro em temperatura ambiente, foi lido em absorvância de 731,0 nm foi expresso em equivalentes de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, o Trolox como curva padrão

previamente feitos.

## 2.7 Atividade Antioxidante - método DPPH

A determinação de atividade antioxidante pelo método de DPPH de acordo com o método de Ahmad et al., (2018). Foi adicionado em um tubo de ensaio 200 uL de DPPH 0,05%, onde também foi adicionado 80 uL de amostra e 3,72 mL de metanol, foi incubado na ausência de luz durante 30 minutos à temperatura ambiente. A leitura por espectrômetro Cary, 50-Scan UV-Vis em 517,0 nm sendo que o composto de referência utilizado foi o Trolox de acordo com a curva padrão. Os dados também foram calculados em porcentagem de inibição.

$$\% \text{Inibição} = (\text{ABS Controle} - \text{ABS Amostra}) / \text{ABS Controle} * 100 \quad \text{Equação 1}$$

## 2.8 Avaliação da capacidade de inibição da enzima alfa-amilase

Segundo Apostolidis et al (2007) é avaliado a inibição da enzima da alfa-amilase com diferentes concentrações de amido, assim como diferentes concentrações de amostra e do inibidor padrão, acarbose, colocaremos 500 uL da solução de amido, 250 uL amostra, será incubado por 5 minutos a 37 °C, pipetamos 250 uL da enzima e incubamos por mais 10 minutos, adicionamos 250 uL de DNS e levamos a fervura por 5 minutos, adicionamos 2,5 mL de água destilada, e ao esfriar lemos em um espectrofotômetro na absorbância de 540 nm, e utilizamos a curva de maltose para expressar os dados.

$$\% \text{Inibição} = (\text{ABS controle} - \text{ABS amostra}) / \text{ABS controle} \times 100$$

## 2.9 Avaliação da capacidade de inibição da enzima alfa-glucosidase

Seguindo a metodologia de Natsir et al (2018) com adaptações de Shin et al (2003) e Subramanian et al (2008), foi adicionado 200 uL de enzima, 200 uL de amostra homogeneizado em vortex, pré-incubar a 37 °C por 5 minutos, pipetamos 500 uL de substrato da enzima pNPG, incubamos por mais 20 minutos, foi pipetado 8 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, homogeneizar e ler em um espectrofotômetro a 400 nm. Os dados foram expressos de acordo com a **Equação 1**.

## 2.10 Avaliação da capacidade de inibição da enzima lipase

A avaliação da capacidade de inibição dos extratos e frações seguindo a metodologia de Oliveira et al (2015), onde 20 mg do substrato o p-nitrofenil-palmitato foi suspenso em 10 mL de isopropanol até sua dissolução completa, a enzima lipase foi dissolvida em tampão Tris-HCl em pH 8 que foi centrifugada e usado o sobrenadante como fonte enzimática, Foi usado 100 uL de tampão Tris HCl (tris(hidroximetil)aminometano-ácido

clorídrico), 530 uL de substrato, após pré aquecimento da mistura de reação a 37 °C, 100 uL da solução enzimática foi colocada na mistura de reação aguardamos 20 minutos na mesma temperatura, para então a reação ser parada em fervura, resfriada a solução é colocado em uma centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos, lemos o sobrenadante em espectrofotômetro a 410 nm.

## 2.11 Identificação de compostos bioativos

Os extratos foram submetidos a análise por *Ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry UHPLC-HRMS* para identificação de compostos fenólicos e flavonoides. AS amostras foram introduzidas por injetor automático em um sistema cromatográfico UHPLC (Shimadzu, modelo Nexera X2), equipado com um sistema binário de bombas (A e B). O UHPLC estava acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução (Bruker, modelo Impact II) com fonte de ionização por Electrospray e analisadores Quadrupolo (Q) e Tempo de voo (TOF). O espectrômetro de massas (QTOF) foi calibrado com uma solução de formiato de sódio a 1 mM, e os espectros de MS serão adquiridos em modo positivo e negativo, com espectros de MS/MS obtidos no modo scan para íons mais intensos na faixa de 50 a 1300 m/z. Para a separação das moléculas nas amostras, foi utilizada uma coluna cromatográfica do tipo C18. Foram injetados 3 uL de cada amostra, com a temperatura do forno cromatográfico ajustada para 40 °C. A fase móvel ligada à bomba A do UHPLC continha água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico, enquanto a fase móvel ligada à bomba B continha metanol (MeOH) com 0,1% de ácido fórmico, em um fluxo contínuo de 0,250 mL/minutos em eluição por gradiente. Na análise em modo negativo, apenas a fase móvel A continha ácido fórmico. No início da corrida cromatográfica até 2 minutos a fase móvel B estava em 5%, de 2 a 5 minutos, a 30% de B de 5 a 10 minutos, a 70% de B de 10 a 20 minutos a 90% de B de 20 a 30 minutos a 95% de B e 30 a 35 minutos haverá a reconstituição da coluna com 5% da fase B. O cromatograma iônico e os espectros MS e MS/MS obtidos foram visualizados com o software DataAnalysis 4.1, comparados com a literatura e analisados por bancos de dados de espectrometria de massa de acesso aberto, como Massbank e Human Metabolome Database.

## 2.12 Análise estatística

Todos os testes foram realizados em triplicata, os resultados foram expressos como média e erro padrão da média e submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo seguido pelo teste de Tukey com significância estabelecidas em  $p < 0,05$ .

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Teor de glicosídeos

Glicosídeos de esteviol são os ditos adoçantes de estévia. São compostos metabólitos secundários, e são um complexo que consiste em duas unidades, uma de aglicona, também conhecida como genina que é lipofílica, podendo ter diversos grupos funcionais e a glicona que é hidrofílica composta por um ou mais componentes de açúcar, sendo mais comum a D-glicose. Com a glicose ancorada os glicosídeos de esteviol tem sabor doce. O número de glicoses e a posição determinam diferentes propriedades dos glicosídeos. O rebaudiosídeo A é reconhecido mundialmente como o glicosídeo de quantidades importantes e com perfil sensorial superior. No entanto pesquisas recentes vêm procurando destacar outros rebaudiosídeos como de melhor perfil, como o rebaudiosídeo M. Nos glicosídeos ainda, podem estar presentes diversos grupos como fenólicos, flavonoides, cumarinas, álcoois, cromonas, antraquinonas, cardíacos, cianogênicos, glicosinolatos, saponínicos e aldeídos. Para as análises de glicosídeos presentes nas amostras, quantificamos os principais, em quantidades, glicosídeos (rebaudiosídeo A, C e esteviosídeo). Os dados estão expressos na **Tabela 2**.

Os extratos metanólicos e etanólicos das folhas apresentaram maior teor de glicosídeos em comparação com os extratos do caule, que ainda assim apresentou maior teor que as frações. Os teores desses extratos provenientes das folhas ficaram em torno de 30%, o que pode demonstrar que em termos de extração de glicosídeos os dois solventes foram muito similares. Dessa forma utilizar o etanol pode ser mais vantajoso por ser um solvente considerado verde, além disso reutilizar este subproduto merece ser estudado pensando na sustentabilidade do processo. O fracionamento apresentou uma perda no teor de glicosídeos em comparação aos extratos de mesma origem. Tal fato é resultante da solubilidade nos solventes orgânicos aos quais foram expostos e fracionados (IUPAC Goldbook, 2016; Vollhardt & Schore, 2007; Bruice, 2006). EHF e EMC obtiveram valores maiores em comparação com os extratos aquosos de caules e folhas e mostraram que o processo de extração em água possibilita maior rendimento de extração de glicosídeos (Dacome et al., 2005).

Extrato/Fração	% de Glicosídeos totais
EEF	28,5
EHF	NA
EMF	30,1
FAE ETF	ND
FAE METF	0,05
EMC	8,66
EHC	4,12
FAE METC	ND

**EEF** - Extrato Etanólico a partir das Folhas; **EHC** - Extrato Hidroetanólico a partir dos Caules; **EHF** - Extrato Hidroetanólico a partir das Folhas; **EMC** - Extrato Metanólico a partir dos Caules; **EMF** - Extrato Metanólico a partir das Folhas; **FAE ETF** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Etanólico das Folhas; **FAE METC** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico do Caule; **FAE METF** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico das Folhas; **NA** - Não analisado; **ND** - Não detectado, inferior a 0,0001%.

**Tabela 2.** Percentagem de Glicosídeos totais por Extrato/Fração

## 3.2 Quantificação de compostos fenólicos e flavonoides

A concentração de compostos fenólicos e flavonoides está mostrada na **tabela 3**. Compostos fenólicos também chamados de polifenóis são compostos por anéis aromáticos com radicais hidroxilas variando de compostos simples a altamente polimerizados, são facilmente conjugados a monossacarídeos e sua síntese está relacionada com duas vias metabólicas: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico. Os fenólicos estão muito relacionados com a coloração dos alimentos, que ao serem oxidados causam as cores do amadurecimento, além de estar diretamente relacionado com o crescimento das plantas e defesa contra infecções e ferimentos, o que proporciona um impacto importante em sua estabilidade oxidativa. A maioria dos polifenóis antioxidantes estão presentes nos alimentos que consumimos no cotidiano, portanto são considerados antioxidantes dietéticos. Um desses polifenóis, o ácido clorogênico e o ácido cinâmico presentes nas folhas e nos caules respectivamente, estão muito relacionados com as atividades antioxidante, anti-inflamatória, antilipidêmica e antidiabética (Koblitz, 2008; Lemus-Mondaca, et al., 2018; Ling e Kitts, 2016; Gouthamchandra, Sudeep, Venkatesh e Shyam Prasad, 2017; Ong, Hsu e Tan, 2013; Myint, et al., 2020). Flavonoides também conhecidos como heterosídeos, quando existe a presença de açúcar, são o maior grupo de fenólicos naturais que são encontrados em frutas e vegetais. Duas de suas propriedades marcantes são seu sabor amargo e sua baixa solubilidade o que potencializa sua recuperação em solventes polares sendo responsáveis pelos sabores, cores e fragrâncias nas flores e frutos. Como integrantes dos compostos fenólicos demonstram ter características nutracêuticas como antioxidantes, antidiabéticos

e imunomoduladores, suplementos de flavonoides mostraram eficácia de medicamentos em várias doenças neuro inflamatórias, neurodegenerativas, diabetes e infecções (Nagar, Dey, Das, Basu, 2022; Rodriguez, et al., 2021; Mancarz, Prado, Pazzim, 2023). Na tabela a seguir é mostrado que frações provenientes dos extratos obtiveram um resultado melhor em comparação com seus extratos, sendo a fração acetato de etila do extrato metanólicos tanto da folha (FAE METF) quanto do caule (FAE METC) as que apresentaram resultados mais proeminentes. Ainda a fração obtida a partir do extrato metanólico foi testada quanto a sua citotoxicidade, e os resultados mostraram-se negativos até mesmo em concentrações 1000 vezes superiores que as doses administradas nos animais. O extrato hidroetanólico da folha (EHF) obteve melhores resultados pela provável mistura de solventes polares verdes, a água e o etanol, tendo a maior porcentagem de extração de compostos fenólicos e de flavonoides, demonstrando possuir atividade antioxidante importante, aumentando as expectativas de possuírem atividades antidiabéticas e antilipídica.

Extrato/Fração	% Compostos Fenólicos u	% Flavonoides
EEF	10,04	7,71
EHF	56,7	19,5
EMF	10,2	4,15
FAE ETF	45,9	16,51
FAE METF	51,3	17,8
EMC	17,25	6,78
EHC	15,93	5,32
FAE METC	26,29	9,53

**EEF** - Extrato Etanólico a partir das Folhas; **EHC** - Extrato Hidroetanólico a partir dos Caules; **EHF** - Extrato Hidroetanólico a partir das Folhas; **EMC** - Extrato Metanólico a partir dos Caules; **EMF** - Extrato Metanólico a partir das Folhas; **FAE ETF** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Etanólico das Folhas; **FAE METC** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico do Caule; **FAE METF** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico das Folhas.

**Tabela 3.** Porcentagem de Compostos Fenólicos e Flavonoides por Extrato/Fração

### 3.3 Atividade Antioxidante - método DPPH

O radical 2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazil DPPH foi um método desenvolvido por Brand-Willians em 1995, onde um radical livre estável é usado para determinar a atividade antioxidante. Esse método, ao longo dos anos foram sofrendo modificações e adaptações por diversos pesquisadores, mas os ensaios são baseados na capacidade dos antioxidantes em eliminar os radicais DPPH. O único elétron do átomo de nitrogênio no DPPH é reduzido à hidrazina retirando um átomo de hidrogênio dos antioxidantes. Sua estabilidade é proveniente do aglomerado estérico no átomo de nitrogênio divalente de primeira ordem e ao efeito “*push-pull*” exercido pelo grupo difenilamino de segunda ordem, um doador de

elétrons e *picryl* um receptor de elétrons. Esse efeito estabiliza consideravelmente sua estrutura canônica. O radical DPPH possui uma cor violeta, estável e intensa. Quando a solução antioxidante é misturada com a solução de DPPH essa cor violeta desaparece resultando na forma reduzida do radical DPPH-H; a solução muda de violeta para amarelo pálido como resultado da redução radical pela transferência de átomos de hidrogênio dos antioxidantes que são doadores de H.

O radical é levemente solúvel em solventes polares, dissolve-se em solventes orgânicos, reage de forma exigente com doadores de hidrogênio em diferentes locais de reação, geralmente atacando o anel fenil. A solução radical DPPH-metanol é muito usada por ser simples e disponível como radicais prontos, muito usado para testes em produtos alimentícios e farmacológicos medindo a absorvância dos radicais que ficam no meio de reação. O oxigênio molecular não reage com o DPPH, apenas na presença de luz, onde torna-se possível verificar uma ligeira interação (Kawai e Shibuya, 2002; Chen et al., 2009; Xie e Schaich, 2014).

O ensaio DPPH, apesar de ser *in vitro*, geralmente reflete resultados *in vivo*, sendo um bom parâmetro para extrapolação. O extrato metanólico teve os melhores resultados entre os extratos, apenas sendo superado pelas frações acetato de etila obtidas a partir do extrato metanólico da folha (FAE METF) e do caule (FAE METC), demonstrando que a fração concentrou os compostos antioxidantes, ou ainda apresentou algum constituinte que estava presente no seu extrato de origem. A **tabela 4** apresenta os resultados deste estudo. FAE METF concentrou quase 100% dos radicais na concentração de apenas 1 miligrama. Quando reduzimos esta concentração pela metade e até mesmo  $\frac{1}{4}$  a porcentagem ainda fica acima dos 80% (Cabeça et al., 2023; Siciliano et al., 2024). Esses dados foram referência para conduzir os estudos *in vivo*. A FAE METC também apresentou importante atividade antioxidante (nogueira et al., 2024). Yu et al., 2017 obtiveram um extrato aquoso de caules e folhas de *Stevia* e avaliaram o potencial em inibir a oxidação lipídica em óleo de peixe. O extrato do caule apresentou capacidade superior ao extrato da folha. Ainda não está claro, e totalmente correlacionada a capacidade antioxidante `concentração de compostos fenólicos. Pesquisas mostram que as vezes, mesmo em menor quantidade tal composto já pode pronunciar uma atividade de sequestro superior. Assim, identificar e quantificar esses compostos torna-se uma tarefa importante de pesquisa. Este trabalho apresenta alguns desses compostos identificados (**tabelas 7, 8 e 9**).

Extrato/Fração	% Compostos Fenólicos u
EEF	13
EHF	4
EMF	93
FAE ETF	55
FAE METF	98
EMC	53
EHC	65
FAE METC	90

**EEF** - Extrato Etanólico a partir das Folhas; **EHC** - Extrato Hidroetanólico a partir dos Caules; **EHF** - Extrato Hidroetanólico a partir das Folhas; **EMC** - Extrato Metanólico a partir dos Caules; **EMF** - Extrato Metanólico a partir das Folhas; **FAE ETF** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Etanólico das Folhas; **FAE METC** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico do Caule; **FAE METF** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico das Folhas.

**Tabela 4.** Percentagem de inibição pelo método de DPPH por Extrato/Fração

### 3.4 Atividade Antioxidante - método ABTS<sup>+</sup>

O ensaio 2,2-Azino-Bis(2-Ethylbenzeno-thiazoline-6-Sulfonic Acid) Diammonium Salt, ABTS, é um ensaio para a determinação de antioxidantes totais, onde há o sequestro de radicais livres ABTS<sup>+</sup>. É um ensaio medido como uma redução na presença de doadores de hidrogênio, e é um método de descoloração, sendo muito popular para estimar a capacidade antioxidante de alimentos. A metodologia baseia-se nas reações de um elétron de redução do radical ABTS por compostos antioxidantes presentes nas amostras tanto proteicas como ácidos alimentícios. Quando o ABTS<sup>+</sup> reage com certos compostos como as proteínas, o radical é reduzido formando um produto de cor, o que pode ser uma evidência de reações de adição de radicais nas proteínas. A interação ABTS com ácidos alimentícios tem como resultado a conversão de cátion radical em seu derivado diamagnético, facilitada pela ligação de hidrogênio com ânions ácidos. O ABTS em si pode acelerar o processo de oxidação de fenóis substituindo-os por permanganato de potássio Mn(VII), esses fenóis substituídos poderiam ser prontamente oxidado pelo cátion radical estável que foi produzido a partir da oxidação do ABTS por Mn(VII). As vias de reação do ensaio de descoloração do ABTS/persulfato de potássio mostram que alguns antioxidantes formam adutos de acoplamento com o ABTS<sup>+</sup>, enquanto outros sofrem oxidação sem acoplamento, apontando reações específicas para diferentes antioxidantes. Os resultados do ensaio ABTS nas amostras apresentadas neste estudo ou foram negativos ou tiveram ação antioxidante reduzida (dados não mostrados). Isto se deve ao fato de que muitas vezes uma amostra tem uma atividade importante para sequestrar determinado radical livre e não tem o mesmo resultado quando mudamos o radical. A diferença na efetividade se dá

por inúmeros fatores, um deles pode ser pelo composto presente e seu mecanismo de ação não terem sido efetivos para aquele radical. Outra observação se dá no ensaio: ensaios *in vitro* não podem ser totalmente extrapolados para os resultados *in vivo*. (Sadowska-Bartosz, Bartosz 2022; Kut, et al., 2022; Ilyasov, Beloborodov, Selivanova e Terekhov, 2020).

### 3.5 Avaliação atividade Antidiabética

A alfa-amilase é uma enzima que pode ser produzida por diversos organismos. São endo-carboidrases que hidrolisam ligações alfa-1,4, que existem na amilose e na amilopectina aleatoriamente no centro da molécula. Sua ação enzimática ocorre sobre o amido de forma acelerada, visto que elas apresentam maior atividade sobre substratos de alta massa molecular, gerando oligossacarídeos de diferentes tamanhos, chamadas dextrina ou maltodextrinas, com maior tempo de ação são capazes de produzir glicose e maltose. Elas são estabilizadas na presença de íons de cálcio que em si não aumentam a velocidade de reação, mas aumentam sua estabilidade, reduzindo a desnaturação aumentando sua vida útil. Essa enzima é usado em diversas áreas da biotecnologia e indústria como na fermentação de alimentos, indústria de papel, indústria têxtil apesar de existir outras enzimas que possam hidrolisar o amido, a alfa-amilase ainda é considerada a mais importante, pela sua alta demanda, são usados microrganismos para sua produção em alta escala. Nos animais é produzida na saliva e no pâncreas para a digestão do amido nos alimentos. A alfa-glicosidase é outra enzima carboidrase capaz de hidrolisar carboidratos possuem ligações alfa-glicosídicas 1,6, que uma vez rompida o resíduo liberado poderá manter sua conformação sendo ela alfa ou beta. O diabetes mellitus é uma das doenças com risco de morte, sendo as formas mais comuns o tipo 1 e 2. A diferença destes tipos é causada pela incapacidade do pâncreas de produzir insulina e da dificuldade das células em reconhecer a insulina para a captação da glicose respectivamente. A Federação Internacional de Diabetes (IDF) tem como previsão que em 2030 cerca de 643 milhões de pessoas terão diabetes e que até 2045 cerca de 783 milhões.

Pesquisas buscam adjuvantes naturais que possam auxiliar na prevenção e no tratamento do DM. Uma das formas de investigação vem sendo estudada é a inibição de enzimas como alfa-amilase e alfa glicosidase, o que retardaria a quebra de carboidratos pela saliva, intestino, pâncreas e limitaria a excursão de glicose no sangue. Muitos compostos à base de plantas são usados como inibidores enzimáticos para retardar e reduzir a disponibilidade de glicose no sangue pós-prandial (Ogle et al., 2022; Jeevanandam, et al., 2023; Koblitz, 2008). Como podemos constatar pela tabela 5 a seguir, é possível notar que os extratos e frações proveniente da Stevia puderam apresentar inibição dessas enzimas. Dados como estes, de estudos *in vitro*, são predicativos importantes para avançar nos estudos *in silico* e *in vivo*. A FAE METF obteve melhores resultados na inibição de ambas

as enzimas. Esses dados corroboram com os estudos de Singla et al (2019) que mostrou que *Stevia rebaudiana* apresenta alta atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase, sugerindo potencial para o desenvolvimento de medicamentos terapêuticos para o tratamento do diabetes.

Extrato/Fração [0,1 mg/ml]	% de Inibição de Amilase [4mg/mL]	% de Inibição de Glicosidase [4mg/mL]
EEF	10	90
EHF	8	97*
EMF	19	90
FAE ETF	5	92
FAE METF	40	95
EMC	8	99
EHC	26	99
FAE METC	0	99

EEF - Extrato Etanólico a partir das Folhas; EHC - Extrato Hidroetanólico a partir dos Caules; EHF - Extrato Hidroetanólico a partir das Folhas; EMC - Extrato Metanólico a partir dos Caules; EMF - Extrato Metanólico a partir das Folhas; FAE ETF - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Etanólico das Folhas; FAE METC - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico do Caule; FAE METF - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico das Folhas. \*Não foi analisado nas mesmas concentrações que os outros extratos e frações para a análise da avaliação da inibição da glicosidase, esse valor é correspondente a concentração de 0,5 mg/mL.

**Tabela 5.** Porcentagem de inibição de Amilase e Glicosidase por Extrato/Fração

### 3.6 Avaliação da atividade Antilipídica

Lipases são enzimas que hidrolisam os triacilgliceróis constituindo a classe das serina hidrolases que não exige nenhum cofator para sua atividade, possuem diversos substratos tendo como produto o glicerol e ácidos graxos livres através da hidrólise de gorduras e óleos. As lipases contribuem para melhor absorção de corantes em produtos têxteis, auxiliam em muitos processos como a fabricação de couro, na remoção de componentes hidrofóbicos na indústria de papel e celulose, também são empregadas nos processos de biorremediação.

A inibição da lipase, principalmente da lipase pancreática vem sendo estudada extensivamente utilizando vários compostos naturais antioxidantes como compostos fenólicos e flavonoides. Os principais mecanismos de inibição envolvem a inibição competitiva com afinidade de ligação moderada, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Para compostos de *Stevia rebaudiana*, esses testes são recentes. A inibição da lipase como demonstrada na tabela 6, foi destacada pela FAE METC que obteve quase 100% de inibição da lipase o que demonstra que esta fração pode apresentar atividade antilipídica alta assim como a FAE METF que obteve 95% de inibição. Este dado é importante por se tratar do caule, considerado resíduo ou subproduto. Os caules apresentam pouco teor de adoçantes e por isso não são usados na indústria para destinação humana. No entanto os

dados apresentados podem auxiliar e impulsionar o desenvolvimento deste setor.

Extrato/Fração [0,1mg/mL]	% de Inibição de Lipase [1,0mg/mL]
EEF	76
EHF	27
EMF	90
FAE ETF	76
FAE METF	95
EMC	77
EHC	49
FAE METC	99

**EEF** - Extrato Etanólico a partir das Folhas; **EHC** - Extrato Hidroetanólico a partir dos Caules; **EHF** - Extrato Hidroetanólico a partir das Folhas; **EMC** - Extrato Metanólico a partir dos Caules; **EMF** - Extrato Metanólico a partir das Folhas; **FAE ETF** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Etanólico das Folhas; **FAE METC** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico do Caule; **FAE METF** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico das Folhas.

**Tabela 6.** Porcentagem de inibição da Lipase por Extrato/Fração

### 3.7 Identificação de bioativos

A cromatografia é um método de separação que distribui os componentes de uma mistura entre uma fase estacionária e uma fase móvel por meio de vários métodos, incluindo adsorção, partição, troca iônica e por diversos outros. A cromatografia líquida (LC) é o método mais comum para identificar, medir e separar componentes, essa técnica se desenvolveu para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) que é um método eficaz, muito utilizado para identificar produtos farmacêuticos em fluidos biológicos. O desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra alta eficiência-espectrometria acoplada à espectrometria de massa (UHPLC-MS/MS) foi se necessária pela necessidade de técnicas de separação rápida e ultrarrápida que possuem resolução maior. O UHPLC tem um tempo de análise surpreendentemente curto e usa uma pequena quantidade de solvente e fase móvel, aumenta consideravelmente a eficácia de separação e a resolução da mistura de analitos, usa o tamanho da partícula empacotamento de coluna inferior a microns como seu diferencial dos sistemas HPLC. A ideia fundamental por trás da técnica se baseia na eficiência obtida a partir do tamanho das partículas de empacotamento de colunas diminui. Uma redução do tamanho das partículas inferior a 2  $\mu\text{m}$  resulta em uma melhoria na eficiência que não cai em velocidades lineares ou taxas de fluxos mais altas. Para aumentar a resolução cromatográfica com o maior número de picos, aprimorando os sistemas de separação de LC, usando uma pequena quantidade de materiais para o empacotamento de coluna e redução de tamanho das partículas e a análise se torna mais rápida e sensível (Chawla e Ranjan, 2016; Klimczak e Gliszczynska, 2014; Kumar, Saini, Nair e Shamar, 2012; Chesnut e Salisbury, 2007; Taleuzzaman, et al., 2015; Nogueira et al.,

2024). As tabelas a seguir mostram os compostos identificados nas frações e extratos com maiores teores de compostos fenólicos.

Provável metabólico	Classe	Grupo observado	Adduct	Fórmula química	m/z teórico	m/z experimental	ppm
Ácido 1,3-dicafeoil quinico	Derivados do ácido cinâmico	FAE METC POS	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	515,1184	515,1184	0
Ácido 3-cafeoilquinico	Compostos fenólicos Derivados do ácido cinâmico	FAE METC NEG	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	353,0867	353,0862	-1,416
Naringenina	Flavonoide	FAE METC NEG	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	271,0601	271,0601	0

**FAE METC** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico do Caule.

**Tabela 7.** Identificação de compostos da fração acetato de etila do extrato metanólico do caule por UHPLC

Provável metabólico	Classe	Grupo observado	Adduct	Fórmula química	m/z teórico	m/z experimental	ppm
Quercetina-3-O-desoxihexosil-(1-2)-petosídeo	Flavonoide	FAE METF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	580,14	579,13	1,20
Kaempferol-3-O-pentosídeo	Flavonoide	FAE METF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	418,08	417,08	0,71
Quercetina-3-O-desoxihexosídeo	Flavonoide	FAE METF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	448,1	447,09	0,67
Ácido 1-feruloil-5-cafeoilquinico	Compostos fenólicos	FAE METF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	530,14	529,13	-1,51
Ácido clorogênico	Compostos fenólicos	FAE METF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	354,09	353,08	0
Quercetina-3-O-deoxi-hexosil-(1-6)-hexosídeo	Flavonoide	FAE METF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	610,15	609,14	-0,49
Quercetina-3-O-hexosídeo	Flavonoide	FAE METF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	464,09	463,08	-0,64

**FAE METF** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Metanólico das Folhas.

**Tabela 8.** Identificação de compostos da fração acetato de etila do extrato metanólico da folha por UHPLC

Provável metabólico	Classe	Grupo observado	Adduct	Fórmula química	m/z teórico	m/z experimental	ppm
Astragalina	Flavonoide	FAE ETF	[MH] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	448,376	449,1039	-8,68
Quercetina-3-O-desoxihexosil-(1-2)-pentosídeo	Flavonoide	FAE ETF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	581	579,099	1,21
Kaempferol-3-O-pentosídeo	Flavonoide	FAE ETF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	418	417,056	0,72
Quercetina-3-O-desoxihexosídeo	Flavonoide	FAE ETF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	431,097	431,072	-0,46
Quercetina-3-O-desoxihexosil-(1-6)-hexosídeo	Flavonoide	FAE ETF	[MH] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	610,152	609	0
Quercetina-3-O-desoxihexosídeo	Flavonoide	FAE ETF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	448,1	447,065	0,45
Kaempferol-7-O-hexosídeo	Flavonoide	FAE ETF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	448,4	447,065	1,34
Ácido cafeoilquínico	Compostos fenólicos	FAE ETF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	354,091	353	3,4
Ácido 3,4-dicafeoilquínico	Compostos fenólicos	FAE ETF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	516,450	515	3,7
Kaempferol-3-O-desoxihexosídeo	Flavonoides	FAE ETF	[MH] <sup>-</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	432,105	431	0
Rutina	Flavonoides	FAE ETF	[MH] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	611	611,152	-4,91
Quertricina	Flavonoides	FAE ETF	[MH] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	448,376	449,101	-5,12
Afzelin	Flavonoides	FAE ETF	[MH] <sup>+</sup>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	432,4	433,107	-4,85

**FAE ETF** - Fração Acetato de Etila a partir do Extrato Etanólico das Folhas;

**Tabela 9.** Identificação de compostos da fração acetato de etila do extrato etanólico da folha por UHPLC

Comparando as tabelas 6 e 7 mostram os compostos fenólicos e flavonoides nas frações obtidas a partir do extrato etanólico, publicados por Nogueira et al., 2024 e Siciliano et al., 2024. A tabela 8, apresenta os compostos fenólicos e flavonoides presentes na FAE obtida a partir do extrato etanólico, um subproduto da extração e purificação de adoçantes de estêvia (Cabeça et al., 2024). Nota-se que alguns compostos são similares, mostrando que a FAE a partir de um resíduo tem potencial para ser explorada e pode trazer benefícios, agregando valor ao setor e ainda contribuindo para uma exploração sustentável de estêvia.

Um dos compostos que aparece nas tabelas é o ácido cafeoilquínico é muito abundante em grãos de café, conhecido pela melhora da função cognitiva em camundongos modelo da doença de Alzheimer, possui propriedades antioxidantes devido a sua porção catecol e à conjugação estendida da cadeia lateral, forma um radical fenoxi estabilizado por ressonância, responsável pelo seu potencial antioxidante (Suganuma et al., 2024; Dizdar,

Vidic, Zeljkovic e Maksimovic, 2024).

O ácido 1,3-dicafeoilquínico também chamado de ácido 3,5-dicafeoilquínico é um composto fenólico também encontrado nos caules e nas folhas de estevia, que possui diversos benefícios à saúde. Pesquisas mostraram que o composto bioativo pode inibir o acúmulo de lipídios nas células adiposas, dificultando a proliferação celular durante a fase de expansão clonal mitótica e postergando a diferenciação terminal dos adipócitos tornando-o um potencial bioativo no combate a obesidade (Raineri et al., 2021; Lee et al., 2019). Esses resultados motivam a investigar melhor o potencial bioativo desses compostos para combater diversas doenças, como diabetes e a própria obesidade. A biossíntese desses compostos de forma sintética pode ser custoso e dessa forma obter um extrato ou fração de um resíduo e ainda ter múltiplos agentes funcionais pode representar benefícios inúmeros para diversos setores das áreas farmacêutica, de alimentos, agrária e da saúde.

## 4 | CONCLUSÃO

Este presente trabalho teve como objetivo reunir dados recentes publicados ou não sobre compostos bioativos presentes em resíduos, subprodutos ou extratos não doces de *Stevia rebaudiana*, especialmente de variedades de elite. O objetivo é proporcionar às literaturas do setor informações científicas importantes para contribuir para o desenvolvimento sustentável da exploração da estevia no Brasil e no mundo. A identificação de compostos bioativos e a investigação inicial da capacidade antidiabética e antilipídica de extratos e frações de estevia foi relatada. Nossos resultados demonstraram que o fracionamento dos extratos aumenta significativamente o potencial do extrato em diversas análises como na atividade antioxidante. Ainda, o caule, resíduo na obtenção de adoçantes a partir das folhas ou subproduto usado para ração animal, tem potencial para ser usado também pelas áreas farmacêutica, de alimentos e de saúde, e precisa ser melhor avaliado e aplicado. A fração proveniente do extrato etanólico, subproduto do pré-tratamento apresentou compostos bioativos similares aos das frações obtidas a partir de extratos metanólicos, solvente considerado não verde, e pode ter potencial funcional. As frações em acetato de etila (metanólicas) das folhas e dos caules possuíram maiores atividades, com maiores concentrações de compostos fenólicos, em baixas concentrações conseguiram inibição superior a 90% da enzima glicosidase e lipase, obtendo um potencial para inibir também a enzima amilase. Esses resultados obtidos têm implicações importantes para o desenvolvimento de novos tratamentos baseados em bioativos naturais principalmente no manejo e controle de diversas doenças como a diabetes mellitus e a obesidade. No entanto, a pesquisa possui limitações quanto aos rendimentos das extrações, e mais aplicações e investigações são incentivadas.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, M.; ASHRAF, B.; GANI, A.; GANI, A. Microencapsulation of saffron anthocyanin using  $\beta$  glucan and  $\beta$  cyclodextrin: Microcapsule characterization, release behavior and antioxidant potential during in-vitro digestion. **International Journal of Biological Macromolecules**. 109: 435-442, 2018.

ANVISA. Aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2024. Disponível em <Aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia — Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa (www.gov.br)> Acessado dia 17 de maio de 2024.

ANATEL. Diabetes (diabetes mellitus), ministério da saúde, 2021. Disponível em <Diabetes (diabetes mellitus) — Ministério da Saúde (www.gov.br)> Acessado dia 17 de maio de 2024

APOSTOLIDIS, A.; KWON, Y.-I.; SHETTY, K. Inhibitory potential of herb, fruit and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, i. 1, p. 46-54, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.06.001>.

ATTEH, J.; ONAGBESAN, O.; TONA, K.; DECUYPERE, E.; GEUNS, J. Potential use of Stevia rebaudiana in animal feeds. **Archivos de Zootecnia**, v. 60, n. 229, <https://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922011000100015,2011>.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVÉLIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebens.-Wiss. U. Technol.** 28, 25-30. 1995. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. *Vigitel Brasil 2006-2021: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica do estado nutricional e consumo alimentar nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal entre 2006 e 2021: estado nutricional e consumo alimentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2022.*

BRUICE, P. Y. Química Orgânica. **Pearson Prentice Hall**. ed. 4, vol. 1, p 385-390, 2006.

CABEÇA, CYNTHIA LETÍCIA S.; **NOGUEIRA, NATANI CAROLINE**; ZORZENON, MARIA ROSA T.; DACOME, ANTONIO SERGIO; MADRONA, GRASIELE SCARAMAL; DA COSTA, CECÍLIA EDNA MAREZE; DA COSTA, SILVIO CLAUDIO; MILANI, PAULA GIMENEZ. Microencapsulated antioxidant stevia fraction fortifies whey protein and enhances its antidiabetic activity. **JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-MYSORE JCR**, v. 60, p. 2275-2285, 2023.

Stevia by-product fraction has antioxidant capacity and has been evaluated for its antihyperglycemic and antilipid potential". De autoria de Cynthia Letícia Serra Cabeça, Betânea Campangolli Pereira, Natani Caroline Nogueira, Paulo Leonardo Marotti Siciliano Maria Rosa Trentin Zorzenon, Antonio Sergio Dacome, Milena Kazue Enokida, Felipe de Oliveira Souza, Pauline Godoi Silva, Adan Rodrigues de Oliveira, Eduardo Jorge Pilau, Silvio Claudio da Costa e Paula Gimenez Milani Fernandes. Submetido à revista "Current Bioactive Compounds", aguardando publicação.

CIOTTA, S. R.; ZORZENON, M. R. T.; DACOME, A. S.; HODAS, F.; COUTO, J. M. F. A.; MILANI, P. G.; COSTA, C. E. M.; COSTA, S. C. Extraction of sweeteners from Stevia rebaudiana by semicontinuous percolation of untreated leaves and leaves pretreated with ethanol. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s.1], v. 46, n. 3, p. 1-9, 2002

CHAWLA, G.; RANJAN, C. Principle, instrumentation, and applications of UPLC: A novel technique of liquid chromatography. **Open Chemistry Journal**, 2016.

CHEN, J. Scientific consensus on food sweeteners. **China Food Information Center**, v. 57 I. 4, p. 457-460, doi: 10.3760/cma.j.cn112150-20221117-01119, 2023.

CHEN, O.; ZHUANG, J.; GUZZETTA, F.; LYNCH, J.; ANGERHOFER, A.; CAO, Y.C. Synthesis of water-soluble 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl nanoparticles: A new standard for electron paramagnetic resonance spectroscopy. **J. Am. Chem. Soc.** 2009, 131, 12542–12543.

DACOME, A. S.; SILVA C. C.; DA COSTA C. E. M.; FONTANA, J.; ADELMANN, J.; DA COSTA, S. C. Sweet diterpenic glycosides balance of a new Cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic and electrophoretic methods. **Process Biochemistry**, v. 40, i. 11, p. 3587 -3594, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.035>

DESAI, A. G.; QAZI, G. N.; GANJU, R. K.; EL-TAMER, M.; SINGH, J.; SAXENA, A. K.; BEDI, Y. S.; TANEJA, S. C.; BHAT, H. K. Medicinal plants and cancer chemoprevention. **Current Drug Metabolism**, s. 9 (7), p. 581-591, 2008. doi: 10.2174/138920008785821657

DIZDAAR, M.; VIDIC, D.; ZELJKOVIC, S. C.; MAKSIMOVIC, M. *In vitro* Antioxidant activity of 5-caffeoylquinic acid and ester analogues. **Bentham Science**, 2024.

DURMIC, Z.; BLACHE, D. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. **Animal Feed Science Technology**, v. 176, p. 150-162, 2012.

EMBRAPA. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em

frutas pela captura do radical livre ABTS+. Fortaleza, CE: EMBRAPA Comunicado Técnico, 2007. 4p.

FORMIGONI, M.; MILANI, P. G.; AVÍNCOLA, A. S.; SANTOS, V. J.; BENOSSI, L.; DACOME, A. S.; PILAU, E. J.; COSTA, S. C. Pretreatment with ethanol as an alternative to improve steviol glycosides extraction and purification from a new variety of stevia. **Food Chemistry**. 241: 452-459, 2017.

GOUTHAMCHANDRA, K., SUDEEP, H. V., VENKATESH, B. J., & SHYAN PRASAD, K. Chlorogenic acid complex (CGA7), standardized extract from green coffee beans exerts anticancer effects against cultured human colon cancer HCT-116 cells. **Food Science and Human Wellness**, 6(3), 147–153 2017.

ILYASOV, I. R.; BELOBORODOV, V. L.; SELIVANOVA, I. A.; TEREKHOV, R. ABTS/PP Decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways. **International Journal of Molecular Science**, 2020, <https://doi.org/10.3390/ijms21031131>

IUPAC GOLDBOOK. Disponível em <<https://www.iupac.org/goldbook/G02661.pdf>> Acessado em 24 de julho de 2024.

JEEVANANDAM, J.; GONÇALVES, M.; CASTRO, R.; GALLO, J.; BAÑOBRE-LÓPEZ, M.; RODRIGUES, J. Enhanced alpha-amylase inhibition activity of amine-terminated PAMAM dendrimer stabilized pure copper-doped magnesium oxide nanoparticles. **Biomaterials advances**, 2023 <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213535>.

KAWAI, A.; SHIBUYA, K. Energy separation between quartet and doublet spin states of radical-triplet encounter pairs; unusual ferromagnetic interaction in a 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl and triplet coronene pair. **J. Phys. Chem. A** 2002, 106, 12305–12314.

- KLIMCZAK, I.; GLISZCZYNSKA, A. W.; Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. **Food Chemistry**, 2015.
- Koblitz, M. G. B. Bioquímica de Alimentos teoria e aplicações práticas. **Guanabara Koogan LTDA**, 2008.
- KUREK, J. M.; MIKOLAJCZYK-STECYNA, J.; KREJPCIO, Z. Steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni mitigate lipid metabolism abnormalities in diabetes by modulating selected gene expression- An in vivo study. **Biomedicine e Pharmacotherapy**, 2023.
- KOUBA, M.; ROSELLO-SOTO, E.; ŠIČ ŽLABUR, J.; JAMBRAK, A.R.; BRNCIC, M.; GRIMI, N. Boussetta N & Barba FJ (2015) Current and New Insights in the Sustainable and Green Recovery of Nutritionally Valuable Compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 63 (31), 6835-6846 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01994>
- KUMAR, A.; SAINI, G.; NAIR, A.; SHARMA, R. Review UPLC: a preeminent technique in pharmaceutical analysis. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, 2012.
- KUT, K.; CIENIEK, B.; STEFANIUK, I.; BARTOSZ, G.; SADOWSKA-BARTOSZ, I. A Modification of the ABTS• Decolorization Method and an Insight into Its Mechanism. **Processes** 2022, 10, 1288.
- LEE, J. I.; KIL, J. H.; YU, G. H.; KARADENIZ, F.; OH, J. H.; SEO, Y.; KONG, C. S. 3,5-Dicaffeoyl-epi-quinic acid inhibits the PMA-stimulated activation and expression of MMP-9 but not MMP-2 via downregulation of MAPK pathway. **Zeitschrift fur naturforschung C**, 2019.
- LEMUS-MONDACA, R., VEGA-GALVEZ, A., ROJAS, P., STUCKEN, K., DELPORTE, C., VALENZUELA-BARRA, G., ... PASTEN, A. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory potential of *Stevia rebaudiana* leaves: Effect of different drying methods. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, 11, 37–46 2018.
- LIANG, N., & KITTS, D. D. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. **Nutrients**, 8(1), 16–36, 2016.
- MAGALHÃES P.M.; DE MARTÍNEZ, A.J.V.; YESID, B.H.; CÁCERES, A. Agrotecnología para el cultivo de estévia o hierba dulce. **Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**, Colômbia, p. 441-450, 2000.
- Mancarz, G. F. F.; Prado, M. R. M.; Pazzim, M. S. Studies in Natural Products Chemistry. **Bioactive Natural Products**, 2023. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91294-5.00002-6>
- MILANI, P.G.; FORMIGONI, M.; DACOME, A.S.; BENOSSI, L.; COSTA, C.E.M.; COSTA, S.C. New seminal variety of *Stevia rebaudiana*: obtaining fractions with high antioxidant potential of leaves. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v.89,n.3,p.1841 1850, 2017a.<https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170174>
- MILANI, P.G.; FORMIGONI, M.; LIMA, Y.C., et al. Fortification of the whey protein isolate antioxidante and antidiabetic activity with fraction rich in phenolic compounds obtained from *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni leaves. **Journal Food Science Technol**,v.54, n.7, p.2020-2029, 2017b.
- MILANI, P.G.; PIOVAN, S.; LIMA, Y.C.; ZORZENON, M.R.T.; ROSA, C.V.D.; PEIXOTO, G.M.L.; MATHIAS, P.C.F.; NATALI, M.R.M.; COSTA, S.C.; COSTA, C.E.M. Whey protein enriched with *Stevia rebaudiana* fraction restores the pancreatic function of streptozotocin induced diabetic rats. **Journal Food Science Technol**, 58(2): 805-810, 2021. doi: 10.1007/s13197-020-04799-3

Ministério da Saúde. O impacto da obesidade. Disponível em <O impacto da obesidade — Ministério da Saúde (www.gov.br) > Acesso 30 de maio de 2024

MYNT, K. Z.; WU, K.; XIA, Y.; FAN, Y.; SHEN, J.; ZHANG, P.; GU, J. Polyphenols from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves and their functional properties. **Journal of Food Science**, 2020. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15017>

NAGAR, S.; DAEY, S.; DAS, A.; BASE, S. Flavonoids: Recent advances and applications in Crop Breeding. **IntechOpen**, 2022. DOI: 10.5772/intechopen.107565

NATSIR, H.; WAHAB, A. W.; LAGA, A.; ARIF, A. R. Inhibitory activities of Moringa oleifera leaf extract against alpha-glucosidase enzyme in vitro. **Journal of Physics: Conference Series**, 2018. 10.1088/1742-6596/979/1/012019

NOGUEIRA, N. C.; CABEÇA, C. L. S.; SICILIANO, P. L. M.; PEREIRA, B. C.; ZORZENON, M. R. T.; DACOME, A. S.; SOUZA, F. O.; PILAU, E. J.; ENOKIDA, M. K.; OLIVEIRA, A. R.; SILVA, P. G.; COSTA, S. C.; MILANI, P. G. Methanolic and hydroalcoholic extract of stevia stems have antihyperglycemic and antilipid activity. *Food Bioscience*, v. 58, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103690>

OGLE, G. D.; TIAGO, S.; DABELEA, D.; PIHOKER, C.; SVENNSON, J.; MANIAM, J.; KLATMAN, E. L.; PATTERSON, C. C. Global estimates of incidence of type 1 diabetes in children and adolescents: Results from the International Diabetes Federation Atlas. **Diabetes Research and Clinical Practice**, 2022 <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109083>.

OLIVEIRA, R.; GONÇALVES, G.; INÁCIO, F.; KOEHNLEIN, E.; DE SOUZA, C.; BRACHT, A.; PERALTA, R. Inhibition of pancreatic lipase and triacylglycerol intestinal absorption by a pinhão coat (*Araucaria angustifolia*) extract rich in condensed tannin. **Nutrients**, v.7, n. 7, p. 5601-5614, 2015.

ONG, K. W., HSU, A., & TAN, B. K. H. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by AMPK activation. **Biochemical Pharmacology**, 85(9), 1341–1351, 2013.

PACIFICO, S.; GALASSO, S.; PICCOLELLA, S.; KRETSCHMER, N.; PAN, S. P.; MARCIANO, S.; BAUER, R.; MONACO, P. Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. **Food Research International**, v. 69. p. 121-132, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.019>

PACIFICO, S.; PICCOLELLA, S.; NOCERA, P.; TRANQUILLO, E.; POGGETTO, F. D.; CATAURO, M. New insights into phenol and polyphenol composition of *Stevia rebaudiana* leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 163, p. 45-57, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.046>

PIOVAN, S.; PAVANELLO, A.; PEIXOTO, G.M.L.; MATIUSSO, C.C.I. de MORAES, A.M.P.; MARTINS, I.P.; MAREZA-COSTA, C.E. (2018) *Stevia* Non sweetener Fraction Displays an Insulinotropic Effect Involving Neurotransmission in Pancreatic Islets. **International Journal of Endocrinology**, p.1–7. doi:10.1155/2018/3189879

RAINERI, A.; CAMPAGNARI, R.; TOSO, R. D.; COPETTI, S.; GOMEZ-LIRA, M.; MENEGAZZI, M. 3,5-Dicaffeoylquinic acid lowers 3T3-L1 mitotic clonal expansion and adipocyte differentiation by enhancing heme oxygenase-1 expression. **Molecules**, 2021.

Rammohan, A. Zyryanov, G. V. Bhagath, Y. B. Manjula, K. Antioxidants. **Vitamins and Hormones**, Russian, 395-411p. 2023.

RODRIGUEZ, M. C.; CALEJA, C.; NUÑEZ-ESTEVEZ, B.; PEREIRA, E.; FRAGA-CORRAL, M.; REIS, F. S.; SIMAL-GANDARA, J.; FERREIRA I. C. F. R.; PIETRO, M. A.; BARROS, L. Flavonoids: A group of potential food additives with beneficial health effects. **IntechOpen**, 2021. DOI: 10.5772/intechopen.101466

RUIZ-RUIZ, J. C.; MOGUEL-ORDOÑES, Y. B.; MATUS-BASTO, A. J.; SEGURA-CAMPOS, M. R. Antidiabetic and antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* extracts (Var. Morita) and the irin corporation into a potential functional bread. **J Food Sci Technol** 52 (12): 7894-7903. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1883-3>. 2015

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; BARTOSZ, G. Evaluation of The Antioxidant Capacity of Food Products: Methods, Applications and Limitations. **Processes** 2022, 10, 2031.

SARAVANAKUMAR, K.; SEONJU, P.; MARIADOSS, A.V.A.; SATHIYASEELAN, A.; VEERARAGHAVAN, V.P.; KIM, S.; WANG, M.H. Composição química atividades antioxidante e antidiabética da fração acetato de etila de *Stachys riederivar. japonica* (Miq.) em camundongos diabéticos tipo 2 induzidos por estrepzotocina. **Toxicologia Alimentar e Química**, v 155, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112374>

SHIM, Y. J.; DOO, H. K.; AHN, S. Y.; KIM, Y. S.; SEONG, J. K.; PARK, I. S.; MIN, B. H. Inhibitory effect of aqueous extract from the gall of *Rhus chinensis* on alpha-glucosidase activity and postprandial blood glucose. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, l. 2-3, p. 283-287, [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00370-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00370-7). 2003.

SICILIANO, P. L. M. ; CABEÇA, CYNTHIA LETÍCIA S. ; NOGUEIRA, NATANI C. ; PEREIRA, B. C. ; ENOKIDA, M. K. ; OLIVEIRA, A. R. ; SILVA, P. G. ; MATIUCCI, M. A. ; DACOME, ANTONIO SERGIO ; DA COSTA, SILVIO CLAUDIO ; FERNANDES, PAULA G. M. . Comparison between microcapsules of antioxidant fraction of *Stevia*: evaluation of physicochemical parameters, stability, bioaccessibility, and antidiabetic capacity. CURRENT BIOACTIVE COMPUND, 2024. Aceito na revista "Current Bioactive Compounds", aguardando publicação.

Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**. 4: 180-183, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002> .

SIMOENS, C.; WUYTS, C.; KHODAPARAST, L.; KHODAPARAST, L.; GOSCINNY, S.; HOEK, E. V.; LOCO, J. V.; PHILIPPAERT, K.; SCHUEREN, B. V.; VENNEKENS, R. Steviol, the aglycon of steviol glycosides, does not reduce hyperglycemia in mice with type 2 diabetes. **Phytomedicine Plus**, 2022.

SINGLA, R., SINGLA, N., & JAITAK, V. (2019). *Stevia rebaudiana* visando  $\alpha$ -amilase: Um estudo mecanístico in vitro e in silico. *Natural Product Research* , 33, 548 - 552. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1395433> .

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. 299: 152-178, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)

SUBRAMANIAN, R.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A. In vitro alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Acta Biochimica Polônia**, 55(2), pp 391-398, 2008.

SUGANUMA, T.; HATORI, S.; CHEN, C. K.; HORI, S.; KANUKA, M.; LIU, C. Y.; TATSUZAWA, C.; YANAGISAWA, M.; HAYASHI, Y. Caffeoylquinic acid mitigates neuronal loss and cognitive decline in 5XFAD mice without reducing the amyloid-beta plaque burden. **IOS PRESS**, 2024.

TALEUZZAMAN, M.; ALI, S.; GILANI, S. J.; IMAN, S. S.; HAFEEZ, A. Ultra performance liquid chromatography (UPLC). **Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry**, 2015.

TIJANI, H.; MOHAMMED, A.; MUKTAR, S.; MUSA, S.; ABUBAKAR, Y.; ADEGUNLOYE, A.P.; ISHOLA, A.A.; JOEL, E.B.; LUKA, C.D.; ALHASSAN, A.J. Antioxidant and antihyperlipidemic effects of aqueous seed extract of *Daucus carota L.* in triton x100-induced hyperlipidemic mice. **Journal of Applied Biology e Biotechnology**, v. 8, l 1, 2020. doi: 10.7324/JABB.2020.80113

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. Organic Chemistry. **Bookman**, ed. 5, p. 987-989, 2007.

XIE, J.; SCHAICH, K.M. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. **J. Agric. Food Chem.** 2014, 62, 4251–4260.

YU, H.; Yang, G.; Sato, M.; Yamaguchi, T.; Nakano, T.; Xi, Y. Antioxidant activities of aqueous extract from *Stevia rebaudiana* stem waste to inhibit fish oil oxidation and identification of its phenolic compounds, **Food Chemistry**, V. 232, P.379-386, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.004>