



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

**PROPRIEDADES E SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL
in vitro DE IOGURTE ADICIONADO DE EXTRATO DE *Stevia*
Rebaudiana (Bert.) EM PÓ**

MESTRANDA

Mariana Wolff de Carvalho

ORIENTADORA

Prof.^a. Dr.^a. Renata Dias de Mello Castanho Amboni

**Florianópolis
2017**

Mariana Wolff de Carvalho

PROPRIEDADES E SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL
in vitro **DE IOGURTE ADICIONADO DE EXTRATO DE *Stevia***
***Rebaudiana* (Bert.) EM PÓ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Dias de Mello Castanho Amboni

FLORIANÓPOLIS
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

CARVALHO, MARIANA WOLFF DE
PROPRIEDADES E SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL in
vitro DE IOGURTE ADICIONADO DE EXTRATO DE Stevia
Rebaudiana (Bert.) EM PÓ / MARIANA WOLFF DE CARVALHO
; orientador, Profa. Dra. Renata Dias de Mello
Castanho Amboni, 2017.
67 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Stevia rebaudiana
(Bert.). 3. Iogurte enriquecido. 4. Simulação
gastrointestinal in vitro. 5. Atividade
antioxidante.. I. Amboni, Profa. Dra. Renata Dias
de Mello Castanho. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência
dos Alimentos. III. Título.

Mariana Wolff de Carvalho

**PROPRIEDADES E SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL *in vitro*
DE IOGURTE ADICIONADO DE EXTRATO DE *Stevia*
Rebaudiana (Bert.) EM PÓ**

Dissertação aprovada como requisito final para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, pela comissão formada por:

Prof^ª. Dr^ª. Renata Dias de Mello Castanho Amboni
Coordenadora do Programa
Florianópolis, 20 de Março de 2017.

Banca Examinadora:

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Renata Dias de Mello Castanho Amboni (UFSC)

Membro:

Prof. Dr José Carlos Cunha Petrus (UFSC)

Membro:

Prof^ª. Dr^ª. Carmen Maria Oliveira Müller (UFSC)

Membro:

Prof^ª. Dr^ª. Elane Schwinden Prudêncio (UFSC)

Suplente:

Prof^ª. Dr^ª. Edna Regina Amante (UFSC)

*Aos meus pais, Adriana e Jorge,
Aos meus irmãos, Gustavo e Jorge,
Ao meu companheiro, Guilherme,
À minha família, minha base, meu suporte.*

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos aos que contribuíram para a realização deste trabalho:

À professora Dra. Renata Dias de Mello Castanho Amboni, minha orientadora, pela oportunidade concedida, dedicação, amizade, disposição e confiança.

À professora Dra. Elane Schwinden Prudêncio, pelo acolhimento, colaboração e ensinamentos. Ao Laboratório de Leites e Derivados pela parceria e acolhimento.

À professora Dra. Edna Regina Amante e Carmen Maria de Oliveira Muller, pelos ensinamentos, disposição e carinho. Ao Laboratório Frutas e Hortaliças, onde realizei grande parte das análises.

Aos membros da banca examinadora, pela presença, aceite e contribuições ao trabalho.

Às colegas do Laboratório, pelo bom humor, companheirismo, amizade e toda ajuda no decorrer do mestrado. Em especial a Nathalia e Silvani minhas companheiras de análises e desafios e a Stephanie por sempre estar disposta a ajudar e me orientar durante o trabalho! Vocês foram indispensáveis para meu crescimento pessoal e intelectual!

À professora Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi e ao Laboratório de Biotecnologia, pelo empréstimo do ultrafreezer.

Ao professor Dr. Pedro Luiz Manique Barreto e ao Laboratório de Reologia, pela disposição e ajuda na liofilização das amostras.

À minha família, Adriana, Jorge, Gustavo e Jorge, pelo apoio indispensável em todos os momentos. A minha avó Marina e ao avô que a vida me deu Arno por todo amor e carinho. Aos meus avós Herondina e Astrogildo (*in memoriam*) pelo amor e boas lembranças. Aos meus tios Andreza, Adriano, Andréia e Izabel pela alegria e dedicação. A minha prima Maria Luiza que consegue transformar os piores nos melhores dias. Vocês são o motivo da minha determinação em querer fazer sempre o “meu melhor”.

Ao me companheiro Guilherme, pelo amor, companheirismo, apoio e por sempre estar do meu lado me mostrando que sou capaz de chegar onde eu quiser. À sua família, que sempre me acolheu como sua e sempre trouxe de alegrias. Em especial a vó Marilda e ao vô Manoel (*in memorian*) que foram dois presentes que a vida me deu.

Às minhas amigas Jéssica, Juliana, Amanda, Kerolly, Brunela e Mariane pelo companheirismo e por estarem sempre presentes em todas as etapas da minha vida.

Às minhas amigas de graduação Ana Paula, Daniela e Luana parceiras e companheiras pra vida.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do mestrado, e aos professores do programa pelo conhecimento adquirido nesses dois anos.

À Capes pelo apoio financeiro para a concretização desta pesquisa e no auxílio bolsa.

A todos os professores, funcionários em especial ao Sérgio e colegas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Muito Obrigada!!

RESUMO

Stevia rebaudiana (Bert.) é uma planta que vem atraindo o interesse da indústria e da comunidade científica nos últimos anos devido aos efeitos do extrato de estévia quanto a sua atividade antioxidante, anti-hiperglicêmica, antimicrobiana e adoçante. Dessa forma, a adição de extrato de *S. rebaudiana* (Bert.) com o intuito de enriquecer produtos como o iogurte torna-se interessante. Os principais objetivos deste trabalho foram avaliar o comportamento do iogurte incorporado de extrato liofilizado de estévia (FSE) quanto aos aspectos físico-químicos, microbiológicos e ao teor de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante nos dias 1, 15 e 30 de armazenamento a 4 ± 2 ° C, bem como avaliar a atividade antioxidante através dos métodos FRAP e ABTS e a bioacessibilidade dos compostos fenólicos durante a simulação gastrointestinal *in vitro* após 30 dias de armazenamento. Foram avaliados iogurtes enriquecidos com 0,25 % e 0,5 % (m/m) de extrato de estévia e um iogurte controle (sem adição de extrato). Tanto a adição quanto a quantidade de FSE adicionado no iogurte contribuíram para o aumento da atividade antioxidante, do teor de CFT, dos parâmetros de cor (a^* e b^*) e do teor de sólidos totais dos iogurtes. Por outro lado, a acidez, o pH, a sinerese e as contagens de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* do produto final não foram significativamente afetadas ($p > 0,05$). A amostra enriquecida com 0,5 % de FSE apresentou os maiores valores para CFT, ABTS e FRAP. Ao longo do tempo de armazenamento, o teor de de sólidos totais, a sinerese, a cor e o teor de CFT das amostras adicionadas de FSE permaneceram estáveis, enquanto que a atividade antioxidante e o pH diminuíram significativamente. Após a simulação da digestão *in vitro*, a bioacessibilidade dos compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos iogurtes enriquecidos aumentou cerca de 2,5 e 7,5 vezes, respectivamente, em relação às frações não digeridas. Assim, comprova-se que o enriquecimento do iogurte com extrato de estévia aumenta as propriedades antioxidantes e o teor de compostos fenólicos do iogurte, podendo ser uma opção promissora para o desenvolvimento de alimentos funcionais.

Palavras-chave: *Stevia rebaudiana* (Bert.), iogurte enriquecido, simulação gastrointestinal *in vitro*, bioacessibilidade, compostos bioativos, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Stevia rebaudiana (Bert.) is a plant that has been attracting the interest of industry and the scientific community in recent years due to the effects of the stevia extract on its antioxidant, antihyperglycemic, antihypertensive, antimicrobial activity and sweetener. In this way, it became interesting to add extracts such as *S. rebaudiana* (Bert.) in order to enrich products such as yogurt. The main objectives of this work were to evaluate the behavior of the incorporated yogurt of freeze-dried stevia extract (FSE) regarding the physicochemical, microbiological and total phenolic compounds (CFT) and antioxidant activity on days 1, 15 and 30 of storage at 4 ± 2 °C, in addition to evaluating the antioxidant activity through the FRAP and ABTS methods and the bioaccessibility of the phenolics during *in vitro* gastrointestinal simulation at the end of the shelf life (day 30). The yogurts enriched with 0,25 and 0,5 % (w / w) of stevia extract and the control sample (without extract) were evaluated. The incorporation of FSE and the percentage of addition contributed to increase antioxidant activity, CFT, color parameters (increased values for a^* and b^* and decreased value for L^*) and total solids; while the acidity, pH, syneresis and counts of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* of the final product were not significantly affected ($p > 0,05$). The sample enriched with 0.5 % FSE presented the highest values for CFT, ABTS and FRAP. Throughout the storage time, the parameters of total solids, syneresis, color and CFT of the samples added of FSE remained stable, whereas the antioxidant activity and pH decreased significantly. After *in vitro* digestion simulation, the bioaccessibility of the CFT and the antioxidant activity of the enriched yogurts increased by 2,5 and 7,5 times, respectively, in relation to the undigested fractions. Thus, it is proven that the enrichment of yogurt with stevia extract actually increases the antioxidant properties and the amount of phenolic compounds of the yogurt, being to be a promising option for the development of functional foods.

Keywords: *Stevia rebaudiana* (Bert.), enriched yogurt, *in vitro* gastrointestinal simulation, bioaccessibility, bioactive compounds, antioxidant activity.

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1.1. Ilustração da planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni. 16

Figura 1.2. Condições encontradas no trato gastrointestinal humano. 23

Capítulo 2

Figura 2.1. Fluxograma de preparo do extrato liofilizado das folhas de estévia. 38

Figura 2.2. Fluxograma da simulação gastrointestinal *in vitro* utilizado para as amostras de iogurte com e sem extrato liofilizado de estévia (FSE). 43

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1.1. Análises físico-químicas das folhas secas de estêvia (g 100g⁻¹ com base em peso seco) 16

Capítulo 2

Tabela 2.1. Contagens de células viáveis (log UFC g⁻¹) de *Streptococcus thermophilus* (A) e *Lactobacillus bulgaricus* (B) dos iogurtes fortificados com 0 % (Controle), 0,25 % (S1) e 0,5 % (S2) de FSE durante o armazenamento a 4 ± 2 °C. 45

Tabela 2.2. Sólidos totais, sinerese, acidez e valores de pH dos iogurtes fortificados com 0 % (Controle), 0,25 % (S1) e 0,5 % (S2) de FSE durante o armazenamento a 4 ± 2 °C. 46

Tabela 2.3. Parâmetros de cor dos iogurtes fortificados com 0 % (Controle), 0,25 % (S1) e 0,5 % (S2) de FSE durante o armazenamento a 4 ± 2 °C. 47

Tabela 2.4. Valores de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante (FRAP e ABTS) dos iogurtes fortificados com 0 % (Controle), 0,25 % (S1) e 0,5 % (S2) de FSE durante o armazenamento a 4 ± 2 °C. 48

Tabela 2.5. Conteúdo e bioacessibilidade dos compostos fenólicos e atividade antioxidante (FRAP e ABTS) dos iogurtes fortificados com 0 % (Controle), 0,25 % (S1) e 0,5 % (S2) de FSE durante a simulação gastrointestinal *in vitro*. 50

Lista de Abreviaturas

| | |
|------|---|
| ABTS | 2,2, azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) |
| FRAP | Potencial antioxidante redutor férrico (<i>Ferric reducing antioxidant power</i>) |
| EAG | Equivalentes de Ácido Gálico |
| UV | Ultravioleta |
| CFT | Compostos Fenólicos totais (<i>Total phenolic content</i>) |
| Vis | Visível |
| FSE | Extrato Liofilizado de Estévia (<i>Freeze-dried stevia extract</i>) |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO | 11 |
| REFERÊNCIAS | 13 |
| CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 15 |
| 1.1 <i>Stevia rebaudiana</i> (Bert.) | 15 |
| 1.2 ANTIOXIDANTES | 17 |
| 1.3 LIOFILIZAÇÃO | 19 |
| 1.4 IOGURTE | 20 |
| 1.5 SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL <i>in vitro</i> | 22 |
| REFERÊNCIAS | 25 |
| CAPÍTULO 2 - ARTIGO | 33 |
| RESUMO | 33 |
| ABSTRACT | 34 |
| 1 INTRODUÇÃO | 35 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 2.1 MATERIAL | 37 |
| 2.2 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE ESTÉVIA | 37 |
| 2.3 ADIÇÃO DE EXTRATO AQUOSO DE ESTÉVIA LIOFILIZADO (FSE) NO IOGURTE | 39 |
| 2.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS | 39 |
| 2.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS | 40 |
| 2.6 ÍNDICE DE SNERESE | 40 |
| 2.7 ANÁLISE DE COR | 40 |
| 2.8 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE | 41 |
| 2.9 SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL <i>in vitro</i> | 41 |
| 2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 43 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 3.1 EFEITOS DA ADIÇÃO DE FSE NA VIABILIDADE DAS CULTURAS INICIADORAS DO IOGURTE | 44 |
| 3.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE IOGURTE | 45 |
| 3.3 COR | 46 |
| 3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS DE IOGURTE | 47 |
| 3.5 SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL <i>in vitro</i> | 49 |
| 3.5.1 Compostos fenólicos totais | 49 |
| 3.5.2 Atividade antioxidante | 51 |

| | |
|--|----|
| 4 CONCLUSÃO | 55 |
| REFERÊNCIAS | 57 |
| ANEXO A – Trabalhos apresentados em eventos | 65 |

INTRODUÇÃO

Stevia rebaudiana (Bert.) é uma planta que vem atraindo o interesse da indústria e da comunidade científica nos últimos anos. Numerosos estudos têm sido publicados a respeito dos efeitos do extrato de estévia quanto a sua atividade antioxidante, anti-hipertensiva, anti-hiperglicêmica, antimicrobiana, anti-inflamatória, anticancerígena, além do seu alto poder adoçante (ÁLVAREZ-ROBLES et al., 2016; CARBONELL-CAPELLA et al., 2015; CHAN et al., 2000; CHATSUDTHIPONG; MUANPRASAT, 2009; JENTZER et al., 2015; PÉREZ-RAMÍREZ et al., 2015; YILDIZ-OZTURK et al., 2015). É uma planta considerada como uma boa fonte de minerais e aminoácidos essenciais (KIM et al., 2011). Devido ao seu elevado teor de glicosídeos e de compostos bioativos (compostos fenólicos, vitamina C, carotenóides), a estévia é utilizada como um substituto para a sacarose em diversos produtos e para a produção de ingredientes alimentares funcionais (BARBA; GRIMI; VOROBIEV, 2015; LEMUS-MONDACA et al., 2012). Dentre os bioativos, os compostos fenólicos de extratos de estévia têm sido recentemente relacionados à atividade antidiabética. Abo Elnaga et al. (2016) e Shivanna et al. (2013) relataram a redução significativa do nível de glicose no sangue de ratos além de fornecerem proteção renal, indicando que os compostos fenólicos de estévia possuem potencial para serem utilizados como ingredientes bioativos e funcionais.

Entretanto, os compostos fenólicos são vulneráveis a agentes oxidantes, tais como luz, calor, umidade e oxigênio, devido à presença de ligações insaturadas em sua estrutura molecular (HALLIWELL, 2008). Diante disso, torna-se necessário a busca por métodos de preservação para mantê-los estáveis e funcionais, de modo a ampliar seu uso em produtos alimentares (ROSA et al., 2014), como por exemplo, a liofilização. Esta técnica tem sido utilizada para preservar compostos presentes em extratos bioativos que são utilizados para enriquecer produtos alimentícios (VITAL et al., 2015). De um modo semelhante, o extrato de estévia também pode ser liofilizado e empregado com diferentes finalidades na indústria alimentícia, como, por exemplo, no enriquecimento de iogurtes e outros produtos lácteos.

O iogurte é um dos produtos lácteos mais consumidos no mundo. É uma matriz rica em proteínas e alguns micronutrientes como as vitaminas A, D, E e cálcio. No entanto, os iogurtes disponíveis comercialmente são geralmente deficientes em antioxidantes naturais e compostos fenólicos (ÇAM; IÇYER; ERDOGAN, 2014). Portanto, a

finalidade de incorporar ingredientes com conhecida atividade antioxidante é de aumentar a funcionalidade e a bioatividade deste produto (TRIGUEROS et al., 2011).

Até o momento não foram encontradas publicações na literatura envolvendo aplicação de extrato liofilizado de folhas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) em iogurte, assim como a avaliação dos constituintes fenólicos, do potencial antioxidante e estabilidade durante o armazenamento deste produto. Desta forma, se justifica avaliar e caracterizar a influência da adição do extrato de estévia em pó em iogurte, bem como avaliar a viabilidade de seus compostos bioativos durante a simulação gastrointestinal *in vitro*.

Esta dissertação será apresentada na forma de artigos, divididos nos seguintes capítulos:

a) Capítulo 1: Revisão bibliográfica, onde são abordados os principais temas estudados neste trabalho;

b) Capítulo 2: Adição de extrato de *Stevia rebaudiana* (bert.) em iogurte: estabilidade durante o armazenamento e simulação gastrointestinal *in vitro* dos compostos antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- ABO ELNAGA, N. I. E. et al. Effect of stevia sweetener consumption as non-caloric sweetening on body weight gain and biochemical's parameters in overweight female rats. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 61, n. 1, p. 155–163, 2016.
- ÁLVAREZ-ROBLES, M. J. et al. Methanol elicits the accumulation of bioactive steviol glycosides and phenolics in *Stevia rebaudiana* shoot cultures. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 273–279, 2016.
- BARBA, F. J.; GRIMI, N.; VOROBIEV, E. Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Journal of Food Engineering**, v. 149, p. 222–228, 2015.
- ÇAM, M.; IÇYER, N. C.; ERDOGAN, F. LWT - Food Science and Technology Pomegranate peel phenolics : Microencapsulation , storage stability and potential ingredient for functional food development. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 117–123, 2014.
- CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Effect of *Stevia rebaudiana* addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. **Food Chemistry**, v. 184, p. 122–130, 2015.
- CHAN, P. et al. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. **British journal of clinical pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 215–20, set. 2000.
- CHATSTUDTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 121, n. 1, p. 41–54, 2009.
- HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 107–112, 2008.
- JENTZER, J.-B. et al. Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia*

rebaudiana Bertoni leaves. **Food Chemistry**, v. 166, p. 561–567, 2015.

KIM, S. H. et al. Effect of *Dioscorea opposita* Thunb. (yam) supplementation on physicochemical and sensory characteristics of yogurt. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 4, p. 1705–12, 2011.

LEMUS-MONDACA, R. et al. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1121–1132, 2012.

PÉREZ-RAMÍREZ, I. F. et al. Effect of stevia and citric acid on the stability of phenolic compounds and in vitro antioxidant and antidiabetic capacity of a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. **Food Chemistry**, v. 172, p. 885–892, 2015.

ROSA, C. G. et al. Encapsulation of the phenolic compounds of the blackberry (*Rubus fruticosus*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 527–533, 2014.

SHIVANNA, N. et al. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of Stevia rebaudiana. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 27, n. 2, p. 103–113, 2013.

TRIGUEROS, L. et al. Production of low-fat yogurt with quince (*Cydonia oblonga* Mill.) scalding water. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 6, p. 1388–1395, 2011.

VITAL, A. C. P. et al. Microbiological, functional and rheological properties of low fat yogurt supplemented with *Pleurotus ostreatus* aqueous extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1028–1035, 2015.

YILDIZ-OZTURK, E. et al. A comparative study on extraction processes of Stevia rebaudiana leaves with emphasis on antioxidant, cytotoxic and nitric oxide inhibition activities. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 961–971, 2015.

CAPÍTULO 1

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Stevia rebaudiana* (Bert.)

A *Stevia rebaudiana* Bertoni (Bert.) (estévia) (Figura 1.1) é um arbusto da família *Asteraceae* (*Compositae*), originalmente cultivada no Brasil e Paraguai, sendo um dos 154 membros do gênero *Stevia* e uma das duas únicas espécies que produzem glicosídeos de esteviol doces (ÁLVAREZ-ROBLES et al., 2016). Por cerca de 1.500 anos, as tribos da América do Sul usaram as folhas ou extratos de estévia por suas propriedades edulcorantes e medicinais (NARAYANAN et al., 2014).

A composição físico-química das folhas da *S. rebaudiana* (Bert.) é apresentada na Tabela 1.1. Na maior parte dos estudos analisados, as folhas secas apresentam de peso em base seca cerca de 7 g 100g⁻¹ de umidade, 11 g 100g⁻¹ de proteína, 3 g 100g⁻¹ de gordura, 10 g 100g⁻¹ de cinzas, 52 g 100g⁻¹ de carboidratos e 15 g 100g⁻¹ de fibra bruta. As folhas da estévia contêm um alto teor de glicosídeos diterpênicos, representando 15% da sua composição, que são responsáveis pelo seu elevado potencial adoçante (GHANTA et al., 2007). Sua estrutura química foi estabelecida como um glicosídeo diterpênico, composto por três moléculas de glicose ligadas a uma aglicona, a molécula esteviol. Nove glicosídeos doces do esteviol estão presentes nas folhas, os quais foram isolados e identificados como esteviosídeo, esteviolbiosídeo, rebaudiosídeo A, B, C, D, E, F e dulcosídeo A (GEUNS, 2003). Estes glicosídeos têm uma intensidade de sabor doce de cerca de 300 vezes maior que a da sacarose e exibem um ponto de fusão elevado e baixa solubilidade em água (ÁLVAREZ-ROBLES et al., 2016). Com essas propriedades estáveis, a inclusão de estévia na dieta é vantajosa para diabéticos e pessoas que sofrem de obesidade, doenças cardíacas e cárie dentária (GEUNS, 2003). Estes fatos têm incentivado muitos países, tais como Japão, Estados Unidos, Israel e Brasil a produzir este adoçante em escala industrial (GARDANA; SCAGLIANTI; SIMONETTI, 2010).

Embora o adoçante comercial de estévia seja desprovido de propriedade antioxidante, o extrato de suas folhas possui grande quantidade de compostos bioativos (NARAYANAN et al., 2014). Dentre estes compostos, os antioxidantes tem papel importante na inibição de radicais livres associados a doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e envelhecimento (GARDANA; SCAGLIANTI; SIMONETTI, 2010; SHUKLA et al., 2009). Sendo assim, os compostos

bioativos da estévia apresentam potencial para serem incorporados na dieta como antioxidantes.

Figura 1.1 Ilustração da planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni.



Fonte: Lemus-Mondaca et al. (2012).

Tabela 1.1. Análises físico-químicas das folhas secas de estévia (g 100g⁻¹ com base em peso seco)

| Componentes | Referências | | | | | | |
|--------------|---------------------|--------------------|-------------|---------------------|-----------------|-------------------------|----------------------|
| | Mishra et al., 2010 | Goyal et al., 2010 | Serio, 2010 | Savita et al., 2004 | Abou-arab; 2010 | Tadhani e Subhash, 2006 | Kaushik et al., 2010 |
| Umidade | 7 | 4,65 | ND | 7 | 5,37 | ND | 7,7 |
| Proteína | 10 | 11,2 | 11,2 | 9,8 | 11,40 | 20,4 | 12 |
| Gordura | 3 | 1,9 | 5,6 | 2,5 | 3,73 | 4,34 | 2,7 |
| Cinzas | 11 | 6,3 | ND | 10,5 | 7,41 | 13,1 | 8,4 |
| Carboidratos | 52 | ND | 53 | 52 | 61,9 | 35,2 | ND |
| Fibra bruta | 18 | 15,2 | 15 | 18,5 | 15,5 | ND | ND |

*ND = Não determinado. Fonte: Lemus-Mondaca et al. (2012).

Muitos pesquisadores avaliaram o potencial antioxidante *in vitro* das folhas de *S. rebaudiana* (Bert.) nos últimos anos (BARBA et al., 2014; BARBA; GRIMI; VOROBIEV, 2015; LEMUS-MONDACA et al., 2012). Pesquisas indicam que este potencial antioxidante pode ser atribuído à sua capacidade de sequestrar radicais livres e superóxidos (THOMAS; GLADE, 2010). Thomas e Glade (2010) avaliaram a

prevenção da oxidação de óleo de sardinha pela ação inibitória da formação de hidroperóxido por antioxidantes. Extratos de estévia apresentaram potencial de inibição maior quando comparados com o DL- α -tocoferol e com extratos de chá verde. O significativo potencial antioxidante das folhas de estévia também foi observado em extratos aquosos (KIM et al., 2011; SHUKLA et al., 2012) e etanólicos (SHUKLA et al., 2009; TAVARINI; ANGELINI, 2013), sendo evidenciado o alto teor de compostos antioxidantes naturais em todos os estudos.

1.2 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são definidos como compostos que podem retardar, inibir, ou prevenir a oxidação de materiais oxidáveis por eliminação de radicais livres (MOUSSI et al., 2015). Eles podem ser divididos conforme a característica de possuir ou não atividade enzimática. Os compostos com atividade enzimática são capazes de bloquear o início da oxidação, ou seja, as enzimas removem as espécies reativas ao oxigênio. Nos compostos sem atividade enzimática, as moléculas interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004). Os compostos fenólicos são grupos grandes e heterogêneas originados de metabólitos secundários, um grupo diversificado de fitoquímicos derivados de fenilalanina e tirosina sendo distribuídos em todo o reino vegetal (MAESTRI et al., 2006). Ele são essenciais para o crescimento e reprodução das plantas, e se formam em condições de estresse como, infecções, fermentos, radiações UV, dentre outros (ANGELO; JORGE, 2007). Além disso, atuam como agentes antipatogênicos e contribuem na pigmentação e são responsáveis pela adstringência, cor, aroma e estabilidade oxidativa de alimentos (MOUSSI et al., 2015).

Os fenólicos são definidos quimicamente como substâncias que possuem anel aromático ligados a uma ou mais hidroxila (OH), incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005). Englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (ANGELO; JORGE, 2007). Eles podem ser classificados como polímeros, pouco ou muito distribuídos na natureza. Os polímeros são fenólicos que não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais, englobando os taninos e as ligninas. Os pouco distribuídos na natureza

são os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. Pertencem ainda a esta família os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina. Os largamente distribuídos na natureza são os fenólicos encontrados geralmente em todo reino vegetal, mas podem estar localizados em uma só planta. Este grupo, pode-se dividir em flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados e cumarinas) (ANGELO; JORGE, 2007; KING; YOUNG, 1999; SOARES, 2002).

A atividade antioxidante exercida pelos compostos fenólicos é determinada pelas suas características estruturais. A bioatividade dos compostos fenólicos é refletida na prevenção de processos de autoxidação, a qual pode estar relacionada à sua capacidade de quelar metais, inibir lipoxigenases e sequestrar radicais livres pela doação de átomos de hidrogênio ou elétrons (BOURNE; RICE-EVANS, 1998). Os antioxidantes possuem propriedades de ruptura da reação em cadeia de radicais livres podendo neutralizar radicais livres e prevenir danos oxidativos causados por radicais livres (LEMUS-MONDACA et al., 2012). O mecanismo de ação dos antioxidantes presentes em extratos de plantas, possui então um importante papel na diminuição da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não só conserva a qualidade do alimento, mas também diminui o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (LADIZESKY et al., 1995; WEBB; KLINE; HOLICK, 1988). A atividade anticarcinogênica dos compostos fenólicos vem sendo relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele (CARBONELL-CAPELLA et al., 2013; PEREIRA et al., 2015).

Para que isso ocorra, a preservação da funcionalidade dos compostos fenólicos é indispensável. A presença de grupamentos hidroxila, responsáveis pelas propriedades antioxidantes desses compostos, é também causa de sua instabilidade, sendo estes facilmente degradados na presença de luz, oxigênio e temperatura elevada (BAKOWSKA-BARCZAK; KOLODZIEJCZYK, 2011). Por este motivo, torna-se necessário adotar medidas para manter a estabilidade dos compostos fenólicos durante o processamento e estocagem, como, por exemplo, a liofilização.

1.3 LIOFILIZAÇÃO

A liofilização é uma técnica de secagem que retira a umidade contida no material através do congelamento da parte líquida e sublimação do gelo (FANG; BHANDARI, 2010). Como um fenômeno físico e uma técnica de laboratório, a liofilização já era conhecida no final do século XIX, no entanto, só se transformou em um processo industrial depois da Segunda Guerra Mundial (BERK, 2013), com aplicação na indústria farmacêutica (antibióticos, células vivas, plasma sanguíneo, etc), que ainda é a maior usuária desta tecnologia (MARQUES, 2008).

Na indústria alimentícia, esta técnica tem como objetivo melhorar a estabilidade dos alimentos por meio das etapas de congelamento, sublimação e dessorção (BERK, 2013). O congelamento é uma etapa muito importante visto que pode provocar mudanças microestruturais no alimento. Na sublimação, o solvente congelado é removido por sublimação, que ocorre sob vácuo e com a adição de calor. Isto requer que a pressão do liofilizador seja menor do que a pressão de vapor de equilíbrio do solvente congelado (FELLOWS, 2009). O final da sublimação pode ser constatado pelo aumento da temperatura do produto em um valor próximo à temperatura do ambiente (ORDÓÑEZ, 2005). A última etapa do processo é a dessorção, onde a maior parte da água não congelada na matriz sólida é removida. Esta etapa deve acontecer até que a umidade residual seja tão pequena quanto a que o material necessite para manter sua estabilidade e qualidade (MARQUES, 2008).

O calor usado para secar alimentos, remove água e, portanto, preserva o alimento por uma redução da sua atividade da água. No entanto, a aplicação de calor também pode provocar diminuição da qualidade nutricional e afetar as características sensoriais dos produtos. Por outro lado, na liofilização o efeito conservante é obtido através da redução da atividade da água dos alimentos com pouco aquecimento e, conseqüentemente, os processos causam danos mínimos às suas qualidades nutricionais e sensoriais e produzem uma estrutura porosa que reidrata quase que completamente (> 90 % de reabsorção de umidade) (FELLOWS, 2009). Esta é uma das principais características da liofilização, a dissolução instantânea. Por isto, ela faz com que os produtos liofilizados sejam de fácil utilização. Apesar da liofilização ser mais lenta do que a desidratação convencional ou a evaporação (tipicamente um ciclo de secagem de 4 a 12 horas), esta técnica chama atenção pois preserva o sabor, a cor e a aparência dos alimentos. Além

disso, uma vez que todo o processo ocorre em estado sólido, o encolhimento e outros tipos de mudanças estruturais são, em grande parte, evitados (RATTI, 2001).

Na indústria de alimentos, o interesse na liofilização resulta da qualidade superior dos produtos liofilizados em comparação com os alimentos desidratados por outros métodos (RATTI, 2001). Entretanto, é economicamente viável apenas no caso de produtos de alto valor agregado e sempre que a qualidade superior do produto justifique o custo de produção mais elevado (BERK, 2013). Apesar da grande variedade de trabalhos com produtos liofilizados (ALVES, 2007; BAKOWSKA-BARCZAK; KOLODZIEJCZYK, 2011; VITAL et al., 2015), poucos trabalhos na literatura utilizaram extratos vegetais liofilizados adicionados a iogurtes avaliando sua atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos.

1.4 IOGURTE

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, aprovado pela Instrução normativa/MAPA nº 46, de 23 de outubro de 2007, entende-se por Leites Fermentados os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de micro-organismos específicos. Estes micro-organismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade (BRASIL, 2007). O mesmo regulamento classifica os leites fermentados de acordo com o conteúdo de matéria gorda na base láctea e com relação às características físico-químicas de composição, os quais devem apresentar no mínimo 2,9 g/100 g de proteínas lácteas e acidez titulável entre 0,6 e 1,5 g de ácido láctico/100 g de produto. Quando em sua elaboração tenham sido adicionados ingredientes opcionais não lácteos, antes, durante ou depois da fermentação, até um máximo de 30 % m/m, classificam-se como leites fermentados com adições. Além disso, os leites fermentados podem ser classificados de acordo com a microbiota e a tecnologia empregada no processo de obtenção (ORDÓÑEZ, 2005).

Um dos tipos de leite fermentado mais popular é o iogurte, cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbóticos de *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade, contribuem para a

determinação das características do produto final (BRASIL, 2007). O iogurte é caracterizado como um gel suave, viscoso e com sabor característico (KOSIKOWSKI, 1970). Dentre os fatores que justificam a sua grande popularidade destacam-se as características sensoriais (principalmente gosto ácido), as propriedades naturais, o apelo saudável e o custo moderado.

O aumento do consumo dos iogurtes se deve, a princípio, ao interesse em suas propriedades nutricionais que trazem benefícios à saúde, além de ser considerado equilibrado e adequado a qualquer dieta (CASAROTTI, 2009). Este tipo de produto, de uma forma geral, contém a mesma quantidade de nutrientes que o leite processado, apesar que durante a fermentação ocorre um aumento na biodisponibilidade de cálcio, lipídeos e proteína e uma redução no teor de lactose (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

Além disso, a adição de ingredientes naturais com reconhecida atividade antioxidante em iogurtes pode agregar benefícios ao produto (NARAYANAN et al., 2014). Por esta razão, têm sido realizados vários estudos para produzir iogurtes enriquecidos com extratos ricos em antioxidantes naturais, através da suplementação com extrato de casca de romã (EL-SAID et al., 2014), morangos (OLIVEIRA et al., 2015), extratos de semente de uva (CHOUCHOU LI et al., 2013), avelãs (BERTOLINO et al., 2014), óleo de farelo de arroz (ALFARO et al., 2015), lentilha (AGIL et al., 2013), e pistache (MANDALARI et al., 2013). Conforme Vital et al. (2015), Oh et al. (2016) e Lamothe et al. (2014), mudanças na tecnologia de obtenção dos iogurtes, como a adição de ingredientes fontes de compostos bioativos podem resultar em produtos com diferentes propriedades. No trabalho de Vital et al. (2015) é relatado que a adição de extrato de shimeji-preto (*Pleurotus ostreatus*), rico em compostos fenólicos com alta atividade antioxidante, aumentou a funcionalidade dos iogurtes. Oh et al. (2016) concluíram que a suplementação de iogurte com os extratos vegetais (*Cudrania tricuspidata* e *Morus alba* L.) aumentou as atividades antioxidantes e os teor de compostos fenólicos totais. Assim como Lamothe et al. (2014), que adicionaram chá verde em iogurtes e, que além de verificarem o aumento da atividade antioxidante, sugeriram que o consumo simultâneo de chá verde e iogurte ajuda a manter a integridade e a atividade dos compostos bioativos (fenólicos e antioxidantes totais) durante a digestão.

Apesar da grande variedade de trabalhos que propõem a adição de compostos com atividade antioxidante em iogurtes, não existem trabalhos na literatura que utilizam a estêvia a fim de formular um

produto rico nestes compostos e avaliem o comportamento destes durante a simulação gastrointestinal *in vitro*.

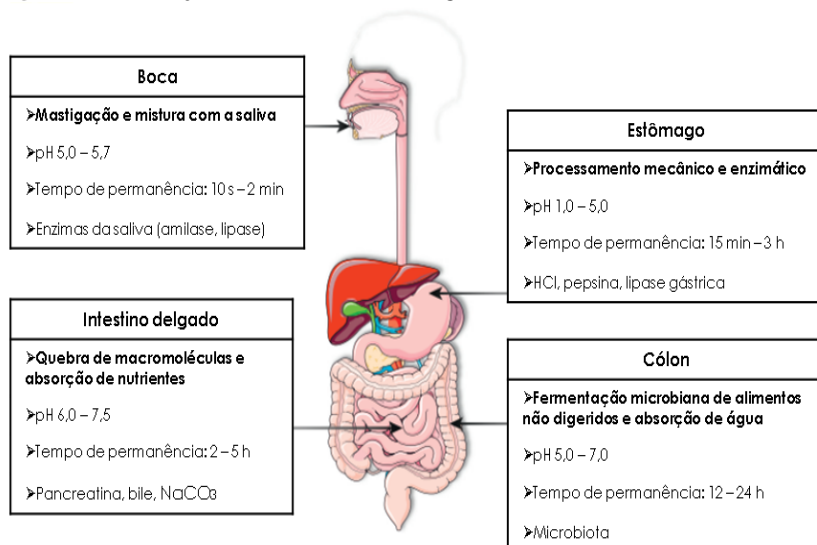
1.5 SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL *in vitro*

A digestão humana (Figura 1.2) é um processo complexo no qual os alimentos ingeridos se transformam em nutrientes que podem ser utilizados pelo corpo tanto para o crescimento e manutenção das células quanto como energia. A principal função do sistema digestivo humano é a transferência de nutrientes, água e eletrólitos proveniente dos alimentos para o corpo (GUERRA et al., 2012). Durante a digestão, dois processos principais ocorrem simultaneamente, o primeiro consiste nas transformações mecânicas, que reduzem o tamanho das partículas dos alimentos, e o segundo as transformações químicas, em que macromoléculas são transformadas em moléculas mais simples auxiliadas por enzimas digestivas, que catalisam a hidrólise de proteínas em aminoácidos, de carboidratos em monossacarídeos e de gorduras em glicerol e ácidos graxos que são absorvidas na corrente sanguínea (AGUDELO, 2015). Ainda no trato digestivo, vitaminas e minerais provenientes dos alimentos são convertidos, ou biotransformados, em uma forma mais assimilável ao organismo humano (PEIXOTO, 2015). A desintegração dos alimentos é feita principalmente na boca e no estômago, enquanto a digestão enzimática e absorção dos nutrientes e água ocorrem principalmente no intestino delgado e no intestino grosso (GUERRA et al., 2012).

O processo de digestão inicia pela boca, onde a mastigação inicia a degradação mecânica dos alimentos e a produção da saliva umedece os alimentos e a enzima amilase atua na quebra de polissacarídeos em dissacarídeos (AGUDELO, 2015). No estômago são iniciados os processos de digestão de proteínas com a secreção de ácido clorídrico e enzimas. A principal função da digestão gástrica é a digestão parcial das frações proteicas dos alimentos com a atuação da enzima pepsina (BJARNASON; SHERWOOD, 2014). Neste órgão, os alimentos são misturados com as secreções gástricas para produzir o quimo, um líquido espesso composto pelos alimentos ingeridos e as secreções salivares e gástricas. Então, o quimo acidificado é transportado ao duodeno, onde é neutralizado por bicarbonato de sódio, que é secretado pelo pâncreas (PEIXOTO, 2015). Durante a digestão intestinal, o fígado também secreta a bile no duodeno, que auxilia na emulsificação, hidrólise e absorção de lipídios (BJARNASON; SHERWOOD, 2014; PEIXOTO, 2015). O intestino delgado é o principal local onde os

nutrientes são absorvidos, incluindo gorduras, carboidratos, proteínas, minerais, vitaminas, água e eletrólitos (AGUDELO, 2015). A água e eletrólitos também são absorvidos no intestino grosso ou colón e o material residual passa para o reto (AGUDELO, 2015). Deste modo, de uma forma geral e resumida, pode-se dizer que o sistema digestivo atua na biotransformação dos componentes alimentares de maneira a torná-los em uma forma mais assimilável ao organismo, ou seja, em uma forma mais biodisponível (PEIXOTO, 2015).

Figura 1.2. Condições encontradas no trato gastrointestinal humano.



Fonte: Adaptado de Guerra et al. (2012).

A fração de compostos bioativos liberados da matriz alimentar após a digestão que é solubilizada no intestino para a absorção intestinal é normalmente conhecida como fração bioacessível (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2015). Os conceitos de bioacessibilidade e bioatividade são termos específicos da terminologia de biodisponibilidade. A bioacessibilidade é a porção do nutriente que é liberado da sua matriz no trato gastrointestinal e está disponível para que seja absorvido via circulação sanguínea. Nesta etapa ocorre uma sequência de eventos, onde os nutrientes podem ser modificados no processo de digestão (HELENO et al., 2015; LIMA, 2015). Já a bioatividade está inserida no contexto de ação fisiológica mais específica e obtenção de uma resposta

com efeito direto do nutriente à saúde. Quando se avalia a bioatividade realizam-se ensaios com animais ou com humanos. Contudo, a utilização de ensaios *in vivo* apresentam algumas dificuldades como custo elevado, comprometimento e adesão (ensaios com humanos), a necessidade de protocolos éticos e a demanda de tempo para realizar o estudo (FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005; LIMA, 2015). Portanto, é interessante utilizar a ferramenta de bioacessibilidade (*in vitro*) para estimar a estabilidade digestiva dos constituintes alimentares de um composto em estudo, através de sistemas que simulem as condições gastrointestinais já que os estudos *in vitro* se mostram bem correlacionados com os *in vivo* (HELENO et al., 2015). Além disso, este recurso tem ampla aceitação no âmbito científico (APEA-BAH et al., 2016; GULLON et al., 2015; PETRAT-MELIN et al., 2016; RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- ABOU-ARAB, A. E.; ABOU-ARAB, A. A.; ABU-SALEM, M. F. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* bertonii plant. **African Journal of Food Science**, v. 4, n. 5, p. 269–281, 2010.
- AGIL, R. et al. Lentils enhance probiotic growth in yogurt and provide added benefit of antioxidant protection. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 45–49, 2013.
- ALFARO, L. et al. Physical properties of a frozen yogurt fortified with a nano-emulsion containing purple rice bran oil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 1184–1191, 2015.
- ÁLVAREZ-ROBLES, M. J. et al. Methanol elicits the accumulation of bioactive steviol glycosides and phenolics in *Stevia rebaudiana* shoot cultures. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 273–279, 2016.
- ALVES, C. C. DE O. **PÓS OBTIDOS DA POLPA DE PEQUI (Caryocar brasiliense Camb.) LIOFILIZADA: HIGROSCOPICIDADE E MICROESTRUTURA**. [s.l.] UFLA - Universidade Federal de Lavras, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- APEA-BAH, F. B. et al. Sorghum-cowpea composite porridge as a functional food, Part II: Antioxidant properties as affected by simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 197, p. 307–315, 2016.
- BAKOWSKA-BARCZAK, A. M.; KOLODZIEJCZYK, P. P. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 2, p. 1301–1309, 2011.
- BARBA, F. J. et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural antioxidant/antimicrobial for high pressure processed fruit extract: Processing parameter optimization. **Food Chemistry**, v. 148, p. 261–267, 2014.

BARBA, F. J.; GRIMI, N.; VOROBIEV, E. Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Journal of Food Engineering**, v. 149, p. 222–228, 2015.

BERK, Z. Freeze Drying (Lyophilization) and Freeze Concentration. In: **Food Process Engineering and Technology**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 567–581.

BERTOLINO, M. et al. Influence of the addition of different hazelnut skins on the physicochemical, antioxidant, polyphenol and sensory properties of yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1145–1154, 2014.

BJARNASON, I. T.; SHERWOOD, R. A. CHAPTER 12 – Clinical biochemistry of the gastrointestinal tract. In: **Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects**. [s.l.: s.n.]. p. 214–230. 2014

BOURNE, L. C.; RICE-EVANS, C. Bioavailability of Ferulic Acid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 2, p. 222–227, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Gabinete do Ministro **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 46, DE 23 DE OUTUBRO DE 2007**, 2007. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/instru%C3%87%C3%83o-normativa-n%C2%BA-46-de-23-de-outubro-de-2007.pdf>>. Acesso em: 1 fev. 2017

CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. High pressure processing of fruit juice mixture sweetened with *Stevia rebaudiana* Bertoni: Optimal retention of physical and nutritional quality. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 18, p. 48–56, 2013.

CASAROTTI, S. N. **Instituto De Biociências , Letras e Ciências Exatas Sabrina Neves Casarotti EFEITO DE EDULCORANTES SOBRE A QUALIDADE DE LEITES FERMENTADOS São José do Rio Preto**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2009.

CHOUCHOULI, V. et al. Fortification of yoghurts with grape (*Vitis*

vinifera) seed extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 522–529, 2013.

EL-SAID, M. M. et al. Antioxidant activities and physical properties of stirred yoghurt fortified with pomegranate peel extracts. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, n. 2, p. 207–212, 2014.

FAILLA, M. L.; CHITCHUMROONCHOKCHAI, C. In vitro models as tools for screening the relative bioavailabilities of provitamin A carotenoids in foods. **Harvest Plus Technical Monograph**, v. 3, p. 32, 2005.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010.

FELLOWS, P. J. 23 – Freeze drying and freeze concentration. In: **Food Processing Technology**. [s.l: s.n.]. p. 687–699. 2009.

GARDANA, C.; SCAGLIANTI, M.; SIMONETTI, P. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 9, p. 1463–1470, 2010.

GEUNS, J. M. . Stevioside. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 913–921, 2003.

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

GOYAL, S. K.; SAMSHER; GOYAL, R. K. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 1, p. 1–10, 6 fev. 2010.

GUERRA, A. et al. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 591–600, 2012.

GULLON, B. et al. In vitro gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 617–628, 2015.

HELENO, S. A. et al. Chemical composition, antioxidant activity and bioaccessibility studies in phenolic extracts of two *Hericium* wild edible species. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 475–481, 2015.

KAUSHIK, R. et al. Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 27–33, 6 jan. 2010.

KIM, S. H. et al. Effect of *Dioscorea opposita* Thunb. (yam) supplementation on physicochemical and sensory characteristics of yogurt. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 4, p. 1705–12, 2011.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213–218, 1999.

KOSIKOWSKI, F. **Cheese and Fermented Milk Foods**. northfield, MN, U.S.A.: [s.n.]. 1970.

LADIZESKY, M. et al. Solar ultraviolet B radiation and photoproduction of vitamin D3 in central and southern areas of argentina. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 10, n. 4, p. 545–549, 1995.

LAMOTHE, S. et al. Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. **Food & Function**, v. 5, p. 2621–2631, 2014.

LEE, S.-J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131–137, jun. 2005.

LEMUS-MONDACA, R. et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a

high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1121–1132, 2012.

LIMA, F. A. DE. “ESTUDO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA FARINHA DE CENTEIO POR TRATAMENTO ENZIMÁTICO E AVALIAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DE ÁCIDOS FENÓLICOS PELO MODELO DE DIGESTÃO *in vitro* E DE ABSORÇÃO POR CÉLULAS INTESTINAIS CACO-2”. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2015.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2001.

MAESTRI, D. M. et al. Natural products as antioxidants. **Research Signpost**, v. 37661, n. 2, p. 105–135, 2006.

MANDALARI, G. et al. Bioaccessibility of pistachio polyphenols, xanthophylls, and tocopherols during simulated human digestion. **Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 338–344, 2013.

MARQUES, L. G. **LIOFILIZAÇÃO DE FRUTAS TROPICAIS**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2008.

MISHRA, P. K. et al. Stevia Rebaudiana - A Magical Sweetener. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 62–74, 2010.

MÓNICA ALEJANDRA HERRERA AGUDELO. **ESTUDO DA BIOACESSIBILIDADE IN VITRO (ESTÁTICA E DINÂMICA) DE ALGUNS METAIS DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA EM SEMENTE DE SOJA TRANSGÊNICA E NÃO TRANSGÊNICA**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2015.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411–424, 2004.

MOUSSI, K. et al. HPLC-DAD profile of phenolic compounds and antioxidant activity of leaves extract of *Rhamnus alaternus* L. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 858–866, 2015.

NARAYANAN, P. et al. Use of just-about-right scales and penalty analysis to determine appropriate concentrations of stevia sweeteners for vanilla yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 6, p. 3262–3272, 2014.

OH, N. S. et al. Microbiological characterization and functionality of set-type yogurt fermented with potential prebiotic substrates *Cudrania tricuspidata* and *Morus alba* L. leaf extracts. **Journal of Dairy Science**, p. 1–12, 2016.

OLIVEIRA, A. et al. Incorporation of strawberries preparation in yoghurt: Impact on phytochemicals and milk proteins. **Food Chemistry**, v. 171, p. 370–378, 2015.

ORDÓÑEZ, J. A. P. **Tecnología de alimentos**. v. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PEIXOTO, R. R. A. **ELEMENTOS METÁLICOS EM ACHOCOLATADOS: TEORES TOTAIS E FRAÇÕES BIOACESSÍVEIS E BIODISPONÍVEIS**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas como, 2015.

PEREIRA, E. et al. Gamma irradiation improves the extractability of phenolic compounds in *Ginkgo biloba* L. **Industrial Crops And Products**, v. 74, p. 144–149, 2015.

PETRAT-MELIN, B. et al. In vitro gastrointestinal digestion of purified bovine kappa-casein variants A, B, and E: Effects on antioxidant and angiotensin 1-converting enzyme inhibitory capacity. **International Dairy Journal**, v. 57, p. 44–51, 2016.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 49, n. 4, p. 311–319, 2001.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. In vitro bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice- and milk-based beverages. **Food Research International**, v. 62, p. 771–778, 2014.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. Impact of food matrix and

processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 33–43, 2015.

SAVITA, S. M. et al. Stevia rebaudiana – A Functional Component for Food Industry. **Journal Human Ecology**, v. 15, p. 261–264, 2004.

SERIO, L. La Stevia rebaudiana, une alternative au sucre. **Phytothérapie**, v. 8, n. 1, p. 26–32, 5 fev. 2010.

SHUKLA, S. et al. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p. 2338–2343, 2009.

SHUKLA, S. et al. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 64, n. 7–8, p. 807–811, 2012.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutricao**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

TADHANI, M.; SUBHASH, R. Preliminary Studies on Stevia rebaudiana Leaves: Proximal Composition, Mineral Analysis and Phytochemical Screening. **Journal of Medical Sciences**, v. 6, n. 3, p. 321–326, 2006.

TAVARINI, S.; ANGELINI, L. G. Stevia rebaudiana Bertoni as a source of bioactive compounds: The effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2121–2129, 2013.

THOMAS, J. E.; GLADE, M. J. Stevia: It's Not Just About Calories. **The Open Obesity Journal**, v. 2, p. 101–109, 2010.

VITAL, A. C. P. et al. Microbiological, functional and rheological properties of low fat yogurt supplemented with *Pleurotus ostreatus* aqueous extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1028–1035, 2015.

WEBB, A. R.; KLINE, L.; HOLICK, M. F. Influence of Season and

Latitude on the Cutaneous Synthesis of Vitamin D₃ : Exposure to Winter Sunlight in Boston and Edmonton Will Not Promote Vitamin D₃ Synthesis in Human Skin*. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 67, n. 2, p. 373–378, ago. 1988.

CAPÍTULO 2

Adição de extrato de *Stevia rebaudiana* (Bert.) em iogurte: estabilidade durante o armazenamento e simulação gastrointestinal *in vitro* dos compostos antioxidantes.

RESUMO

Neste estudo, extrato de estévia liofilizado (FSE) foi adicionado ao iogurte com o objetivo de aumentar suas propriedades funcionais. Os iogurtes enriquecidos com 0,25 e 0,5 % (m/m) de extrato de estévia e a amostra controle (sem extrato) foram investigados quanto às suas características físico-químicas, teor de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante durante o armazenamento a 4 ± 2 °C. Avaliou-se também o efeito da digestão gastrointestinal *in vitro* sobre a bioacessibilidade dos compostos fenólicos e o teor de CFT e atividade antioxidante dos iogurtes após 30 dias de armazenamento. A adição de FSE contribuiu para o aumento do teor de CFT, da atividade antioxidante, dos sólidos totais e dos parâmetros de cor, enquanto que o pH, a acidez, sinerese e as contagens de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* do produto final não foram significativamente afetadas ($p > 0,05$). A amostra enriquecida com 0,5 % de FSE apresentou os maiores valores para CFT, FRAP e ABTS. Ao longo do armazenamento, o teor de CFT, o teor de sólidos totais, a sinerese e a cor das amostras enriquecidas permaneceram estáveis enquanto que a sua atividade antioxidante e pH diminuíram significativamente. Após a digestão simulada *in vitro*, a bioacessibilidade dos compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos iogurtes fortificados aumentaram cerca de 2,5 e 7,5 vezes, respectivamente, em relação às frações não digeridas. Em conclusão, a suplementação de extrato de estévia pode ser empregada com sucesso para aumentar a propriedade antioxidante do iogurte e é, portanto, uma opção promissora no desenvolvimento de alimentos com propriedades funcionais.

Palavras-chave: *Stevia rebaudiana* (Bert.), iogurte fortificado, simulação gastrointestinal *in vitro*, bioacessibilidade, compostos bioativos, atividade antioxidante.

ABSTRACT

In this study, freeze-dried stevia extract (FSE) was added to yogurt aiming to increase its functional properties. Yogurt fortified with 0,25 and 0,5 % (w/w) stevia extract, and control samples (with no extract) were investigated on their physicochemical characteristics, total phenolic compounds (CFT) and antioxidant activity during storage at 4 ± 2 °C. The effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of the phenolic compounds and the changes in the CFT and antioxidant activity of the yogurts after 30 days of storage were also assessed. The incorporation of FSE and the percentage at which it was added contributed to the increase in the CFT, antioxidant activity, total solids and color parameters (increased the values for a^* and b^* and decreased the value for L^*) while the pH, acidity, syneresis and the counts of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* of the final product were not significantly affected ($p > 0,05$). The sample fortified with 0,5 % FSE showed the highest values for CFT, FRAP and ABTS. Throughout the storage time, the CFT, total solids, syneresis and color parameters of the fortified samples remained stable while their antioxidant activity and pH significantly decreased. After *in vitro* simulated digestion, the bioaccessibility of the CFT and the antioxidant activity of the fortified yogurts increased 2,5 and 7,5 times, respectively, in relation to the undigested fractions. In conclusion, stevia extract supplementation can be successfully employed to enhance both the antioxidant properties and the CFT of yogurt and is therefore a promising approach in the development of functional foods.

Keywords: *Stevia rebaudiana* (Bert.), fortified yogurt, *in vitro* gastrointestinal simulation, bioaccessibility, bioactive compounds, antioxidant activity.

1 INTRODUÇÃO

Stevia rebaudiana Bertonii é uma planta que desperta interesse principalmente porque suas folhas contêm glicosídeos de esteviol, que podem ser usados como agentes adoçantes não calóricos (LEMUS-MONDACA et al., 2012). Além disso, *S. rebaudiana* também se destaca por suas propriedades medicinais, atribuídas principalmente a compostos fenólicos, flavonóides e outros compostos bioativos que se acumulam nas folhas da planta (ARRIOLA et al., 2016; SHUKLA et al., 2009). Vários estudos foram publicados sobre os efeitos antioxidantes (ARRIOLA et al., 2016; CARBONELL-CAPELLA et al., 2015; DEL PINO-GARCÍA et al., 2016a; PÉREZ-RAMÍREZ et al., 2015) e anti-hipertensivos (CHAN et al., 2000; JENTZER et al., 2015) do extrato de estévia.

Geralmente, os iogurtes comerciais disponíveis são deficientes em antioxidantes naturais e compostos fenólicos (ÇAM; IÇYER; ERDOGAN, 2014). Estudos têm sido realizados para investigar o iogurte como um potencial carreador de compostos antioxidantes visando aumentar os benefícios de saúde e atributos de qualidade conferidos ao produto. Muniandy, Shori e Baba (2016) produziram iogurtes enriquecidos com chás verde, branco e preto e observaram que os iogurtes fortificados exibiam teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante significativamente maiores do que o iogurte não enriquecido. Do mesmo modo, o extrato aquoso de *Pleurotus ostreatus* aumentou a atividade antioxidante de iogurtes (VITAL et al., 2015).

Para avaliar os efeitos benéficos a saúde conferidos pelos compostos fenólicos, é necessário avaliar a sua bioacessibilidade e a sua atividade antioxidante após o processo de digestão gastrointestinal. Este processo pode causar algumas interações entre os componentes alimentares e os fitoquímicos presentes no extrato, ocorrendo alterações como degradação, oxidação e hidrólise, reduzindo assim a atividade biológica dos compostos bioativos (CARBONELL-CAPELLA et al., 2013, 2015). Estudos confirmam que os ensaios de simulação gastrointestinal *in vitro* podem estimar uma previsão confiável da biodisponibilidade dos compostos bioativos e da atividade antioxidante total (DEL PINO-GARCÍA et al., 2016a; RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2014a). Vários estudos simulam condições gastrointestinais, mas não de forma contínua como em um processo de digestão natural (ABADÍA-GARCÍA et al., 2013; ORTAKCI et al., 2012; SOLIERI et al., 2014). No entanto, este estudo engloba as condições gastrointestinais simuladas das principais sessões do trato gastrointestinal: boca (com simulação da

saliva), esôfago-estômago (com presença de pepsina e diminuição gradual do pH), duodeno (presença dos sais biliares, pancreatina e gradual aumento do pH) e íleo; bem como a simulação mecânica, por exemplo, dos movimentos peristálticos através de agitação real, como sugerido por Laurent, Besançon e Caporiccio (2007) e Verruck et al. (2015).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição do extrato liofilizado de estévia (FSE) às amostras de iogurte, quanto às suas propriedades microbiológicas e físico-químicas, teor de fenólicos totais e atividade antioxidante durante o armazenamento. Avaliou-se também o efeito da simulação gastrointestinal *in vitro* na bioacessibilidade dos compostos fenólicos e as alterações no teor de compostos fenólicos totais e na atividade antioxidante das amostras após 30 dias de armazenamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

As folhas desidratadas de *Stevia rebaudiana* Bertoni foram gentilmente fornecidas pela empresa Stevia Paraguaya (Assunção, Paraguai). As folhas desidratadas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) foram trituradas (Wallita-Philipps, Varginha, MG, Brazil) e peneiradas em tamiz de 30 mesh (Endecotts, London, UK) com abertura de 0,59 mm. As mesmas foram acondicionadas em embalagens metalizadas seladas a vácuo e armazenadas a $-18 \pm 2^\circ \text{C}$ até o momento da preparação do extrato aquoso (Figura 2.1). O reagente *Folin-Ciocalteu*, o radical ABTS (2,2, azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), 2,4,6-tri(2-pyridil)-s-triazina (TPTZ), carbonato de sódio, cloreto de cálcio e o padrão ácido gálico foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (MO, EUA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

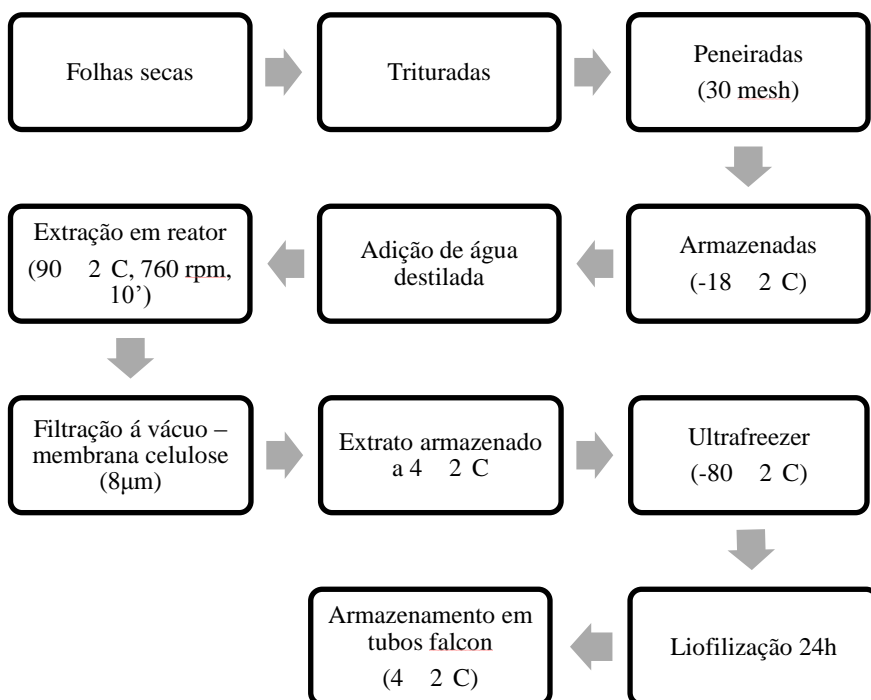
As enzimas α -amilase ($28,75 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína), pepsina da mucosa gástrica suína (400 U mg^{-1} de proteína) e pancreatina de pâncreas suíno (poder digestivo - 8 x USP); e os sais biliares de bovinos utilizado para as condições gastrointestinais simuladas *in vitro* foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Para determinar a contagem de células viáveis foram utilizados o ágar MRS (Difco, Sparks, MD, USA) e o ágar M17 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os ingredientes comerciais utilizados para a produção do iogurte foram: leite comercial pasteurizado (30 g L^{-1} de gordura, Tirol[®], Treze Tílias, SC, Brasil) e a cultura iniciadora termofílica composta por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Yo-Flex[®] L812, Chr. Hansen, Valinhos, SP, Brasil). Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico.

2.2 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE ESTÉVIA

O extrato aquoso das folhas foi preparado (Figura 2.1) usando 1 g de folhas trituradas suspensas em 20 mL de água destilada, de acordo com o método previamente descrito por Arriola et al. (2016). Após 10 minutos a 90°C , o extrato foi filtrado em membrana de celulose de 8 μm (Sartorius AG, Gottingen, Alemanha) utilizando uma bomba de vácuo (Primatec 131, Itu, SP, Brasil). O extrato aquoso foi congelado a $-80 \pm 2^\circ \text{C}$ e liofilizado (JJ Científica, modelo LJJ 02, São Paulo, SP,

BRASIL) por 24 h. O extrato de estévia liofilizado (FSE) foi armazenado em frascos *Falcon* a 4 ± 2 °C até a realização das análises. O FSE apresentou teor de compostos fenólicos totais de $147,21 \pm 0,26$ mg de equivalente de ácido gálico (GAE)/g (base seca) (SINGLETON; ROSSI, 1965) e atividade antioxidante, determinada pelo método de captura de radical ABTS (RE et al., 1999) e pelo método de redução férrica FRAP (BENZIE; STRAIN, 1996), no valor de $1804,01 \pm 116,34$ μ mol Trolox/g (base seca) e $767,64 \pm 86,22$ μ mol Trolox/g (base seca), respectivamente.

Figura 2.1. Fluxograma de preparo do extrato liofilizado das folhas de estévia.



Fonte: Acervo do autor.

2.3 ADIÇÃO DO EXTRATO DE ESTÉVIA LIOFILIZADO (FSE) NO IOGURTE

Para a fabricação dos iogurtes, a metodologia proposta por Lucey e Singh, (1998) foi utilizada com algumas modificações. O leite pasteurizado foi aquecido a 90 ± 2 °C durante 5 minutos e depois foi resfriado até 42 ± 2 °C, seguido pela inoculação da cultura termofílica composta por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, de acordo com as instruções do fabricante. A mistura foi incubada a 42 ± 2 °C, até atingir um pH de 4,6, seguido por um resfriamento a 4 ± 2 °C e mantido nesta temperatura por 24 h. O iogurte preparado foi então dividido em três porções (Controle, S1 e S2), onde o Controle foi preparado sem a adição do FSE; e as amostras de S1 e S2 foram preparadas com a adição de 0,25 e 0,5 % de FSE, respectivamente.

As amostras foram embaladas em copos de plástico de 100 mL, selados termicamente (Sulplack SPO-150, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil) com tampa multicamada de alumínio e polietileno e armazenados sob refrigeração (4 ± 2 °C) até o momento das análises. Foram realizadas três repetições completas de cada experimento. As amostras de iogurte (Controle, S1 e S2) foram avaliadas em relação à viabilidade microbiológica, teor de sólidos totais, pH, acidez titulável, sinerese, cor, atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais (CFT) nos dias 1, 15 e 30 de armazenagem a 4 ± 2 °C, enquanto determinação da atividade antioxidante e da bioacessibilidade dos compostos fenólicos foi realizada utilizando o procedimento de digestão *in vitro* (descrito no item 2.9) após 30 dias de armazenamento (4 ± 2 °C).

2.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas do iogurte foram realizadas para determinar a influência da adição de FSE nas culturas iniciadoras. As células viáveis de *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrückii* subsp. *bulgaricus* foram avaliadas para todos os iogurtes (Controle, S1 e S2). Para tal avaliação, foram recolhidas assepticamente 25 g de cada iogurte e misturadas com 225 mL de 0,1 g 100 g⁻¹ de água de peptonada em um *Bag Mixer* 400 (Interscience, St. Nom, França), seguido de diluições decimais com o mesmo diluente. A contagem de *S. thermophilus* foi realizada utilizando ágar M17 com adição de lactose

(10 g 100 mL⁻¹), incubada aerobicamente a 37 ± 2 °C durante 48 h, como metodologia descrita pela *International Dairy Federation* (IDF, 1997). *L. bulgaricus* foi enumerado em ágar MRS com sobrecamada sob incubação aeróbica a 37 ± 2 °C durante 72 h (DAVE; SHAH, 1996). Após os períodos de incubação, todas as contagens de células viáveis foram realizadas e expressas como unidades formadoras de colônia por grama de iogurte (log UFC g⁻¹). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Todas as amostras de iogurte foram analisadas quanto ao teor de sólidos totais (g 100 g⁻¹) através de secagem em estufa a 105 ± 1 °C até peso constante; quanto a acidez titulável (g 100 g⁻¹ de ácido láctico), determinada de acordo com a metodologia da AOAC (2005) e quanto aos valores de pH, obtidos utilizando pHmetro de bancada (Bel Engineering, W38, Monza, Italia). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.6 ÍNDICE DE SINERESE

O índice de sinerese dos iogurtes foi determinado utilizando a metodologia descrita por Modler e Kalab (1983), com modificações. Uma massa de 100 g de cada amostra foram drenados em uma tela de malha de 100 mesh, que foi colocada em um copo béquer com o mesmo diâmetro para recolher o líquido. O índice de sinerese (determinado em triplicata) foi considerado como a quantidade de líquido (g) por 100 g de amostra após 2 h de drenagem (4 ± 2 °C).

2.7 ANÁLISE DE COR

As medições dos parâmetros de cor dos iogurtes foram realizadas com um colorímetro Minolta Chroma Meter CR-400 (Minolta®, Japão) previamente calibrado, ajustado para operar com iluminante D65 e um ângulo de observação de 10°. O colorímetro foi calibrado com uma placa padrão branca e a escala de cores CIELab foi usada para medir os parâmetros L*, a* e b*. Para cada amostra de iogurte foram feitas seis medições. A diferença total de cor (ΔE^*) entre os valores medidos no tempo final (dia 30) e tempo inicial (dia 1) de armazenamento foi calculada de acordo com Okpala, Piggott e Schaschke, (2010), como descrito na Eq. (1),

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

Onde ΔL^* é a diferença de luminosidade para a mesma amostra de iogurte, entre o dia 1 e o dia 30 de armazenamento, enquanto Δa^* representa a intensidade da cor vermelha e Δb^* a intensidade da cor amarela. Todas as análises foram feitas em triplicata.

2.8 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A extração do teor de fenólicos e antioxidantes dos iogurtes foi realizada de acordo com o descrito por Karaaslan et al. (2014), com modificações. Para o processo de extração, 20g de iogurte foi misturado com 30 mL de acetona 80 % acidificada (0,01 % HCl). Em seguida, a amostra foi mantida um banho com agitação (180 rpm) (Dist DI950M, Florianópolis SC, Brazil) a 50 °C por 60 min e centrifugada a 3823 x g por 8 minutos (Hermle Z200A, Germany). Os sobrenadantes foram coletados e utilizados para a quantificação do teor de CFT e da atividade antioxidante das amostras de iogurte.

O teor de CFT do FSE foi quantificado de acordo com o método de Folin–Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965). A curva de calibração foi preparada com o padrão de ácido gálico ($y = 0,0109 x - 0,0277$; $r^2 = 0,99$) e utilizada para expressar os resultados em mg de ácido gálico equivalente (GAE) por g de peso seco. A capacidade de eliminação do radical ABTS^{•+} foi quantificada através do método descrito por Re et al. (1999). Como padrão para a curva de calibração foi utilizado o Trolox e os resultados foram expressos como equivalente de Trolox em μmol por g de extrato (peso seco). A atividade antioxidante também foi determinada pelo potencial antioxidante redutor férrico (FRAP), de acordo com o método descrito por Benzie e Strain (1996). Trolox foi utilizado como padrão e os resultados foram expressos como Trolox equivalente em μmol por g de peso seco. Todas as análises foram feitas em triplicata.

2.9 SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL *in vitro*

A simulação gastrointestinal *in vitro* (Figura 2.2) foi realizada para simular as condições típicas prevalentes nos passos boca humana, esôfago/estômago, duodeno e íleo (VERRUCK et al., 2015). Para simular a temperatura e a intensidade dos movimentos peristálticos em

cada parte do sistema digestivo humano, utilizou-se um banho-maria (Dist DI950M, Florianópolis SC, Brasil) mantido a 37 ± 1 °C com agitação mecânica utilizando intensidades semelhantes às atingidas em cada um dos passos digestivos. Foram pesadas e colocados em Erlenmeyers 20 g de cada amostra de iogurte (Controle, S1 e S2). Para a simulação do passo de boca o pH foi ajustado para 6,9 com 1 mol L^{-1} de NaHCO_3 e foi adicionada às amostras uma solução de saliva preparada com 100 U mL^{-1} de α -amilase em 1 mmol L^{-1} CaCl_2 a uma taxa de $480 \mu\text{L min}^{-1}$ por 2 minutos, com agitação de 200 rpm. No passo do esôfago/estômago, o pH foi diminuído até 2 com 1 mol L^{-1} de HCl e então adicionou-se 0,05 mL de solução de pepsina (25 mg mL^{-1} in 0,1 mol L^{-1} HCl) em alíquotas de mesmo volume durante a fase gástrica, resultando num tempo de 90 minutos sobre agitação de 130 rpm. Para simular o passo do duodeno, o pH foi aumentado para 5 com 1 mol L^{-1} de NaHCO_3 e adicionou-se 0,25 mL de solução de sais biliares de pancreatina bovina (2 g L^{-1} de pancreatina e 12 g L^{-1} de sais biliares bovino em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaHCO_3) e nesta etapa, foi empregada agitação de 45 rpm por 20 minutos. Para o passo de íleo a agitação foi mantida a 45 rpm durante 90 minutos, o pH foi aumentado para 6,5 através da adição de 1 mol L^{-1} de NaHCO_3 .

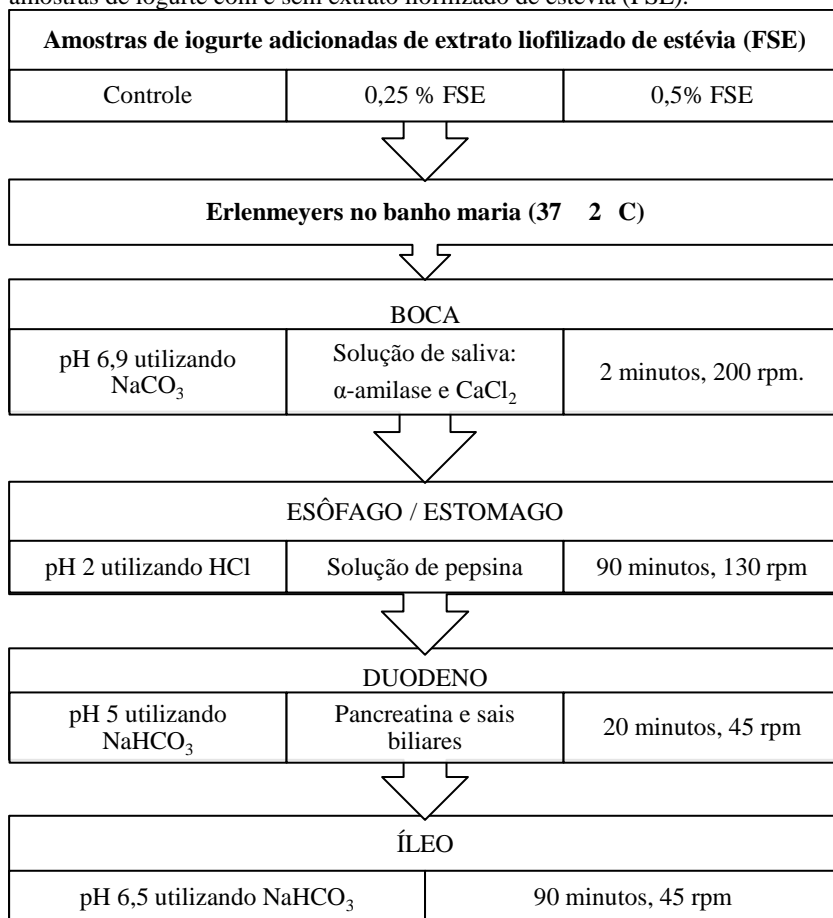
As condições gastrointestinais foram simuladas de forma contínua, assim, o volume total aumentou, da mesma forma como ocorre na digestão real. As alíquotas foram retiradas no final de cada passo e imediatamente colocadas num banho de água fria durante 10 minutos e congeladas (-40 ± 2 °C) até a análise do teor de compostos fenólicos e da atividade antioxidante como previamente descrito na Seção 2.8.

A bioacessibilidade (%) dos compostos fenólicos é considerada como a concentração de compostos fenólicos liberados a partir das amostras de iogurte durante a simulação gastrointestinal *in vitro* e que está disponível para absorção. A bioacessibilidade foi calculada pela Equação (2), de acordo com Rodríguez-Roque et al. (2013).

$$\text{Bioacessibilidade } \% = \frac{BC_1}{BC_0} \times 100 \quad (2)$$

Onde BC_1 e BC_0 correspondem à concentração de compostos fenólicos após cada etapa de simulação gastrointestinal *in vitro* e amostra de iogurte não submetida à simulação, respectivamente.

Figura 2.2. Fluxograma da simulação gastrointestinal *in vitro* utilizado para as amostras de iogurte com e sem extrato liofilizado de estévia (FSE).



Fonte: Acervo do autor.

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como médias \pm desvio padrão de três repetições. Para determinar as diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados, utilizou-se a análise de variância unidirecional (ANOVA) e o teste de Tukey. Os dados também foram submetidos à correlação linear (R) da análise de regressão. Todas as

análises estatísticas foram realizadas utilizando o software STATISTICA versão 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EFEITOS DA ADIÇÃO DE FSE NA VIABILIDADE DAS CULTURAS INICIADORAS DO IOGURTE

As alterações nas contagens de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* em todas as amostras durante o armazenamento são mostradas na Tabela 2.1. A adição de FSE às amostras não afetou a sobrevivência das cepas em comparação com a amostra controle ao longo de todo o período de armazenamento. Um comportamento semelhante foi observado por Jaziri et al. (2009), que relataram que a adição de chás verde e preto no iogurte não influenciou significativamente no crescimento ou sobrevivência de *Lactobacillus spp.* durante o armazenamento.

As contagens de células viáveis de *S. thermophilus* aumentaram ($p < 0,05$) do dia 1 ao dia 30 em todas as amostras. Por outro lado, a contagem de células viáveis de *L. bulgaricus* não foi afetada ($p > 0,05$) durante o armazenamento. Após 30 dias de armazenamento, as contagens de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* de todas as amostras permaneceram acima de $8 \log \text{ UFC g}^{-1}$ e cerca de $7 \log \text{ UFC g}^{-1}$, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os valores exigidos pelo Codex Alimentarius (2011), que estabelece que essa contagem deve permanecer acima de $7 \log \text{ UFC g}^{-1}$ até o final da vida útil. Além disso, Cruz et al. (2012) descreveram que o iogurte adicionado de *L. bulgaricus* apresentou contagens viáveis mais baixas em comparação com *S. thermophilus* ao fim de 28 dias de armazenamento. Segundo Beshkova et al. (2002), isso provavelmente ocorreu devido à maior sensibilidade de *L. bulgaricus* ao oxigênio, enquanto *S. thermophilus* é conhecido por superar o estresse causado pelo oxigênio presente no alimento (iogurte).

Tabela 2.1. Contagens de células viáveis (log UFC g⁻¹) de *Streptococcus thermophilus* (A) e *Lactobacillus bulgaricus* (B) dos iogurtes fortificados com 0 % (Controle), 0,25 % (S1) e 0,5 % (S2) de FSE durante o armazenamento a 4 ± 2 °C.

| Micro-organismo | Amostra | Dia 1 | Dia 15 | Dia 30 |
|------------------------|----------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| <i>S. thermophilus</i> | Controle | 8,24 ± 0,09 ^{bA} | 8,34 ± 0,11 ^{bb} | 8,68 ± 0,03 ^{aA} |
| | S1 | 8,21 ± 0,11 ^{bA} | 8,50 ± 0,04 ^{aAB} | 8,62 ± 0,08 ^{aA} |
| | S2 | 8,40 ± 0,15 ^{bA} | 8,63 ± 0,14 ^{abA} | 8,77 ± 0,10 ^{aA} |
| <i>L. bulgaricus</i> | Controle | 7,24 ± 0,10 ^{aA} | 6,96 ± 0,18 ^{aB} | 7,25 ± 0,11 ^{aA} |
| | S1 | 7,11 ± 0,03 ^{aA} | 6,98 ± 0,10 ^{aB} | 7,07 ± 0,18 ^{aA} |
| | S2 | 7,12 ± 0,02 ^{aA} | 7,17 ± 0,05 ^{aA} | 7,24 ± 0,34 ^{aA} |

Legenda: Valores médios ± desvio padrão (n = 3). FSE: extrato de estévia liofilizado. Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas (p < 0,05) para a mesma amostra em diferentes dias de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre todas as amostras no mesmo dia de armazenamento para cada micro-organismo.

3.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE IOGURTE

Os valores de sólidos totais, sinerese, acidez e pH das amostras são apresentados na Tabela 2.2. Como esperado, as amostras enriquecidas com FSE apresentaram maior teor de sólidos totais (p < 0,05) do que a amostra Controle. O teor de sólidos totais para todas as amostras não se alterou significativamente (p > 0,05) durante o armazenamento. Os valores de sinerese foram semelhantes em todas as amostras em cada dia de análise (p > 0,05). Similarmente, O'Sullivan et al. (2016) relataram que a adição de extratos de algas não afetou a separação do soro no iogurte.

Todas as amostras mostraram um aumento significativo (p < 0,05) de acidez após 30 dias de armazenamento. No entanto, os valores de acidez e pH de todas as amostras não diferiram (p > 0,05) quando se considerou o mesmo dia de armazenamento. Além disso, o pH de todas as amostras diminuiu (p < 0,05) durante o armazenamento, independentemente da adição do FSE. Muniandy, Shori e Baba (2016) e Najgebauer-Lejko et al. (2011) suplementaram iogurtes com extratos de

plantas que são ricos em compostos fenólicos e notaram a mesma redução gradual no pH. Foi observada uma redução menor ($p < 0,05$) no pH da amostra S2 durante o armazenamento. Esse comportamento está de acordo com os encontrados por Michael, Phebus e Schmidt (2010) e Muniandy, Shori e Baba (2016), que sugerem que a adição de compostos fenólicos de extratos de plantas ao iogurte pode aumentar sua capacidade de tamponamento, uma vez que melhoram a resistência do iogurte às mudanças no pH apesar da acumulação dos ácidos orgânicos que são geralmente produzidos por *Lactobacillus* spp.

Tabela 2.2. Sólidos totais, sinerese, acidez e valores de pH dos iogurtes fortificados com 0 % (Controle), 0,25 % (S1) e 0,5 % (S2) de FSE durante o armazenamento a 4 ± 2 °C.

| Amostra | Dia | Sólidos totais (g 100 g ⁻¹) | Sinerese (g 100 g ⁻¹) | Acidez (g 100 g ⁻¹ de ácido láctico) | pH |
|----------|-----|--|--------------------------------------|---|----------------------------|
| Controle | 1 | 11,55 ± 0,02 ^{bB} | 29,24 ± 0,48 ^{aA} | 0,65 ± 0,01 ^{bA} | 4,65 ± 0,01 ^{aA} |
| | 15 | 11,91 ± 0,02 ^{aB} | 32,98 ± 2,54 ^{aA} | 0,72 ± 0,07 ^{abA} | 4,36 ± 0,22 ^{abA} |
| | 30 | 12,04 ± 0,14 ^{aB} | 30,24 ± 1,59 ^{aA} | 0,76 ± 0,05 ^{aA} | 4,31 ± 0,05 ^{bB} |
| S1 | 1 | 11,91 ± 0,18 ^{aA} | 27,37 ± 1,32 ^{bA} | 0,68 ± 0,02 ^{aA} | 4,65 ± 0,01 ^{aA} |
| | 15 | 12,09 ± 0,17 ^{aAB} | 33,18 ± 1,92 ^{aA} | 0,69 ± 0,03 ^{aA} | 4,44 ± 0,02 ^{bA} |
| | 30 | 12,25 ± 0,09 ^{aAB} | 31,99 ± 2,94 ^{abA} | 0,74 ± 0,04 ^{aA} | 4,33 ± 0,02 ^{cB} |
| S2 | 1 | 12,20 ± 0,14 ^{aA} | 28,72 ± 1,63 ^{aA} | 0,67 ± 0,01 ^{bA} | 4,66 ± 0,01 ^{aA} |
| | 15 | 12,22 ± 0,07 ^{aA} | 32,53 ± 1,70 ^{aA} | 0,72 ± 0,02 ^{aA} | 4,50 ± 0,01 ^{cA} |
| | 30 | 12,43 ± 0,09 ^{aA} | 30,31 ± 2,36 ^{aA} | 0,72 ± 0,01 ^{aA} | 4,54 ± 0,01 ^{bA} |

Legenda: Valores médios ± desvio padrão (n = 3). FSE: extrato de estévia liofilizado. Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para a mesma amostra nos diferentes dias de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todas as amostras no mesmo dia de armazenamento.

3.3 COR

Os valores de L*, a*, b* e ΔE^* de todas as amostras são apresentados na Tabela 2.3. Os parâmetros de cor mudaram gradualmente à medida que a concentração de FSE aumentou. A luminosidade dos iogurtes (valor L*) diminuiu ($p < 0,05$) com o aumento da concentração de FSE. Os parâmetros a* e b* aumentaram em paralelo com a concentração de FSE. Tendências semelhantes foram

observadas por Schamberger e Labuza (2007) e Boroski et al. (2012) com a adição de polifenóis de chá verde ao leite e com a adição de extrato de orégano a bebidas lácteas, respectivamente. A diferença total de cor (ΔE^*) é um valor único que leva em consideração a diferença entre os valores L^* , a^* e b^* da amostra e, assim, avalia as alterações globais. Não foram observadas diferenças ($p < 0,05$) no parâmetro de diferença de cor total (ΔE^*) de todas as amostras durante o armazenamento. Além disso, o ΔE^* de todas as amostras apresentou valores inferiores a 3, o que é considerado uma diferença que não é perceptível ao olho humano, conforme relatado por Martínez-Cervera et al. (2011).

Tabela 2.3. Parâmetros de cor dos iogurtes fortificados com 0 % (Controle), 0,25 % (S1) e 0,5 % (S2) de FSE durante o armazenamento a 4 ± 2 °C.

| Amostra | Dia | L^* | a^* | b^* | ΔE^* |
|-----------------|-----|-----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|
| Controle | 1 | $90,05 \pm 0,09^{aA}$ | $-2,97 \pm 0,04^{aC}$ | $9,87 \pm 0,28^{aC}$ | - |
| | 15 | $90,06 \pm 0,14^{aA}$ | $-3,06 \pm 0,03^{bC}$ | $9,87 \pm 0,17^{aC}$ | - |
| | 30 | $90,16 \pm 0,13^{aA}$ | $-3,04 \pm 0,03^{bC}$ | $10,07 \pm 0,12^{aC}$ | $0,39 \pm 0,28^{aA}$ |
| S1 | 1 | $85,53 \pm 0,46^{aB}$ | $-2,71 \pm 0,07^{aB}$ | $13,56 \pm 0,25^{aB}$ | - |
| | 15 | $85,79 \pm 0,07^{aB}$ | $-2,79 \pm 0,02^{bB}$ | $13,68 \pm 0,19^{aB}$ | - |
| | 30 | $85,93 \pm 0,08^{aB}$ | $-2,82 \pm 0,02^{bB}$ | $13,68 \pm 0,37^{aB}$ | $0,59 \pm 0,40^{aA}$ |
| S2 | 1 | $83,67 \pm 0,13^{aC}$ | $-2,43 \pm 0,14^{aA}$ | $15,91 \pm 0,27^{aA}$ | - |
| | 15 | $83,66 \pm 0,06^{aC}$ | $-2,50 \pm 0,03^{aBA}$ | $15,82 \pm 0,19^{aA}$ | - |
| | 30 | $83,80 \pm 0,14^{aC}$ | $-2,57 \pm 0,04^{bA}$ | $15,64 \pm 0,11^{aA}$ | $0,44 \pm 0,24^{aA}$ |

Legenda: L^* : Luminosidade, a^* : vermelho-verde, b^* : amarelo-azul, ΔE^* : diferença total de cor (parâmetros de cor). FSE: extrato liofilizado de estévia. Valores médios \pm desvio padrão ($n = 3$). Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para a mesma amostra nos diferentes dias de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todas as amostras no mesmo dia de armazenamento.

3.4 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (CFT) E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS AMOSTRAS DE IOGURTE

Os resultados do teor de CFT e da atividade antioxidante (ABTS e FRAP) das amostras ao longo dos 30 dias de armazenamento são mostrados na Tabela 2.4. O teor de CFT de todas as amostras não

alterou significativamente durante o armazenamento. No entanto, as amostras enriquecidas com FSE apresentaram maior teor de CFT e atividade antioxidante ($p < 0,05$) do que a amostra de Controle em todos os dias analisados. A atividade antioxidante das amostras enriquecidas (S1 e S2) diminuiu ($p < 0,05$) durante o armazenamento. De acordo com Lamothe et al. (2014), isso provavelmente ocorre devido à formação de um complexo entre polifenóis e proteínas do leite, o que pode levar a uma diminuição da atividade antioxidante. Chouchouli et al. (2013) e Vital et al. (2015) também relataram um aumento na atividade antioxidante após a adição de extrato de sementes de uva e extrato aquoso de *Pleurotus ostreatus*, respectivamente. Entretanto, em ambos os casos houve diminuição deste parâmetro durante o armazenamento.

Tabela 2.4. Valores de compostos fenólicos totais (CFT) e atividade antioxidante (FRAP e ABTS) dos iogurtes fortificados com 0 % (Controle), 0,25 % (S1) e 0,5 % (S2) de FSE durante o armazenamento a 4 ± 2 °C.

| Amostra | Dia | CFT (mg GAE/g) | FRAP (μ mol Trolox/g) | ABTS (μ mol Trolox/g) |
|----------|-----|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Controle | 1 | $0,14 \pm 0,01^{aC}$ | $0,40 \pm 0,03^{aC}$ | $0,40 \pm 0,04^{aC}$ |
| | 15 | $0,13 \pm 0,01^{aC}$ | $0,40 \pm 0,01^{aC}$ | $0,32 \pm 0,08^{aC}$ |
| | 30 | $0,10 \pm 0,01^{bC}$ | $0,40 \pm 0,01^{aC}$ | $0,29 \pm 0,03^{aC}$ |
| S1 | 1 | $0,43 \pm 0,02^{aB}$ | $2,57 \pm 0,09^{aB}$ | $3,63 \pm 0,08^{aB}$ |
| | 15 | $0,41 \pm 0,01^{aB}$ | $2,27 \pm 0,06^{bB}$ | $2,36 \pm 0,11^{bB}$ |
| | 30 | $0,40 \pm 0,03^{aB}$ | $2,15 \pm 0,04^{bB}$ | $1,82 \pm 0,08^{bB}$ |
| S2 | 1 | $0,65 \pm 0,02^{aA}$ | $4,19 \pm 0,05^{aA}$ | $5,34 \pm 0,23^{aA}$ |
| | 15 | $0,62 \pm 0,01^{aA}$ | $4,08 \pm 0,05^{aA}$ | $4,16 \pm 0,29^{bA}$ |
| | 30 | $0,60 \pm 0,03^{aA}$ | $3,89 \pm 0,09^{bA}$ | $3,12 \pm 0,15^{cA}$ |

Legenda: Valores médios \pm desvio padrão ($n = 3$). FSE: extrato liofilizado de estévia liofilizado. Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para a mesma amostra nos diferentes dias de armazenamento. Letras sobrescritas maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre todas as amostras.

Uma correlação forte e positiva foi encontrada entre o teor de CFT e a atividade antioxidante medida com os ensaios ABTS ($R = 0,942$) e FRAP ($R = 0,996$). Estes resultados estão de acordo com vários estudos que relatam uma alta correlação entre compostos polifenólicos e atividade antioxidante. Além disso, Muniandy, Shori e Baba (2016) encontraram altos coeficientes de correlação entre o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante de iogurtes adicionados com três tipos

diferentes de chá. Do mesmo modo, Perna et al. (2014) observaram uma forte correlação entre a atividade antioxidante e o teor de CFT de iogurtes fortificados com castanha e mel.

3.5 SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL *in vitro*

3.5.1 Compostos fenólicos totais

O efeito da simulação gastrointestinal *in vitro* sobre os compostos fenólicos totais e sobre a bioacessibilidade dos compostos fenólicos nos iogurtes é apresentado na Tabela 2.5. Como discutido anteriormente, antes da simulação, a amostra S2 exibiu o teor de CFT mais elevado, indicando que FSE poderia ser utilizado como fonte potencial de polifenóis naturais. Após todos os passos das condições gastrointestinais simuladas, a amostra S2 continha ainda duas vezes mais polifenóis totais do que a amostra de controle, confirmando que a adição de FSE nos iogurtes é um meio de aumentar o consumo destes componentes benéficos.

Foi observado um aumento ($p < 0,05$) no teor de CFT de todas as amostras (Controle, S1 e S2) após o passo da boca. Um comportamento semelhante foi observado por Carbonell-Capella et al. (2015) e, de acordo com estes autores, isto pode ocorrer devido ao aumento da solubilização dos compostos fenólicos, uma vez que alguns fenóis que têm elevada massa molar podem ser insolúveis e as condições de agitação ou a atividade enzimática podem facilitar a degradação destas moléculas maiores. Além disso, Martínez-Las Heras et al. (2017) relataram que o passo da boca foi a fase que mais afetou o teor de fenólicos, independentemente da matriz digerida de caqui.

Após o passo do esôfago/estômago (digestão gástrica), o teor de CFT de todas as amostras (Controle, S1 e S2) aumentou significativamente ($p < 0,05$) quando comparado às amostras não digeridas. Estes resultados sugerem que a digestão gástrica melhora a liberação de compostos fenólicos a partir da matriz do iogurte. Este fato pode ser atribuído à agitação, ao pH ácido e a atividade enzimática da pepsina durante esta fase, que pode induzir a hidrólise de alguns compostos fenólicos ligados a outros constituintes alimentares. Do mesmo modo, Baublis, Decker e Clydesdale (2000), Liyana-Pathirana e Shahidi (2005), Rodríguez-Roque et al. (2013), e Wootton-Beard e Ryan (2011), sugerem que as condições gástricas aumentam a extração de compostos fenólicos da matriz alimentar. Além disso, Saura-Calixto, Serrano e Goñi (2007), relataram que os fenóis ligados a compostos de

alta massa molar, como proteínas e carboidratos, podem ser liberados pela ação da enzima digestiva levando a um aumento significativo nas suas concentrações após a simulação gástrica.

Tabela 2.5. Conteúdo e bioaccessibilidade dos compostos fenólicos e atividade antioxidante (FRAP e ABTS) dos iogurtes fortificados com 0 % (Controle), 0,25 % (S1) e 0,5 % (S2) de FSE durante a simulação gastrointestinal *in vitro*.

| Amostra | Etapa | CFT | | FRAP | ABTS |
|----------|------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | (mg GAE g ⁻¹) | Bioaccessibilidade (%) | (μmol Trolox g ⁻¹) | (μmol Trolox g ⁻¹) |
| Controle | Inicial | 0,10 ± 0,01 ^{dC} | - | 0,40 ± 0,01 ^{cC} | 0,39 ± 0,11 ^{dC} |
| | Boca | 0,39 ± 0,05 ^{cC} | 386,78 ± 67,78 | 0,34 ± 0,03 ^{dC} | 3,74 ± 0,53 ^{cC} |
| | Esôfago-estômago | 0,68 ± 0,03 ^{aC} | 670,24 ± 32,69 | 0,86 ± 0,11 ^{aC} | 0,16 ± 0,07 ^{eC} |
| | Duodeno | 0,58 ± 0,02 ^{bC} | 574,72 ± 30,67 | 0,49 ± 0,04 ^{bC} | 5,15 ± 0,25 ^{bC} |
| | Íleo | 0,74 ± 0,03 ^{aC} | 728,92 ± 64,06 | 0,45 ± 0,02 ^{bC} | 9,67 ± 0,59 ^{aC} |
| S1 | Inicial | 0,45 ± 0,03 ^{eB} | - | 2,11 ± 0,06 ^{cB} | 1,94 ± 0,12 ^{cB} |
| | Boca | 0,73 ± 0,01 ^{dB} | 162,13 ± 7,89 | 2,08 ± 0,03 ^{dB} | 6,43 ± 0,64 ^{bB} |
| | Esôfago-estômago | 0,85 ± 0,01 ^{cB} | 188,82 ± 9,76 | 2,53 ± 0,10 ^{bB} | 1,70 ± 0,02 ^{dB} |
| | Duodeno | 0,93 ± 0,02 ^{bB} | 205,04 ± 16,94 | 2,62 ± 0,23 ^{abB} | 6,89 ± 0,30 ^{bB} |
| | Íleo | 1,11 ± 0,01 ^{aB} | 245,62 ± 15,92 | 3,15 ± 0,33 ^{aB} | 14,44 ± 2,50 ^{aB} |
| S2 | Inicial | 0,65 ± 0,01 ^{dA} | - | 3,83 ± 0,08 ^{bA} | 3,47 ± 0,29 ^{dA} |
| | Boca | 1,08 ± 0,02 ^{cA} | 166,20 ± 5,07 | 3,43 ± 0,10 ^{cA} | 8,69 ± 0,52 ^{cA} |
| | Esôfago-estômago | 1,12 ± 0,02 ^{cA} | 172,35 ± 6,16 | 4,01 ± 0,11 ^{bA} | 3,18 ± 0,05 ^{dA} |
| | Duodeno | 1,24 ± 0,01 ^{bA} | 190,96 ± 2,40 | 4,19 ± 0,24 ^{abA} | 11,08 ± 1,38 ^{bA} |
| | Íleo | 1,36 ± 0,03 ^{aA} | 209,52 ± 1,00 | 4,59 ± 0,30 ^{aA} | 19,60 ± 0,92 ^{aA} |

Legenda: Valores médios ± desvio padrão (n = 3). FSE: extrato liofilizado de estévia. Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p < 0,05) para a mesma amostra nas diferentes etapas. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre todas as amostras na mesma etapa.

O teor de CFT da amostra Controle diminuiu (p < 0,05) após a simulação da digestão duodenal. Este comportamento pode ser explicado pelas condições alcalinas atingidas durante esta etapa, juntamente com possíveis interações entre polifenóis e outros componentes, tais como enzimas e sais biliares. No entanto, o teor de CFT das amostras S1 e S2 aumentou (p < 0,05) após esta etapa. Esta

diferença entre os resultados do CFT pode ser atribuída à composição da matriz alimentar submetida à digestão, uma vez que a amostra de controle não foi adicionada de FSE.

Após a etapa do íleo, todas as amostras apresentaram aumento ($p < 0,05$) nos CFT. Este aumento pode ser explicado pelo tempo adicional de extração (90 minutos ou mais) e/ou pelo aumento do valor de pH (de 5 para 6,5) das amostras que facilitam a liberação de compostos fenólicos ligados à matriz. O inverso ocorreu em um estudo conduzido por Carbonell-Capella et al. (2015), que analisaram uma mistura de suco de frutas adicionada com extrato de estévia e observaram que os valores de CFT diminuíram cerca de 40 % em relação ao valor inicial após a passagem pela simulação intestinal. Este comportamento confirma a interferência da matriz alimentar na absorção de compostos fenólicos.

A bioacessibilidade dos compostos bioativos é um pré-requisito para sua biodisponibilidade. De acordo com Xiao et al. (2014), geralmente, a fim de exercerem atividade benéficas ao organismo, os compostos bioativos devem ser biodisponíveis e também devem ser efetivamente absorvidos do trato intestinal para a corrente sanguínea e levados ao local apropriado no corpo humano. A bioacessibilidade dos compostos fenólicos nas amostras Controle, S1 e S2 no fim da simulação gastrointestinal *in vitro* foi cerca de 728, 245 e 209 %, respectivamente. Estes valores sugerem que muitas alterações nos compostos fenólicos, tais como solubilidade, estrutura química e interações com outros compostos, podem ocorrer durante a digestão de iogurtes e afetar a sua bioacessibilidade.

3.5.2 Atividade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante nas amostras após simulação gastrointestinal *in vitro* são apresentados na Tabela 2.5. Independentemente da etapa de simulação que foi analisada, um aumento nos valores de ABTS e FRAP foi observado quando a concentração de FSE foi aumentada. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores de diferentes autores, que relataram uma alta atividade antioxidante de produtos de *Stevia rebaudiana* (CARBONELL-CAPELLA et al., 2015; ŠIČ ŽLABUR et al., 2013).

Em relação ao poder de redução da atividade férrica (FRAP), os valores no final da etapa oral diminuíram ($p < 0,05$) em todas as amostras em comparação com seus valores iniciais. No entanto, na etapa esôfago-estômago os valores de FRAP em todas as amostras aumentaram significativamente ($p < 0,05$) em relação aos seus valores

iniciais e a etapa oral. Wootton-Beard e Ryan (2011) relataram o mesmo comportamento nos valores de FRAP em amostras de suco de beterraba após a passagem pela digestão gástrica. Estes resultados sugerem que os compostos bioativos que estão presentes na matriz do iogurte podem ser liberados quando submetidos a pH ácidos ou tratamentos enzimáticos, os quais podem hidrolisar proteínas e carboidratos. No entanto, uma alteração nas condições de pH provavelmente diminuiu o seu poder redutor, como ocorreu nos passos seguintes. Na etapa duodenal, os valores de FRAP das amostras Controle e S1 permaneceram ($p < 0,05$) maiores que seus valores iniciais. No entanto, não foi observada diferença entre o valor de FRAP da amostra S2 e o seu valor inicial após esta etapa. Resultados semelhantes foram observados por Gullon et al. (2015), que relataram que os valores das amostras analisadas pelo método FRAP aumentaram cerca de 8 % quando submetidos às condições duodenais. Após a simulação das condições do íleo, todas as amostras apresentaram um aumento ($p < 0,05$) nos valores de FRAP quando comparados aos valores iniciais. Estes aumentos foram de 12, 50 e 20 % para as amostras Controle, S1 e S2, respectivamente. De acordo com Gullon et al. (2015b) e Wootton-Beard e Ryan (2011b), os compostos antioxidantes seriam mais reativos em particular ao pH ácido (como ocorre na digestão gástrica e duodenal) e menos reativos ao pH perto da neutralidade (como ocorre na digestão do íleo). Isto poderia explicar o maior aumento nos valores de FRAP na digestão gástrica do que nas etapas seguintes.

Quando o potencial de eliminação do radical ABTS foi avaliado, todas as amostras digeridas na boca apresentaram maior atividade antioxidante ($p < 0,05$). Na etapa de digestão gástrica (esôfago/estômago), as amostras Controle e S1 apresentaram redução nos valores de ABTS ($p < 0,05$) quando comparados com os valores da etapa inicial, enquanto na amostra S2 esses valores permaneceram inalterados ($p > 0,05$). Segundo Rodríguez-Roque et al. (2014b), alguns compostos antioxidantes podem ser perdidos pela digestão enzimática ou por mudanças de pH em simulações *in vitro*. Após exposição às condições simuladas do duodeno (sais biliares, pancreatina e pH 5,0), os valores de ABTS aumentaram ($p < 0,05$) quando comparados com a digestão gástrica e às etapas iniciais. Esse comportamento está de acordo com o estudo de Mosele et al. (2016), que relataram um aumento de aproximadamente 7,7 vezes na quantidade de ácido gálico após digestão, atribuída à hidrólise parcial de galotaninos. Estes resultados também estão de acordo com os resultados obtidos por Del Pino-García et al. (2016b), Rufián-Henares e Delgado-Andrade (2009), onde a

digestão gastrointestinal foi essencial para permitir a liberação de uma grande quantidade de compostos antioxidantes, mostrando um aumento de até quatro vezes nos valores de ABTS para a fração digerida em comparação com os produtos originais. Após a simulação das condições do íleo, todas as amostras apresentaram aumento ($p < 0,05$) nos valores de ABTS quando comparadas aos seus valores iniciais e a etapa do duodeno. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Wootton-Beard, Moran e Ryan (2011), que relataram que os valores de ABTS de 23 sucos de vegetais aumentaram após a digestão intestinal e também estão de acordo com os resultados obtidos por Chandrasekara e Shahidi (2012), que relataram que a digestão intestinal aumentou os valores de ABTS de grãos de pãoço.

Bouayed, Hoffmann e Bohn (2011) relataram que o pH pode desempenhar um papel importante na atividade antioxidante de compostos fenólicos, sugerindo que a transição de um ambiente ácido para um alcalino aumenta a atividade antioxidante destes compostos causando a desprotonação dos radicais hidroxila presentes nos anéis aromáticos. Em relação à condição de pH dos testes de atividade antioxidante realizados neste estudo, sugere-se que o teste FRAP (conduzido a pH 2) poderia ser mais apropriado para avaliar a atividade antioxidante na digestão gástrica. No entanto, o ensaio ABTS (conduzido a pH 5-6,5) poderia ser mais apropriado para avaliar a digestão intestinal.

Existem evidências que indicam uma relação entre os compostos de polifenóis e a atividade antioxidante, mostrando que esses compostos contribuem amplamente para as propriedades antioxidantes (CHANDRASEKARA; SHAHIDI, 2012; ČÍŽ et al., 2010). Uma correlação positiva e forte ($R = 0,81$, $p < 0,001$) foi encontrada entre o CFT e a atividade antioxidante medida com o ensaio ABTS. Isto pode ser atribuído ao fato dos dois ensaios se basearem na transferência de elétrons. Foi obtida uma significativa boa correlação ($R = 0,73$, $p < 0,001$) entre os ensaios CFT e FRAP. Estes resultados estão de acordo com vários estudos que relataram uma alta correlação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante. Além disso, Gullon et al. (2015b) encontraram altos coeficientes de correlação entre o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante da farinha de bagaço de maçã submetida à digestão *in vitro*. Similarmente, Carbonell-Capella et al. (2015) relataram que há uma forte correlação entre a atividade antioxidante e o CFT de bebidas adicionadas de extrato de estêvia após o processo de digestão *in vitro*. Além disso, Apea-Bah et al. (2016)

relataram que há uma alta correlação entre a atividade antioxidante e o CFT de sorgo após digestão *in vitro*.

4 CONCLUSÃO

Este estudo mostra que FSE pode ser utilizado como uma fonte alternativa de compostos fenólicos e antioxidantes para fortificar iogurte. As amostras enriquecidas com FSE apresentaram maior teor de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante do que a amostra de Controle, tanto no início quanto no final do tempo de armazenamento. Todas as amostras mantiveram uma contagem elevada de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* ao longo dos 30 dias de armazenamento. O pH, acidez e sinerese não foram afetados pela adição de FSE às amostras. A adição de 0,25 e 0,5 % de FSE contribuiu para aumentar a concentração e a bioacessibilidade dos compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante total dos iogurtes. Finalmente, as amostras adicionadas com FSE apresentaram aumento no potencial antioxidante, promovendo mais uma característica funcional para o iogurte, uma vez que a presença de uma matriz estruturada parece influenciar favoravelmente na bioacessibilidade de compostos fenólicos e antioxidantes no processo digestivo.

REFERÊNCIAS

ABADÍA-GARCÍA, L. et al. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. **International Dairy Journal**, v. 33, n. 2, p. 191–197, 2013.

APEA-BAH, F. B. et al. Sorghum-cowpea composite porridge as a functional food, Part II: Antioxidant properties as affected by simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 197, p. 307–315, 2016.

ARRIOLA, N. D. A. et al. Encapsulation of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content. **Food Bioscience**, v. 13, p. 32–40, 2016.

BAUBLIS, A.; DECKER, E. A.; CLYDESDALE, F. M. Antioxidant effect of aqueous extracts from wheat bases ready-to-eat breakfast cereals. **Food Chem**, v. 68, p. 1–6, 2000.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BESHKOVA, D. M. et al. Effect of oxygen on batch yogurt cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 361–365, 2002.

BOROSKI, M. et al. Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 167–174, 2012.

BOUAYED, J.; HOFFMANN, L.; BOHN, T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 14–21, 2011.

ÇAM, M.; İÇYER, N. C.; ERDOĞAN, F. LWT - Food Science and Technology Pomegranate peel phenolics : Microencapsulation , storage

stability and potential ingredient for functional food development. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 117–123, 2014.

CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. High pressure processing of fruit juice mixture sweetened with Stevia rebaudiana Bertoni: Optimal retention of physical and nutritional quality. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 18, p. 48–56, 2013.

CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al. Effect of Stevia rebaudiana addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. **Food Chemistry**, v. 184, p. 122–130, 2015.

CHAN, P. et al. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. **British journal of clinical pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 215–20, set. 2000.

CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 226–237, 2012.

CHOUCHOULI, V. et al. Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 522–529, 2013.

ČÍŽ, M. et al. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 518–523, 2010.

CODEX, A. **Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual, 19th ed.** Rome, Italy: 2011Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_19e.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2016

CRUZ, A. G. et al. **Glucose oxidase: A potential option to decrease the oxidative stress in stirred probiotic yogurt****LWT - Food Science and Technology**. [s.l: s.n.].

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*

- ssp. bulgaricus, *Lactobacillus acidophilus*, and bifidobacteria. **Journal of dairy science**, v. 79, n. 9, p. 1529–1536, 1996.
- DEL PINO-GARCÍA, R. et al. Bioavailability of phenolic compounds and antioxidant effects of wine pomace seasoning after oral administration in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 486–496, 2016a.
- DEL PINO-GARCÍA, R. et al. Total antioxidant capacity of new natural powdered seasonings after gastrointestinal and colonic digestion. **Food Chemistry**, v. 211, p. 707–714, 2016b.
- GULLON, B. et al. In vitro gastrointestinal digestion of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 617–628, 2015a.
- GULLON, B. et al. Bioaccessibility, changes in the antioxidant potential and colonic fermentation of date pits and apple bagasse flours obtained from co-products during simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 78, p. 169–176, 2015b.
- JAZIRI, I. et al. Effect of green and black teas (*Camellia sinensis* L.) on the characteristic microflora of yogurt during fermentation and refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 614–620, 2009.
- JENTZER, J.-B. et al. Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Food Chemistry**, v. 166, p. 561–567, 2015.
- KARAASLAN, M. et al. Drying kinetics and thermal degradation of phenolic compounds and anthocyanins in pomegranate arils dried under vacuum conditions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 2, p. 595–605, 2014.
- LAMOTHE, S. et al. Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. **Food & Function**, v. 5, p. 2621–2631, 2014.
- LAURENT, C.; BESANÇON, P.; CAPORICCIO, B. Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. **Food**

Chemistry, v. 100, n. 4, p. 1704–1712, 2007.

LEMUS-MONDACA, R. et al. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, v. 132, n. 3, p. 1121–1132, 2012.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 93, n. 1, p. 47–56, 2005.

LUCEY, J. A.; SINGH, H. Formation and physical properties of acid milk gels: A review. **Food Research International**, v. 30, n. 7, p. 529–542, 1998.

MARTÍNEZ-CERVERA, S. et al. Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 3, p. 729–736, 2011.

MARTÍNEZ-LAS HERAS, R. et al. Evaluation studies of persimmon plant (*Diospyros kaki*) for physiological benefits and bioaccessibility of antioxidants by in vitro simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 214, p. 478–485, 2017.

MICHAEL, M.; PHEBUS, R. K.; SCHMIDT, K. A. Impact of a plant extract on the viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in nonfat yogurt. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 10, p. 665–672, 2010.

MODLER, H. W.; KALAB, M. Microstructure of Yogurt Stabilized with Milk Proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 3, p. 430–437, 1983.

MOSELE, J. I. et al. Stability and metabolism of *Arbutus unedo* bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under in vitro digestion and colonic fermentation. **Food Chemistry**, v. 201, p. 120–130, 2016.

MUNIANDY, P.; SHORI, A. B.; BABA, A. S. Influence of green, white and black tea addition on the antioxidant activity of probiotic yogurt during refrigerated storage. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 8, p. 1–8, 2016.

NAJGEBAUER-LEJKO, D. et al. The impact of tea supplementation on microflora, pH and antioxidant capacity of yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 8, p. 568–574, 2011.

O’SULLIVAN, A. M. et al. Seaweed Extracts as Potential Functional Ingredients in Yogurt. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2016.

OKPALA, C. O. R.; PIGGOTT, J. R.; SCHASCHKE, C. J. Influence of high-pressure processing (HPP) on physico-chemical properties of fresh cheese. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 61–67, 2010.

ORTAKCI, F. et al. Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6274–6281, 2012.

PÉREZ-RAMÍREZ, I. F. et al. Effect of stevia and citric acid on the stability of phenolic compounds and in vitro antioxidant and antidiabetic capacity of a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. **Food Chemistry**, v. 172, p. 885–892, 2015.

PERNA, A. et al. Antioxidant activity of yogurt made from milk characterized by different casein haplotypes and fortified with chestnut and sulla honeys. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 11, p. 6662–6670, 2014.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology & medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–7, maio 1999.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 206–212, 2013.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. In vitro bioaccessibility of health-related compounds from beverages based on fruit juice, milk or soymilk: Influence of the food matrix. **Journal of Functional Foods**, v. 7, n. c, p. 1–256, 2014a.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. In vitro bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice- and milk-based beverages. **Food Research International**, v. 62, p. 771–778, 2014b.

RUFÍÁN-HENARES, J. A.; DELGADO-ANDRADE, C. Effect of digestive process on Maillard reaction indexes and antioxidant properties of breakfast cereals. **Food Research International**, v. 42, n. 3, p. 394–400, 2009.

SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; GOÑI, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 492–501, jan. 2007.

SCHAMBERGER, G. P.; LABUZA, T. P. Effect of green tea flavonoids on Maillard browning in UHT milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p. 1410–1417, 2007.

SHUKLA, S. et al. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p. 2338–2343, 2009.

ŠIĆ ŽLABUR, J. et al. *Stevia rebaudiana* Bertonii - A review of nutritional and biochemical properties of natural sweetener. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v. 78, n. 1, p. 25–30, 2013.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, 1965.

SOLIERI, L. et al. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by in vitro screening and principal component analysis. **Food Microbiology**, v. 38, p. 240–249, 2014.

VERRUCK, S. et al. The buffalo Minas Frescal cheese as a protective matrix of *Bifidobacterium* BB-12 under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1179–1183, 2015.

VITAL, A. C. P. et al. Microbiological, functional and rheological properties of low fat yogurt supplemented with *Pleurotus ostreatus*

aqueous extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1028–1035, 2015.

WOOTTON-BEARD, P. C.; MORAN, A.; RYAN, L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 217–224, 2011.

WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, L. **A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants** *Journal of Functional Foods*. Oxford: [s.n.].

WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, L. Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. **Food Research International**, v. 44, n. 10, p. 3135–3148, 2011b.

XIAO, P. et al. In vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of Radix Isatidis extract and bioaccessibility of six bioactive compounds after simulated gastro-intestinal digestion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 55–61, 2014.

ANEXO A – Trabalhos apresentados em eventos



Certificate of Presentation

Dear Sir or Madam,

We confirm that Ms Nathalia Aceval participated at IUFOST 2016 Dublin - 18th World Congress on Food Science and Technology. The conference was held on 21st - 25th August 2016 at the RDS, Dublin, Ireland.

Ms Nathalia Aceval is author/co-author of the following accepted contribution(s):

Speaker Presentation(s)

| | |
|-------------------|---|
| Title | In vitro gastrointestinal release of phenolic compounds of Stevia rebaudiana (Bert.) incorporated in yogurt |
| Presentation Type | Poster Presentation |
| Theme | Innovation in Food Quality and Processing |
| Presenting Author | Ms Nathalia Aceval Affiliations: Universidade Federal de Santa Catarina, Newcastle University |
| Co-Author | Ms Mariana Wolff Carvalho Affiliations: Universidade Federal de Santa Catarina |
| Co-Author | Ms Silvani Verruck Affiliations: Universidade Federal de Santa Catarina |
| Co-Author | Ms Lara Felisbino Alves Affiliations: Universidade Federal de Santa Catarina |
| Co-Author | Ms Luiza Cirra Pereira Affiliations: Universidade Federal de Santa Catarina |
| Co-Author | Ms Gabriela Liz Affiliations: Universidade Federal de Santa Catarina |
| Co-Author | Ms Sofia Grechi Garcia Affiliations: Universidade Federal de Santa Catarina |
| Co-Author | Dr Elane Schwinden Prudêncio Affiliations: Universidade Federal de Santa Catarina |
| Co-Author | Dr Renata Dias de Melo Castanho Amboni Affiliations: Universidade Federal de Santa Catarina |

Best regards,
IUFOST 2016 Scientific Committee



Operating in 24 Countries Worldwide

Company Registered in Dublin, Ireland.

Registration Number: 288489 VAT Number: 8288489 Q.

Registered Office: 11-13 The Hyde Building, The Park, Carrickmines, Dublin 18

Managing Director: Nicola Mc Grane, Director: Eamonn O Callanáin

www.conferencepartners.com



V SEMANA ACADÊMICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – VSACTA
A INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA E O CONSUMIDOR – CUIDADO COM A SAÚDE
26 A 30 de Setembro, 2016



Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias
Rod. Ademar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, Estado de Santa Catarina
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

CERTIFICADO

O trabalho **Efeito da adição de extrato liofilizado de *Stevia rebaudiana* (Bert.) sobre a viabilidade de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* em iogurte [P038]**, dos autores: **CARVALHO, M.; VERRUCK, S.; ARRIOLA, N.D.A.; PEREIRA, L.C.; ALVES, L.F.; AMBONI, R.D.M.; PRUDÊNCIO, E.S.** foi apresentado na forma de pôster no período de 26 a 30 de setembro de 2016 durante a V SACTA realizada na Sede das Centrais Elétricas de Santa Catarina, cidade de Florianópolis, estado de Santa Catarina.

Florianópolis, 30 de Setembro de 2016.

Manuela Roffili da Silveira

Manuela Roffili da Silveira
Presidente da V SACTA

Pedro L. M. Barreto

Pedro L. M. Barreto Prof. Dr. Moecke, Profa. Dra.
Comissão Científica

Vildes M. Scussel

Vildes M. Scussel, Profa. Dra. P.D.
Coordenadora da V SACTA/ Presidente da ABMAG

Resumos: <http://sacta2016.paginas.ufsc.br/lista-de-trabalhos-aceitos-para-apresentacao-na-forma-de-poster-na-v-sacta-2016/>