

# AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS OPERACIONAIS NA OBTENÇÃO DE EXTRATO DE FOLHAS DE STEVIA A PARTIR DA EXTRAÇÃO POR LÍQUIDO PRESSURIZADO

D. T. RASPE<sup>1</sup>, C. SILVA<sup>2</sup>, S. C. COSTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias; <sup>2</sup> Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Tecnologia

**RESUMO** – A extração com líquido pressurizado (ELP) é um método de extração que combina temperatura e pressão com solventes líquidos para alcançar rápida e eficiente extração de compostos de interesse. Essa técnica usando solvente de grau alimentício foi aplicada em folhas de *Stevia rebaudiana* pré-tratadas, a fim de investigar o rendimento em massa ( $R_M$ ) do processo, e obter extratos ricos em compostos fenólicos (CFT) e atividade antioxidante (AA). A influência dos parâmetros percentual de etanol no solvente extrator, tempo estático e pressão foram investigados frente às variáveis resposta, onde os maiores conteúdos obtidos foram de 47,8%, ~300 mg GAE g<sup>-1</sup> extrato e 8,6 mmol TEAC g<sup>-1</sup> extrato para  $R_M$ , CFT e AA, respectivamente, obtidos com 70% de etanol no solvente extrator, 10 min de tempo estático, 50 bar a 125 °C. Estes resultados indicam que a ELP apresenta ser uma ferramenta poderosa para a obtenção de extratos de Stevia como potencial fonte de CFT, AA e adoçantes não calóricos.

Palavras-chave: Atividade antioxidante, compostos fenólicos, rendimento, *Stevia rebaudiana*.

**ABSTRACT** – *Pressurized Liquid Extraction (PLE) is an extraction method that combines temperature and pressure with liquid solvents to achieve fast and efficient extraction of compounds of interest. This technique using food grade solvent was applied to pre-treated Stevia rebaudiana leaves in order to investigate the mass yield ( $Y_M$ ) of the process, and obtain extracts rich in phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity (AA). The influence of percentage parameters of ethanol in the extracting solvent, static time and pressure were investigated against the response variables, where the highest contents obtained were 47.8%, ~300 mg GAE g<sup>-1</sup> extract and 8.6 mmol TEAC g<sup>-1</sup> extract for  $Y_M$ , TPC and AA, respectively, obtained with 70% ethanol in the extracting solvent, 10 min static time, 50 bar at 125 °C. These results indicate that PLE is a powerful tool for obtaining Stevia extracts as a potential source of TPC, AA and non-caloric sweeteners.*

*Keywords: Antioxidant activity, phenolic compounds, yield, Stevia rebaudiana.*

## 1. INTRODUÇÃO

O papel da dieta alimentar na prevenção de doenças e na manutenção do bem-estar psicofísico tem adquirido relevante destaque nas últimas décadas. De modo crescente, os consumidores estão cientes de que a presença de compostos bioativos nos alimentos representa uma série de benefícios, podendo desempenhar papel fundamental na busca por uma vida saudável. Nesse sentido, trabalhos têm sido desenvolvidos em prol dos chamados “alimentos funcionais”, que podem ser desenvolvidos por meio da suplementação de um alimento “tradicional” com um ingrediente rico em compostos bioativos, ou ainda, no uso de extratos de ervas como aditivos alimentares, possibilitando a obtenção de um produto alimentar cuja composição química seja enriquecida pela presença de metabolitos derivados de plantas, com propriedades promotoras da saúde (HU, 2020).

A *Stevia rebaudiana* Bertoni desempenha um papel significativo na tendência de incremento no uso de plantas na indústria de alimentos e bebidas. Essa matriz vegetal é um arbusto perene, nativo da América do Sul e pertencente à família Asteraceae. Várias classes de compostos foram identificadas nas folhas de *Stevia* (WÖLWER-RIECK, 2021), mas os glicosídeos de esteviol são, sem dúvida, os mais distintos. O poder adoçante de alguns desses compostos, centenas de vezes maiores do que a sacarose, juntamente com a ausência de índice glicêmico ou energia gerada (KOUBAA E COLABORADORES, 2015), tornam-na uma importante fonte de adoçantes cujo emprego como aditivos naturais é particularmente indicado para indivíduos afetados por diabetes mellitus, obesidade ou hipertensão (KIM E COLABORADORES, 2011).

A importância industrial e científica da *Stevia rebaudiana* é reforçada pela ocorrência, junto com os glicosídeos de esteviol, de compostos antioxidantes (KOUBAA E COLABORADORES, 2015). Dentre estes, os polifenóis são os que mais se destacam por suas propriedades benéficas à saúde humana. São metabólitos secundários sintetizados pelas plantas contra o estresse oxidativo e sua inclusão na dieta está de fato associada à diminuição do risco de doenças cardiovasculares, alguns tipos de câncer e doenças neurodegenerativas (VAUZOUR E COLABORADORES, 2010). Apesar da importância desta categoria de substâncias, poucos trabalhos têm se dedicado ao estudo da fração fenólica de *Stevia rebaudiana*.

A extração com líquido pressurizado (ELP) é considerada uma técnica de extração avançada que, em comparação com os métodos mais tradicionais (maceração, refluxo de calor, etc.), oferece a possibilidade de obter maiores rendimentos de extração, com menores volumes de solvente em tempos mais curtos de processo. A ELP explora a possibilidade de usar solventes comuns em temperaturas mais altas do que seus pontos de ebulição. Atrelada ao uso da pressão, aumenta a solubilidade dos analitos na matriz, facilitando os fenômenos de transferência de massa (HENG E COLABORADORES, 2013). Além disso, o aumento da temperatura de extração quando a água é usada como solvente (ou um dos solventes), causa o enfraquecimento das ligações de hidrogênio, resultando em uma constante dielétrica mais baixa, que pode variar de 80 à 25 °C, a 25-27 a 250 °C, sendo esse último caso muito próximo a solventes polares à temperatura ambiente (HERRERO E COLABORADORES, 2013).

Dada a escassez de informações sobre o desenvolvimento de métodos de extração eficazes na obtenção de compostos bioativos de *Stevia rebaudiana*, que explorem o uso de solventes de “grau alimentício”, atrelado ao rendimento quantitativo do processo (rendimento em massa), o objetivo principal

deste trabalho foi investigar as variáveis operacionais que contribuam na obtenção mássica de extratos ricos em CFT e AA provenientes de folhas de *Stevia* pré-tratadas, fazendo uso da extração com líquido pressurizado (ELP) utilizando uma mistura binária de água e etanol como solvente extrator.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni (*Stevia* UEM-13) foram cultivadas no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NEPRON) localizado na Universidade Estadual de Maringá (Paraná, Brasil). Colhidas no estágio de formação dos brotos das flores (~50 a 60 dias após poda), as folhas foram separadas dos talos, secas em estufa com circulação de ar a 60 °C por 8 horas, trituradas em moinho de facas e apresentavam teor de umidade final de <10% e diâmetro médio de 0.30 – 0.60 mm. Posteriormente, as folhas foram submetidas ao pré-tratamento etanólico (FORMIGONI E COLABORADORES, 2018), e posteriormente, foram secas e armazenadas para etapa de extração. A composição em termos de adoçantes das folhas utilizadas neste trabalho com e sem pré-tratamento estão apresentadas na Tabela 1. Etanol (Anidrol) e água deionizada (Induslab, Brasil) foram utilizados como solventes na ELP. O teor de compostos fenólicos totais (CFT) e a atividade antioxidante (AA) foram determinados usando ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico, Vetec), reagente Folin-Ciocalteu (Dinâmica), carbonato de sódio (Anidrol), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma Aldrich) e Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, Sigma Aldrich), e etanol (Anidrol).

Tabela 1 - Teor de adoçantes nas folhas de *Stevia rebaudiana* antes e depois do pré-tratamento etanólico

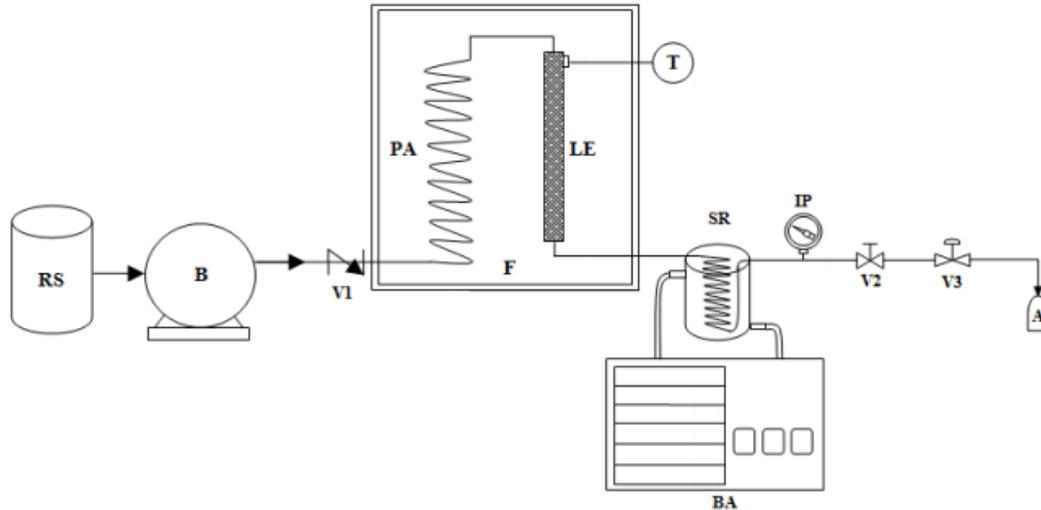
Análise	Sem pré-tratamento (g 100 g)	Com pré-tratamento (g 100 g)
Steviosídeo	4,34 ± 0,04	4,08 ± 0,07
Rebaudiosídeo C	1,92 ± 0,02	1,75 ± 0,01
Rebaudiosídeo A	6,98 ± 0,04	6,83 ± 0,02
Glicosídeos Totais	13,18 ± 0,06	12,76 ± 0,07

Fonte: o autor

### 2.1. Extração com líquido pressurizado (ELP)

Os experimentos foram realizados em modo semicontínuo, conforme esboça a Figura 1, e descrito por Iwassa e colaboradores (2019). O aparato experimental consistia em um reservatório (RS), contendo o solvente, cujo qual era continuamente bombeado por meio de uma bomba de alta pressão para líquidos (B). Para entrar no leito de extração (LE) na temperatura de teste, o solvente passou pela zona de pré-aquecimento (PA), que foi monitorado por um termopar (T). Em cada extremidade do LE haviam filtros de aço sintetizados. O forno (F) foi aquecido na temperatura desejada e, após seu alcance, o LE foi alocado em seu interior com 2 g de folhas de *stevia*, intercalados a cada 1 g com esferas de vidro.

Figura 1 - Aparato experimental semicontínuo: (RS) reservatório de solvente, (B) bomba de HPLC, (V1) válvula de retenção, (F) forno, (PA) pré-aquecimento, (LE) extrator, (T) termopar, (SR) sistema de resfriamento, (BA) banho termostático, (IP) indicador de pressão, (V2) válvula de controle de pressão, (V3) válvula de redução de pressão e (A) amostragem.



Fonte: Iwassa e colaboradores (2019)

O procedimento de extração baseia-se no aquecimento do sistema (F - Sanchis, BTT1050-00, Porto Alegre, Brasil) e preenchimento com solvente até a pressão de teste. Uma vez que o sistema foi pressurizado e a temperatura desejada foi atingida (125 °C), o extrator foi colocado no forno durante um determinado tempo estático (condições investigadas), sendo após este período, a extração dinâmica iniciada. As amostras (A) foram coletadas após a passagem por um sistema de refrigeração (SR), conectado a um banho termostatizado (BA). A pressão do sistema foi monitorada via indicador de pressão (IP) e controlada com uma válvula agulha e outra redutora de pressão.

Nos experimentos, foi investigada a extração dos compostos das folhas pré-tratadas de Stevia. Foi avaliada a proporção de etanol no solvente extrator (70 e 40%, v/v), tempo estático (10, 20 e 30 min) e pressão (50 e 100 bar), sob vazão fixa de 1 mL min<sup>-1</sup>. A temperatura utilizada para as extrações foram de 125 °C. Após o período de extração, o solvente foi removido em evaporador rotativo à vácuo (Marconi, MA 120) e armazenado em dessecador. O rendimento em massa ( $R_M$ ) foi calculado de acordo com a Equação 1, onde  $q_o$  é a massa de extrato obtida (g) e  $q_s$  é a massa de folha (g) utilizada no experimento.

$$R_M = \left( \frac{q_o}{q_s} \right) \times 100 \quad (1)$$

## 2.2. Caracterização do extrato

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) foi determinado de acordo com Singleton e colaboradores (1999) com alterações. 4 mg de amostra foi pesada em tubo de ensaio, dissolvido em 8 mL de água e agitado. Uma alíquota de 2 mL de uma solução de Folin-Ciocalteu a 10% (v/v) e 2,5 mL de

carbonato de sódio a 7,5 % (m/v) foram adicionadas em tubos de ensaio contendo 0,5 mL do extrato. A mistura foi agitada e incubada em um banho de aquecimento (Quimis®, Q334M) a 50 °C durante 5 min. Após a reação, a absorbância da mistura foi medida a 760 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu, UV 1900, Tokyo, Japan). A curva de calibração foi realizada utilizando ácido gálico em diferentes concentrações (17 a 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e os resultados foram expressos como mg de equivalente de ácido gálico (GAE) por g de extrato seco.

A atividade antioxidante (AA) pelo ensaio do radical livre DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Wiliams e colaboradores (1955). Inicialmente, 50 mg de amostra foi pesada em tubo de ensaio, dissolvido em 2,5 mL de etanol e agitado. Posteriormente, uma alíquota de 0,1 mL dessa solução foi pipetada em tubo de ensaio e acrescida de 3,9 mL de solução etanólica de DPPH ( $6,7 \times 10^{-5}$  mM). A mistura foi agitada até total homogeneização e acondicionada em local isento de luz por 30 min à temperatura ambiente. Depois disso, a absorbância da mistura foi medida em comprimento de onda de 517 nm em espectrofotômetro UV-VIS (Shimadzu, UV 1900, Tokyo, Japan) em triplicata contra um branco de etanol. Uma curva padrão Trolox com concentrações variando de 0,05 a 0,95 mM foi usada para determinar a capacidade antioxidante do extrato de stevia, e os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) por g de extrato seco ( $\text{mmol g}^{-1}$ ).

### 2.3. Análise estatística

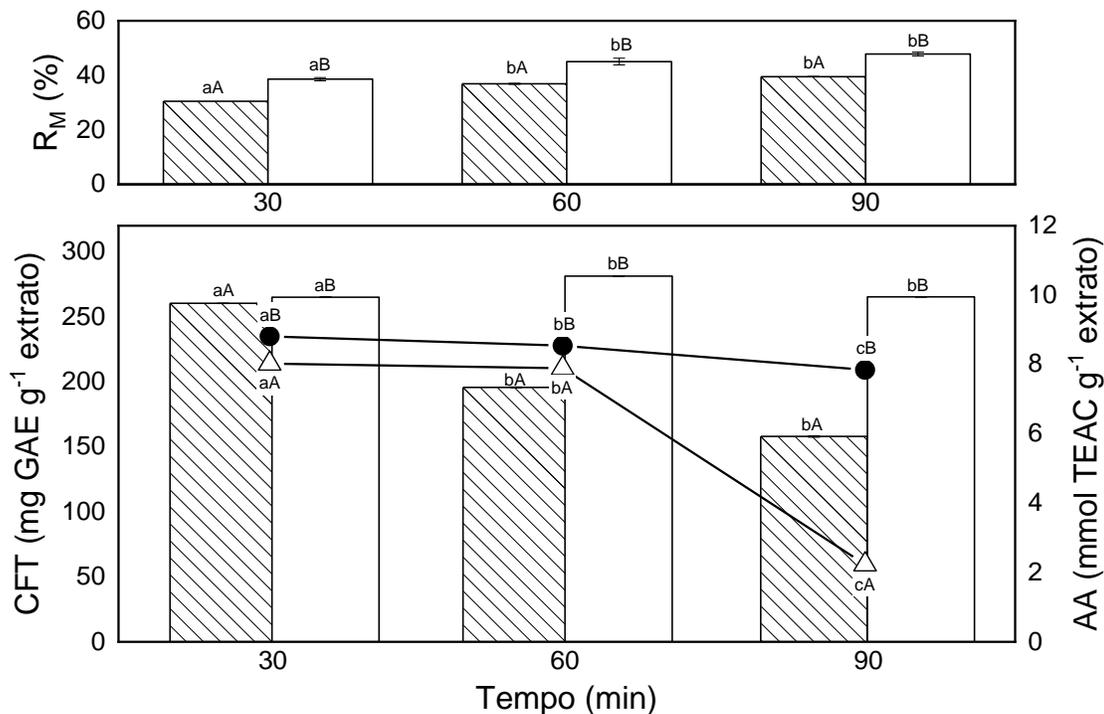
As análises foram conduzidas em triplicata sendo os resultados expressos pela média seguido do desvio padrão. A comparação entre as médias foi realizada utilizando o teste de Tukey com nível de significância de 95% sendo os dados da ANOVA gerados pelo software Statistica® 8.0.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Influência do percentual de etanol no solvente extrator

A Figura 2 apresenta o resultado do  $R_M$ , CFT e AA dos compostos de folhas de Stevia pré-tratadas obtidos perante os diferentes percentuais de etanol no solvente extrator investigados (40 e 70%, v/v).

Figura 2 - Efeito do percentual de etanol no solvente extrator (▨ e -△- 40%; □ e -●- 70%) no  $R_M$ , CFT e AA obtidos à 125 °C, com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, tempo estático de 30 min e 100 bar. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (efeito do tempo para cada solvente) e maiúsculas (efeito do solvente em cada tempo) não diferiram estatisticamente ( $p>0,05$ ).



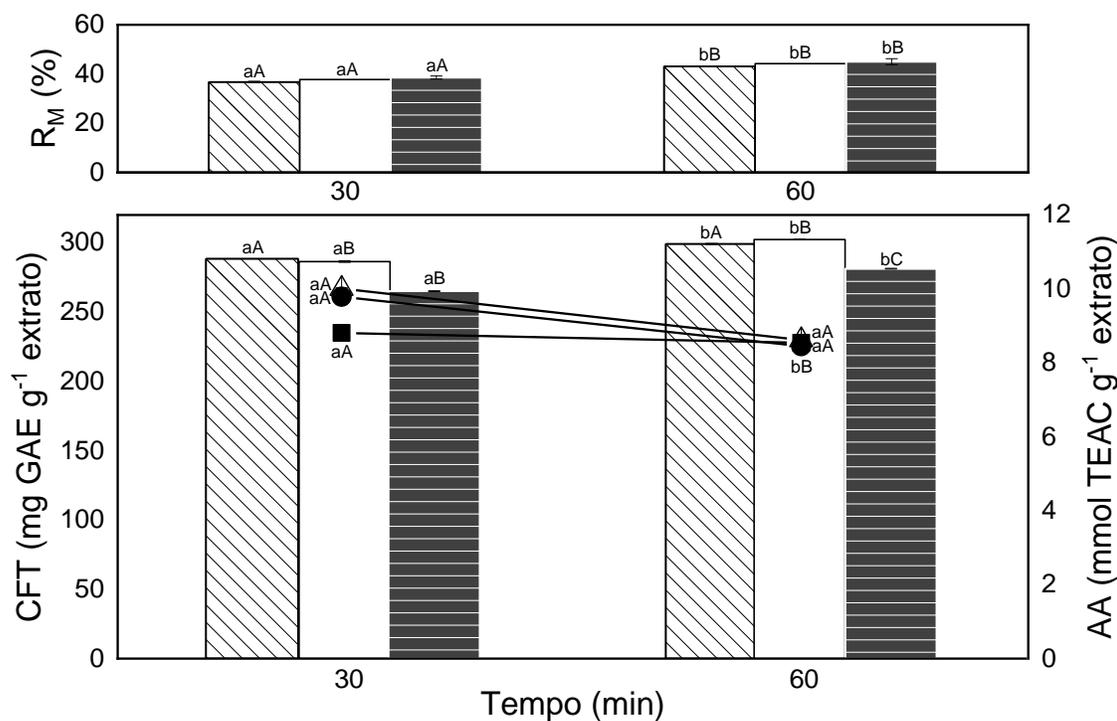
Fonte: o autor

Como pode ser observado, 70% de etanol no solvente extrator propiciou os maiores valores à todas as investigações realizadas. O  $R_M$  do processo conduzido com 70% de etanol no solvente extrator foi, em média, ~8% superior ao de etanol 40% durante os 3 tempos de extração investigados, demonstrando maior eficiência no uso desse solvente para estes fins. Capacidade crescente de extrair CFT das folhas de Stevia pré-tratadas foi verificada com o percentual de etanol no solvente extrator de 70% (v/v) até 60 min de processo, com um pequeno declínio, sem diferença significativa, quando a extração se estendeu à 90 min. Misturas binárias entre água e etanol exploram a capacidade da água de quebrar a ligação de hidrogênio entre a matriz e os analitos, enquanto o etanol aumenta a solubilidade das espécies extraídas (MUSTAFA; TURNER, 2011), propiciando aumento nos rendimentos do processo. Para o solvente composto por 40% de etanol (v/v), por sua vez, o teor de CFT reduziu, e em ambos os solventes, a AA apresentou redução significativa no decorrer da extração. Embora as condições operacionais da ELP promovam melhor solubilidade do analito, difusão mais rápida e menor viscosidade do solvente (KOVAČEVIĆ E COLABORADORES, 2018), promovendo a extração dos compostos, às temperaturas mais altas que as técnicas convencionais envolvidas ao processo, podem levar à degradação térmica dos compostos, especialmente dos compostos termolábeis, como é o caso dos antioxidantes (AMEER E COLABORADORES, 2017).

### 3.2. Influência do tempo estático

A Figura 3 apresenta o  $R_M$ , CFT e AA do extrato de folhas de Stevia pré-tratadas, obtido perante os diferentes tempos estáticos investigados (10, 20 e 30 min). De acordo com o apresentado, o  $R_M$  não apresentou diferença significativa em seus resultados nos diferentes tempos estáticos e, portanto, 10 min foi considerado suficiente para obtenção de rendimento de ~45%, após 60 min de extração. Para os CFT, os 30 min iniciais resultaram em ~289 mg GAE  $g^{-1}$  extrato em tempo estático de 10 min, valor superior aos valores reportados para o tempo estático de 30 min, para o tempo de 30 e 60 min de extração. O tempo de 60 min de processo após tempo estático de 20 min, resultou em um extrato com ~302 mg GAE  $g^{-1}$ , apenas 1% superior ao de 10 min, o que torna o tempo estático de 10 min o mais adequado nesta investigação, tendo em vista a economia de energia, insumos e tempo envolvidas ao processo.

Figura 3 - Efeito do tempo estático (▨ e -△- 10 min; □ e -●- 20 min; ■ e -■- 30 min) no  $R_M$ , CFT e AA obtidos à 125 °C, com vazão de 1 mL  $min^{-1}$ , percentual de etanol no solvente extrator de 70% e 100 bar. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (efeito do tempo para cada tempo estático) e maiúsculas (efeito do tempo estático em cada tempo) não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ).



Fonte: o autor

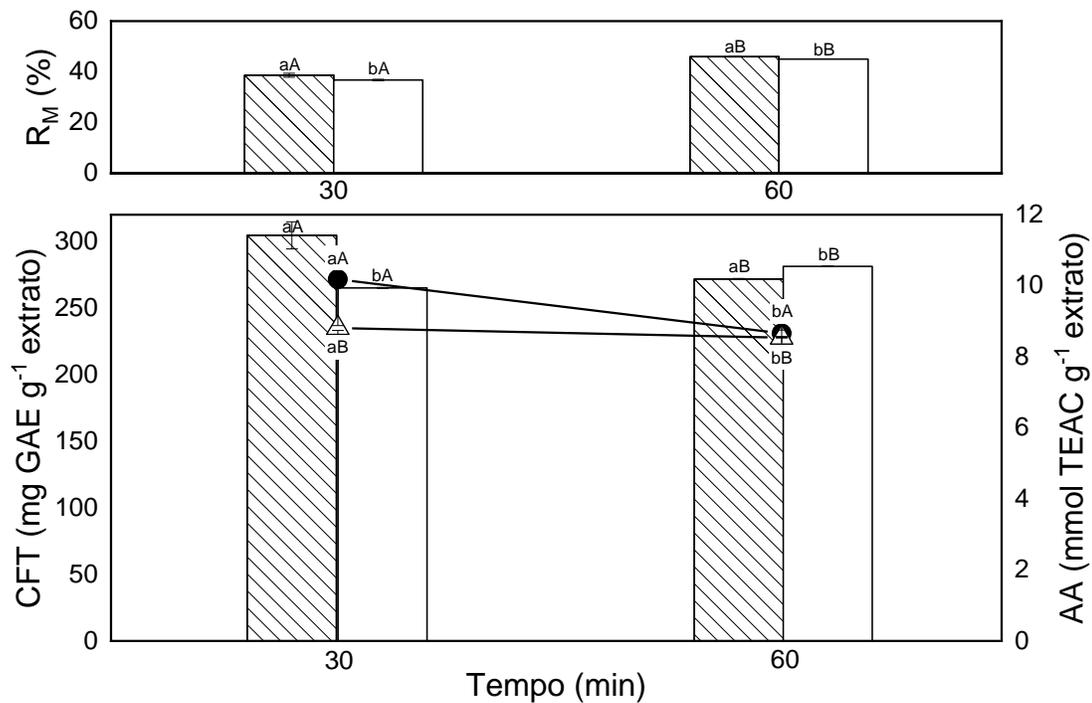
De modo geral, o tempo estático tem um efeito positivo na recuperação dos compostos de interesse, onde um maior tempo de contato entre solvente e matriz promove um maior rendimento à extração (SETYANINGSIH E COLABORADORES, 2016). Esse efeito também foi verificado por Sandra e

colaboradores (2020), que constatou que o aumento do tempo estático de 5 à 10 min promoveu acréscimo no CFT de folhas de Stevia de 17,04 mg à 18,83 mg por g, em processo conduzido à 130 °C. Em nosso trabalho, entretanto, efeito oposto foi verificado, o que pode estar relacionado ao fato de que os ácidos fenólicos que compõem esses compostos, apresentam estrutura química que difere entre si, tendo portanto, adequação variável nas diferentes condições de extração, apresentando susceptibilidade à degradação (ZORIC E COLABORADORES, 2014; PLAZA; TURNER, 2015; GIL; WIANOWSKA, 2017).

### 3.3. Influência da pressão

A Figura 4 apresenta o  $R_M$ , CFT e AA do extrato de Stevia pré-tratadas obtido perante as diferentes pressões (50 e 100 bar) investigadas. Por meio destes resultados, é possível verificar que a pressão de 50 bar promoveu os maiores teores de CFT e AA logo nos primeiros 30 min de processo. Nesta mesma pressão, incremento no tempo do processo à 60 min resultou no aumento de ~19% do  $R_M$ , entretanto, redução de 12 e 17,5% foram verificadas no teor de CFT e AA, respectivamente. Ao aumentar a pressão no processo à 100 bar, incremento de ~17,5% no  $R_M$  foi verificado de 30 à 60 min de processo. Diferentemente do CFT e AA à 50 bar que decresceram, acréscimo de 6,1% no CFT foi verificado à 100 bar, enquanto que a AA não apresentou diferença significativa nos tempos de 30 e 60 min investigados ( $8,81 \pm 0,07$  e  $8,54 \pm 0,01$  mmol TEAC g<sup>-1</sup> extrato, respectivamente).

Figura 4 - Efeito da pressão (  e  - 50 bar;  e  - 100 bar) no  $R_M$ , CFT e AA obtidos à 125 °C, com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, percentual de etanol no solvente extrator de 70% e tempo estático de 10 min. Médias seguidas das mesmas letras minúsculas (efeito do tempo para cada pressão) e maiúsculas (efeito da pressão em cada tempo) não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ).



Fonte: o autor

Mustafa e Turner (2011) mencionam que a alta pressão permite que o solvente permaneça no estado líquido e acima do ponto de ebulição, acelerando o processo de extração. Entretanto, pode-se verificar que elevada pressão não se faz necessária na obtenção de um extrato rico em CFT e AA, apresentando uma nova tendência no que foi relatado até aqui e permitindo discussões acerca do tema. No geral, a intensificação dos parâmetros da ELP não produziu extratos com níveis de CFT mais elevados, e no caso da AA, apresentou redução em todas as investigações realizadas. Isso pode estar relacionado ao fato da matriz em questão ser pré-tratada, o que facilita o acesso do solvente e remoção dos analitos da célula vegetal, não requerendo degradação da parede celular em virtude das intensas condições, como comumente é relatado (KOVAČEVIĆ E COLABORADORES, 2018). Dada as circunstâncias, pressão de 50 bar possibilitou um extrato rico em compostos ativos (CFT e AA), já nos 30 min iniciais de extração.

#### 4. CONCLUSÃO

A técnica de extração com líquido pressurizado foi proposta e utilizada na obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos e atividade antioxidante por meio de uma mistura binária de etanol e água como solvente extrator. A investigação das condições experimentais demonstrou que 70% de etanol no solvente extrator, tempo estático de 10 min e pressão de 50 bar foram as condições mais adequadas na obtenção do extrato com maiores  $R_M$  (47,8%), CFT (~300 mg GAE g<sup>-1</sup> extrato) e AA (8,6 mmol TEAC g<sup>-1</sup> extrato). Para tanto, podemos considerar que a ELP representa uma ferramenta poderosa para a obtenção de extratos de Stevia propícios para consumo humano e/ou aditivo alimentar, sendo estes, potencial fonte de

compostos fenólicos, antioxidantes e adoçantes não calóricos. Além disso, esses achados demonstram a relevância tecnológica na investigação proposta, onde a aplicação de um método de extração considerado moderno, além de resultar na obtenção de respostas apreciáveis em menores tempos, demanda de menor consumo de energia e solvente que os relatados pelas técnicas convencionais e comumente empregadas, promovem inovação ao processo de obtenção de compostos naturais com forte potencial terapêutico e adoçante.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## 5. REFERÊNCIAS

AMEER, K., BAE, S. -W., JO, Y., LEE, H. -G., AMEER, A., KWON, J. -H. Optimization of microwave-assisted extraction of total extract, stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves, using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN) modelling. **Food Chemistry**. v229, 198-207. 2017.

BRAND-WILIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**. v28, 25-30. 1955.

FORMIGONI, M., MILANI, P. G., AVINCOLA, A. S., SANTOS, V. J., BENOSSI, L., DACOME, A. S., PILAU, E. J., COSTA, S. C. Pretreatment with ethanol as an alternative to improve steviol glycosides extraction and purification from a new variety of stevia. **Food Chemistry**. v241, 452-459. 2018.

GIL, M., WIANOWSKA, D. Chlorogenic acids-Their properties, occurrence and analysis. **Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Sectio AA – Chemia**. v72, 44. 2017.

HENG, M. Y., TAN, S. N., YONG, J. W. H., ONG, E. S. Emerging green technologies for the chemical standardization of botanical and herbal preparations. **Trends in Analytical Chemistry**. v50, 1-10. 2013.

HERRERO, M., HERRERO, M., CASTRO-PUYANA, M., MENDIOLA, J. A., IBAÑEZ, E. Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **Trends in Food Science and Technology**. v43, 67-83. 2013.

HU, C. **Extratos botânicos: evidências científicas a favor da nutrição**. 1. ed. São Paulo: International Life Sciences Institute do Brasil. 2020. 20 p.

IWASSA, I. J., RIBEIRO, M. A. S., MEURER, E. C., CARDOZO-FILHO, L., BOLANHO, B. C., SILVA, C. Effect of subcritical water processing on the extraction of compounds, composition, and functional properties of asparagus by-product. **Journal of Food Process Engineering**. v42, e13060. 2019.

KIM, I.-S., YANG, M., LEE, O.-H., KANG, S.-N. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. **Food Science and Technology**. v44, 1328-1332. 2011.

KOUBAA, M., ROSELLÓ-SOTO, E., Žlabur, J. S., JAMBRAK, A. R., Brnčić, M., GRIMI, N., BOUSSETTA, N. BARBA, F. J. Current and new insights in the sustainable green recovery of nutritional and valuable compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v63, 6835-6846. 2015.

KOVAČEVIĆ, D. B., BARBA, F. J., GRANATO, D., GALANAKIS, C. M., HERCEG, Z., DRAGOVIĆ-UZELAC, V., PUTNIK, P. Pressurized hot water extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Food Chemistry**. v254, 150-157. 2018.

PLAZA, M., TURNER, C. Pressurized hot water extraction of bioactives. **Trends in Analytical Chemistry**. v71, 39-54. 2015.

SANDRA, P., ZORIĆ, Z., KOVAČEVIĆ, D. B., GAROFULIĆ, I. E., DRAGOVIĆ-UZELAC, V. Pressurized hot water extraction of phenolic compounds from leaves of *Stevia rebaudiana*: An UPLC-ESI-MS/MS study. **Journal of Food Process Engineering**. v43, e13319. 2020.

SETYANINGSIH, W., SAPUTRO, I. E., PALMA, M., BARROSO, C. G. Pressurized liquid extraction of phenolic compounds from rice (*Oryza sativa*) grains. **Food Chemistry**. v192, 452-459. 2016.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**. v299, 152-178. 1999.

MUSTAFA, A., TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: a review. **Analytica Chimica Acta**. v703, 8-18. 2011.

VAUZOUR, D., RODRIGUEZ-MATEOS, A., CORONA, G., ORUNA-CONCHA, M. J., SPENCER, J. P. E. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. **Nutrients**. v2, 1106-1131. 2010.

WÖLWER-RIECK, U. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v60, 886-895. 2021.

ZORIC, Z., VERICA, D.-U., SANDRA, P. Kinetics of the degradation of Anthocyanins, phenolic acids and flavonols during heat treatments of freeze-dried sour cherry marasca paste. **Food Technology and Biotechnology**. v52, 101-108. 2014.