

OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE ESTÉVIA A PARTIR DA VARIEDADE STEVIA UEM-13

Maria Rosa Trentin Zorzenon (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Paula Gimenez Milani, Antonio Sergio Dacome, Silvio Claudio da Costa (Orientador),
e-mail: sccosta@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas

Área e subárea: 5.07.01.00-2 Ciência de Alimentos. 5.07.01.02-9 Química, Física, Físico-Química e Bioquímica dos Alim. e das Mat.-Primas Alimentares

Palavras-chave: *Stevia*, glicosídeos, pré-tratamento etanólico

Resumo

O objetivo deste projeto foi a obtenção de extratos a partir de folhas *Stevia* pré-tratadas com etanol com diferentes níveis de pureza. Nas folhas de *Stevia* UEM-13, nova variedade, foram quantificados os teores de glicosídeos, compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante. Após essas análises, os glicosídeos foram separados e purificados por meio de processos de separação por membrana (ultrafiltração e nanofiltração) e métodos cromatográficos (tratamento em resina de iônica e resina de adsorção). As folhas foram pré-tratadas com etanol por meio do processo de maceração até exaustão e o extrato obtido foi analisado quanto ao teor de glicosídeos, fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. Após o pré-tratamento essas folhas foram submetidas ao mesmo processo de extração de glicosídeos descrito anteriormente. O produto final apresentou maior e o dobro de rendimento de extração em relação à folha não-tratada. Por meio desse experimento pôde-se concluir que o pré-tratamento etanólico aumentou a extração de glicosídeos de esteviol, o que é de suma importância para o processamento industrial dos adoçantes de estévia e ainda permite a obtenção de um extrato etanólico rico em compostos antioxidantes, que podem ser reutilizados no desenvolvimento de outros produtos.

Introdução

Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni, planta da família *Astareaceae*, é naturalmente doce, em função da presença de glicosídeos de esteviol presentes em suas folhas e, ainda é rica em outros nutrientes. Os glicosídeos diterpênicos com alto poder adoçante são principalmente esteviosídeo, rebaudiosídeos A-F, esteviolbiosídeo e dulcosídeo, apresentando valor comercial em todo o mundo como substituto do açúcar em alimentos, bebidas e medicamentos. Além dos glicosídeos de esteviol, estudos demonstraram que as folhas de *Stevia* e principalmente seus

extratos alcóolicos podem apresentar compostos fenólicos e flavonoides que conferem alta atividade antioxidante. Esses compostos, no entanto, podem conferir sabor amargo aos extratos de estévia e prejudicar o valor sensorial dos produtos (WÖLWER-RIECK, 2012). Estudos estão sendo realizados com o objetivo de obter esses compostos. Com isso, o objetivo do projeto foi a caracterização de uma nova variedade de estévia (Stevia UEM-13) com alto teor de rebaudiosídeo A, que pode ser reproduzida por sementes, o que melhora cultivo, reprodutibilidade e comercialização e ainda a obtenção de extratos a partir de folhas pré-tratadas com etanol com diferentes níveis de pureza de glicosídeos de esteviol.

Materiais e métodos

Caracterização de folhas de Stevia UEM-13

Os arbustos de Stevia UEM-13 cultivados no NEPRON (UEM) foram coletados após 60 dias de cultivo e utilizados para as posteriores análises. Esses arbustos foram secos em estufa a 60 °C, e posteriormente foram separadas as folhas dos caules e ramos. Foi realizada uma extração aquosa para determinar a concentração de glicosídeos (Dacome *et al.*, 2005), de compostos fenólicos (SINGLETON *et al.*, 1999), flavonoides (JIA *et al.*, 1999) e atividade antioxidante pelo método de DPPH (BLIOS, 1958), antes da realização do tratamento com etanol (folhas não tratadas), e com as folhas após esse tratamento (folhas pre-tratadas). Esse procedimento é comumente usado para a determinação do teor desses compostos antes e depois de qualquer procedimento de extração ou de obtenção de compostos purificados (Dacome *et al.*, 2005; Wölwer-Rieck, 2012).

Para a preparação do extrato aquoso, 2,0 g de folhas moídas e 100 mL de água foram transferidas para um bequer de 250 mL e mantido ao fogo por 5 minutos após a fervura. O extrato foi então filtrado em um filtro de papel. Esse procedimento foi feito em triplicata, sendo que na última etapa foram adicionados 50 ml e água. Uma amostra de extrato aquoso foi seca em rotaevaporador e o teor de glicosídeos foi analisado segundo Dacome, 2005.

Pré-tratamento etanólico de folhas Stevia UEM-13.

O pré-tratamento foi realizado utilizando 100 g de folhas de Stevia UEM-13 previamente moídas, depositadas em um becker de vidro; foram adicionados 400 mL de etanol absoluto (99,5%) P.A. O sistema permaneceu em repouso por 24 horas ao abrigo de luz para a obtenção da primeira fração. O mesmo processo foi repetido até a exaustão (foi obtido 7 frações). Os extratos foram reunidos e secos em rotaevaporador (marca *Buchi*), na temperatura de 50°C e à vácuo. O pó obtido foi utilizado para a avaliação dos glicosídeos, compostos fenólicos totais, flavonoides totais e a atividade antioxidante, seguindo as metodologias descritas anteriormente.

Obtenção de extratos com diferentes níveis de pureza de glicosídeos

As folhas de Stevia UEM-13 foram adicionadas de água (1:27) p/v a 60°C e 200 rpm em três ciclos. Em seguida, o extrato bruto foi filtrado à vácuo. Em seguida o extrato bruto foi ultrafiltrado em membrana de 10kDa e nanofiltrado em membrana de 500Da. O extrato obtido foi então passado em uma coluna de permuta iônica e de adsorção usando como eluente etanol: água (85:15) v/v. Finalmente, o material foi seco em um evaporador rotativo e os edulcorantes em pó foram obtidos. No final de cada etapa do processo, uma alíquota foi coletada para investigar a perda de compostos.

Resultados e Discussão

A **tabela 1** apresenta os resultados das análises da composição proximal do extrato aquoso das folhas de Stevia UEM-13 não tratadas e pré-tratadas com etanol.

Tabela 1. Composição proximal de folhas de Stevia UEM-13 não tratadas, pré-tratadas e do extrato etanólico

Análise	Folhas Não tratadas com etanol (extrato aquoso)	Folhas Pré-tratadas com etanol (extrato aquoso)	Extrato etanólico
Esteviosídeo (%)	4,9	3,9*	8,9
Reb C (%)	2,8	3,0	3,9
Reb A (%)	7,3	8,0*	9,9
Glicosídeos (%)	15,0	14,9	22,7
Fenólicos (mgEAg*/g)	3,32	5,54	5,41
Flavonóides (mgEQ*/g)	2,64	1,68	4,84
%AA* (%/mgET)	63,79	94,55	94,73

EAg=equivalentes de ácido gálico; EQ= equivalentes de quercetina; ET: equivalentes de Trolox; %AA= % atividade de inibição de radicais livres; Estev. = esteviosídeo; reb = rebaudiosídeo. *difere de folhas não tratadas (p>0,05).

Wölwer-Rieck, 2012 relataram valores encontrados em *Stevia rebaudiana* de esteviosídeo de 4-13 % e rebaudiosídeo A de 2-4%. Como mostrado na **tabela 1**, os valores encontrados nesse estudo foram de 4,9% de esteviosídeo e 7,3% de rebaudiosídeo A, comprovando que a Stevia UEM-13 é uma variedade de elite, devido ao seu teor de rebaudiosídeo A ser superior ao de esteviosídeo e que pode ser reproduzida por semente, facilitando seu cultivo, reprodução e comercialização.

O teor de glicosídeos totais das folhas antes e após o tratamento não diferiu significativamente, mostrando que o tratamento etanólico não retira os glicosídeos e sim outros compostos, como fenólicos, que conferem possível residual amargo aos extratos de estévia e ainda dificultam os processos de

extração. O processo de pré-tratamento etanólico mostrou quantidades superiores de compostos fenólicos de alta capacidade antioxidante. O tratamento com solvente alcóolico pode ainda contribuir para um maior rendimento de extração do edulcorante de melhor perfil sensorial, rebaudiosídeo A, em detrimento do esteviosídeo, como mostrado na tabela 1.

A extração com água a 60°C em três ciclos resultou em 9,5 g /100 g de glicosídeos de esteviol. Com a filtração a vácuo obteve-se 8,7 g/100 g de glicosídeos. A ultrafiltração (10 kDa), a nanofiltração (500 Da), extraiu 4,3 g de glicosídeos. Após passar pela coluna de permuta iônica e adsorção obteve-se um produto final com 4,02 g de adoçantes com 87% de pureza.

Utilizando a mesma metodologia e a partir 100 g de folhas, foi obtido no final do processo 2,20 g com 84,8% de pureza, um valor de rendimento do produto final consideravelmente menor quando comparado ao mesmo processo com folhas tratadas.

Conclusões

O pré-tratamento etanólico resultou em retirada de compostos que dificultam o processo de obtenção de adoçantes e diminuem o rendimento e a pureza do produto final. Entre esses compostos estão os fenólicos e flavonoides, que são componentes importantes na alimentação pela sua característica de alto poder antioxidante e que podem ser usados como aditivos alimentares.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro e ao NEPRON-UEM pela oportunidade e confiança.

Referências

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

DACOME, A.S., SILVA C.C., COSTA C.E.M, FONTANA, J.D., ADELMANN, J., COSTA, S.C. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatography, and electrophoretic methods. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 3587 – 3594, 2005.

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

SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means folin-ciocalteu reagentes. **Methods Enzymol** v.299, 152–178, 1999.

WÖLWER-RIECK, U. The Leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review. **Journal of agricultural and food chemistry**, 60, 886–895, 2012.