

OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES COM ALTO PODER ANTIOXIDANTE A PARTIR DE UMA NOVA VARIEDADE DE ESTÉVIA

Maria Eduarda Perina Padilha (PIBIC/CNPq), Sílvio Cláudio da Costa (Orientador), e-mail: sccosta@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas / Maringá, PR

Ciência de Alimentos / Química, Física, Físico-Química e Bioquímica dos Alim. e das Mat.-Primas Alimentares

Palavras-chave: *Stevia rebaudiana*, fenólicos, potencial antioxidante.

Resumo:

Este estudo teve por objetivo a obtenção de extratos alcoólicos de folhas da Stevia UEM-13, uma nova variedade de *Stevia rebaudiana*, e ainda o fracionamento do extrato metanólico e determinação de glicosídeos totais, teor de compostos fenólicos totais, teor de flavonóides e atividade antioxidante do extrato e frações obtidas. Folhas da variedade Stevia UEM 13 contêm o rebaudiosídeo A (Reb A) como glicosídeo principal, enquanto que a maioria das variedades de estévia não melhoradas apresentam o esteviosídeo como glicosídeo majoritário. O Reb A apresenta perfil sensorial bastante superior ao do esteviosídeo, com reduzido gosto residual amargo. Para a extração foram empregados alcoóis etanol e metanol, tendo sido a extração com metanol mais eficiente. O extrato metanólico foi fracionado sequencialmente com hexano, clorofórmio, acetato de etila e isobutanol e a maior atividade antioxidante foi encontrada na fração acetato de etila. Além de ser uma excelente fonte de obtenção de extratos ricos em adoçantes (glicosídeos do esteviol), esta nova variedade também pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de extratos ou frações com teor de flavonóides e atividade antioxidante expressivas, com potencial de serem utilizados como aditivos alimentares ou fortificadores da atividade antioxidante em produtos para fins diversos.

Introdução

As plantas representam uma fonte importante de bioativos utilizados na nutrição e medicina, os quais se diferem estruturalmente e em suas propriedades biológicas. A *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, planta da família Asteraceae, é nativa da América do Sul e tem sido cultivada em muitos países do mundo. Ela tem importância na indústria de alimentos por apresentar, principalmente em suas folhas, glicosídeos diterpênicos com alto poder edulcorante, dentre os quais se destacam o esteviosídeo (Est) e o rebaudiosídeo A (Reb A). Estes glicosídeos podem apresentar capacidade edulcorante até 450 vezes maior que a sacarose (DACOME *et al.*, 2005), o que permite a sua utilização como adoçante não nutritivo em alimentos,

bebidas e medicamentos. Além dos glicosídeos, a estévia também possui alto teor de compostos fenólicos, dentre os quais destacam-se os flavonoides, com propriedades antidiabéticas e antioxidantes (MILANI *et al.*, 2017). A composição dos extratos de folhas de estévia, bem como a concentração destes compostos bioativos, depende fundamentalmente da variedade da planta e também do método de extração e fracionamento. O Núcleo de Estudos em Produtos Naturais (NEPRON) da Universidade Estadual de Maringá (UEM) mantém uma coleção de plantas de estévia com diferentes perfis na composição de glicosídeos de esteviol. A variedade seminal Stevia UEM-13 tem como principal característica o alto teor de Reb A, com menor sabor residual amargo em relação ao esteviosídeo. Outro diferencial importante é que esta variedade pode ser multiplicada por semente, o que reduz o custo da implantação de culturas quando comparado com o processo de estaquia. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial da variedade Stevia UEM-13 como fonte de bioativos com capacidade antioxidante.

Materiais e métodos

Arbustos da variedade seminal Stevia UEM-13, cultivados no NEPRON, foram coletados em janeiro de 2017, na fase de máximo crescimento vegetativo, os quais foram secos em estufa a 60°C e, posteriormente, foram separadas folhas dos caules e ramos e estas foram acondicionadas em sacos de polietileno e mantidas no congelador a -18°C, até serem realizadas as extrações. As folhas, previamente moídas, foram submetidas a diferentes métodos de extração para obtenção dos extratos brutos empregando como solventes etanol e metanol. O teor de glicosídeos totais (esteviosídeo, rebaudiosídeo A e rebaudiosídeo C) do extrato metanólico e frações foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), conforme Dacome *et al.* (2005), utilizando cromatógrafo líquido da marca Gilson, modelo 307, acoplado a um detector de UV-VIS 210 nm, com coluna de NH₂ de 5µm, e dimensões de 125 x 4,6 mm. A extração etanólica por maceração (EEFM) foi realizada com 500 g de folhas, as quais foram adicionados a 1,5 L de etanol. O sistema permaneceu em repouso por 24h ao abrigo de luz e o processo foi repetido até que a extração não apresentasse massa expressiva. Os extratos obtidos foram reunidos e secos em rotaevaporador (marca Büchi), à temperatura de 50°C sob vácuo. A extração etanólica por Soxhlet (EEFS) foi realizada com 100 g de folhas, as quais foram adicionadas a 500 mL de etanol. A mistura foi acondicionada utilizando o aparato de Soxhlet até obtenção de um extrato etanólico incolor. O extrato obtido foi filtrado e evaporado em rotaevaporador à temperatura de 50°C e à vácuo. A extração metanólica por Soxhlet (EMFS) foi realizada com 100 g de folhas, as quais foram adicionadas a 500 mL de metanol. A mistura foi acondicionada utilizando o aparato de Soxhlet até obtenção de um extrato metanólico incolor. O extrato obtido foi filtrado e evaporado em rotaevaporador à temperatura de 50°C sob vácuo. O pó resultante foi hidratado com 400 mL de água deionizada e submetido ao fracionamento com diferentes solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etila e isobutanol)

para a obtenção das frações orgânicas correspondentes, as quais foram utilizadas para a análise de compostos fenólicos totais, teor de flavonóides e atividade antioxidante. Os compostos fenólicos totais foram determinados segundo Singleton *et al.* (1999) pelo método Folin-Ciocalteu e os dados foram expressos em equivalentes de ácido gálico. O teor de flavonóides totais foi obtido conforme Jia *et al.* (1999) e os resultados expressos em equivalentes de quercetina. A atividade antioxidante foi avaliada de acordo com a eliminação de radicais DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) seguindo a metodologia de Blios (1958) e o padrão utilizado foi ácido gálico.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 1 e 2. As extrações etanólicas EEFM e EEFS obtiveram, respectivamente, massa total seca de 30,66 g e 29,5 g, sendo menos eficientes que a extração metanólica EMFS que obteve massa de 54,0 g. Portanto, a partir do extrato metanólico foi realizado o fracionamento com solventes distintos e a posterior análise de fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante e glicosídeos totais.

Tabela 1 – Resultados obtidos da EMFS e do fracionamento.

| Amostra | Massa total (g) | Fenólicos totais (g/100 g) | Flavonoides (g/100 g) | Atividade antioxidante* |
|---------|-----------------|----------------------------|-----------------------|-------------------------|
| EMFS | 54,0 | 0,63 | 3,33 | 138,0 |
| FH | 11,41 | 0,61 | 4,69 | 79,1 |
| FC | 1,0 | 0,44 | 1,51 | 173,0 |
| FAE | 4,07 | 3,30 | 12,24 | 271,5 |
| FI | 17,41 | 0,46 | 1,38 | 146,5 |
| FA | 8,6 | 0,34 | 1,28 | 0 |

Extrato metanólico das folhas por Soxhlet (EMFS); Fração hexânica (FH); Fração clorofórmica (FC); Fração de acetato de etila (FAE); Fração isobutanólica (FI) e Fração aquosa (FA); * Dados expressos em μg de equivalente de ácido gálico / mg da amostra.

A fração de estévia obtida por fracionamento com acetato de etila (FAE) apresentou os valores mais expressivos de compostos fenólicos, flavonoides e de atividade antioxidante.

Tabela 2 – Concentração de glicosídeos totais resultante da EMFS.

| Amostra | Esteviosídeo (g/100 g) | Rebaudiosídeo A (g/100 g) | Rebaudiosídeo C (g/100 g) | Total (g/100 g) |
|---------|------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------|
| EMFS | 13,7 | 16,5 | 8,7 | 38,9 |
| FH | Nd | Nd | Nd | Nd |
| FC | 3,5 | 3,6 | 1,8 | 8,9 |
| FAE | 0,9 | 0,4 | 0,1 | 1,4 |
| FI | 23,1 | 27,2 | 15,9 | 66,2 |
| FA | 2,7 | 6,6 | 1,3 | 10,6 |

Extrato metanólico das folhas por Soxhlet (EMFS); Fração hexânica (FH); Fração clorofórmica (FC); Fração de acetato de etila (FAE); Fração isobutanólica (FI) e Fração aquosa (FA); Nd = não detectado.

No extrato metanólico, foi obtido um total de 38,9 g de glicosídeos/100 g de folhas de estévia secas com uma razão Reb A/Est de 1,20, valor muito superior aos verificados por outros autores em variedades não selecionadas ou melhoradas geneticamente, o que confirma que a variedade Stevia UEM 13 é uma planta de elite. A fração isobutanólica demonstrou que este solvente, dentre os testados, é o mais adequado para recuperação dos glicosídeos do esteviol a partir do extrato metanólico, tendo sido extraído 66,2% de glicosídeos.

Conclusões

Folhas da nova variedade seminal Stevia UEM-13 obtida pelo NEPRON apresentou alto teor de rebaudiosídeo A, indicando ser uma variedade de elite. A extração metanólica por Soxhlet foi a mais eficiente e a fração acetato de etila a que apresentou maior teor de flavonóides e atividade antioxidante, com potencial de ser empregada como aditivo alimentar ou fortificador da atividade antioxidante em produtos para fins diversos.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, a toda a equipe do NEPRON e ao CNPq.

Referências

BLIOS, M. S. **Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical**. Nature, 181: 1199-1200, 1958.

DACOME, A. S. *et al.* **Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and eletrophoretic methods**. Process Biochemistry, 40: 3587–94, 2005.

JIA, Z; TANG, M.; WU, J. **The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals**. Food Chemistry, 64: 555–559, 1999.

MILANI, P. *et al.* **Fortification of the whey protein isolate antioxidant and antidiabetic activity with fraction rich in phenolic compounds obtained from *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni leaves**. J Food Sci Technol, 2017.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant means folin-ciocalteu reagents**. Methods in Enzymology, 299: 152–78, 1999.