

OBTENÇÃO DE FRAÇÃO ANTIOXIDANTE DE STEVIA REBAUDIANA A PARTIR DO EXTRATO ETANÓLICO AMARGO E AVALIAÇÃO ANTIDIABÉTICA

Betânea Campagnolli Pereira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Cynthia L. S. Cabeça, Natani C. Nogueira, Paulo L. M. Siciliano, Milena Kazue, Paula Gimenez Milani Fernandes (Orientador). E-mail: pgmfernandes2@uem.br.

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

Ciências Biológicas / Bioquímica

Palavras-chave: *Stevia rebaudiana*, subproduto de estévia, microencapsulação.

RESUMO

Uma fração de estévia obtida em acetato de etila após o fracionamento do extrato amargo de *Stevia* UEM-13, um subproduto do pré-tratamento etanólico de folhas desta variedade de *Stevia rebaudiana*, foi caracterizada, microencapsulada e avaliada quanto ao potencial antioxidante e antidiabético. A fração livre apresentou atividade antioxidante e antidiabética e uma quantidade de compostos fenólicos e flavonóides importantes. A fração foi microencapsulada, analisada e comparada com os resultados obtidos a partir da fração livre e com outras frações de *Stevia*. A fração microencapsulada também apresentou atividade antioxidante e antidiabética e aumentou significativamente a solubilidade da fração livre.

INTRODUÇÃO

Estudos realizados no NEPRON (Formigoni et al., 2018), da Universidade Estadual de Maringá, mostraram que o pré-tratamento etanólico em folhas de *Stevia rebaudiana* melhora o processo de obtenção e purificação dos adoçantes extraídos desta planta, resultando em um adoçante de melhor perfil sensorial. O subproduto deste processo é o extrato etanólico (EE) e merece ser investigado. Recentemente, Milani et al. 2017b obtiveram uma fração antioxidante de *Stevia* (FAS) por meio do fracionamento do extrato metanólico de folhas de *Stevia rebaudiana*. FAS apresentou alto potencial antidiabético e antioxidante, mas também apresentou algumas dificuldades na obtenção do FAS como o uso de um solvente considerado “não verde” para a extração. A microencapsulação de frações de estévia, pode aumentar a solubilidade e preservar compostos antioxidantes.

Assim este estudo busca a obtenção de FAS a partir do extrato etanólico amargo obtido do pré-tratamento de folhas de *Stevia* UEM-13, realizar sua caracterização, microencapsulação e avaliar estabilidade; e ainda estudar seu potencial como fração antioxidante e antidiabética in vitro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção da Fração Antioxidante de Estévia (FAS)

As folhas da variedade de elite *Stevia* UEM-13, foram colhidas no NEPRON. O pré-tratamento etanólico dessas folhas foi realizado de acordo com Formigoni et al. (2018), gerando como subproduto o extrato amargo de estévia (extrato etanólico). Esse extrato foi fracionado de acordo com Milani et al. (2017), levando a obtenção de uma fração em acetato de etila (FAS) que foi submetida a secagem.

Análises físico-químicas

O extrato etanólico e a fração obtidas foram analisadas quanto ao teor de glicosídeos de esteviol, compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante, de acordo com as metodologias desenvolvidas por Dacome, et al. (2005), Ahmed et al., (2018) e Jia et al., (1999), respectivamente. Os resultados de compostos fenólicos que foram expressos em equivalentes do padrão ácido gálico, os flavonoides em equivalentes do padrão quercetina, e a atividade antioxidante em relação ao sequestro dos radicais ABTS e DPPH, e os padrão utilizado para expressar os resultados foi TROLOX.

Avaliação da atividade antidiabética in vitro

Inibição de α -amilase e Inibição de α -glicosidase

A capacidade de inibição da enzima α -amilase foi avaliada em relação a FAS e MFAS (de 2,0 a 0,05 mg/ml), seguindo a Cabeça et al. (2023), com adaptações. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição.

Microencapsulação da Fração

FAS foi microencapsulada na proporção e foi avaliada em relação à MFAS quanto a Digestão in vitro, estabilidade e solubilidade. Para o teste de digestão a metodologia seguiu Cabeça et al (2023). Para verificar a estabilidade dos produtos, foram utilizados os resultados de flavonoides e de atividade antioxidante para o radical DPPH em um período de 30 dias. A Eficiência de microencapsulação da FAS foi calculada acordo com Cabeça, 2023.

Análise estatística

Todos os testes realizados em triplicata. Os resultados serão expressos como média $\pm$ erro padrão da média e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey com significância estabelecida em $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da tabela 1, é possível observar que o EE possui edulcorantes de estévia, porém devido ao teor de compostos de sabor amargo como fenólicos e ao residual amargo característico dos glicosídeos podemos chamá-lo de extrato amargo de estévia. FAS e MFAS não apresentaram teor de adoçantes e mostraram um teor importante de compostos fenólicos e flavonoides, respectivamente 45g/100g e 15g/100g. Cabeça et al 2023, Milani et al., 2017 encontraram teores de cerca de 50g/100g em frações obtidas em acetato de etila a partir do fracionamento do extrato metanólico de folhas de estévia.

Houve um aumento significativo da capacidade antioxidante das frações, livre e microencapsulada, em relação ao extrato etanólico. Além disso as frações apresentaram um potencial antioxidante em relação ao sequestro de radicais livres, especialmente DPPH. A FAS apresentou 82 % de inibição do radical DPPH e 55,1%.

Caracterização da FAS e MFAS

do radical ABTS. A MFAS mostrou uma inibição de 43,68% e 18,55% do radical DPPH e ABTS+, respectivamente. Comparando com os dados obtidos por Cabeça et al., 2023 da FAS metanólica, observamos que a FAS deste estudo teve uma porcentagem de inibição muito semelhante em relação ao radical DPPH, porém a inibição pelo radical ABTS+ teve uma queda de 32,8%.

Tabela 1. Concentração de Glicosídeos Totais, Compostos Fenólicos, Flavonoides e Capacidade Antioxidante

AMOSTRAS	Total de Glicosídeos (g/100g)	Fenólicos em Eq. De Ácido Gálico (g/100g)	Flavonoides em Eq. De Quercetina (g/100g)
EE	15,3	10,04 ± 0,01	7,71 ± 0,0005
FAS	<0,0001	45,9 ± 0,002	4,02 ± 0,007
MFAS	<0,0001	15,6 ± 0,005	3,25 ± 0,0005
Capacidade antioxidante			
Amostra	Inibição DPPH (%/mg)	Inibição ABTS+ (%/mg)	
EE	8,73 ± 0,003	12,57 ± 0,005	
FAS	82 ± 0,01	55,1 ± 0,001	
MFAS	43,68 ± 0,03	18,55 ± 0,004	

Caracterização da atividade antidiabética

Com a enzima α -glicosidase, apenas a fração livre apresentou inibição (90%) na concentração de 2 mg/ml. Com a enzima α -amilase, a fração FAS mostrou inibição de 15% na concentração de 0,1 mg/ml (substrato em 2mg/mL) e MFAS uma inibição de 7% na concentração de 0,1 mg/ml e com substrato na concentração de 6 mg/mL. A melhor taxa de inibição alcançada pela acarbose, inibidor padrão dessas enzimas foi de 83,05% quando sua concentração foi de 0,1 mg/mL e a de amido foi de 6 mg/mL. Isso demonstra o potencial dessas frações, especialmente a FAS, em serem avaliadas quanto a uma possível adjuvante no tratamento dos distúrbios causados pelo diabetes.

A tabela 2 mostra a comparação do conteúdo de fenólicos e flavonoides e ainda da capacidade antioxidante no período de 30 dias após a obtenção de FAS e MFAS.

Tabela 2. Concentração de Compostos Fenólicos, Flavonoides e inibição do radical DPPH no intervalo de 30 dias.

Fenólicos em eq. De Quercetina (g/100g)		
	Dia 1	Dia 30
EE	10,04 ± 0,01	<0,0001
FAS	45,9 ± 0,08	8,97 ± 0,005
MFAS	15,6 ± 0,007	8,45 ± 0,0006
Flavonoides em eq. De Quercetina (g/100g)		
	Dia 1	Dia 30
EE	7,71 ± 0,0005	<0,0001
FAS	5,50 ± 0,006	3,94 ± 0,004
MFAS	3,25 ± 0,0005	4,2 ± 0,0005
Inibição do DPPH (%)		
	Dia 1	Dia 30
EE	8,74 ± 0,02	<0,0001
FAES	29,18 ± 0,005	11,8 ± 0,004
MFAS	18,31 ± 0,009	12,74 ± 0,0005

Após 30 dias o EE apresentou uma queda em todas as análises realizadas. Já a FAS apresentou uma queda de compostos fenólicos de 80,46%. Com relação a compostos flavonoides a queda obtida foi de 28,4% e a inibição do radical DPPH apresentou uma queda de 30,42%. A MFAS apresentou uma queda de 45,80% e 30,42% de compostos fenólicos e inibição do radical DPPH, porém o compostos flavonoides obteve um aumento de 29,2%. Assim, conseguimos observar que para esta fração, diferentemente da FAS obtida a partir do extrato metanólico por Cabeça et al, a microencapsulação não foi muito expressiva na preservação dos compostos bioativos. Esses resultados também foram corroborados pelos dados obtidos na análise de digestão *in vitro*. A MFAS apresentou uma eficiência na microencapsulação de 93,9% e um aumento da solubilidade de 100% em comparação a FAS, mostrando que a microencapsulação aumenta a solubilidade de compostos insolúveis, aumentando sua aplicabilidade em diferentes (Cabeça et al., 2023) produtos.

CONCLUSÕES

A FAS obtida a partir do EE, um subproduto gerado no pré-tratamento com etanol absoluto de folhas de Stevia apresentou atividade antioxidante e antibiótica *in vitro* o que demonstra que mais estudos devem ser realizados para o reaproveitamento deste resíduo que apresenta potencial de aplicação, especialmente quando consideramos seus compostos bioativos. A microencapsulação da FAS mostrou-se um processo vantajoso apenas em relação à solubilidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPQ pelo financiamento.

REFERÊNCIAS

CABEÇA, C.L.S., NOGUEIRA, N.C., ZORZENON, M.R.T. ET AL. Microencapsulated antioxidant stevia fraction fortifies whey protein and enhances its antidiabetic activity. **J Food Sci Technol** 60, 2275–2285 (2023).

FORMIGONI, M., MILANI, P. G., DACOME, A. S., & COSTA, S. C. (2018). Effect of enzymatic pretreatment on the extraction yield of *Stevia rebaudiana* leaves.

International Food Research Journal, 25(4).

MILANI, P.G.; FORMIGONI, M.; DACOME, A.S.; BENOSSI, L.; COSTA, C.E.M.; COSTA, S.C. New seminal variety of *Stevia rebaudiana*: obtaining fractions with high antioxidant potential of leaves. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v.89, n.3, p.1841–1850, 2017a.