



ESTUDO FITOQUÍMICO DE CLONES DE ELITE DE FOLHAS DE ESTÉVIA

Paula Gimenez Milani¹, Paula Moro², Heloisa Vialle Pereira³, Mariane Fernandes⁴, Antonio Sérgio Dacome⁵,
Silvio Claudio da Costa⁶.

RESUMO: O objetivo deste estudo foi avaliar a composição de compostos fenólicos, flavonoides e a capacidade antioxidante de extratos etanólico obtido por maceração de folhas e caules e ramos folhas *Stevia rebaudiana*. Os compostos fenólicos foram avaliados pelo método de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão. Flavonoides totais foram quantificados em equivalentes de quercetina e rutina e a atividade antioxidante foi avaliada por meio da redução dos radicais livres DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Compostos fenólicos em mg equivalentes de ácido gálico/g do extrato etanólico obtido por maceração das folhas e caules apresentaram-se no valor de 358,8 e 690, respectivamente. A capacidade antioxidante expressa em porcentagem dos respectivos extratos foi de 75% e 96,92%. O conteúdo de flavonoides totais não foi expressivo, sendo maior nas folhas. Este estudo mostrou que os extratos etanólicos das folhas e principalmente dos caules e ramos de *Stevia rebaudiana* podem ser usados como importantes aditivos em alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade Antioxidante; Compostos Fenólicos; Flavonóides; *Stevia rebaudiana*.

1 INTRODUÇÃO

Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni, apresenta, principalmente em suas folhas, glicosídeos diterpênicos com alto poder edulcorante, dentre os quais se destacam o esteveosídeo e o rebaudiosídeo A (rebA) (Dacome et al., 2005). As plantas de estévia apresentam ainda mais de 100 compostos, (Wölwer-Rieck, 2012) e extratos das suas folhas têm sido tradicionalmente utilizados no tratamento de doenças como o diabetes (Tadhani et al., 2007; Shukla et al., 2009), possuem efeitos benéficos na saúde humana, incluindo anti-hipertensão (Chan et al., 2000), anti-hiperglicêmica (Abudula et al., 2008) e na função renal (Shukla et al., 2009). Esses extratos contêm compostos fenólicos, flavonóides, alcalóides, clorofilas hidrossolúveis e xantofilas, entre outros que têm sido estudados como fonte desses efeitos benéficos na saúde humana. Importantes concentrações foram encontradas nos extratos etanólicos, metanólicos e usando acetato de etila como solventes (Wölwer-Rieck, 2012; Shukla et al., 2009). Porém mais estudos devem ser realizados devido ao fato dessas plantas apresentarem variações. Os caules e ramos de *Stevia rebaudiana* apresentam menores concentrações de glicosídeos de esteviol, e, portanto são geralmente descartados da produção de adoçantes, alimentos e bebidas para seres humanos. No entanto esses constituintes representam uma biomassa significativa (35%) da planta (Brandle et al., 1998) e podem apresentar concentrações importantes, possivelmente maiores que nas folhas, de compostos fenólicos e flavonoides, o que confere grande importância ao estudo desses componentes.

No Brasil, o Núcleo de Estudos em Produtos Naturais (NEPRON) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), apresenta uma coleção de plantas de estévia com diferentes perfis na composição de glicosídeos de esteviol. Destacam-se as variedades clonais *Stevia* UEM-320, a M1 Alvarez e uma nova coleção denominada *Stevia* UEM 13, que possuem altos teores de Reb A. Sendo assim o objetivo deste estudo foi avaliar o total de glicosídeos, compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante de extratos etanólicos de folhas e caules *Stevia rebaudiana* produzidas e cultivadas no NEPRON (UEM).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL EXPERIMENTAL

Os arbustos de clones de *Stevia rebaudiana* da variedade seminal UEM 13 cultivada no NEPRON (UEM) foram coletados na fase de máximo crescimento vegetativo. Esses arbustos foram previamente secos em estufa a 60 °C, e posteriormente foram separadas as folhas dos caules e ramos que foram acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas a -18°C até sua utilização para o desenvolvimento dos diferentes extratos. Os reagentes químicos e os padrões de ácido gálico, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), rutina, quercetina e DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

¹ Doutoranda do Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá. Bolsista CAPES. paulinhauem@gmail.com



2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Folhas e caules de estévia (variedade seminal UEM 13) foram submetidos a diferentes métodos de extração e posteriormente foram realizadas as análises de quantificação de glicosídeos, compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante.

2.3 EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS REALIZADO POR MACERAÇÃO (EEFM)

O sistema de extração foi estabelecido utilizando 100 g de folhas de *Stevia rebaudiana* da variedade seminal UEM 13 previamente moídas, depositadas em um becker de vidro com capacidade de 1,0 L; foram adicionados 350 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 obtenção de 7 frações. Os extratos foram reunidos e secos em rotaevaporador (marca Buchi), a 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.

2.4 EXTRATO ETANÓLICO DOS CAULES E RAMOS REALIZADO POR MACERAÇÃO (EECM)

O sistema de extração foi estabelecido utilizando 200 g de caules e ramos de *Stevia rebaudiana* da variedade seminal UEM 13 previamente moídos, depositados em um becker de vidro com capacidade de 1,0 L; foram adicionados 350 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 obtenção de 6 frações. Os extratos de cada fração foram reunidos e secos em rotaevaporador a temperatura de 50°C e à vácuo, e o fluido obtido foi utilizado para a avaliação dos glicosídeos, compostos fenólicos totais, flavonoides totais e a atividade antioxidante.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os teores de glicosídeos totais dos extratos e frações estão indicados na Tabela 1. As folhas e caules de *Stevia* UEM 13 utilizadas neste estudo apresentaram respectivamente um teor de 13,1% e 3,8% de glicosídeos totais. O processo de extração etanólico por maceração retirou um percentual baixo de adoçantes (12,1% das folhas e 1,05% dos caules). Esses resultados indicam que tratamentos com solventes alcóolicos podem contribuir para a extração de demais substâncias presentes na estévia como compostos fenólicos, extraindo valores mínimos de glicosídeos. Pasquel et al., 2000 mostraram que um pré-tratamento das folhas de estévia com solventes como etanol e CO₂ anteriormente ao processo de extração convencional podem melhorar a qualidade do adoçante obtido, contribuindo para a redução do sabor residual amargo (Pasquel, 2000).

Tabela 1. Glicosídeos totais presentes nos extratos de *Stevia rebaudiana*

Tipo de Extrato	Total de Glicosídeos (g/100g de extrato)
EEFM	26,0
EECM	8,7

EEFM: Etanólico das folhas (maceração); EECM: Etanólico dos caules (maceração).

Fonte: O Autor

A concentração de compostos fenólicos das folhas e dos caules e ramos foi, respectivamente de 358,8 e 690,0 mg em equivalente de ácido gálico/g de extrato. Esses resultados evidenciam o elevado potencial antioxidante de extratos desenvolvidos a partir de folhas e caules de estévia. Concentrações importantes de compostos fenólicos dos óleos essenciais e extratos de estévia foram encontradas por Muanda et al., 2011. Shukla et al., 2009 encontraram 61,5 mg de EAG/g de extrato etanólico de folhas de estévia obtido em Soxhlet. Kim et al., 2011 também encontraram quantidades significativas de compostos fenólicos em extratos aquosos de folhas de estévia e identificaram como composto principal o pyrogallol. Os valores encontrados neste estudo pioneiro de caules e ramos de estévia (690,3 mg/g) são superiores aos encontrados nos extratos de folhas e calos, disponíveis na literatura (Wölwer-Rieck, 2012), o que indica que esses componentes devem ser melhores avaliados quanto ao seu potencial como antioxidante a ser adicionados em alimento e bebidas.

Quantidades de flavonoides não foram expressivas em ambos os extratos, apresentando-se em valores inferiores a 1mg/g de extrato. Em geral todos os extratos apresentaram potenciais antioxidantes importantes, destacando-se o extrato etanólico dos caules com respectivamente 96,92%% de inibição na concentração de 1 mg/ml.



4 CONCLUSÃO

Uma dieta rica em antioxidantes pode contribuir de forma significativa para a prevenção de doenças degenerativas, cardiovasculares e metabólicas. Sendo assim a busca por alimentos tanto naturais quanto industrializados enriquecidos de compostos fenólicos e flavonoides contribui para a redução dessas doenças. Este estudo mostrou que os extratos etanólicos das folhas e caules e ramos de *Stevia rebaudiana* apresentaram grande potencial como possíveis aditivos para aumentar a funcionalidade de alimentos e bebidas.

REFERÊNCIAS

- ABUDULA, R., MATCHKOV, V.V., JEPPESEN, P.B., NILSSON, H., AALKJÆR, C., HERMANSEN, K., 2008. Rebaudioside A directly stimulates insulin secretion from pancreatic beta cells: a glucose-dependent action via inhibition of ATP-sensitive K⁺-channels. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.10, p. 1074–1085, 2000.
- BLIOS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 26, p. 1199–1200, 1958.
- BRANDLE, J.E., STARRATT, A.N., GIJZEN, M. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. **Canadian Journal of Plant Science**, p. 526–536, 1998.
- CHAN, P., LINSON, B., CHEN, Y., LIU, J., HSIEH, M., CHENG, J. A double blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. **Br. J. Clin. Pharmacol** v.50, p.215–220, 2000.
- 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 chromatographic, spectroscopic, and eletrophoretic methods. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3587–3594, 2005.
- JIA, Z., TANG, M., WU, J..The determination of flavonoid contentes in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food chemistry** v.64, 555–559, 1999.
- KIM, I.-S., YANG, M., LEE, O.-H., KANG, S.-N. The antioxidante actvity and the bioactive compound contente of *Stevia rebaudiana* water extracts. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 1328–1332, 2011.
- PASQUEL, A., MEIRELES, M.A.A., MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J. Extraction of stevia glycosides with CO₂ + water, CO₂ + ethanol, and CO₂ + water + ethano. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, n.3, 271–282, 2000.
- SHUKLA, S., MEHTA, A., BAJPAI, V.K., SHUKLA S. In vitro antioxidante activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. **Food and Chemical Toxicology** v. 47, p. 2338–2343, 2009.
- SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation sustrates and antioxidants by means folin-ciocalteu reagentes. **Methods Enzymol** v. 299, p. 152–178, 1999.