

Métodos extrativos para obtenção de bioativos de caules de *Stevia rebaudiana*

Extractive methods for obtaining bioactive stems from *Stevia rebaudiana*

RESUMO

Pâmela da Silva Souza
pamsouza2016@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Leila Larisa Medeiros Marques
leilamarques@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Thainara Coneglian
thainaraconeglian@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Maysa Formigoni
maysaformigoni@live.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Flávia Aparecida Reitz
flaviareitz@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

O interesse pela descoberta de extratos vegetais com diferentes atividades biológicas tem aumentado muito nos últimos anos em decorrência da busca por um estilo de vida saudável e da avaliação de que certos alimentos têm substâncias que trazem efeitos fisiológicos desejáveis e é benéfico à saúde. O presente trabalho tem como objetivo utilizar o caule, um resíduo da cadeia produtiva de estévia, para a obtenção de um extrato natural com alta capacidade antioxidante a partir da técnica de extração sólido-líquido com agitação e temperatura, e para atingir um ponto ótimo de extração foi feito um planejamento experimental composto por um ponto central (3^2). A partir dos resultados deste estudo foi possível observar que os caules apresentam compostos com alta capacidade antioxidante tornando-se viável sua aplicação em alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Extrato. Stevia. Antioxidante.

ABSTRACT

The interest in discovering plant extracts with different biological activities has increased a lot in recent years due to the search for a healthy lifestyle and the assessment that certain foods have substances that bring desirable physiological effects and are beneficial to health. The present work aims to use the stem, a residue from the stevia production chain, to obtain a natural extract with a high antioxidant capacity using the solid-liquid extraction technique with agitation and temperature, and to reach an optimum extraction, an experimental design was made, composed of a central point (3^2). From the results of this study, it was observed that the stems have compounds with high antioxidant capacity making it feasible to apply in food.

KEYWORDS: Extract. Stevia. Antioxidant.



INTRODUÇÃO

A *Stevia rebaudiana* é um arbusto perene da família Asteraceae, originária da serra Amambai, fronteira entre Paraguai e Brasil, tradicionalmente cultivada pelas populações nativas da região (BRANDLE, 1998). Ela também é cultivada em diversas outras regiões do mundo como em algumas partes da Europa e Ásia. A estévia contém glicosídeos diterpênicos (glicosídeos do esteviolo), sendo estes, responsáveis pelo potente sabor doce, e na matéria seca da folha está presente um alto teor de terpenoides (LEMUS-MONDACA et al., 2011).

Antioxidantes são compostos que ganharam importância nos últimos anos devido à sua capacidade de neutralizar os radicais livres. Estes têm sido relatados para evitar danos oxidativos causados por estes radicais livres. Podem interferir no processo de oxidação, reagindo com os radicais livres, quelando metais catalíticos e atuando como eliminadores de oxigênio. Sabe-se que muitas das substâncias biologicamente ativas encontradas nas plantas, incluindo compostos fenólicos (flavonoides, fenólicos), possuem propriedades antioxidantes em potencial (LEMUS-MONDACA et al., 2011). Plantas que apresentam atividade antioxidante são de grande interesse. Estes antioxidantes naturais à base de plantas, especialmente fenólicos e flavonoides, têm sido explorados comercialmente como aditivos antioxidantes ou como suplementos nutricionais (LEMUS-MONDACA et al., 2011; SANTOS, 2010).

O presente trabalho tem como objetivo utilizar o caule de estévia, para a obtenção de um extrato natural com alta capacidade antioxidante a partir da técnica de extração sólido-líquido com agitação e temperatura e realizar um planejamento experimental composto por um ponto central (3^2) para definir o ponto ótimo de extração variando a concentração de solvente e a relação peso/volume durante a extração tendo como variável de resposta o rendimento em massa e a atividade antioxidante.

MATERIAL E MÉTODOS

Pesou-se 2g da amostra de caules e ramos de estévia secos e moídos em um erlenmeyer. Esse procedimento foi realizado 10 vezes e em duplicata para desenvolvimento do planejamento experimental, como demonstrado no Tabela 1. Após preparou-se todas as amostras seguindo o planejamento experimental, e respeitando as combinações propostas. As amostras foram levadas até a incubadora a uma temperatura de 55°C e agitação de 180 rpm. Realizou-se 3 ciclos de extração, cada um com 1 hora. Em cada ciclo, adicionou-se o volume de solvente relacionado em cada combinação (Tabela 1). Ao término dos três ciclos, as amostras foram filtradas, transferidas para balões de secagem e secas individualmente em evaporador rotativo (Figura 1). Em seguida, obteve-se a massa extraída em miligramas e preparou-se uma solução mãe a partir do material seco, na concentração de 5 mg/mL de etanol:água (1:1).

Para a determinação dos índices de flavonoides totais utilizou-se o método espectrofotométrico, segundo Jia et al. (1999). Sendo assim, 250µL da amostra (2mg/mL) foi adicionado a 1000µL de solução etanol:água (50:50) e 75µL uma solução de nitrito de sódio (5%). Agitou-se a mistura por 5 minutos e acrescentou-se 75µL de uma solução de cloreto de alumínio (10%). Manteve-se as amostras em

repouso por 5 minutos e por fim, acrescentou-se 500µL de solução de hidróxido de sódio (1M). Procedeu-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 510nm, utilizando a quercetina (SIGMA) como padrão de referência. A concentração de flavonoides é expressa como mg de equivalente de quercetina (EAQ)/mL de extrato por intermédio da equação (1), obtida pela curva de calibração desta técnica, com um R2 igual a 0,9931.

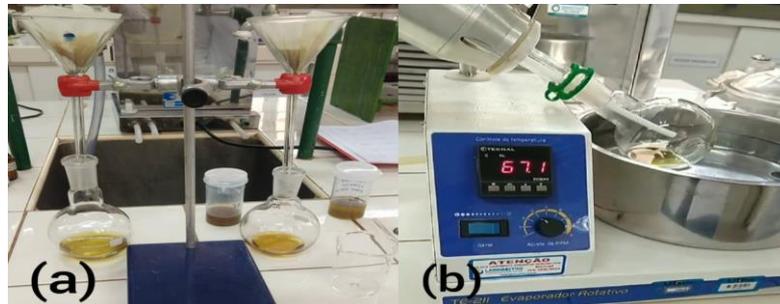
$$y = 0,0003x + 0,0074 \quad (1)$$

Tabela 1 – Planejamento experimental (3²)

Variáveis		Planejamentos	
Relação peso amostra seca:volume de solvente	(%) etanol-água	Combinação	Códigos
90:10 (-1)	1:5 (-1)	-1 -1	1A1B
		-1 0	2A2B
		-1 1	3A3B
		0 -1	4A4B
80:20 (0)	1:6 (0)	0 0	5A5B
		0 1	6A6B
		1 -1	7A7B
70:30 (1)	1:7 (1)	1 0	8A8B
		1 1	9A9B

Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 1 – Processo de extração do caule da *Stevia rebaudiana*



(a) Filtragem de um dos ciclos da extração; (b) Secagem no evaporador rotativo.

Fonte: Autoria própria (2020).

A atividade antioxidante dos extratos foi medida pela capacidade de eliminar os radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), método utilizado por Blois (1958). Para tal, 0,1mL dos extratos preparados em etanol:água (50:50) na concentração de (2,0 mg/mL), foi adicionado a 3,9 mL do reagente DPPH (SIGMA) a 60 µmol. Na sequência, as amostras foram armazenadas no escuro durante 30 minutos. Para remover a interferência da cor nas leituras, adicionou-se 0,1mL dos extratos em 3,9mL de etanol:água (50:50). O controle negativo é realizado com 0,1mL de etanol:água (50:50) acrescido de 3,9mL do reagente DPPH. Dado o tempo, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 515 nm em espectrofotômetro (Global analyzer). Os resultados são expressos como percentagem de inibição de radicais livres equação (2).

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{\text{Absorbância}_{\text{controle negativo}} - \text{Absorbância}_{\text{amostra}}}{\text{Absorbância}_{\text{controle negativo}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde:

Absorbância controle negativo = absorbância da solução de DPPH sem a amostra;
Absorbância amostra = absorbância da amostra com o DPPH.

Os compostos fenólicos totais foram estabelecidos de acordo com o método descrito por Singleton (1999). Um total de 30µL de amostra (2,0mg/mL) foi adicionado a 2370µL de solução etanol:água (50:50). Após, acrescentou-se 125µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 5 minutos, adicionou-se 450µL de carbonato de sódio a 15%. As amostras permaneceram em repouso por 2 horas. Após esse tempo, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 765 nm. A concentração fenólica é expressa como mg de equivalente de ácido gálico (EAG)/mL de extrato por intermédio da equação (3), que foi obtida pela a curva de calibração desta técnica, com um R2 igual a 0,9903.

$$y = 0,0002x + 0,03 \quad (3)$$

O procedimento de extração foi realizado em duplicata. Os resultados de rendimento em massa e atividade antioxidante foram analisados com auxílio do programa estatístico IBM SPSS Statistics Base 22.0 para construção dos gráficos de superfície de resposta, avaliação da influência das variáveis empregadas e identificação do ponto ótimo de extração resultante da combinação das variáveis. As demais análises foram realizadas em triplicata. Os resultados, expressos como a média ± erro padrão da média, foram submetidos à análise de variância usando o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para a análises das extrações foi realizado o teste da Análise de variância com nível de significância de 5%. Os testes constantes da Tabela 2 e determinadas segundo o delineamento fatorial completo do tipo 32 com três níveis e dois fatores e com uma repetição no ponto central. O teste de rendimento em massa (g) foi realizado em duplicata e o de atividade antioxidante (%) foi realizada em triplicata. Os resultados das médias e os desvios encontram-se na Tabela 2.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Pelos resultados é possível analisar que houve diferenças significativas para as dez amostras com relação às análises de rendimento em massa e atividade antioxidante. Para o rendimento, a amostra A1 teve o menor valor apresentado, e a amostra A9 o maior valor. Para a determinação da atividade antioxidante, o maior valor apresentado foi para a amostra A1 e o menor valor para a amostra A7. As amostras A4, A5, A9 e A10 não apresentaram médias significativas.

A análise de variância das respostas de interesse em relação às variáveis independentes do processo de extração também objetivou a análise da significância dos efeitos destas nas variáveis resposta e o ajuste dos dados experimentais a um modelo de regressão que expressasse matematicamente a extração. A seguir são comentadas as respostas estudadas neste trabalho.

Seguidamente, apresenta-se os dados referentes à análise de variância para os dados experimentais obtidos para a resposta rendimento em massa. A variável solvente (etanol:água) foram significantes na Anova. Os termos de relação

peso:volume, bem como as interações entre este e o solução, foram eliminados nesta análise por não atender ao nível de significância. Com isso, analisou-se um bom ajuste para o modelo, que foi de 92,779%. Na Figura 2 pode-se ver a relação entre os valores experimentais e os valores preditos pelo modelo ajustado.

Objetivando-se rendimento em massa, a variável independente solução etanol:água apresentou efeito significativo positivo, ou seja, o seu aumento contribuiu para o aumento do rendimento, conforme se verifica na Figura 3.

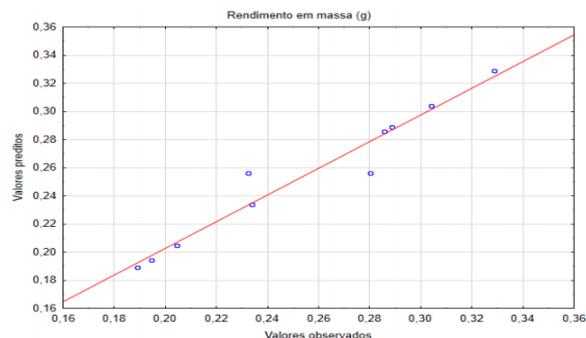
Tabela 2 – Delineamento experimental do experimento fatorial completo com a distribuição das variáveis estudadas e valores das variáveis de resposta para todas as extrações

Amostras	X ₁	X ₂	Solução etanol:água	Relação peso:volume	Rendimento em massa (g)	Atividade antioxidante (%)
A1	-1	-1	90:10	1:5	0,189 ^c ±0,001	90,551 ^a ±1,203
A2	-1	0	90:10	1:6	0,205 ^{bc} ±0,006	89,239 ^{ab} ±0,946
A3	-1	1	90:10	1:7	0,194 ^c ±0,009	88,967 ^{ab} ±2,406
A4	0	-1	80:20	1:5	0,234 ^b ±0,001	86,614 ^{abc} ±1,639
A5	0	0	80:20	1:6	0,233 ^b ±0,005	86,348 ^{abc} ±3,290
A6	0	1	80:20	1:7	0,289 ^d ±0,007	89,239 ^{ab} ±1,050
A7	1	-1	70:30	1:5	0,286 ^d ±0,008	78,540 ^c ±1,829
A8	1	0	70:30	1:6	0,304 ^{ad} ±0,003	81,365 ^{bc} ±1,837
A9	1	1	70:30	1:7	0,329 ^a ±0,006	87,139 ^{abc} ±1,144
A10	0	0	80:20	1:6	0,280 ^d ±0,005	84,525 ^{abc} ±1,045

Médias na mesma coluna, seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Fonte: Autoria própria (2020).

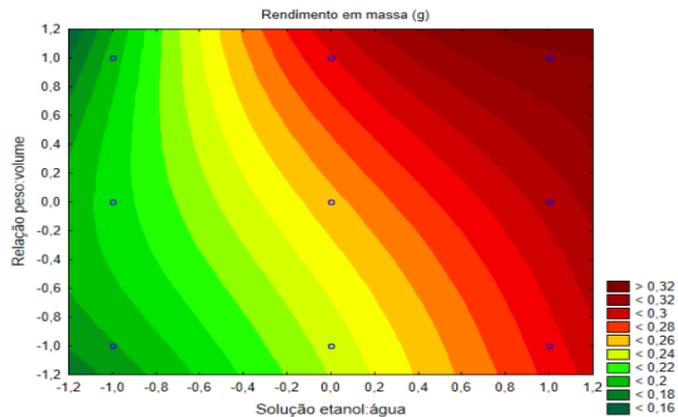
Figura 2 – Coeficientes do modelo de regressão para o rendimento em massa (g)



Fonte: Autoria própria (2020).

É possível ver ilustrativamente este comportamento, quanto maior a concentração de água em relação ao etanol (70:30) e maior a relação peso:volume, maiores são os valores obtidos para o rendimento. Esta tendência se inicia entre os níveis 0,0 e +1,0 para ambas as variáveis.

Figura 3 – Gráfico de contorno para a variável rendimento em massa



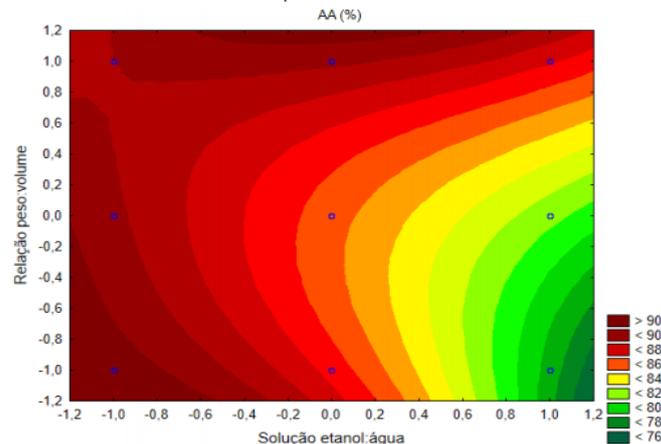
Fonte: Autoria própria (2020).

Analisando a resposta da atividade antioxidante (%), as variáveis solução (etanol:água) e relação peso:volume foram efeitos significantes na Anova, ou seja, foram significativas para que o ajuste no modelo fosse bastante satisfatório: 97,332%. A interação entre ambas as variáveis não é significativa.

Analisando a Figura 4, nota-se que maiores valores da atividade antioxidante se destacaram para valores menores da água em relação ao etanol (-1,0), combinados com valores menores da relação peso:volume (-1,0), assim como valores intermediários para a solução etanol:água e valores maiores para a relação peso:volume (+1,0).

Com base nas respostas obtidas, desejou-se determinar qual a solução ideal entre etanol e água, bem como a relação peso e volume ideal. Ainda mais considerando que, para o processo de extração, tanto a atividade antioxidante como o rendimento em massa devem ter seus valores maximizados.

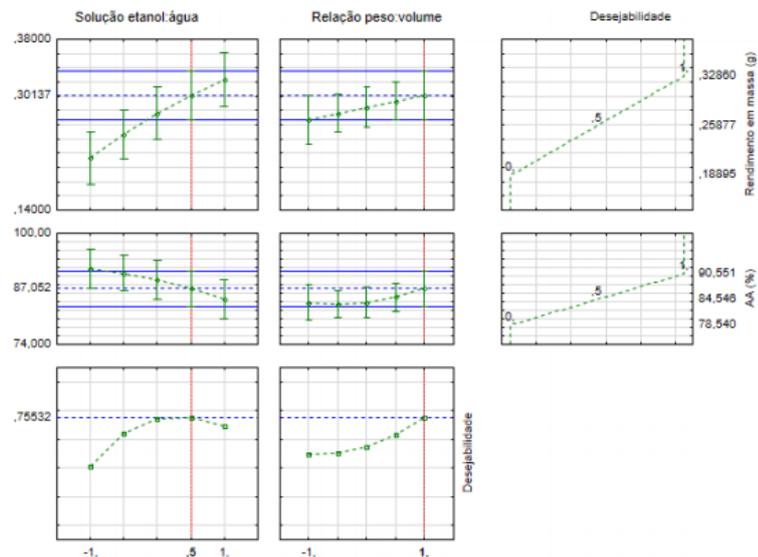
Figura 4 – Gráfico de contorno para a variável atividade antioxidante



Fonte: Autoria própria (2020).

Pela Figura 5 é possível verificar que valores ótimos (75,532%) para o rendimento em massa (g) e para a atividade antioxidante (%) são obtidos quando se opta pela proporção 75:25 da solução etanol:água e a relação peso:volume 1:7. Caso opte-se por trabalhar os níveis (+1,0) para ambas as variáveis, os valores otimizados terão uma queda de 6,492%.

Figura 5 – Gráfico de influência da concentração da solução etanol:água e da relação peso:volume na obtenção do rendimento em massa (g) e da atividade antioxidante (%)



Fonte: Autoria própria (2020).

A partir da análise estatística realizada foi possível obter o extrato otimizado no ponto ótimo de extração. A partir deste extrato foram realizadas as análises de atividade antioxidante onde o resultado obtido foi de 76% de inibição, de compostos fenólicos foi de 4,65 mgEAG/mL e flavonoides de 1,33 mgEQ/mL.

Muanda et al. (2011) avaliaram a atividade antioxidante das folhas de stévia em extrato aquoso e obteve 82,86% de inibição. Desta forma, o valor encontrado no presente trabalho é semelhante, mostrando que o caule de estévia também tem um potencial antioxidantes muito bom para ser aplicado em alimentos.

Gawel-Beben et al. (2015) estimaram os valores para compostos fenólicos e flavonoides, respectivamente, em 3,85 mgEAG/g de folha seca e 2,03 mgEQ/g de folha seca. Sendo assim, esses valores são similares aos encontrados neste trabalho.

Formigoni et al. (2018) trataram as folhas de estévia com etanol e obteve 94,55% de inibição da atividade antioxidante, 6,72mgEAG/g de folha seca para compostos fenólicos e 1,68 mgEQ/g de folha seca para flavonoides.

CONCLUSÃO

Este trabalho mostra que o caule de estévia, mesmo sendo uma parte da planta com pouco interesse comercial por ser considerado um resíduo, tem grande abundância de compostos com alta capacidade antioxidante, assim como nas

folhas e, portanto, a sua utilização no processamento de alimentos pode ser economicamente considerada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Fundação Araucária pela disponibilização de bolsa de estudos, agradeço a UTFPR e todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

BLOIS, Marsden S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, 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**, vol. 78, n. 4, p. 527-536. <http://dx.doi.org/10.4141/P97-114>. 1998.

FORMIGONI, Maysa et al. Pretreatment with ethanol as an alternative to improve steviol glycosides extraction and purification from a new variety of stevia. **Food chemistry**, v. 241, p. 452-459, 2018.

GAWĘŁ-BĘBEN, Katarzyna et al. Stevia rebaudiana Bert. leaf extracts as a multifunctional source of natural antioxidants. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 5468-5486, 2015.

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

LEMUS-MONDACA, Roberto et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a highpotency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**. Santiago, v.132, p. 1121-1132. dez. 2011.

MUANDA, Francois N. et al. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 1865-1872, 2011.

SANTOS, Paula Macedo Lessa et al. A atividade antioxidante dos extratos de folhas de Jacarandá puberula Cham., Bignoniaceae, uma planta medicinal brasileira usada para depuração do sangue. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 147-153, 2010.

SINGLETON, Vernon L.; ORTHOFER, Rudolf; LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1999. p. 152-178.

ZHISHEN, Jia; MENGCHENG, Tang; JIANMING, Wu. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.