

A

TECNOLOGIA AGRÍCOLA E

ALIMENTAR - CTAA

Rua Jardim Botânico, 1024 - Parte

RJ - CEP 22.460 - Fone: 239-6290

Telex: 33267 EBPA

PESQUISA EM ANDAMENTO

Nº 005 Julho/83 número de páginas 08

STEVIA REBAUDIANA. I. Determinação quantitativa dos componentes doces. Correlação entre um método químico e o método de cromatografia líquida de alta pressão.

Ismênia Salignac de S. Guimarães¹Seiva Cherdman Cascon¹Afonso do Prado Seabra²

Stevia rebaudiana (Bert) Bertoni (Compositae) é planta originária do Paraguai e Sul do Brasil que se caracteriza pelo sabor doce muito intenso de suas folhas resultante da presença de vários glicosídeos de uma única aglicona diterpênica, o ácido caurênico.

A planta foi descrita por Bertoni em 1899 como Eupatorium rebaudianum e mais tarde o mesmo pesquisador verificou tratar-se de planta do gênero Stevia (Felipe, 1977).

Em Paraguai e África do Sul os nativos usam as folhas de Stevia como adoçante em cafés e chás (Tanaka, 1982).

¹ - Pesquisadoras do Centro de Tecnologia Agrícola e Alimentar-CTAA/EMBRAPA

² - Pesquisador do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, UFRJ

Recentemente essa planta vem despertando grande interesse, já que seu principal componente doce, o esteviosídeo, que é cerca de 300 vezes mais doce que a sacarose, poderá ser um substituto da sacarina, adoçante cuja restrição de uso é cada vez maior devido a seus efeitos tóxicos.

No Japão, o esteviosídeo já é empregado como aditivo em diversos alimentos como molhos de soja, vegetais em conserva e sucos de frutas (Tanaka, 1982).

Em 1979, cerca de 300 toneladas de planta seca foram colhidas não somente no Japão mas também no Sul e Leste da Ásia (Tanaka, 1982).

No Brasil tem observado interesse na cultura e desenvolvimento de tecnologia, para o aproveitamento dos princípios doces de Stevia.

A produção agrícola está em desenvolvimento visando um mercado exportador promissor, principalmente o Japão.

Informações junto à maior firma exportadora de Stevia no Brasil, indicaram uma exportação, em folhas secas, de 10 toneladas em 1981 e 15 toneladas em 1982, volume reduzido devido à produção insuficiente e a um consumo interno elevado.

Os produtores agrícolas de Stevia têm se preocupado em selecionar espécimens mais ricos em edulcorantes bem como em determinar as melhores condições de cultura e de poda.

Determinações quantitativas de esteviosídeo e de outros componentes doces das folhas de Stevia têm apresentado problemas.

Os teores de edulcorantes encontrados por diversos autores variam. Angelucci (1979) encontrou 8,0%, Hashimoto (1978) entre 2,0 e 7,7%. Ahmed e Dobberstein (1982) afirmam que a técnica de Hashimoto extrai somente 50% dos edulcorantes e assim sendo aqueles seriam o dobro.

Os dados analíticos disponíveis na literatura não esclarecem o local, idade e modo de cultivo das plantas analisadas. Esses fatores influem como foi observado pelos autores deste trabalho. Ocorre um aumento de edulcoran

tes com o desenvolvimento da planta assim como em determinadas condições de clima e cultivo, independentes do fator genético.

Alguns dos métodos descritos na literatura se fundamentam na reação destes componentes glicosídicos com antrona, reagente empregado em determinações de açúcares.

Estes métodos espectrofotométricos se diferenciam entre si pelos sistemas de purificação prévia empregados para eliminar interferentes, principalmente os açúcares componentes das folhas.

Um micro método descrito por Metivier e Viana (1979) emprega a cromatografia em camada delgada de gel de sílica para separar os componentes das folhas. Após a separação do esteviosídeo dos açúcares, é feita a eluição do esteviosídeo com água e a determinação deste se faz pela reação com antrona. Este método, ensaiado pelos autores, mostrou-se pouco preciso. Observou-se que a sílica gel adsorve fortemente o esteviosídeo de modo a impedir sua recuperação quantitativa.

Um outro método, descrito por Angelucci se vale da maior solubilidade dos açúcares no éter. Os edulcorantes, são precipitados de uma solução metanólica pela adição de excesso de éter e o precipitado é dissolvido em água quente; a solução aquosa é purificada e procede-se à dosagem dos edulcorantes totais pela reação com antrona.

O método proporciona resultados concordantes e repetitivos, porém excessivamente elevados em comparação com os dados mencionados anteriormente.

Pelo emprego desse método os autores encontraram valores entre 8,0 e 25,0% de edulcorantes totais em diferentes amostras de plantas. Estes valores, bastante elevados, parecem ser devidos à presença de interferentes nos extratos de plantas, mesmo depois de purificados.

O método mais recente adotado para a dosagem dos componentes doces de Stevia rebaudiana é o que emprega cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) segundo técnicas descritas por Hashimoto e colaboradores (1979) e Ahmed e Dobberstein (1982).

Dosagens de esteviosídeo ensaiadas através dessas técnicas utilizando colunas radial Pak C₁₈, μ Bondapak NH₂ ou duas colunas de proteína I-125 Watters, em série, não tiveram sucesso mesmo quando numerosos sistemas de solventes foram tentados tais como: metanol, metanol:água (1:1), acetonitrila, acetonitrila:água (1:1) e tampão TRIS (hidroxi-metil) amino metano + sulfato de sódio 0,1 M pH=7,2.

Seguindo a técnica de Ahmed que usou duas colunas de proteína e propanol-1, como fase móvel, para a separação de esteviosídeo, rebaudiosídeo A e rebaudiosídeo C, os autores não conseguiram bons resultados.

Uma separação satisfatória foi obtida quando se usaram duas colunas de proteína em série e água deionizada como fase móvel, nas condições especificadas a seguir:

2 Colunas de Proteínas I - 125, 30 x 0,78 cm de diâmetro interno (Watters)

Vazão de eluição: 3 ml/min

Pressão da bomba: 1,4 psi

Atenuação do refratômetro diferencial: 4 vezes

Temperatura : ambiente

Detetor de U.V. : 210 nm

Velocidade do registrador: 30 cm/min.

Nessas condições de operação separou-se a mistura dos edulcorantes totais com um tempo de retenção de 10 minutos.

Os valores fornecidos por HPLC foram calculados a partir da curva padrão da lei de Beer construída através de uma variação de concentração de esteviosídeo padrão contra a altura dos picos correspondentes a 100, 200, 300 e 500 μ l de uma solução a 0,1% em água.

Foram analisadas de forma idêntica por HPLC e pelo método químico 12 amostras de Stevia rebaudiana. Os resultados mostraram que os valores de HPLC são aproximadamente 50% dos valores obtidos pelo método químico.

Com base nos dados analíticos foram calculados os valores que representam a correlação entre os dois métodos:

$$\text{HPLC} = \frac{\ln A - a}{b}$$

onde: A = valor (%) obtido pelo método químico

$$a = 2,05676$$

$$b = 0,08640$$

Esses parâmetros foram estimados pelo método dos mínimos quadrados, ajustando-se às 12 observações disponíveis o modelo:

$$\ln A = a + b \cdot \text{HPLC} + e$$

Houve a necessidade de se proceder a uma correção para a heterocedasticidade dos erros. Assumiu-se para tanto que:

$$e = \text{HPLC} \cdot e'$$

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos para as estimativas dos parâmetros.

As amostras analisadas foram bastante reduzidas, havendo necessidade de maior número para que haja confiabilidade no método.

A correlação entre os dois métodos pode ser aplicada nos casos em que o equipamento de HPLC não for disponível.

A Tabela 2 mostra os resultados das análises de 12 amostras de Stevia rebaudiana obtidos pelos métodos de HPLC e químico de Angelucci (1982). Os dados apresentados nessa tabela são portanto experimentais.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao DR. LUIS FERNANDO VIEIRA e VERA LÚCIA NOGUEIRA FERNANDES, pelos cálculos dos parâmetros que estabeleceram a relação entre os dois métodos.

TABELA I

DETERM. DO TEOR DE ESTEVIOSÍDEO : REG. DO MET. QUÍMICO (LNA) VS CROM. (HPLC)

MODELO DE REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLO

VARIÁVEL DEPENDENTE: LNA

COEFICIENTE DE VARIACÃO	DESVIO PADRAO	MÉDIA
5.65042 %	.0202228	.357899

PARAMETRO	ESTIMATIVA	TESTE PARA HO: PARAMETRO=0	PROB> T	ERRO PADRAO
INTERCEPT	.0864058	3.07144	1.18118 %	.028132
HPLC	2.05676	9.86546	.01 %	.208481

QUADRO DE ANALISE DA VARIANCIA

FONTE	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO	VALOR DE F	PROB > F	R QUADRADO
REGRESSÃO	.0398031	1	.0398031	97.3272	.01 %	.906827
ERRO	4.08962E-03	10	4.08962E-04			
TOTAL	.0438927	11				

TABELA 2

Amostra	HPLC(%)	Método Químico(%)
1	5,4	10,7
2	8,0	19,0
3	10,3	16,0
4	7,7	14,6
5	10,0	23,6
6	8,9	16,0
7	7,4	17,0
8	6,0	15,0
9	8,3	15,3
10	6,5	12,5
11	6,2	14,3
12	10,3	14,9

REFERÊNCIAS

- AHMED, M.S. & DOBBERSTEIN, R.H. Stevia rebaudiana. II. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of stevioside, rebauside A and rebauside C. J. Chromatog., Amsterdam, 236 (2): 523-526, 1982.
- ANGELUCCI, E. O esteviosídeo de plantas brasileiras de Stevia rebaudiana Bertoni e a potencialidade de seu emprego em alimentos. Ensaio em formulações hídricas e carbonatadas. Campinas, Fac. Ciências Farmaceuticas. Univ. de São Paulo (USP), 1979 78p. (Tese de Doutorado).
- FELIPPE, G.M. Stevia rebaudiana Bert.: uma revisão: Ciência e Cultura. S. Paulo, 29: 7-12, 1977.
- HASHIMOTO, M.; MORIYASU, M.; NAKAMURA, S.; ISHIGURO, S. & KOMURO M. High-performance liquid chromatographic determination of Stevia components on a hydrophilic packed column. J. Chromatog., Amsterdam, 161: 403-405, 1978.
- METIVIER, J. & VIANA, A.M. Determination of microgram quantities of stevioside from leaves of Stevia rebaudiana Bert. by two-dimensional thin layer chromatography. J.Exp.Bot. 30 (117): 805-810, 1979.
- TANAKA, O. Steviol - glycosides: new natural sweeteners. Trends in Qual. Chem. 1: 246-248, 1982.



EMBRAPA

CEP

--	--	--	--	--