



SELEÇÃO DE CLONES DE ELITE DE *Stevia rebaudiana* (Bert.) BERTONI COM ÊNFASE NO TEOR DO REBAUDIOSÍDEO A E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

*Thatiane Rodrigues Mota*¹; *Antônio Sérgio Dacome*²; *Silvio Claudio da Costa*³

RESUMO: *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni é uma planta originária da América do Sul, pertencente à família Compositae, que possui princípios edulcorantes em suas folhas, caules e inflorescências. Folhas de *S. rebaudiana* com razão rebA/stev >1 são utilizadas como matéria prima para a produção do rebaudiosídeo A, o qual é o único adoçante de *Stevia* aprovado nos Estados Unidos e França. A partir de uma população geneticamente melhorada, 75 clones tiveram o teor de polifenóis totais determinados e, de 50 destes, a composição glicosídica, o teor de adoçantes totais e a razão rebA/stev foram também determinados. Os valores encontrados para polifenóis estão entre 1,22% e 6,71%, dos quais, 37 exemplares, ou seja, 47,44% das amostras analisadas apresentaram valores maiores que 4,00%, o que sugere que os mesmos podem apresentar valores expressivos de atividade antioxidante. A razão (rebA/stv) média determinada para os 50 clones foi de 3,27, caracterizando uma matéria prima de excelente qualidade para a produção do rebaudiosídeo A. Dentre os clones analisados, foram selecionados clones isentos de reb C, clones com baixíssimo teor de esteviosídeo e, ainda, clones isentos de esteviosídeos, os quais podem ser considerados clones de elite.

PALAVRAS-CHAVE: Esteviosídeos; Polifenóis; Razão; Rebaudiosídeos.

1 INTRODUÇÃO

Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni, como mostrada na figura 1, é uma planta originária da América do Sul, pertencente à família Compositae, que se tornou popular devido às suas propriedades adoçantes presentes nas folhas. Essas propriedades permitem seu uso como adoçantes de medicamentos, bebidas e alimentos. Por questões de estética ou saúde, observa-se a substituição total ou parcial do açúcar (sacarose) por produtos conhecidos como edulcorantes, que são compostos com sabor semelhante à sacarose, porém de baixo valor calórico ou completamente sem calorias.

O extrato concentrado de *S. rebaudiana*, em dose normal, pode ser utilizado como adoçante, pois possui como principais compostos em suas folhas os glicosídeos

¹Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná. thati.mota@yahoo.com.br

²Químico do Núcleo de Estudo em Produtos Naturais da Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná. asdacome@uem.br

³Docente da Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná. sccosta@uem.br

diterpênicos esteviosídeo e rebaudiosídeos, sendo a maior porcentagem de esteviosídeo (Bunhak *et al.*, 2004).

O esteviosídeo é um edulcorante que possui sabor doce, seguido de um forte sabor amargo residual e, por isso, tem sua aplicação industrial restrita a alguns segmentos, devido a esse sabor amargo residual e a baixa solubilidade (Goto e Clemente, 1998). Este glicosídeo, que é cerca de 300 vezes mais doce que a sacarose, é extraído e comercializado no Brasil há vários anos, sendo utilizado, principalmente, em formulações de blends de adoçantes não calóricos.

Pesquisas no final da década de 90 no NEPRON (Núcleo de Estudos em Produtos Naturais) /UEM envolveram o trabalho de avaliação sensorial (degustação) e a análise em CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) de centenas de plantas, o que resultou na obtenção de uma variedade, depois denominada de *Stevia* UEM-320, que apresenta três vezes mais rebaudiosídeo A (9,8%), quando comparada com uma variedade selvagem (2,8%), sendo, portanto, o glicosídeo majoritário na planta selecionada.

Os clones de *S. rebaudiana* utilizados neste trabalho foram obtidos por retro cruzamento entre plantas de elites pré-selecionadas no programa de melhoramento genético que vem sendo conduzido no NEPRON (desde o ano de 1998). Com isso, objetivou-se determinar o teor de polifenóis, composição glicosídica, teor de adoçantes totais e razão rebA/stev de clones de elite de *S. rebaudiana*.



Figura 1: *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a obtenção do material biológico, as folhas (após a poda) de *S. rebaudiana* foram levadas à estufa a 60°C e, após estarem secas, foram moídas. Esse processo foi realizado para os 75 clones.

As análises bioquímicas foram realizadas a partir da preparação dos extratos aquosos. Essas preparações ocorreram inicialmente pesando-se 2,0 gramas de *S. rebaudiana* previamente moídas e transferidas para um Becker com capacidade de 250 mL com adição de 100 mL de água destilada e deionizada, levando-se a ferver por cinco minutos. Após a ferver, o material decantou por um minuto e foi filtrado à vácuo. O processo descrito foi repetido duas vezes, com respectivamente, 100 mL e 50 mL de água. Após a última filtragem, o extrato foi transferido para um balão volumétrico de 250 mL, no qual o volume foi completado com água. O procedimento descrito foi repetido para os 75 clones analisados.

Para a preparação da Solução de Ácido Gálico, a qual foi utilizada para a determinação do Fator de calibração, inicialmente, pesou-se 100 mg de ácido gálico e dissolveu-se em 100 mL de água destilada e deionizada. A partir da solução inicial 1.000 µg/mL, dissolveu-se para 2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL, 7,5 µg/mL, 10,0 µg/mL, 12,5 µg/mL, 25,0 µg/mL e 50,0 µg/mL, a fim de obter a curva padrão e o fator de calibração. As leituras foram realizadas em triplicatas e em espectrofotômetro, a 760nm, como mostrado na figura 2. Os fatores de calibração adotados foram de 60,3504 e 60,7806. Parte das amostras tiveram seus cálculos de polifenóis baseados no primeiro fator, e as demais, com o segundo.

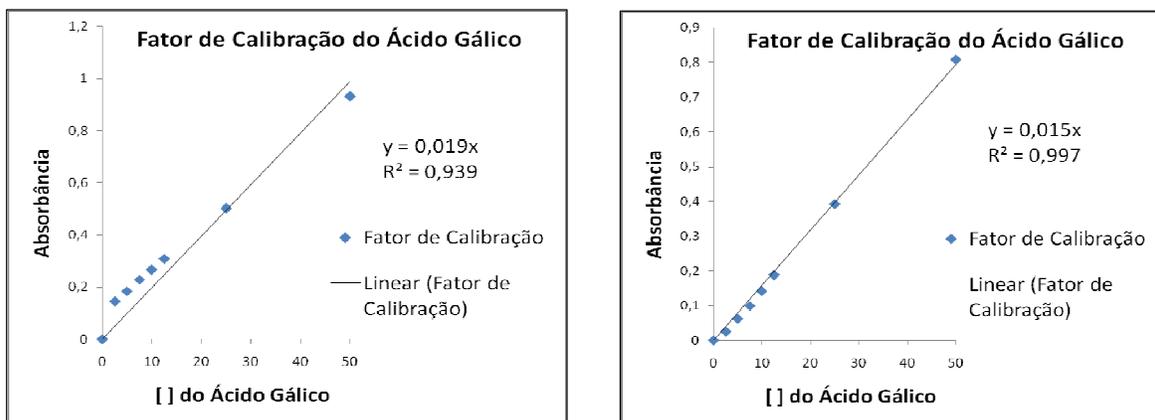


Figura 2: Fatores de Calibração do Ácido Gálico (Respectivamente: 60,3504 e 60,7806)

Para a análise de Polifenóis, utilizou-se o método Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Bora *et al.* (2005). Dos extratos previamente preparados, fez-se a diluição em 1/10 e distribuiu-se 0,5 mL desta em três tubos de ensaio. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de reativo Folin-Ciocalteu, 0,5 mL de Carbonato de Sódio 10% e 1,5 mL de água destilada e deionizada em cada um dos tubos. Para o branco, utilizou-se 0,5 mL de água destilada adicionada aos demais reagentes citados anteriormente. Todos os tubos foram homogeneizados, tampados com papel filme e deixados no escuro, à temperatura ambiente, por uma hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 760 nm.

Para a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foi utilizada a metodologia descrita por Dacome *et al.* (2005) para analisar os esteviosídeos e rebaudiosídeos dos extratos. A coluna utilizada foi de NH₂ com uma vazão de 0,500 mL/minuto e duas injeções de 20 minutos para cada amostra.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores encontrados para o doseamento de polifenóis pelo método Folin-Ciocalteu dos 75 clones de *S. rebaudiana* analisados encontraram-se entre 1,22% e 6,71%.

Logo, como mostrado na tabela 1, três exemplares apresentaram valores de polifenóis entre 1,00% e 1,99% (média: 1,48%); 13 entre 2,00 e 2,99% (média: 2,58%); 22 entre 3,00% e 3,99% (média: 3,65%); 21 entre 4,00% e 4,99% (média: 4,42); 13 entre 5,00% e 5,99% (média: 5,32%) e três entre 6,00% e 6,99% (média: 6,33%).

Tabela 1: Porcentagem de Polifenóis dos 75 clones de *S. rebaudiana*

Porcentagem de Polifenóis								
1,22006	2,61264	3,23124	3,68288	3,98342	4,32788	4,62737	5,11341	6,02123
1,40088	2,64108	3,26669	3,71027	3,98969	4,349	4,65098	5,13241	6,26362
1,82851	2,73134	3,36733	3,82222	4,06373	4,42119	4,6764	5,15242	6,71549
2,10074	2,79159	3,41816	3,90241	4,07116	4,42408	4,71314	5,15822	
2,17116	2,81567	3,49794	3,92904	4,08242	4,46367	4,91252	5,34229	
2,38793	2,93627	3,57101	3,93333	4,10179	4,55909	5,033	5,56732	
2,42341	2,94535	3,57543	3,94314	4,10662	4,57018	5,04929	5,74257	
2,49496	3,03729	3,58427	3,96932	4,30609	4,57735	5,05714	5,8598	
2,53902	3,15934	3,68202	3,96955	4,31453	4,59168	5,06845	5,95757	

Os valores médios para polifenóis, esteviosídeos, rebaudiosídeos C e A, adoçantes totais e a razão de rebaudiosídeo A por esteviosídeo encontram-se na tabela 2.

Tabela 2: Valores médios de polifenóis (75 clones), composição glicosídica, adoçantes totais e razão (50 clones)

Parâmetros	Valores médios
Polifenóis	4,79%
Esteviosídeos	5,09%
Rebaudiosídeo C	2,72%
Rebaudiosídeo A	9,60%
Adoçantes Totais	17,29%
Razão	3,27

Dos 50 exemplares que tiveram suas razões determinadas, cinco apresentaram valores menores que 1,00 (média: 0,68), 18 entre 1,00 e 2,00 (média: 1,37), 12 entre 2,00 e 3,00 (média: 2,49) um com razão 3,33, seis entre 3,00 e 4,00 (média: 4,13), e os demais, os valores para as razões foram: 5,09; 7,90; 9,26; 12,11; 14,75 e 21,75. Em dois exemplares não foi possível realizar o cálculo da razão, pois os clones não apresentaram esteviosídeo ou valores próximos de zero para o mesmo, os quais podem ser considerados Clones de Elite, bem como os clones com razão rebA/stev acima de 5.

4 CONCLUSÕES

Conclui-se que foi possível selecionar plantas com características excelentes para a produção de matéria prima (folhas de *S. rebaudiana*) para a indústria de extração e refino

do rebaudiosídeo A. Os teores de polifenóis totais determinados sugerem que alguns clones podem apresentar ainda expressivos valores de atividade antioxidante, uma vez que o teor de polifenóis correlaciona-se positivamente com atividade antioxidante (Sousa *et al.*, 2007).

REFERÊNCIAS

BORA, K.; MIGUEL, O.G.; ANDRADE, C.A.; OLIVEIRA, A.O.T. (2005), Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, *Dicksoniaceae*. **Visão acadêmica**, 6(2), 6-15.

BUNHAK, E. J.; MENDES, E. S.; PEREIRA, N. C.; COSTA, S. C. (2004), Avaliação do efeito do polieletrólito aniônico na clarificação do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 24(4), 587-590.

DACOME, S. A.; SILVA, C.C; COSTA, C.E.M.; FONTANA, J.D.; ADELMANN, J.; COSTA, S.C (2005), "Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic and electrophoretic methods". **Process Biochemistry**, 40, 3587-3594.

GOTO, A.; CLEMENTE, E. (1998), Influência do Rebaudiosídeo A na solubilidade e no sabor do Esteviosídeo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 18(1), 3-6.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, S. H.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L.C.D.; RAELOS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. (2007), Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 30(2), 351-355.