

## PADRÕES ANALÍTICOS E DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE ESTEVIOSÍDEOS

Frida Maciel Pagliosa, Maria Cladis Mezzomo da Silva, Maria Elisebeth do Canto Vinadê e Sonia Maria Bittencourt Frizzo.

Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais. Centro de Ciências Naturais e Exatas. UFSM. Santa Maria, RS.

## RESUMO

Foram estabelecidos parâmetros analíticos para padrões de esteviosídeos, além da obtenção e purificação dos mesmos, e proposta a metodologia para a determinação quantitativa de esteviosídeos por espectrofotometria no ultra-violeta.

A determinação quantitativa de esteviosídeos por espectrofotometria em 208nm, usando o álcool etílico como solvente, apresentou boa precisão relativa, com erro analítico de 1,5%.

Os parâmetros estabelecidos na caracterização dos padrões foram: intervalo de fusão de 197-200°C; Rf dos cromatogramas ao redor de 0,58; pico máximo de absorção em 208nm em álcool etílico; absorvidade molar superior a 4000 em 208nm.

## SUMMARY

PAGLIOSA, F.M.; SILVA, M.C.M.; VINADÊ, M.E.C. and FRIZZO, S.M.B. Analytical Standards and Quantitative Analysis of Steviosides. *Ciência e Natura*, 7:49-56.

It was established analytical parameters for steviosides standard, besides the obtainment and purification of these parameters.

The methodology for quantitative determination was proposed for the stevioside analysis in spectrophotometry U.V.

The quantitative analysis by spectrophotometry was in 208nm, in ethylic alcohol. The curve of calibration presented good relative precision, with analytical error 1.5%.

The parameters established in characterization of standards was: m.p: 197-200°C; Rf around of 0.58; maximum absorption in 208nm and molar absorptivity higher 4000 in 208nm.

## INTRODUÇÃO

A *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni é uma planta de grande importância dada as possibilidades do uso do glicosídeo esteviosídeo como adoçante. A *Stevia* têm despertado interesse especial, não só químico, mas, também biológico, fisiológico e farmacológico.

A obtenção de padrões de esteviosídeos torna-se necessária devido a escassez deste produto padrão no mercado internacional, o que contribui para o alto custo, além das dificuldades de importação.

Obteve-se nesta pesquisa padrões locais com a comprovação necessária dos métodos para a identificação e caracterização, encontrados na literatura.

Foram estabelecidos neste trabalho, parâmetros analíticos para os padrões de esteviosídeos, além da obtenção destes padrões. É preconizada também a metodologia para a determinação quantitativa por espectrofotometria no U.V. Esse método que consiste em uma reta de calibração, confeccionada com padrões analíticos comprovados, servirá para o controle de qualidade de esteviosídeos requerido no controle industrial do produto ou em amostras comerciais.

O primeiro químico que extraiu o princípio doce contido em *Stevia rebaudiana* foi REBAUDIO (12).

RASENACK (11) extraiu e purificou o adoçante, bem como o produto da hidrólise, propondo as respectivas fórmulas moleculares:  $C_{42}H_{72}O_{21}$  e  $C_{30}H_{40}O_5$ .

BRIDEL e LAVIELLE (3), continuaram os estudos procedendo a extração e purificação do adoçante, obtendo um rendimento de 6%. Deste adoçante fizeram a hidrólise ácida, obtendo glicose e esteviol.

Desenvolvendo os estudos de extração do adoçante, GATONI (5) desenvolveu um método de extração por meio de bactéria com câmara de difusão.

WOOD et alii (16) em 1956, extraíram esteviosídeo de folhas secas de *Stevia rebaudiana* por meio de percolato e purificaram com dioxano e metanol.

Em 1975, SAKAMOTO et alii (14) dosaram o esteviosídeo por cromatografia em camada delgada. MITSUHASHI et alii (9, 10) preconizaram a cromatografia gasosa (líquido-gás) para a determinação do teor de esteviosídeo na forma de ester de esteviol. KHODA et alii (8), realizaram estudos de novos adoçantes de *Stevia* e obtiveram também vários produtos de hidrólise desses adoçantes. HODGE e INGLET (7), e CHEN et alii (4) analisaram o esteviosídeo por cromatografia de alta pressão. SUGISAWA et alii (15) determinaram a quantidade de esteviosídeo por espectrofotometria em 313 nm, pela absorbância do produto da hidrólise ácida. HASHIMOTO et alii (5) separaram os compostos de *Stevia*, por cromatografia líquida de alto desempenho. ANGELUCCI (1), fez a identificação do esteviosídeo por espectrofotometria U.V. em 244 nm, em dioxano. Utilizou também para a identificação o ponto de fusão, espectros I.R. e de massa.

Continuando os estudos desta planta, SAKAGUCHI e KANT (13), apresentaram a constituição do adoçante, bem como as suas respectivas estruturas e denominações químicas. Descreveram alguns métodos para a dosagem de esteviosídeo, tais como a cromatografia em camada e outros métodos semi-quantitativos. A determinação quantitativa foi feita por cromatografia gasosa e de alto desempenho (HPLC) que são métodos de maior precisão que a camada delgada. Este trabalho de

SAKAGUCHI e KANT (13) entretanto, não inclui a espectrofotometria U.V.

Nesta pesquisa é preconizado o método de determinação quantitativa do esteviosídeo por espectrofotometria U.V. em 208nm, em álcool etílico, por se tratar de um método rápido, econômico e preciso.

#### MATERIAL E MÉTODO

O material em estudo constitui-se no esteviosídeo extraído de *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni, cultivada junto ao Departamento de Fitotecnia no Campus da UFSM.

A extração do esteviosídeo baseou-se no método de KHODA (8), modificado. A planta seca, moída e pesada foi submetida a extração com metanol a 70%. O resíduo, então, foi concentrado e lavado com éter sulfúrico, sendo a fração aquosa extraída com n-butanol. A fração butanólica foi concentrada e o resíduo submetido a recristalizações sucessivas em metanol, até se obter o esteviosídeo padrão.

A identificação e caracterização do produto foram feitas pela determinação do Intervalo de fusão, do Rf e pela espectroscopia no U.V.

O Rf foi determinado por cromatografia em camada delgada em sílica gel, o eluente empregado foi butanol:metanol:água (8:1:1), e o revelador iodo.

As determinações quantitativas dos esteviosídeos foram feitas por espectrofotometria no U.V., confeccionadas as retas de calibração com os padrões analíticos e aplicado o método dos quadrados mínimos.

Foram testados vários solventes para a diluição dos esteviosídeos como o dioxano, álcool e a água desionizada.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento de extração, após sucessivas recristalizações em metanol, em relação a quantidade de planta utilizada para a extração foi de 2,58%. A importância desta extração está, não no seu rendimento mas, na pureza do produto obtido, pois o objetivo deste trabalho é a obtenção de padrões analíticos. Os padrões obtidos em comparação com os padrões analíticos importados tiveram um índice de 99,98 - 99,99% de pureza.

O intervalo de fusão para os esteviosídeos padrões obtidos foi de 197 - 200°C em concordância com a padrão de referência que é de 196 - 198°C.

O Rf dos cromatogramas foi 0,58.

Os espectros de absorção no U.V. apresentaram absorção máxima em 205nm quando o solvente foi a água desionizada. Este espectro

está na Figura nº 1. A absorptividade molar  $\epsilon = 2612,9 \text{ mol/l.cm}$ .

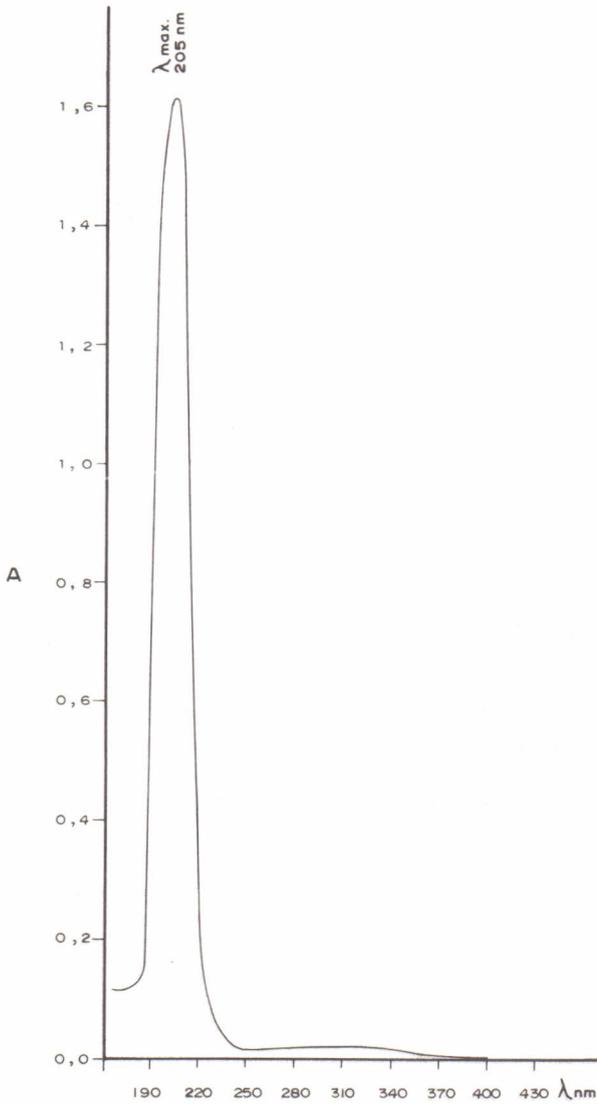


Figura 1. Espectro de absorção do esteviosídeo padrão (50mg%) em água desionizada em 205nm.

O pico de absorção máxima em álcool etílico para os padrões foi em 208nm de acordo com a Figura nº 2. A absorptividade molar  $\epsilon = 4245,7 \text{ mol/l.cm}$ .

Em dioxano o  $\lambda_{max}$  foi em 250nm, como mostra a Figura nº 3.

A absorptividade molar  $\epsilon = 204,1 \text{ mol/l.cm.}$

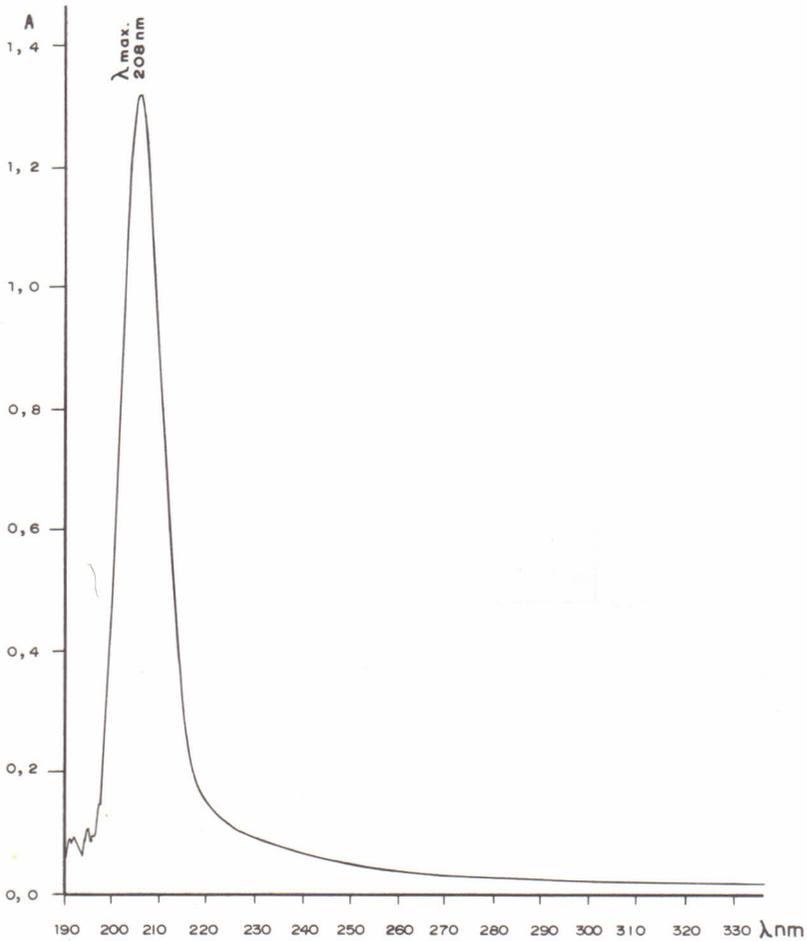


Figura 2. Espectro de absorção do esteviosídeo padrão (25%) em álcool etílico em 208nm.

As soluções aquosas são muito instáveis não apresentando boa reprodutibilidade de resultados enquanto que as soluções alcoólicas são estáveis por vários dias. O dioxano apresenta o valor da absorptividade molar muito baixo.

A reta de calibração para a determinação quantitativa (Figura nº 4), foi confeccionada com os esteviosídeos padrões obtidos, em 208nm usando o álcool etílico como solvente. Os dados experimentais para aplicação do método dos quadrados mínimos, estão na Tabela I.

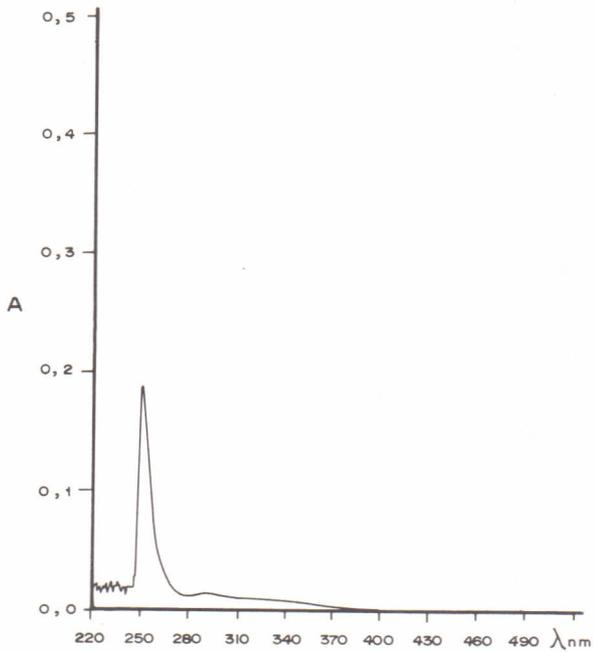


Figura 3. Espectro da absorção do esteviosídeo padrão (20m%) em dióxido de carbono em 250nm.

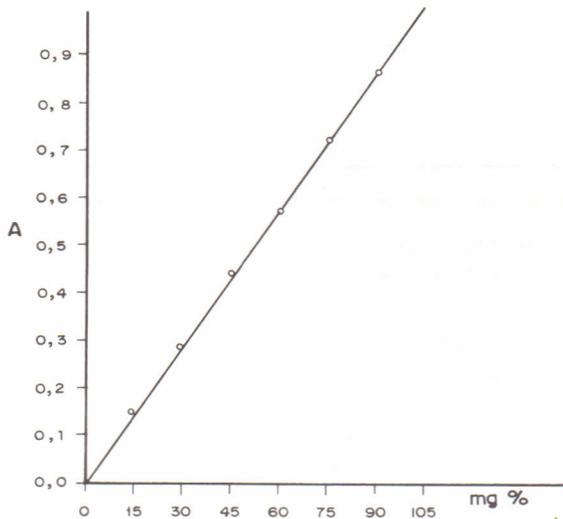


Figura 4. Reta de Calibração para determinação de esteviosídeos em álcool etílico.

TABELA I. DADOS EXPERIMENTAIS DA RETA DE CALIBRAÇÃO PARA A APLICAÇÃO DO MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS.

Sol. nº	Absorbância y	Conc.g% x	x <sup>2</sup>	y <sup>2</sup>	xy
1	0,15000	0,01500	0,000225	0,02250	0,002250
2	0,29000	0,03000	0,000900	0,08410	0,008700
3	0,44000	0,04500	0,002025	0,19360	0,019800
4	0,57500	0,06000	0,003600	0,33060	0,034500
5	0,72500	0,07500	0,005625	0,52560	0,054370
6	0,86000	0,09000	0,008100	0,73960	0,077400
y=3,04000    x=0,31500    x <sup>2</sup> =0,02047    y <sup>2</sup> =1,89600    xy=0,19702					

Os dados calculados foram:  $a=0,00077$ ,  $s(a)=0,002806$ . A significância de (a) foi avaliada pelo Teste "t" student para 0,05% e 5 graus de liberdade  $t_{(5)tabela}=2,571$  e o  $t_{(5)encontrado}=0,2$ , portanto o "t" é não significativo. A precisão absoluta = 0,00080 e a precisão relativa = 1,5%.

A precisão relativa do método é muito boa, pois segundo AYRES (1) os métodos espectrofotométricos não devem apresentar erros relativos superiores a 5%.

#### CONCLUSÕES

1. Os parâmetros estabelecidos para a caracterização dos padrões analíticos foram: intervalo de fusão de 197 - 200°C; Rf dos cromatogramas ao redor de 0,58; pico máximo de absorção em 208nm em álcool etílico; absortividade molar superior a 4000 em 208nm.

2. O método proposto para a determinação quantitativa de esteviosídeos por espectrofotometria no U.V. em 208nm, usando o álcool etílico como solvente, apresentou uma precisão relativa muito boa. O valor de "t" não significativo demonstra a falta de vício, comprovando a eficiência do método.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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*. São Paulo, Universidade de São Paulo, Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, 1979, 78f. Tese doutorado Ciência dos Alimentos.
2. AYRES, G.H. *Análisis Químico Cuantitativo*. Harper & Row Publishers Inc., Buenos Aires, 1968, p 486-490.

3. BRIDEL, M. & LAVIELLE, R. Sur le principe sucré des feuilles de Kaā-hē-ē (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Compt. Rend., Acad.Sci. Paris*, 192: 1123-1125, 1931.
4. CHEN, W.S. & YEH, C.S. Preliminary report on the examination of stevioside by high - pressure liquid chromatography. *T'ai - Wan T'ang Yeh Yen so Yen Chiu Hui Pao*. Taiwan, 79:43-48, 1978.
5. GATONI, L. et alii. Una planta silvestre nativa del Paraguay (*Stevia rebaudiana* Bert.) Instituto Agronômico Nacional del STICA. Assuncion, Paraguay. Setiembre de 1945. 5p. (datilo grado).
6. HASHIMOTO, Y. et alii. High - performance liquid chromatographic determination of *Stevia* components on a hydrophilic packed column. *J.Chromatog.*, Amsterdam, 161: 403-405, 1978.
7. HODGES, J.E. & UNGLETT, G.E. Structural Aspects of Glisocidic Sweeteners containing (1'2) - Linked Disaccharides. In: IN GLETT, G.E. *Symposium Sweeteners*. The Avi Publishing Company. Inc. Connecticut, p 216-234, 1974.
8. KHODA, H. et alii. New swet dipertene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*, Oxford, 15: p. 81-983, 1976.
9. MITSUHASHI, H.; UENO, J. & SUMITAT, T. Studies on cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Determination of stevioside. *Yaku gaku Zasshi*, Tokio, 95(1): 127-130, 1975.
10. \_\_\_\_\_. Studies on the cultivation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Determination of stevioside II. *Yakugaku Zasshi*, Tokio, 95(12): 1501-1503, 1975.
11. RASENACK, P. Über die süsstoffe des *Eupatorium rebaudianum* un des süssholzes *Arb. Kaiserl. Gesundh*, Deutschland, 28: 420-443, 1908.
12. REBAUDIO, O. Nota sobre el Kāa-hē-ē. *Rev.Quim.Farm.*, Buenos Aires, 2, 3, 4, 1980.
13. SAKAGUCHI, M. & KANT, T. As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni e o esteviosídeo, *Ciência e Cultura*, 34 (2): 235-248, 1982.
14. SAKAMOTO, I. et alii. Quantitative analysis of stevioside. *Yaku gaku Zasshi*, Tokio, 95 (12): 1507-1510, 1975.
15. SUGISAWA, H.; KASAI, T. & SUSZI, H. The modified quantitative analysis of stevioside. *Nippon Nogri Kagaku Kaishi*, Tokio, 51(3):175-177, 1977.
16. WOOD, J.R. et alii. Stevioside III. The anomeric 2,3,4,6 - tetra-o-acetyl-1-o-mesitoyl-o-glucopyranoses and their behavior with alkali. *J.Am.Chem.Soc.*, Philadelphia, 78: 207-210, 1956.

Recebido em novembro, 1985; aceito em dezembro, 1985.