

DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* DE EXTRATO METANÓLICO MICROENCAPSULADO DE *STEVIA REBAUDIANA*

Simone Rocha Ciotta¹, Fabiane Hodas², Maria Rosa Trentin Zorzenon¹, Djéssica Tatiane Raspe¹, Paula Gimenez Milani⁴, Silvio Claudio da Costa⁴

¹Acadêmica do Curso de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Bolsista CNPq. simone.ciotta@hotmail.com; mariariosazorzenon@hotmail.com;

²Acadêmica do Curso de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Bolsista PIBIC/CNPq. fabiane.hodas@gmail.com

⁴Docente, Pesquisador, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá – UEM. pgmfernandes2@uem.br; sccosta@uem.br

RESUMO

Stevia rebaudiana é um arbusto perene pertencente à família Asteraceae e além de conter adoçantes naturais, possui também uma mistura complexa de compostos de baixo peso molecular dentre eles fenólicos, terpenóides e flavonoides, os quais apresentam propriedades antioxidantes e tornam extratos de *Stevia* possíveis como aditivos alimentares. Sendo assim o objetivo deste trabalho foi avaliar por meio da simulação da digestão *in vitro* em diferentes condições (boca, estômago e intestino), a biodisponibilidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos metanólico livre e microencapsulado obtido das folhas de *Stevia rebaudiana*. Foram simuladas separadamente cada condição de digestão (boca, estômago e intestino) com o extrato metanólico livre e com o microencapsulado, das quais foram retiradas alíquotas e destas foram analisados o teor de compostos fenólicos totais bem como a atividade antioxidante. Resultados mostraram uma maior biodisponibilidade de compostos fenólicos para o extrato metanólico microencapsulado em todas as condições de digestão analisadas. Quanto à atividade antioxidante, não foram notadas perdas ao se comparar o extrato livre e microencapsulado em ambas as condições do estômago. Nas demais condições, notou-se uma maior atividade antioxidante das microcápsulas, o que sugere que de fato a microencapsulação foi efetiva no impedimento de degradação dos compostos bioativos durante o processo de digestão *in vitro*, podendo ser considerada eficiente na proteção desses compostos visando a possível incorporação destes à alimentos funcionais.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade Antioxidante de extrato de *Stevia*; Biodisponibilidade de extrato de *Stevia*; biodisponibilidade de compostos fenólicos.

1. INTRODUÇÃO

Stevia rebaudiana é um arbusto perene pertencente à família Asteraceae conhecido principalmente por possuir em sua composição glicosídeos de esteviol, compostos edulcorantes com potencial dulçor superior ao da sacarose. Além de conter adoçantes naturais, a *Stevia* possui uma mistura complexa de outros compostos de baixo peso molecular, dentre eles fenólicos, terpenóides, ácidos graxos, vitaminas, minerais, ácido cinâmico e derivados, álcoois e poliois, fenilpropanóides e aminoácidos (FORMIGONI et al., 2018). Extratos de folhas de plantas ricos em compostos polifenólicos têm atraído grande interesse comercial para o desenvolvimento alimentos funcionais devido aos seus potenciais benefícios para a saúde humana (ALVAREZ-HENAO et al., 2018). Devido à presença desses compostos, particularmente flavonoides os quais apresentam propriedades antioxidantes, extratos de *Stevia* tornam-se possíveis como aditivos alimentares (SHUKLA et al., 2009).

Entretanto, estes compostos são sensíveis à fatores ambientais como luz solar, oxigênio, umidade e calor, e alterações de pH que acabam os degradando. A fim de preservar a estrutura desses compostos e protegê-los de possíveis modificações indesejáveis, aplica-se o processo de microencapsulação. (CHEN et al., 2019). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar por meio da simulação da digestão *in vitro* em diferentes condições (boca, estômago e intestino), a biodisponibilidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos metanólico livre e microencapsulado obtido de folhas de *Stevia rebaudiana*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAL DE PARTIDA

Foram utilizados clones de *Stevia rebaudiana* da variedade seminal UEM 13 cultivada no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais – NEPRON da Universidade Estadual de Maringá, os quais foram coletados na fase de máximo crescimento vegetativo. As plantas colhidas foram secas em estufa a 60°C, e posteriormente as folhas foram separadas dos caules e ramos. Uma vez secas, as folhas foram moídas e acondicionadas em sacos de polietileno.

2.2. OBTEÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO LIVRE E MICROENCAPSULADO

Folhas de *Stevia* secas e moídas (100 g) foram colocadas em aparelho *Soxhlet* para extração até exaustão. Adicionou-se 600 mL de metanol P.A e o sistema montado foi submetido a aquecimento por oito horas (primeira extração). Após, o extrato obtido foi retirado e acrescentou-se novamente 600 mL do solvente. O sistema permaneceu em aquecimento por quatro horas (segunda extração). Os extratos obtidos nas duas extrações foram reunidos, filtrados e secos em rotaevaporador (marca Büchi) para obtenção do extrato metanólico livre.

A microencapsulação deste extrato metanólico foi realizada segundo metodologia de CHRANIOTI et al. (2015), com modificações. Adicionou-se o extrato, água destilada e maltodextrina na proporção de 1:4 m/m, sob agitação constante em agitador magnético até completa dissolução. A secagem foi feita por Spray Dryer, sendo a temperatura do ar de entrada de 176°C e do ar de saída de 100°C. O pó obtido foi coletado e armazenado em dessecador contendo sílica gel, em temperatura ambiente e ao abrigo de luz até análises posteriores.

2.3. SIMULAÇÃO DA DIGESTÃO *IN VITRO*

As amostras foram submetidas a digestão *in vitro* a fim de avaliar a biodisponibilidade dos compostos fenólicos e atividade antioxidante durante uma simulação de digestão. As soluções de digestão da boca, gástrico e intestino foram preparadas separadamente em condições específicas para simulação ideal conforme AHMAD et al. 2018. A solução simulada de saliva foi preparada pela dissolução de 0,2 % de α -amilase em tampão fosfato de sódio (pH = 6,8). O suco gástrico simulado (SGJ) foi preparado dissolvendo 3 g/L de pepsina em solução de NaCl (9 g /L) e o pH foi ajustado para 3,0 com HCl. Já o suco intestinal simulado (JIS) foi preparado dissolvendo-se 3 g/L de sais biliares e 10 g/L de pancreatina em solução tampão fosfato de sódio e o pH foi ajustado para 8. Os extratos metanólico livre e microencapsulado (50 mg) foram colocados em diferentes frascos de 125 mL e incubados a 37 °C sob agitação constante. As amostras foram digeridas separadamente e alíquotas de 1 ml foram retiradas dos fracos da condição: boca – após 5 minutos de reação; estômago – após 30 e 60 minutos de reação; intestino – após 2h e 4h de reação. Todas as alíquotas foram centrifugadas a 3400 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado com filtro de membrana de 0,22 μ m. Os compostos fenólicos e atividade antioxidante após a digestão foram quantificados. Os resultados foram expressos em percentual de biodisponibilidade.

2.4. FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os compostos fenólicos foram quantificados pelo reagente Folin-Ciocalteu. Foram adicionados em tubo de ensaio 150 μ L do reagente, 150 μ L da amostra e 2400 μ L de água. A solução foi misturada por agitação e reagiu por 3 minutos. Em seguida, foram adicionados

300 μL de 1N Na_2CO_3 e agitou-se novamente em Vortex. A solução foi incubada em temperatura ambiente por 2h ao abrigo de luz. A absorbância foi medida a 725 nm e a concentração de fenólicos totais foi expressa em μg de equivalente de Trolox ($\mu\text{E.Trolox}$) por mg de amostra determinada pela curva de calibração de Trolox (5-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

A atividade sequestrante das do extrato livre e microencapsulado e do extrato foram medidas pela capacidade de eliminação de radicais DPPH como sugerido por AHMAD et al. (2018).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Gráfico 1 apresenta o percentual de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante presente no extrato metanólico livre (EML) e microencapsulado com maltodextrina (EMM) após a simulação de digestão (boca, estômago e intestino).

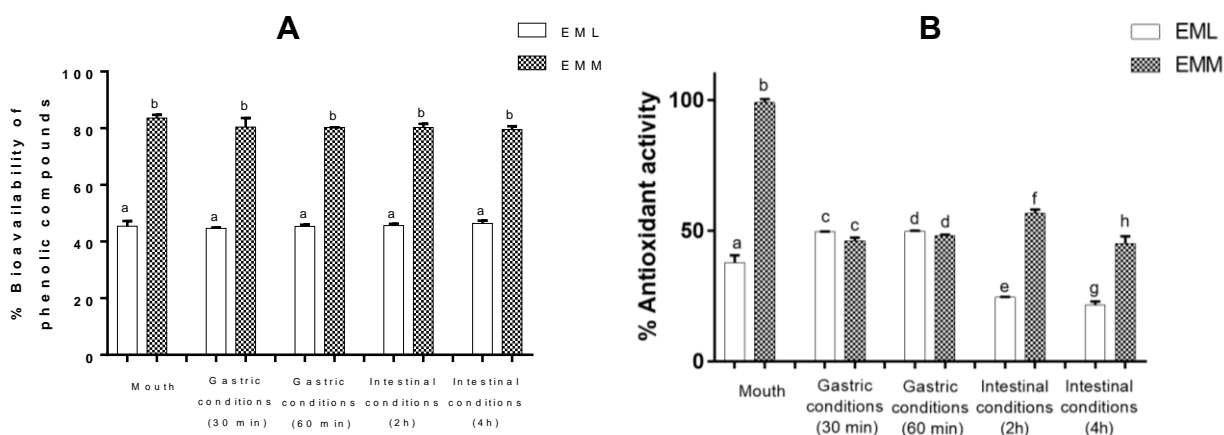


Gráfico 1. Percentual de compostos fenólicos totais (A) e atividade antioxidante (B) após a digestão *in vitro*. Letras diferentes para cada condição (boca, estômago e intestino) apresentam diferença significativa ($p < 0.05$).

Fonte: Dados da pesquisa

Ao se analisar o percentual de biodisponibilidade de compostos fenólicos, foi notada diferença significativa entre o extrato metanólico livre e o microencapsulado em todas as condições analisadas: boca, estômago e intestino. Dentre essas condições, a maior perda de compostos fenólicos do extrato livre ocorreu na boca, enquanto do extrato microencapsulado, no estômago (1h).

Já quanto à atividade antioxidante, tiveram diferenças significativas os extratos livre e microencapsulado das seguintes condições: boca, intestino (2h) e intestino (4h), e a maior porcentagem de perda de atividade ocorreu na condição intestino (4h) tanto para o extrato livre quanto para o microencapsulado.

É possível notar também, uma tendência de aumento na atividade antioxidante quando comparados os extratos microencapsulados das condições estômago (1h) e intestino (2h). Tal fato pode ser explicado pois, embora polifenóis sejam altamente sensíveis, alguns destes compostos podem ser transformados em diferentes formas estruturais e manterem a sua atividade como antioxidantes. (PINACHO et al., 2015).

Com estes resultados é possível notar maiores valores de biodisponibilidade de compostos fenólicos com o extrato microencapsulado quando comparados ao extrato livre, ou seja, houve uma maior preservação de compostos fenólicos no extrato microencapsulado. Isto sugere que a microencapsulação seja de fato protetora destes compostos contra a degradação causada por variações de pH pelas quais estes compostos foram submetidos durante a simulação da digestão.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados expostos mostraram que a biodisponibilidade de compostos fenólicos foi maior no extrato metanólico microencapsulado em todas as condições analisadas. Quanto à atividade antioxidante, não foram notadas perdas ao se comparar o extrato livre e microencapsulado em ambas as condições do estômago. Nas demais condições, notou-se uma maior atividade antioxidante das microcápsulas. Assim, conclui-se que a microencapsulação diminuiu a degradação dos compostos bioativos no processo de digestão, sendo considerada eficiente na proteção destes compostos e facilitando a possibilidade de incorporá-los à alimentos funcionais.

REFERÊNCIAS

AHMAD, M.; ASHRAF, B.; GANI, A. and GANI, A. 'Microencapsulation of saffron anthocyanins using beta glucan and beta cyclodextrin: Microcapsule characterization, release behaviour & antioxidant potential during in-vitro digestion', **Int J Biol Macromol**, 109, pp. 435-442, 2018.

ALVAREZ-HENAO, M. V.; SAAVEDRA, N.; MEDINA, S.; JIMENEZ CARTAGENA, C.; ALZATE, L. M. and LONDONO-LONDONO, J. 'Microencapsulation of lutein by spray-drying: Characterization and stability analyses to promote its use as a functional ingredient', **Food Chem**, 256, pp. 181-187, 2018.

CHEN, L.; GNANARAJ, C.; ARULSELVAN, P.; EL-SEEDI, H. and TENG, H. 'A review on advanced microencapsulation technology to enhance bioavailability of phenolic compounds: Based on its activity in the treatment of Type 2 Diabetes', **Trends in Food Science and Technology**, 85, pp. 149-162, 2019.

CHRANIOTI, C.; CHANIOTI, S.; TZIA, C. Microencapsulation of steviol glycosides (Stevia rebaudiana Bertoni) by a spray drying method – Evaluation of encapsulated products and prepared syrups. **International Journal of Food Studies**, v. 4, p. 212-220, 2015.

FORMIGONI, M.; MILANI, P. G. M.; DACOME, A. S.; AVINCOLA, A. S.; BENOSSI, L.; SANTOS, V. J.; PILAU, E. J. and COSTA, S. C. Pretreatment with ethanol as an alternative to improve steviol glycosides extraction and purification from a new variety of stevia. **Food Chemistry**, 241(15), 452-459, 2018.

LIMA-FILHO, O. F de; VALOIS, A. C. C.; LUCAS, Z. M. (Ed.). Estévia. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Steviafarma Industrial S/A., 2004. 51 p. (**Embrapa Agropecuária Oeste**. Sistemas de Produção, 5).

PINACHO, R.; CAVERO, R. Y.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. and CALVO, M. I. 'Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of in vitro digestion on their antioxidant capacity', **Journal of Functional Foods**, 19, pp. 49-62, 2015.

SHUKLA, S.; MEHTA, A.; BAJPAI, V. K. and SHUKLA, S. 'In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert', **Food Chem Toxicol**, 47(9), pp. 2338-43, 2009.

TADHANI, M. B.; PATEL, V. H.; SUBHASH, Rema. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 3-4, p. 323-329, 2007.