

PESQUISA DE ADOÇANTES NÃO CALÓRICOS SINTÉTICOS EM ADOÇANTE NATURAL  
DE *Stevia rebaudiana* (BERT.) BERTONI\*

Investigation of synthetic sweeteners in  
*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni natural sweetener

MARIANGELA T. AURICCHIO\*\*; MÔNICA A. BATISTIC\*\*; VÂNIA R. HOPPEN\*\* e ISAU  
RA Y. YAMASHITA\*\*

*Foram analisadas 19 amostras de "Adoçantes Naturais de Stevia", tendo por objetivo verificar-se a presença de outros adoçantes não calóricos sintéticos que não são declarados no rótulo do produto. Constatou-se que em 18 amostras, além de componentes do extrato de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, a sacarina estava presente e que só uma delas declarava tal fato no rótulo. Em três dessas amostras foi encontrado também aspartame e em uma, ciclamato. Finalmente, em uma amostra não foi encontrado nenhum componente do extrato de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, mas sim uma mistura de manitol e aspartame.*

UNITERMOS: *Cromatografia em camada delgada de extrato de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni; sacarina; ciclamato; aspartame; manitol.*

#### INTRODUÇÃO

"Stévia", planta de sabor doce, nativa do Paraguai e áreas limítrofes do Mato Grosso do Sul, já era utilizada pelos indígenas devido ao seu sabor doce, motivo pelo qual era chamada pelos guaranis de Ka'a ha'e (1,8).

Em 1889 o botânico Bertoni, descreveu o Ka'a ha'e como uma nova espécie do gênero *Eupatorium*, chamando-a *Eupatorium rebaudianum*.

Em 1901 o Jardim Botânico de Kew, na Inglaterra recebeu amostras e

Trabalho realizado no Instituto Adolfo Lutz - Av. Dr. Arnaldo, 355 - Caixa Postal 7027 - São Paulo, SP - Brasil.

Seção de Farmacognosia da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz.

e informações do *Eupatorium* fornecidas pelo consul Inglês em Assunção.

O próprio Bertoni, em 1905, ratificou a classificação da planta e a designou então de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Os estudos para se conhecer os componentes químicos da "Stévia" iniciaram-se em 1900, com Rebaudi e prosseguiram, até que em 1931 BRIDEL e LAVIELLE(1), na França, isolaram e purificaram o esteviosídeo.

O poder adoçante do esteviosídeo é apresentado como sendo de 200 a 300 vezes maior do que o da sacarose (1,9,13), o que o caracterizou como um adoçante não calórico. Esta propriedade despertou então, o interesse de se utilizar tanto a planta de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, como seus componentes purificados em dietas de substituição da sacarose.

Surgiu entre nós preparações apresentadas como "Adoçante Natural de Stévia", ou então "Stévia D<sub>1</sub>", utilizando-se, neste último caso da terminologia homeopática. Tais preparações são obtidas da incorporação do extrato de Stévia em manitol e utilizada às colheradas, e usadas em substituição ao açúcar.

O presente estudo, contudo, teve por objetivo a verificação qualitativa de Stévia e de outros adoçantes não calóricos e não declarados na fórmula do produto, mas que poderiam estar presentes na preparação.

Embora a literatura nos apresente várias técnicas analíticas de detecção dos princípios ativos da Stévia, como cromatografia em fase gasosa(10), HPLC (13), UV (1) e IR (1), foi escolhida a Cromatografia em Camada Delgada (9), por se adequar às nossas condições de trabalho, introduzindo-se uma modificação no revelador empregado, por se tratar o esteviosídeo de um glicósido diterpênico. O mesmo critério se aplicou com relação aos outros adoçantes pesquisados, dessa forma a detecção de sacarina, ciclamato, aspartame (4,7,11,16), ocorreu por CCD, embora métodos altamente sofisticados estejam descritos na literatura (3,4,5,13,14).

Nosso objetivo foi verificar a fraude que ocorre nestas preparações, pois os rótulos na grande maioria dos casos não mencionam a presença de sacarina e outros adoçantes não calóricos sintéticos.

#### MATERIAL E MÉTODO

Foram analisadas 19 amostras de adoçantes de Stévia, no período de um ano. Parte dessas amostras foi colhida pelo Serviço de Fiscalização e parte foi recebida pela seção para análises de orientação, sendo que qua

tro destas não se apresentavam na embalagem final de comercialização.

— Método para Detecção Qualitativa de Extrato de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni

Conforme foi assinalado anteriormente, a detecção dos componentes do extrato de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, utilizou-se placas de silicagel G 60 (9), com fase móvel n-butanol:metanol:água (8:1:1) com desenvolvimento único, ascendente de 15cm, com saturação total da cuba. Para visualização utilizou-se solução de anisaldeído sulfúrico, por se tratar o esteviosídeo de glicósido diterpênico, ao invés da revelação pelo Iodo, conforme descrito por RUTH LEVI (9). As placas foram aquecidas à 110°C por 10 min e o perfil cromatográfico pode ser observado através de manchas azuladas e azul-esverdeadas.

Preparo das Amostras em pó — À 2g da amostra foram adicionados 3ml de água, seguido de agitação com bastão de vidro e filtração

Preparo das Amostras Líquidas — Aplicar diretamente sobre a placa a solução da amostra.

Preparo do Padrão — Foram utilizados dois tipos de padrão para comparação com as amostras:

- 1 - Esteviosídeo isolado e purificado;
- 2 - Extrato obtido das folhas — moer aproximadamente 2g de folhas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni e preparar um extrato por percolação, usando uma mistura hidroalcoólica a 70°C, recolhendo aproximadamente 20ml de extrato.

Aplicou-se na placa amostra e padrão, observando-se o perfil cromatográfico e a intensidade das manchas obtidos para ambos.

— Método para Detecção Qualitativa de Adoçantes Não Calóricos

As técnicas utilizadas, de um modo geral, foram aquelas já mencionadas na literatura especializada (4,11,16), com modificações nos métodos de extração.

Preparo da Amostra — Transferir aproximadamente 3g do pó para um funil de separação adicionando 20ml de água, 5ml de ácido sulfúrico 3N e extrair com três porções de 50ml de acetato de etila. Filtrar por algodão embebido em acetato de etila e sulfato de sódio anidro. Evaporar à secura utilizando corrente de ar, sem aquecimento. Ressuspender o resíduo em 1ml de álcool diluído 1:1.

Foram utilizados padrões de sacarina sódica p.a. e ciclamato de cálcio p.a., separadamente, e misturados, compondo-se um padrão de mistura de ambos, dissolvidos em álcool 1:1.

Para a detecção da sacarina foi usada placa de Silicagel G, e como fase móvel, acetona: solução aquosa de hidróxido de amônio à 10%: acetato de etila (8:1:1), tendo-se desenvolvido o cromatograma em percurso único, ascendente de 15cm, a revelação foi obtida com reativo de nitrato de prata\*, seguido de aquecimento em estufa à 105°C por 5 minutos, e posterior aplicação do reativo de pirogalol\*\*. A sacarina aparece como manchas brancas sobre fundo cinza escuro (Rf - 0,53).

\* Reativo de Nitrato de Prata

Nitrato de prata .....	170 mg
Água destilada .....	0,5 ml
Solução de hidróxido de amônia à 10% .....	1,25ml
Etanol p.a. ....	50 ml

\*\* Reativo de Pirogalol

Pirogalol .....	50 ml
Etanol p.a. q.s.p. ....	50 ml

— Detecção Qualitativa do Ciclamato

Empregar placas de Silicagel H (4,11). No caso de serem preparadas, as placas não devem ser secas na estufa e sim à temperatura ambiente e usadas dentro de 36 horas (4). Como fase móvel foi empregado n-butanol: álcool etílico: hidróxido de amônia: água (40:4:1:9), e após desenvolvimento único, ascendente com percurso de 15cm, com saturação total da cuba. Revelou-se o cromatograma aplicando-se na placa, primeiramente, uma solução de Bromo em clorofórmio à 5% v/v e a seguir, solução de Fluoresceína à 0,25% em mistura de dimetilformamida: álcool (1:1).

O ciclamato aparece como uma mancha rósea em fundo amarelo-esverdeado (Rf - 0,47).

As amostras foram também submetidas à cromatografia em camada delgada tendo sido apenas dissolvidas em um pequeno volume de água, e após filtração, alíquotas foram aplicadas nas placas para desenvolvimento do cromatograma.

tograma.

A detecção do ciclamato também foi realizada em tubo de ensaio segundo técnica de HARRISON e COOK (5), modificada pela adição de cloreto de bário após reação da amostra com nitrilo em meio ácido. Em caso de reação positiva, observava-se turvação pelo surgimento do sulfato de bário.

#### - Detecção do Aspartame (ester metílico da N-L - $\alpha$ -aspartil-L-fenilalanina)

As amostras foram dissolvidas em água, filtradas e o filtrado foi aplicado sobre placas de Silicagel G 60, comparativamente ao padrão de aspartame p.a., utilizando-se como fase móvel n-butanol:metanol:água (8:1:1), desenvolvimento único, ascendente de 15cm, com saturação total da cuba. O reagente cromogênico de revelação foi a ninhidrina (Solução A + Solução B) que após aquecimento à 110°C revelou o aspartame como uma mancha violeta (Rf - 0,3).

Para verificação do manitol como excipiente foram empregadas técnicas de LARA et al.(8) e VEIGA et al.(17) em cromatografia em papel.

#### RESULTADOS

Das 19 amostras estudadas, 18 apresentaram componentes do extrato de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni e sacarina. Destas, três apresentaram também aspartame, e uma ciclamato. Em uma única amostra foi constatada apenas a presença de aspartame (Tabela 1).

#### DISCUSSÃO

Durante a execução do estudo, observou-se que no preparo das amostras para a detecção da sacarina pode-se alternativamente dispensar a extração com acetato de etila em meio ácido, podendo-se simplesmente dissolver a amostra em água, da mesma forma como o realizado para identificação dos componentes do extrato de *Stevia*, e que ainda com esta solução aquosa pode-se também identificar a presença de aspartame, o que é uma vantagem, pois com aproximadamente 2 gramas de amostra pode-se detectar estes três componentes. Porém, se a amostra contiver ciclamato juntamente com sacarina, deve-se fazer a extração preconizada anteriormente com acetato de etila em meio ácido, para evitar a interferência da sacarina na revelação do ciclamato.

O estudo realizado constatou que 94,74% dos "Adoçantes Naturais de *Stevia*" analisados continham sacarina na formulação e que destes, 94,44%

TABELA 1 - Extrato de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni e outros adoçantes não calóricos sintéticos em "Adoçantes de *Stevia*".

TABLE 1 -

AMOSTRA	COMPONENTES DA STEVIA	SACARINA	ASPARTAME	CICLAMATO
1	+	+	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	-	-
4	+	+	-	+
5	+	+	-	-
6	+	+	-	-
7	+	+	-	-
8	+	+	-	-
9	+	+	-	-
10	+	+	-	-
11	+	+	-	-
12	+	+	-	-
13	+	+	-	-
14	+	+	+	-
15	+	+	+	-
16	+	+	+	-
17	+	+	-	-
18	+	+	-	-
19	-	-	+	-

não declararam nas respectivas fórmulas inscritas nos rótulos. Não só a sacarina foi encontrada, mas também o aspartame, que em 16,67% das amostras estava presente juntamente com a sacarina e 5,56% continham também ciclamato. Apenas 5,26% das amostras analisadas declararam a presença de outro adoçante além do extrato seco de Stevia.

Em nenhuma das amostras analisadas obteve-se apenas o extrato de Stevia incorporado ao excipiente. O extrato seco de Stevia como já mencionado anteriormente, possui um alto poder adoçante e mesmo se usado numa alta diluição, teria um efeito adoçante significativo. O fato de ter-se encontrado outros adoçantes sintéticos nesses produtos, sugere que os mesmos contêm pouco extrato de Stevia e que foram adicionados dessas substâncias, a fim de se atingir o dulçor final desejado.

Outra irregularidade encontrada, foi a inexistência de registro junto ao órgão competente do Ministério da Saúde, que em portaria de 26 de janeiro de 1988, autoriza e normatiza o emprego de extrato purificado de folhas de Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni e do steviosídeo.

#### CONCLUSÃO

Os resultados obtidos mostram claramente que os critérios éticos para a manipulação e comercialização de fitoterápicos não estão sendo seguidos.

A Stevia tem sido utilizada como uma alternativa para adoçantes sintéticos, por tratar-se de um produto natural e não apresentar efeitos colaterais indesejáveis. Da forma como se apresentam (não atendendo às disposições legais vigentes da Lei de Vigilância Sanitária quanto aos dizeres de rotulagem, quanto à ausência de fórmula e registro no órgão competente do Ministério da Saúde) estes produtos levam o consumidor a acreditar que está ingerindo um produto natural, quando na verdade ele está consumindo aqueles mesmos adoçantes que pretendia evitar.

#### SUMMARY

Nineteen samples of Stevia Natural Sweeteners have been analysed aiming at the controlment of the presence of other synthetic sweeteners that are not declared on the label of the product. It was evidenced that in eighteen samples, saccharin was present besides the components of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni extract and that in only one of them such fact was stated on the label. Aspartame was found in three of these samples and

cyclamate in one of them. Finally, no component of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni extract was found in one of the samples, but a mixture of mannitol and aspartame was.

Key-words: Thin-layer chromatography of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni extract; saccharin; cyclamate; aspartame; mannitol.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ANGELUCCI, E. - O esteviósido de plantas brasileiras de Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni e a potencialidade de seu emprego em alimentos. Ensaio em formulações hídricas e carbonatadas. São Paulo, 1979. 76p. [Tese de doutoramento - Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP].
- 2 - BRASIL. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria SNVS/DINAL nº 14, de 10 set. 1986. Autoriza o uso do steviosídeo em alimentos e bebidas dietéticas... Diário Oficial da União, Brasília, 12 dez. 1986, sec. I, p.13770-771.
- 3 - BRASIL. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria MS/SNUS nº 14, de 26 de jan. 1988. Resolve autorizar o emprego de extrato de Stevia extraído das folhas da Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni... Diário Oficial da União, Brasília, 29 jan. 1988, sec. I, p.1860.
- 4 - FAO FOOD and nutrition paper. Manual of Food Quality Control, Rome, 14(2):104-13, 1980.
- 5 - HARRISON, A.J. & COOK, A. - The colorimetric determination of cyclamates in soft drinks and sweetening tablets. J.A.P.A., 7:42-6, jun., 1969.
- 6 - KÖNIG, H. - Trennung, nachweis und bestimmung der künstlichen süsstoffe cyclamat, dulcin und saccharin mittels gas-cromatografie. Z. Anal. Chem., 255:123-5, jan., 1971.
- 7 - KORBELAK, T. & BARTLETT, J.N. - The separation and identification of four synthetic sweeteners by thin-layer chromatography. J. Chromatog., 41:124, jan., 1969.
- 8 - LARA, W.H. & YABIKU, H.Y. - Método para identificação de sorbitol por cromatografia em camada delgada. Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, 34:79-81, 1974.
- 9 - LEVY, R.H.G. - Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni extraccion, purificacion y empleo del steviosídeo. Rev. INF. y B., 8(18):707-13, jun.,

1984.

- 10 - MITSUHASHI, H. et al. apud SAKAGUCHI, M. & KAN, A. As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni e o esteviosídeo. Ciência e Cultura, São Paulo, 34(2):235-47, fev., 1982.
- 11 - OFFICIAL methods of analysis of the A.O.A.C., 12th ed., Washington DC, 1975. p.376-82.
- 12 - PAGLIOSA, F.M. - Adoçantes de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni e seus derivados. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, 2., Campinas, 1982. ITAL, III 1-2 Resumos.
- 13 - SAKAGUCHI, M. & KAN, T. - As pesquisas japonesas com *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni e o esteviosídeo. Ciência e Cultura, São Paulo, 34(2):235-47, fev., 1982.
- 14 - SJOBERG, A.M.K. & ALANKO, T.A. - Liquid chromatographic determination of saccharin in beverages and sweets: NMKL collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70(1):58-60, 1987.
- 15 - TSANG, W.S. et al. - Determination of aspartame and its breakdown products in soft drinks by reverse-phase chromatography with UV detection. J. Agric. Food Chem., 33:734-38, 1985.
- 16 - VALDEHITA, M.T. & ALCÁDE, M.F. - Investigación de los edulcorantes sintéticos sacarina, dulcina y ciclamato en las bebidas analcohólicas. Anales de Bromatología, 22:255-65, 1970.
- 17 - VEIGA, L.A. & CHANDELIER, E.L. - Detection and differentiation of sugars on paper by the p-anisidine periodate reaction. Anal. Biochem., 20:419-22, sep., 1967.