

INFLUÊNCIA DE ESTRESSES NUTRICIONAIS NO TEOR E PRODUÇÃO DE ESTEVIOSÍDEO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA ESTÉVIA¹

OSCAR FONTÃO DE LIMA FILHO², EURÍPEDES MALAVOLTA³ e HELENA YUCO YABICO⁴

RESUMO - O trabalho apresenta os resultados referentes a dois experimentos: o primeiro em solução nutritiva, com o objetivo de avaliar a influência da deficiência de N, P, K, Ca, Mg, S, B e Zn, e da toxidez de B e Zn sobre o teor de esteviosídeo nas folhas de estévia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni). O objetivo do segundo experimento foi analisar a concentração e a quantidade de esteviosídeo ao longo do primeiro ciclo de crescimento da planta em condições de campo. Os ajustes matemáticos realizados visando determinar as correlações significativas permitem afirmar que apenas a deficiência severa de Ca provoca diminuição no teor do esteviosídeo. O teor de esteviosídeo, no campo, alcançou o valor máximo 30 dias após o transplante, com 8,2%. Daí em diante, houve queda na concentração, chegando a 6,0% 90 dias após o transplante. A maior taxa de produção de esteviosídeo, considerando-se a massa ou a área foliar preexistente, ocorreu antes do transplante, e entre 15 e 30 dias após o transplante. Ocorreu taxa de produção negativa de esteviosídeo nas folhas entre 30 e 45 dias após o transplante, período de crescimento vigoroso das inflorescências.

Termos para indexação: índice de produção, desordem nutricional, macronutrientes, boro, zinco, *Stevia rebaudiana*.

INFLUENCE OF NUTRITIONAL STRESS ON CONTENT AND PRODUCTION OF STEVIOSIDE DURING *STEVIA REBAUDIANA* DEVELOPMENT

ABSTRACT - This paper presents the results of two experiments about stevioside in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. In the first one the effects of the deficiencies of N, P, K, Ca, Mg, S, B and Zn as well as the B and Zn toxicity on the stevioside concentration in nutrient solution grown plants were evaluated. In the second trial the objective was to estimate the content of the stevioside produced during the first cycle of growth under field conditions. Only severe Ca deficiency caused reduction in the glycoside concentration. The content of stevioside under field conditions reached a maximum value 30 days after transplanting (dat), namely 8.2% which dropped to 6.0% at 90 dat. The highest production rate of the glycoside, taking into account either the preexisting total dry weight or leaf area, took place before transplanting and between 15 and 30 dat. During the interval of 30 to 45 dat, a period of vigorous growth of the inflorescences, there was a decrease in the stevioside production rate.

Index terms: production index, nutritional disorder, macronutrients, boron, zinc.

¹ Aceito para publicação em 10 de dezembro de 1996.

Extraído da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

² Eng. Agr., Dr., DRN/CCA-UFSCar, Caixa Postal 153, CEP 13600-970 Araras, SP. Bolsista do CNPq.

³ Eng. Agr., Dr., Pesquisador Permissãoário, CENA/USP, Caixa Postal 96, CEP 13400-970 Piracicaba, SP.

⁴ Química, M.Sc., Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902 São Paulo, SP.

INTRODUÇÃO

O gênero *Stevia* é exclusivo do continente americano, distribuindo-se do sudeste dos EUA ao norte da Argentina (Soejarto et al., 1983). A estévia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni), com propriedades medicinais e edulcorante, é nativa do norte do Paraguai, mas já foi coletada no Mato Grosso do Sul (Monteiro, 1982). Os princípios ativos edulcorantes são oito glicosídeos diterpênicos doces, dos quais o esteviosídeo e o rebaudiosídeo-A são os principais, sendo que os demais encontram-se em quantidades muito pequenas.

O esteviol, aglicona do esteviosídeo, é um diterpeno tetracíclico biologicamente ativo, com estrutura e ação semelhantes às das giberelinas (Felippe, 1977; Metivier, 1986). Outros compostos já foram isolados da estévia, como a rutina, flavonóide que possui aplicações terapêuticas como fortalecedora de vasos capilares e

propriedades cardiotônicas (Suzuki et al., 1976), fitosteróis (Nabeta et al., 1976), gomas (arábica e karaya) (Alvarez, 1984), óleos essenciais (Martelli et al., 1985; Tsanova et al., 1989), derivados diterpênicos (jhanol, austroinulina, labdano, esterebinas, etc) (Sholichin et al., 1980; Darise et al., 1983; Oshima et al., 1988), além de substâncias anti-bacterianas (Alvarez, 1984). Extratos aquosos das folhas têm efeito hipoglicemiante (Von Schmeling et al., 1977), molusquicida (Kawano & Simões, 1986), anticoncepcional - provavelmente devido a uma substância denominada apigenina (Crammer & Ikan, 1986). O esteviosídeo inibe o crescimento de microrganismos orais, reduzindo cáries dentárias (Sardesai & Waldshan, 1991), além de possuir efeito hipotensor e antiarrítmico (Humboldt & Boeckh, 1980). O isosteviol (isômero do esteviol) tem atividade inseticida, sendo ativo contra o *Aedes aegypti*. Esteviosídeo, rebaudiosídeo-A e isosteviol também mostraram efeito herbicida (Ikan et al., 1992). Vários trabalhos apresentam estudos da ação da estévia e seus compostos em diversas áreas.

Os objetivos deste trabalho são: avaliar a influência da deficiência ou toxidez de oito nutrientes sobre o teor de esteviosídeo nas folhas; estudar a concentração e a quantidade de esteviosídeo nas folhas, ao longo do primeiro ciclo de crescimento da estévia no campo.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento em casa de vegetação

As mudas de estévia utilizadas neste trabalho eram provenientes do campo experimental da Fundação Universidade Estadual de Maringá (FUEM). Para o estudo de cada nutriente foram utilizados quatro tratamentos, com quatro repetições, em um delineamento inteiramente casualizado. O critério para a escolha das concentrações dos nutrientes nas soluções nutritivas baseou-se em ensaios preliminares. As concentrações iniciais dos nutrientes (mM) nas soluções nutritivas, referentes a cada tratamento, são dadas a seguir: N - 0; 0,14; 0,53; 5,3; P - 0; 0,016; 0,032; 0,32; K - 0; 0,02; 0,13; 1,99; Ca - 0; 0,06; 0,20; 1,32; Mg - 0; 0,004; 0,02; 0,33; S - 0; 0,004; 0,015; 0,31; B - 0; 0,008; 0,025; 0,67; Zn - 0; 0,0006; 0,002; 0,053. A solução nutritiva, diluída a um terço, utilizada para o tratamento completo, foi a de Johnson et al. (1957), modificando-se apenas o teor de P à metade. A colheita ocorreu 97 dias após transplante, antes da floração, coincidindo com o maior desenvolvimento vegetativo.

Experimento de campo

O experimento foi conduzido em Latossolo Vermelho-Escuro, argiloso, a 23° 25' latitude sul e 51° 57' longitude oeste, a 550 metros de altitude, na Fazenda Experimental de Iguatemi, FUEM, Maringá, PR, entre os meses de fevereiro e maio de 1994. Mudas provenientes do próprio local, com 30 dias após semeadura, foram transplantadas para uma área de 225 m², com espaçamento de 50 x 20 cm. Manejo e tratos culturais foram os mesmos preconizados e realizados na produção comercial da cultura na região. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com as coletas sendo realizadas a cada 15 dias a partir do transplante, em um total de sete épocas de coletas aleatórias de plantas competitivas, com três repetições. Cada repetição consistiu de 40, 40, 40, 30, 20, 10 e 10 plantas, da primeira à sétima coleta, respectivamente.

Análises químicas

Foram realizadas as análises de N, P, K, Ca, Mg, S, B e Zn nas folhas, no ensaio em casa de vegetação, e de esteviosídeo nos dois ensaios. O preparo das amostras e as análises dos nutrientes do material vegetal foram feitos segundo os métodos descritos em Malavolta et al. (1989). O esteviosídeo foi extraído por infusão aquosa das folhas de estévia, como descrito a seguir: 200 mg de folhas secas e moídas foram colocadas em infusão em água quente (três vezes, com 7 mL, e uma vez, com 3 mL) e subseqüente centrifugação a 10.000 rpm por dez minutos. Os extratos foram juntados, e o volume, ajustado para 25 mL com água destilada. A extração descrita foi realizada através de modificação do método apresentado por Nishiyama et al. (1991). As análises de esteviosídeo foram realizadas segundo o método apresentado por Alvarez & Kusumoto (1987), utilizando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Eluente - acetonitrilo: água (85 : 15); fluxo - 1,5 mL min⁻¹; leitura - 210 nm; coluna - NH₂, temperatura - ambiente (25°C); loop de injeção - 20 mL; concentração do padrão - 0,5 mg mL⁻¹.

Neste trabalho são apresentados três índices relacionados à produção de esteviosídeo durante o ciclo de crescimento da estévia. Estes índices de produção são assim denominados: 1. Taxa de assimilação econômica líquida (TAEL); 2. Taxa de produção econômica relativa (TPER); 3. Taxa de rendimento da cultura (TRC).

TAEL = $[(e_2 - e_1)/(A_2 - A_1)] \cdot [(\ln A_2 - \ln A_1)/(t_2 - t_1)]$, dado em $\mu\text{g cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$.
 e_1, e_2 = quantidade de esteviosídeo nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente;

A_1, A_2 = superfície foliar total da planta nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente;

\ln = logaritmo neperiano.

$TPER = [(e_2 - e_1)/(M_2 - M_1)].[(\ln M_2 - \ln M_1)/(t_2 - t_1)]$, dado em $mg\ g^{-1}\ dia^{-1}$.

M_1, M_2 = massa foliar total da planta nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente.

$TCR = TAEI \times IAF$, dado em $g\ ha^{-1}\ dia^{-1}$.

IAF = índice de área foliar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra as correlações obtidas entre a análise de esteviosídeo (teor e quantidade), das folhas das plantas cultivadas em solução nutritiva, com os respectivos teores dos nutrientes em estudo. Os ajustes matemáticos realizados visando determinar as correlações significativas permitem afirmar que apenas a deficiência de Ca provocou diminuição no teor do glicosídeo analisado (Tabela 2). A variação na quantidade de esteviosídeo, em função dos níveis dos nutrientes, acompanhou a produção de matéria seca das folhas, exceção feita ao Mg, cuja deficiência não provocou diminuição na produção.

TABELA 1. Correlação entre o teor de nutrientes e a concentração ou quantidade de esteviosídeo nas folhas de estévia.

Nutriente	Teor de esteviosídeo		Quantidade de esteviosídeo	
	Ajuste	R ¹	Ajuste	R
Nitrogênio	13,614 - 0,078x	-0,137 ns	-245,75 + 37,79x	0,812**
Fósforo	4,940 + 1,679x	0,494 ns	-64,77 + 202,14x	0,745**
Potássio	5,322 + 0,231x	0,483 ns	-116,00 + 32,38x	0,763**
Cálcio	0,693 + 1,664x	0,790**	-319,01 + 155,69x	0,874**
Magnésio	9,540 + 0,087x	0,026 ns	708,60 - 262,87x + 75,17x ²	0,419 ns
Enxofre	13,837 - 4,701x	-0,387 ns	2507,1 - 3652,4x + 1480,5x ²	0,707*
Boro ²	6,067 + 0,104x	0,408 ns	-128,69 + 12,82x	0,869**
Boro ³	10,402 - 0,014x	-0,564 ns	444,49 - 0,852x	-0,684*
Zinco ²	3,395 + 0,182x	0,530 ns	22,47 + 9,32x	0,656 ns
Zinco ³	9,757 - 0,001x	-0,122 ns	436,74 - 0,52x	-0,784**

¹ Coeficiente de correlação: **=significativo a 1%; *= significativo a 5%; ns=não-significativo.

² Teores deficientes a normais.

³ Teores normais a tóxicos.

TABELA 2. Análise de variância do modelo $y = 0,693 + 1,664x$, onde y = teor foliar de esteviosídeo e x = teor de Ca nas folhas.

Fator de variação	GL	SQ	QM	F	Prob. > F
Regressão	1	104,790533	104,790533	16,5723982	0,00224684
Resíduo	10	63,2319667	6,32319667		
Total	11	168,0225			

Plantas com baixo nível de Ca nas folhas, variando de 1,9 $g\ kg^{-1}$ a 3,9 $g\ kg^{-1}$, possuíam 5,1% (C.V. = 23,3%) de esteviosídeo, em média. Plantas consideradas normais, do ponto de vista nutricional, com teores foliares de Ca variando de 4,8 $g\ kg^{-1}$ a 7,4 $g\ kg^{-1}$, possuíam 11,4% (C.V. = 35,5%) de esteviosídeo, portanto um aumento em torno de 120%. Devido à deficiência severa de Ca, verifica-se que o prejuízo na produção do edulcorante é muito maior que a simples queda na produção de massa foliar. O aumento de 194% na matéria seca das folhas devido à elevação no teor de Ca, dentro dos limites descritos anteriormente, correspondeu a um acréscimo de 612% na quantidade de esteviosídeo.

Os dados referentes ao teor e quantidade de esteviosídeo e à massa foliar, ao longo do ciclo da estévia no campo, são apresentados na Tabela 3. O teor de esteviosídeo alcançou o valor máximo 30 dias após transplante (dat) com 8,2%. A partir daí, houve uma queda na concentração, chegando a 6% aos 90 dat. A maior variação na quantidade ocorreu entre 15 e 30 dat, quando houve um aumento de quase 420%, enquanto

o aumento na massa foliar foi de 365%. Não houve variação na quantidade nos primeiros 15 dat. Entre 30 e 45 dat, a quantidade diminuiu cerca de 22%. Aos 60 dat, a quantidade de esteviosídeo era apenas 15% maior do que aos 30 dat, enquanto a massa foliar aumentou quase 30% no mesmo período. Portanto, nas condições e período de realização do ensaio, a melhor época para a coleta das folhas, objetivando a extração de esteviosídeo, foi aos 30 dat, pouco antes ou no início do florescimento.

TABELA 3. Teor (%) e quantidade (mg planta⁻¹) de esteviosídeo em folhas, e massa da matéria seca foliar (g planta⁻¹) durante o crescimento da estévia no campo.

Parâmetro	Dias após o transplante ¹						
	0	15	30	45	60	75	90
Teor	6,7 ab	5,8 b	8,2 a	7,0 ab	7,2 ab	6,2 b	6,0 b
C.V.(%)	0,9	14,1	1,2	1,2	5,8	16,6	12,5
Quantidade	26,7 c	26,7 c	138,0 ab	107,0 b	158,1 ab	174,5 a	177,7 a
C.V.(%)	0,9	8,0	0,9	10,7	23,5	9,0	16,4
Massa foliar	0,40 d	0,46 d	1,68 bc	1,53 c	2,17 b	2,81 a	2,95 a
C.V.(%)	0,0	6,2	1,7	4,9	12,7	6,2	15,3

¹ Médias seguidas por letras distintas diferem entre si a 5% pelo teste de Tukey.

A Tabela 4 apresenta os valores de três índices de produção, os quais foram denominados: Taxa de Assimilação Econômica Líquida (TAEL), Taxa de Produção Econômica Relativa (TPER) e Taxa de Rendimento da Cultura (TRC). Denominou-se TAEL ao ganho líquido de assimilados que foram metabolizados para a formação de esteviosídeo, por unidade de área e de tempo. A TPER leva em consideração a massa inicial e final das folhas, ao passo que a TRC é dependente da TAEL e do IAF, pois representa a taxa de produção de esteviosídeo da comunidade vegetal.

TABELA 4. Taxa de assimilação econômica líquida (tael), taxa de produção econômica relativa (tper) e rendimento da cultura (tcr), durante o crescimento da estévia.

Parâmetro ¹	Dias após o transplante						
	0	15	30	45	60	75	90
TAEL	61,3	0	59,7	-10,6	15,3	3,6	0,6
TPER	13,3	0	7,9	-1,3	1,9	0,4	0,1
TRC	361,7	0	1217,9	-197,2	402,5	122,8	21,4

¹ TAEL = $\mu\text{g cm}^{-2} \text{ dia}^{-1}$; TPER = $\text{mg g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$; TRC = $\text{g ha}^{-1} \text{ dia}^{-1}$.

A maior TAEL ocorreu entre a germinação e o transplante, e entre 15 e 30 dat, com valores similares. Em relação a TPER, o maior valor ocorreu no período anterior ao transplante, ao passo que em relação à TRC, o maior acúmulo de esteviosídeo por ha ocorreu entre 15 e 30 dat. A queda acentuada nas três taxas, no período compreendido entre 30 e 45 dat, decorreu do desenvolvimento acelerado das inflorescências, que se tornaram fortes drenos metabólicos. Apesar de bastante variáveis, as taxas apresentadas mostram uma tendência decrescente com a idade da planta.

CONCLUSÕES

1. A deficiência severa de Ca provoca diminuição no teor de esteviosídeo nas folhas.
2. O teor de esteviosídeo, no campo, alcança o valor máximo pouco antes ou no início do florescimento.
3. A maior taxa de produção de esteviosídeo, considerando-se a massa ou a área foliar preexistente, ocorre antes do transplante, e entre 15 e 30 dias após transplante.
4. Ocorre taxa de produção negativa de esteviosídeo entre 30 e 45 dias após transplante, período de crescimento vigoroso das inflorescências.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, processo nº 92/3222-6, e aos professores da Fundação Universidade Estadual de Maringá (FUEM) José Walter Pedrosa Carneiro e José Ozinaldo Alves de Sena pelo apoio e coleta do material de campo.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, M. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: estado atual do conhecimento. Maringá: FUEM. 1984. 118p.
- ALVAREZ, M.; KUSUMOTO, I.T. Análise quantitativa dos glicosídeos edulcorantes da *Stevia rebaudiana* e dos seus produtos de hidrólise através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.30, n.2, p.337-348, 1987.
- CRAMMER, B.; IKAN, R. Sweet glycosides from the stevia plant. **Chemistry in Britain**, London, v.22, p.915-918, 1986.
- DARISE, M.; KHODA, H.; MIZUTANI, K.; KASAI, R.; TANAKA, O. Chemical constituents of flowers of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.47, n.1, p.133-135, 1983.
- FELIPPE, G.M. *Stevia rebaudiana* Bert.: uma revisão. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.29, n.11, p. 1240--1248, 1977.
- HUMBOLDT, G.; BOECKH, E.M.A. Steviosídeo: efeitos cardio-circulatórios em ratos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 32, p.206-207, 1980. Suplemento.
- IKAN, R.; CRAMMER, V.; WEINSTEIN, V.; ZIV, Z. Sweet diterpene glycosides and their biological activity. **Israel Journal of Botany**, Jerusalem, v.41, p.106, 1992.
- JOHNSON, C.M.; STOUT, P.R.; BROYER, T.C.; CARLTON, A.B. Comparative chlorine requirements of different plant species. **Plant and Soil**, The Hague, v.8, p.337-353, 1957.
- KAWANO, T.; SIMÕES, L.C.G. Efeito da *Stevia rebaudiana* em *Biomphalaria glabrata*. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.46, n.3, p.555-562, 1986.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas; princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFÓS, 1989. 201p.
- MARTELLI, A.; FRATTINI, C.; CHIALVA, F. Unusual essential oils with aromatic properties. I. Volatile components of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v.1, n.1, p.3-7, 1985.
- METIVIER, J.R. Giberelinas. In: FERRI, M.G. (Coord.). **Fisiologia vegetal**. 2.ed. São Paulo: EPU, 1986. v.2, cap.5, p.129-161.
- MONTEIRO, R. Estudos taxonômicos em *Stevia* - Série *Multiaristatae* no Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.5, p.5-15, 1982.
- NABETA, K.; KASAI, T.; SUGISAWA, H. Phytosterol from the callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.40, n.10, p.2103-2104, 1976.
- NISHIYAMA, P.; KUSUMOTO, I.T.; COSTA, S.C.; ALVAREZ, M.; VIEIRA, L.G.E. Correlação entre os teores de carboidratos totais e de steviosídeo nas folhas de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.34, n.3-4, p.425-434, 1991.
- OSHIMA, Y.; SAITO, J.; HIKINO, H. Sterebins E, F, G and H, diterpenoids of *Stevia rebaudiana* leaves. **Phytochemistry**, Oxford, v.27, n.2, p.624-626, 1988.
- SARDESAI, V.M.; WALDSHAN, T.H. Natural and synthetic intense sweeteners. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v.2, p.236-243, 1991.
- SHOLICHIN, M.; YAMAZAKI, K.; MIYAMA, R.; YAHARA, S.; TANAKA, O. Labdane-Type diterpenes from *Stevia rebaudiana*. **Phytochemistry**, Oxford, v.19, p.326-327, 1980.
- SOEJARTO, D.D.; COMPADRE, C.M.; MEDON, P.J.; KAMATH, S.R.; KINGHORN, A.D. Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. **Economic Botany**, New York, v.3, p.71-79, 1983.

- SUZUKI, H.; IKEDA, T.; MATSUMOTO, T.; NOGUSHI, M. Isolation and identification of rutin from cultured cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.40, n.4, p.819-820, 1976.
- TSANAVA, V.P.; SARDZHVELADZE, G.P.; KHAREBAVA, L.G. Studies on the volatile of *Stevia rebaudiana*. **Subtropicheskie Kul'tury**, Rockville, v.3, p.73-77, 1989.
- VON SCHEMELING, G.A.; CARVALHO, F.V. de; ESPINOSA, A.D. *Stevia rebaudiana* Bertoni: avaliação do efeito hipoglicemiante em coelhos aloxanizados. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.29, n.5, p.599-601, 1977.