

ARTICULO ORIGINAL

Evaluación del contenido de estevióside y rebaudiósido A en una población de *Stevia rebaudiana* Bertoni (kaâ heê) cultivada comercialmente. Estudio preliminar**Evaluation of the content of stevioside and rebaudioside A in a population of *Stevia rebaudiana* Bertoni (kaâ heê) commercially cultivated. A preliminary study*****Jiménez T^I, Cabrera G^{II}, Álvarez E^{II}, Gómez F^{II}**^IInstituto Nacional de Tecnología y Normalización (INTN). Asunción-Paraguay^{II}Instituto Agronómico Nacional (IAN). Caacupé Paraguay**RESUMEN**

Stevia rebaudiana Bertoni (kaâ heê) es un arbusto originario de la Región Oriental de Paraguay. Sus hojas contienen glucósidos diterpénicos que producen un sabor dulce, pero sin valor calórico y son de 150 a 300 veces más dulces que la sacarosa (solución al 0,4%). Durante las temporadas agrícolas 1998 y 1999 se establecieron sembrados de selección individual, en el Instituto Agronómico Nacional (Caacupé, Paraguay). El objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de estevióside y rebaudiósido A en plantas seleccionadas en campo a fin de evaluar la variabilidad existente en la población e identificar clones con alto contenido de dichos glucósidos. De una población original de 2000 individuos, se seleccionaron fenotípicamente 140 plantas por características agronómicas superiores y se cosecharon en etapa de prefloración y libres de polinización. En los Laboratorios del Instituto Nacional de Tecnología Normalización y Metrología (INTN) fueron evaluados los contenidos de estevióside y rebaudiósido A por detección por cromatografía líquida de alta resolución. El contenido de estevióside fluctuó entre 0 y 21 % concentrándose el 92 % de la población entre valores del 5 al 15 %. En cuanto al contenido de rebaudiósido A se obtuvieron valores entre 0 y 12 % correspondiendo al 68 % de la población un contenido entre 3 y 9 %. La demanda actual de stevia se halla en creciente aumento, por lo que las acciones orientadas a establecer líneas clonales con alto contenido de principios edulcorantes permitirá a los productores primarios la obtención de cultivos más productivos e incrementara el rendimiento de obtención de glucósidos.

Palabras claves: Estevióside, rebaudiósido A, líneas clonales, *Stevia rebaudiana*.**ABSTRACT**

Stevia rebaudiana Bertoni (kaâ heê) is a bush native to the Eastern Region of Paraguay. Its leaves contain diterpene glycosides that produce a sweet taste but without any caloric value and are 150 to 300 times sweeter than sacharose (0, 4% solution). During 1998 and 1999 agricultural seasons, individual selection sown fields were established in the National Agronomical Institute (Caacupé, Paraguay). The objective of this work was to determine the content of stevioside and rebaudioside A in these selected plants in the field in order to evaluate the variability existent in the population and identify clones with high content of those glycosides. Of an original population of 2,000 specimens, 140 plants were selected phenotypically by the superior agronomical characteristics and they were harvested in the period of pre-flowering and were pollination free. The content of

*Autor Correspondiente: **Ing. Oca. Trini Jiménez**, Directora del Organismo de Investigación y Asistencia Tecnológica del Instituto Nacional de Tecnología, Normalización y Metrología. Avda Artigas 3973 y Gral. Roa Asunción-Paraguay. Email trini_vj@hotmail.com. Fecha de Recepción: Febrero de 2010, Fecha de aceptación: mayo de 2010

stevioside and rebaudioside A were evaluated in the laboratories of the National Institute of Technology, Standardization and Metrology (INTN in Spanish) by high resolution liquid chromatography. The content of stevioside ranged from 0 to 21% concentrating the 92% of the population between 5 to 15%. In relation to rebaudioside A, values between 0 and 12% were obtained being 68% of the population between a content of 3 to 9%. As the current demand of *Stevia* is increasingly rising, the actions oriented to establish clonal lines with high content of sweetener principles will allow primary producers to obtain more productive cultivations and increase the output of glycoside obtainment.

Keywords: Stevioside, rebaudioside A, clonal lines, *Stevia rebaudiana*.

INTRODUCCIÓN

Las personas que, por diversas razones, deben reemplazar a la sacarosa debido a su alto contenido calórico buscan edulcorantes no calóricos con gusto y características similares a la misma (1). Varias sustancias han sido propuestas para tal efecto, pero pocas han probado ser seguras para el consumo humano, con poder edulcorante y satisfactoriamente estables. Sacarina, ciclamato, aspartame, sucralosa (edulcorante no calórico derivado del azúcar común) y los extractos de hojas de *Stevia rebaudiana*, entre otros, son permitidos por legislaciones de países de la región (2,3). Los glucósidos de esteviol son alternativas naturales para los edulcorantes sintéticos y para pacientes con enfermedades relativas al metabolismo del azúcar. Son muy usados en las industrias alimentarias en Japón, Corea y Brasil (4). En los EE.UU., la Agencia de Alimentos y Drogas (FDA), aprobó en septiembre de 1995, a los glucósidos de esteviol como edulcorantes naturales no calóricos (1). El establecimiento de reglas para el uso de esteviosidos y hojas de *Stevia rebaudiana* en los EEUU está ahora en progreso (5). En nuestro país existen normativas para el uso de productos derivados de la *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni como aditivo alimentario con función edulcorante así como medicamentos especiales que provienen de esta planta (fitoterapéuticos) (6). El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) en sus reuniones 68^a y 69^a del año 2008, estableció una Ingestión Diaria Admisible (IDA) para los glucósidos de esteviol de 0–4 mg por kg de peso corporal por día, expresada como esteviol. (7). Los glucósidos de esteviol son una mezcla de componentes de diferentes pesos moleculares. Dado que el componente activo efectivo es la parte de esteviol de las distintas moléculas, la IDA se refiere al peso molecular del total de esteviol presente en la mezcla (8).

Stevia rebaudiana Bertoni (Kaã Heê es un arbusto de la familia de las compositae (asteraceae) y uno de los 154 miembros del género *Stevia*. Originario de la Región Oriental de Paraguay, sus hojas contienen glucósidos específicos que producen un sabor dulce pero no tienen valor calórico y son cerca de 150 a 300 veces más dulces que la sacarosa (9). Contienen de 45 a 50% de material soluble en agua. Por siglos esta hierba edulcorante ha sido usada por nativos Guaraníes para contrarrestar el sabor amargo de varias medicinas y bebidas a base de plantas. Muchos países demostraron interés en el cultivo y comercialización de nuestra "hierba dulce" nativa y a nivel nacional se ha dado comienzo a la Investigación en este campo. (10,11) Las hojas contienen una compleja mezcla de glucósidos naturales diterpénicos dulces (steviol-glicósidos o glucósidos de steviol): esteviósido (4-13%), esteviolbiosido (trazas), rebaudiósido A (2-4%), rebaudiósido B (trazas), rebaudiósido C (1-2%), rebaudiósido D (trazas), rebaudiósido E (trazas) y dulcosido A (0,4-0,7%) (8,9). El mayor contenido de esteviósido se encuentra en las hojas, lo que sugiere que estas sirven como el tejido principal para la síntesis y acumulación primaria de glucósidos de esteviol (12,13).

Aun definiendo cantidades diarias de ingesta aceptables sus características sensoriales pueden variar de acuerdo al producto en que se encuentran y la temperatura de consumo (14). En cuanto a la fotoestabilidad no se reporta una fotodegradación significativa, tanto para el esteviósido como para el rebaudiósido A (15).

Entre los glucósidos diterpénicos de la stevia, el esteviósido es el componente principal, constituyendo cerca del 85% de los edulcorantes totales, y rebaudiosido A, en menor proporción es el componente más dulce. Estos dos componentes han sido empleados por el altísimo poder edulcorante y la baja toxicidad. Al esteviósido se le ha atribuido, además, un poder antihipertensivo según estudios en animales y humanos (16) y es usado en el tratamiento de la diabetes (4) Actualmente en el Paraguay, la mayor parte se comercializa como hoja seca, y su procesamiento se limita a la elaboración de saquitos de té y /o extractos acuosos y comprimidos. Existen actualmente en nuestro país empresas procesadoras de las hojas, obteniendo extractos en polvo de glucósidos de steviol de 85% a 95% de pureza.

En enero de 1999 se firmó un convenio entre el Instituto Agronómico Nacional (IAN) sito en Caacupé (Paraguay) y el Instituto Nacional de Tecnología, Normalización y Metrología sito en Asunción (Paraguay) para investigación del kaâ heê. Durante las temporadas agrícolas 1998 y 1999 se establecieron parcelas de selección Individual, en cultivos realizados en el IAN con el objeto de clasificar líneas clonales con alto potencial productivo de hojas secas a nivel de campo, buenas características agronómicas, tolerancia y/o resistencia a enfermedades y alto contenido de esteviósido y rebaudiosido A. Existen reportes de que el rendimiento de la cosecha de la stevia sin cultivos intercalados es mayor que cultivándola junto a otras especies como la cebada (*Hordeum vulgare*) (17). El objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de esteviósido y rebaudiosido A en plantas seleccionadas en campo por características agronómicas superiores, a los efectos de evaluar la variabilidad existente en la población e identificar clones con alto contenido de dichos glucósidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño: Descriptivo, de corte transversal.

Materiales: De una población original de 2000 individuos, plantación cultivada comercialmente por los agricultores, se seleccionaron fenotípicamente por características agronómicas superiores plantas cosechadas en etapa de prefloración y libres de polinización. Se ha descrito anteriormente que el momento ideal de corte se da cuando la planta empieza a emitir botones florales o una semana antes que aparezcan flores abiertas. En esta etapa la cantidad de glucósidos de steviol en hojas es mayor que en otras etapas de cosecha (10,18). En la campaña del año 1998 fueron seleccionados 44 individuos (plantitas) y durante el año 1999; 96 individuos, totalizando 140 individuos que representan un 7% de la población total de 2000 individuos.

Método: Las hojas frescas de las 140 muestras fueron secadas a temperatura ambiente entre 25 °C y 30 °C y luego molidas en molino eléctrico hasta obtener un polvo fino. (19) Un gramo de cada muestra fue disuelto en 100 ml de agua. Esta solución se mantuvo a 80 °C, durante 45 minutos con agitación periódica. Una vez filtradas las muestras se procedió al lavado con acetonitrilo al 20%. El producto lavado fue colectado en tubos de ensayo e inmediatamente se realizó la elución con acetonitrilo al 80%. La muestra fue filtrada con una membrana de 0,45 µm de teflón PTFE (Millex-LCR Millipore) y colocadas en ampollas para ser inyectadas al equipo.

La metodología analítica empleada es la sugerida por Hashimoto y Morigasu (20) cuyo fundamento es que los componentes glucosídicos, previa extracción acuosa se separan de acuerdo a su peso molecular a través de una columna amínica (20,21). Se empleó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (Shimadzu Japón) equipado con inyección manual, compresor de aire y un detector UV/Vis. A una longitud de onda de 210 nm se inyectaron 10 µl de disoluciones de patrones y muestras y se utilizó una columna Chemcosorb 5NH2-U de 4,6 mm x 150 mm (Chemco, Japón) a temperatura de 25°C. Fue utilizada una fase móvil de acetonitrilo y agua en proporción 80:20. Se aplicó un flujo de 1 mL/min. Las muestras analizadas se compararon con estándares internos de valor

conocido de estevósido de 99,6% y rebaudiósido A, pureza de 98,2% (Wako Chemicals, Japon) Los resultados se expresan en % de estevósido y/o rebaudiósido A.

RESULTADOS

El promedio de contenido de estevósido en las muestras analizadas (n:140) fue de 9,14% hallándose un mínimo de 3,74% y un máximo de 20,57%,y el promedio de contenido de rebaudiósido A fue de 4,63% obteniéndose un contenido mínimo de 0,04% y máximo mayor a 12,1%.

En los individuos analizados el 61,4% de las muestras (86 individuos) presentó contenidos de estevósido que fluctúan entre 5,1 y 10% y el 32% (44 individuos) presentó contenidos que fluctúan entre 10,1 y 21%, identificándose uno con 20,57% de estevósido que servirá para constituir una línea clonal con nivel elevado de la sustancia edulcorante. (Ver Figura 1)

En cuanto al contenido de Rebaudiósido A, la concentración varía entre 0 y 12% concentrándose el 68% entre los valores de 3,1 a 9,0% (95 individuos). (Ver Figura 2 y tabla 1).

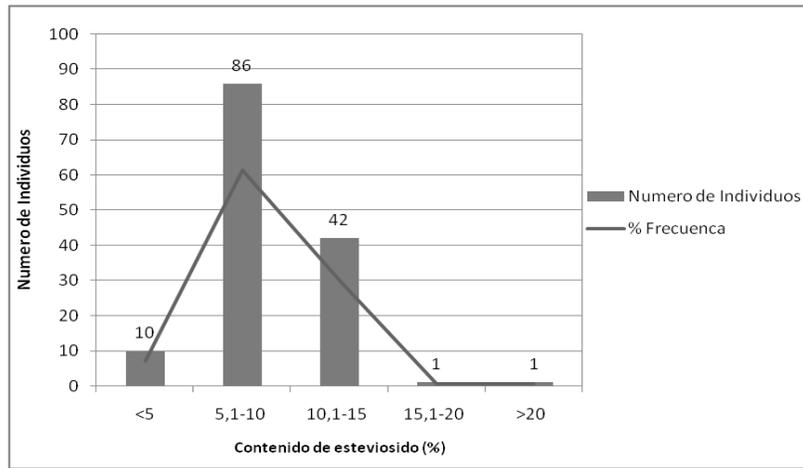


Figura 1. Distribución de frecuencia de individuos conforme al contenido de Estevósido

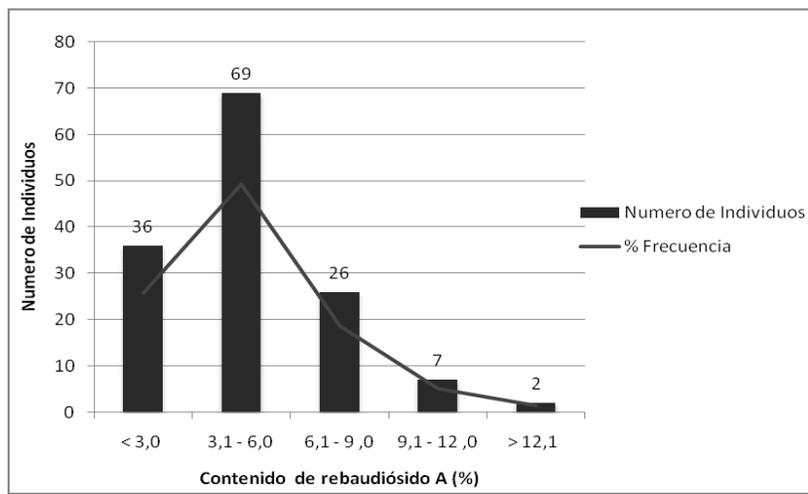


Figura 2. Distribución de frecuencia de individuos conforme al contenido de Rebaudiósido A

Tabla 1. Agrupamiento de individuos en categorías por contenido de glucósidos

Esteviósido	Contenido	Cantidad	Rebaudiósido A	Contenido	Cantidad
< 5,0 %	Muy Bajo	10	<3,0%	Muy Bajo	36
5,1 -10,0%	Bajo	86	3,1-6,0%	Bajo	69
10,1-15%	Medio	42	6,1-9,0 %	Medio	26
15,1-20%	Alto	1	9,1-12 %	Alto	7
>20 %	Muy alto	1	>12,1%	Muy alto	2

Cabe destacar que el individuo que contiene un elevado contenido de steviosido no necesariamente presenta un elevado contenido de rebaudiósido A. Los individuos que presentan 5,1% a 10% de esteviol-glucósidos tienen una cantidad importante de ambos edulcorantes (ver Figura 3). El análisis de resultados presentados muestran que existe una gran variabilidad para los contenidos de esteviósido y rebaudiósido A, ya que la stevia se reproduce sexualmente por fecundación cruzada (alogama) por lo que no debe extrañar la diversidad fenotípica y genotípica que se observa en plantas que crecen espontáneamente, así como en cultivos comerciales (22,23).

Los resultados indican que ambas características son gobernadas por genes de herencia cuantitativa por lo que es de esperar influencias de factores ambientales sobre los mismos (época de cosecha, pos cosecha, temperatura, humedad, fotoperiodo -tiempo en que los organismos están sometidos a la acción de la luz entre dos periodos de oscuridad- (10,24)

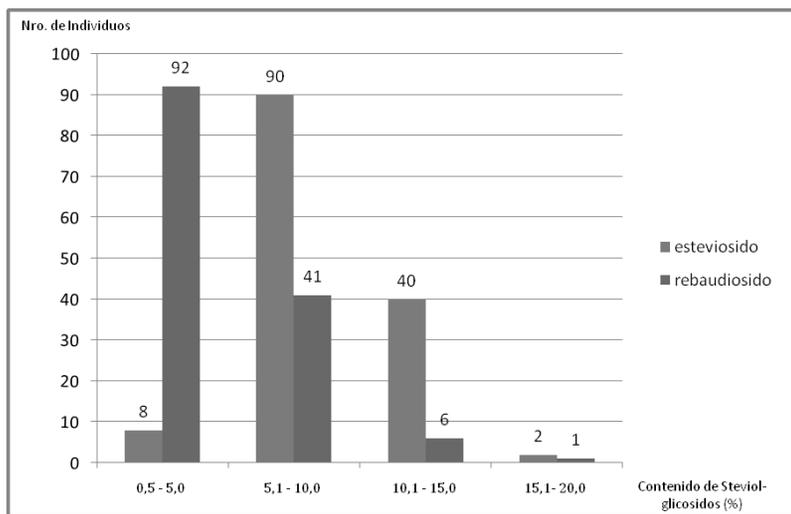


Figura 3. Distribución de N° de Individuos conforme al contenido de esteviósido y rebaudiósido A.

DISCUSION

El análisis de los resultados presentados muestra que existe una gran variabilidad para los contenidos de esteviósido y rebaudiósido A (23) observándose valores de 0 -21% para esteviósido, y 0 a 12% para rebaudiósido A, contenidos en las hojas similares a los resultados obtenidos por otros autores (17,23). Fue posible identificar individuos cuyo contenido de esteviósido alcanza valores de 21% y de rebaudiósido A con valores de 12%

constituyéndose en material de partida idóneo para la obtención de líneas clonales con elevado contenido de estos glucósidos.

La demanda actual de stevia se halla en creciente aumento, por lo que las acciones orientadas a establecer líneas clonales con alto contenido de principios edulcorantes permitirá a los productores primarios la obtención de un cultivo de mayor rendimiento e incrementara el rendimiento de cristalización (19,24).

Se necesitan más estudios acerca de los componentes e impurezas del producto cristalizado con el objeto de obtener un producto nacional que pueda competir en mercados exigentes (9,11).

Agradecimientos: A la Dra. Verónica Villagra, Asesora de Dirección General, Instituto Nacional de Tecnología, Normalización y Metrología por el tiempo dedicado a la lectura y revisión de este manuscrito, y que lo haya enriquecido con sus aportaciones.

BIBLIOGRAFIA

1. Bunhak EJ, Mendes ES, Pereira NC, Costa SC. Avaliação do efeito do polieletrólito aniônico na clarificação do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana*. Ciênc. Tecnol. Aliment. [online]. 2004, vol.24, n.4 [citado 2010-11-08], pp. 587-590.
2. Brasil. Ministerio de Salud de Vigilancia de la Secretaría de Salud. Ordenanza. 318, de 24 de noviembre de 1995. Aprueba el uso de la sucralosa con la función de edulcorantes en los alimentos y bebidas de dieta; Daily Jornal de la República Federativa del Brasil, Brasilia, no. 227 p.194061, 28 de noviembre 1995.
3. Cavalcante da Silva GE, Hakin Assef A, Cordeiro Albino C, Funari Ferri LA, Tasin G, Takahashi MH et al. Investigation of the tolerability of oral stevioside in Brazilian hyperlipidemic patients. Braz. arch. biol. technol. 2006.49 (4):583-87.
4. Rajasekaran T, Giridhar P, Ravishankar GA. Production of steviosides in ex vitro and in vitro grown *Stevia rebaudiana* Bertoni Journal of the Science of Food and Agriculture 2007; 87(3):420-24.
5. US FDA Import Alert (Acceso 21 de Junio de 2010) disponible en http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grn_275.pdf
6. Instituto Nacional de Alimentación y Nutrición. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Resolución S.G. N° 485/2005. Por la cual se definen las áreas de competencia de las dependencias del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, en relación con la comercialización de los productos derivados de la *Stevia Rebaudiana* (Bertoni) para consumo humano.(fecha de acceso diciembre 2009) (disponible en línea en: <http://www.inan.gov.py/decretosresoluciones.htm>
7. FAO/ OMS. Summary and Conclusions of the 69th meeting of the Joint FAO/WHO. Expert Committee on Food Additives, 17-26 June 2008, Rome, Italy. (Acceso 21 de Junio de 2010) Disponible en http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/jecfa69_final.pdf.
8. FAO/ OMS.Hoja Informativa final 5.11.2008 Glucósidos de esteviol (Acceso 21 de Junio de 2010) Disponible en http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/FACTSHEET_%20STEVIOOL%20GLYCOSIDES_final1.pdf.
9. Cardello HM, Silva MA, Damasio MH. Análise tempo-intensidade dos estímulos doce e amargo de extrato de folhas de estévia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni] em doçura equivalente a sacarose. Ciênc. Tecnol. Aliment. [online]. 1999, vol.19, n.2 [cited 2010-06-30], pp. 163-69.
10. Jarma Orozco A. Avances de la Investigación en Stevia en Colombia. En IV Simposio Internacional de la Stevia- Kaã Heê 12-13 de marzo de 2009, Asunción, Paraguay REDIEX; CAPASTE; MIC: 2009
11. Casaccia J, Edgar Álvarez E. Recomendaciones técnicas para la producción sustentable del Kaã Heê (*Stevia rebaudiana*) Bertoni en el Paraguay. Manual No. 8. MAG-DIA-IAN-NL STEVIA. p. 43.
12. Kamath S, Soejarto D, Compadre C, Kinghorn A, Medon P. Potential Sweetening Agents of Plant Origin. II. Field Search for Sweet-Tasting Stevia Species. Economic Botany [serial on the Internet]. (1983, Jan), [cited June 21, 2010]; 37(1): 71. Available from: Environment Index.
13. Melis MS, Rocha ST, Augusto A. Steviol effect, a glycoside of *Stevia rebaudiana*, on glucose clearances in rats. Braz. J. Biol. [serial on the Internet]. 2009 May [cited 2010 June 21]; 69(2): 371-74.

- 14 .Cardoso JMP, Battochio JR, Cardello HM, André B. Equivalência de dulçor e poder edulcorante de edulcorantes em função da temperatura de consumo em bebidas preparadas com chá-mate em pó solúvel Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas, 2004 24(3): 448-52.
15. Clos JF, DuBois GE, Prakash I. Photostability of rebaudioside A and stevioside in beverages. JAgric Food Chem. 2008 Sep 24; 56(18):8507-13.
16. Chan P, Tomlinson B, Chen YJ, Liu JCH, Hsieh MH, Cheng JT. A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. Br J Clin Pharmacol. 2000 ; 50(3): 215–20.
17. Ramesh K, Singh V, Paramvir SA. Production potential of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. under intercropping systems Division of Natural Plant Products, Institute of Himalayan Bioresource Technology, Palampur. Archives of Agronomy and Soil Science 2007; 53(4): 443 – 58.
18. Bondarev NI. Sukhanova MA, Reshetnyak OV, Nosov AM. Steviol Glycoside Content in Different Organs of *Stevia rebaudiana* and Its Dynamics during Ontogeny. Biologia Plantarum 2003/4;47(2):261-64.
19. Singh SD, Rao GP .Stevia: The herbal sugar of 21st century Sugar Tech. 2005; 7 (1):17-24.
20. Hashimoto Y, Moriyasu M. Determination of sweet components in *Stevia rebaudiana* by high performance liquid chromatography ultraviolet detection. Shoyakugaku Zasshi 1978; 32 (2): 209-11.
21. Shibata H, Sonoke S, Ochiai H, Nishihashi H, Yamada M. Glucosylation of Steviol and Steviol-Glucosides in Extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Physiol. 1991; 95(1): 152–6.
22. Bonilla C, Carmen R, Sánchez O, Manuel S, Perlaza DF. Evaluación de métodos de propagación, fertilización nitrogenada y fenología de estevia en condiciones del Valle del Cauca. Acta Agron (Colombia) 2007; 56(3): 131-34.
23. Rodríguez González H, Acosta de la Luz LL, Hechevarría Sosa I, Rivera Amita MM, Rodríguez Ferradá CA, Sánchez Govín E et al. Comportamiento del cultivo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni en Cuba. Rev Cubana Plant Med [revista en la Internet]. 2007 Dic [citado 2009 Dic 09]; 12(4): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962007000400004&lng=es.
24. Brandle JE, Starratt AN, Gijzen M. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. Cana.J.Plant Sci 1998;78:527-36.
25. Fronza D, Folegatti MV. Water consumption of the estevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) crop estimated through microlysimeter. Sci. agric. (Piracicaba, Braz.), Piracicaba, v. 60, n. 3, 2003. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?scrip=sci_arttext&pid=S010390162003000300028&lng=en&nrm=iso>. access on 20 Aug. 2010.
26. Ahmed M, Smith RM. Determination of stevioside by high-performance Liquid chromatography with pulsed amperometric detection J. Sep. Sci. 2002; 25: 170-2.