

Determinación y cuantificación de glucósidos de esteviol en las hojas de Stevia comercial (*Stevia rebaudiana* Bertoni) mediante cromatografía de líquido de alta resolución HPLC**Determination and quantification of steviol glycosides in commercial Stevia leaves (*Stevia rebaudiana* Bertoni) by high resolution liquid chromatography HPLC**

Julio César Benítez-Villalba^{1,*}, Mirtha Letizia Grau-Torales¹, Oscar Daniel Cristaldo-López¹, Arturo Iván Bogado-Fernández¹, Liliana Antonia Arrúa-Martínez¹
& Nadia Mabel Villalba-Villalba¹

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay.

*Autor correspondiente: juliobenitez@facen.una.py.

Resumen: La *Stevia rebaudiana* Bertoni (*Stevia*, ka'ã he'ê) es una planta originaria de nuestro país (Paraguay) con mucho auge en su producción en diferentes países de la región y del mundo. Este vegetal contiene glucósidos que son los responsables de proporcionar el sabor dulce a esta planta que fueron descubiertos en 1931, se denominan glucosidos de esteviol que son del tipo diterpenoide e identificadas como esteviosido, esteviolbiosido, rebaudiosido A, B, C, D, E y F y dulcosido. Éstos compuestos se encuentran en las hojas de la planta en porcentajes variables en función de la especie, las condiciones de crecimiento y las técnicas agronómicas, llegando a alcanzar hasta el 20 % de su composición. En este trabajo de investigación se ha realizado la determinación y cuantificación de los glucósidos de esteviol en hojas de *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) comercial, la extracción de los analitos del vegetal se realizó mediante la extracción sólido-líquido utilizando para ello un equipo de reflujo de soxhlet y se cuantificó por la técnica de cromatografía de líquido de alta resolución HPLC, dando los siguientes resultados: Stevioldiosido 0,16 %, Steviosido 7,35 %, Rebaudiosido A 14,2 %, Rebaudiosido B 0,23%, Rebaudiosido C 1,59 %, Rebaudiosido D 0,86 %, Dulcosido A ND (No detectable). La técnica analítica de extracción y el método analítico utilizado HPLC han demostrado un buen rendimiento y eficiencia, que pudo ser aplicado para el análisis cuantitativo de estos glucósidos más representativos en las hojas de *Stevia* de un producto comercial.

Palabras clave: *Stevia rebaudiana* Bertoni, HPLC, Glucósidos del Steviol, Extracción.

Abstract: *Stevia rebaudiana* Bertoni (*Stevia*, ka'ã he'ê) is a plant native to our country (Paraguay) with much growth in its production in different countries of the region and the world. This vegetable contains glycosides that are responsible for providing the sweet taste to this plant that was discovered in 1931, they are called steviol glycosides that are of the diterpenoid type and identified as stevioside, steviolbioside, rebaudioside A, B, C, D, E and F and dulcoside. These are composed in the days of the plant in variable percentages depending on the species, growth conditions and agronomic techniques, reaching up to 20% of its composition. In this research work, the determination and quantification of steviol glycosides in commercial warehouses of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) was carried out, the extraction of plant analytes was carried out by solid-liquid extraction using a soxhlet reflux equipment and was quantified by the HPLC high resolution liquid chromatography technique, giving the following results: Stevioldioside 0.16%, Stevioside 7.35%, Rebaudioside A 14.2%, Rebaudioside B 0.23%, Rebaudioside C 1.59%, Rebaudioside D 0.86%, Dulcoside A ND (Not detectable). The analytical extraction technique and the analytical method used HPLC have shown good performance and efficiency, which could be applied to the quantitative analysis of these most representative glycosides in *Stevia* reserves of a commercial product.

Key words: *Stevia Rebaudiana* Bertoni, HPLC, Steviol Glycosides, Extraction.

La *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) conocida en guaraní como *ka'a he'ê* (hierba dulce); es una planta nativa de nuestro país, específicamente del valle del río Monday, donde crece en suelos arenos-

os cerca de las corrientes de agua (Madan *et al.*, 2010; Brandle *et al.*, 1998; Yadav *et al.*, 2011). Es resistente a las bajas temperaturas, aunque el ritmo al que crece es mayor en estaciones cálidas (Aran-

Recibido: 11/02/2022 Aceptado: 17/08/2022





Figura 1. Hojas de la planta de *Stevia*. a) Planta viva. b) Hojas comerciales.

da González *et al.*, 2014; Curi *et al.*, 1986; Melis, 1995). Es un arbusto que puede alcanzar hasta los 65 cm de altura. Sus hojas (Fig. 1a) son lanceoladas y oval-lanceoladas, dispuestas de forma opuesta y son sésiles. Éstas se encuentran serradas en su tramo medio y presentan tricomas en su superficie de diferentes tamaños: grandes, los cuales oscilan entre los 4–5 μm , y pequeños, de aproximadamente 2,5 μm . Sus flores son pequeñas (7-15 mm) y de color blanco, dispuestas en una inflorescencia cimosa irregular. La semilla es un aquenio con vilano de aproximadamente 3 mm (Wöelwer-Rieck, 2012; Kujur *et al.*, 2010).

Nuestro país se destaca con una superficie sembrada de 2.300 hectáreas que produjeron en el año 2014 aproximadamente 3.680 toneladas ocupando el segundo lugar detrás de China en cuanto a la venta del Ka'a He'e. Los departamentos paraguayos que tienen mayor rendimiento (kilogramos por hectárea) son San Pedro, Caaguazú, Itapúa y Alto Paraná (Woelwer Rieck *et al.*, 2010; Yong Heng *et al.*, 2014; Shukla *et al.*, 2011).

Existen unas 261 especies aceptadas que forman parte del género *Stevia*, pero la *Stevia rebaudiana* Bertoni es una de las especies productoras de glucósidos de esteviol (The Plant List 2013) que genera mayor potencial edulcorante (Brandle *et al.*, 1998). Los compuestos responsables de la propiedad edulcorante de la planta, son los glucósidos diterpenos derivados de esteviol. En las

variedades generalmente cultivadas de *Stevia*, los principales compuestos glucósidos de esteviol son cuatro: esteviósido, rebaudiósido A, dulcósido A y rebaudiósido C, entre los cuales destacan en cantidad los primeros dos (Lewis, W.H. 1992). El esteviósido (Fig. 2) es 250 – 300 más dulce que el azúcar, aunque con un sabor ligeramente amargo, mientras que el Rebaudiósido A (Fig. 3) tiene mayor capacidad edulcorante (350-450 veces más que el azúcar) y sin resabio amargo (Goyal *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2009). En menor cantidad, se pueden encontrar el rebaudiósido C y dulcósido A junto con estevolbiósido, rubusósido, rebaudiósido B, D, E y F (Woelwer Rieck *et al.*, 2009; Brandle, 1999).

Debido a las características que contiene la planta, la *Stevia* ha sido objeto de estudio desde principios del siglo XX, tanto para su producción y su comercio por lo que se han visto incrementados con las mejoras de los procesos de extracción y refinamientos de sus glucósidos (Bridel *et al.*,

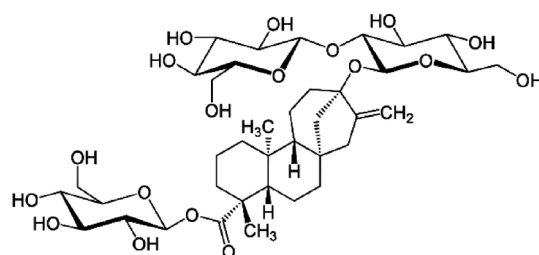


Figura 2. Estructura del Esteviósido.

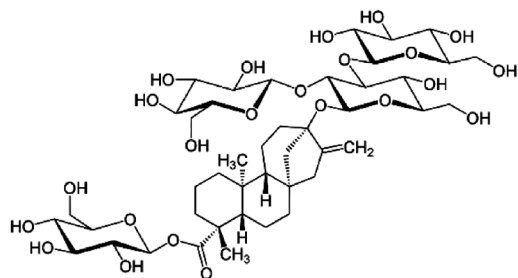


Figura 3. Estructura del Rebaudiósido A.

1931; Wood *et al.*, 1931). La mayoría de las investigaciones han realizados estudios para mejorar el rendimiento en los procesos de obtención de tales glucósidos, así como la optimización de las extracciones acuosas, más sencillas y económicas que las extracciones con otros disolventes. (Kaneda *et al.*, 1977; Sakamoto, 1977)

El consumo de Stevia es cada vez mayor, por lo cual se debe investigar y desarrollar una alternativa de extracción económica y socialmente viable, favoreciendo así su consumo regional y nacional. Además, existen motivos a nivel salud para su consumo, por ejemplo: puede ser consumida por personas con diabetes, obesidad, ayuda a la prevención de caries, etc. (Anton *et al.*, 2010). La planta ha llamado la atención en un momento de incremento en la demanda de los alimentos alternativos bajos en calorías y se ha demostrado resultados prometedores en investigaciones médicas en el tratamiento de la obesidad y presión arterial (Barba *et al.*, 2014). La Stevia no tiene ningún efecto en el azúcar en sangre, y es por esta razón, que resulta un edulcorante natural atractivo para el uso de pacientes diabéticos y los que se encuentran bajo dietas con control de hidratos de carbono (Millones, 2014).

En este trabajo de investigación se tiene como objetivo la determinación y cuantificación de los principales compuestos glucósidos del esteviol de las hojas de Stevia comercial (Fig. 1b) para ello se ha utilizado una técnica de extracción sólido-líquido para separar los glucósidos de la matriz y desarrollar una metodología analítica para la determinación y cuantificación de los analitos mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC.

Materiales y métodos

Productos químicos y reactivos

Para los ensayos correspondientes se han utilizados reactivos de grado analítico. El patrón de Stevia que se ha utilizado fue una materia prima certificada. La solución madre del analito fue preparada una sola vez a una concentración de 1000 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una botella de vidrio oscuro. El acetonitrilo que se utilizó para la preparación de la fase móvil fue de grado cromatográfico (Merck, Darmstadt, Alemania). Los reactivos carbonato de sodio y sulfato de sodio empleados fueron de calidad analítica (Merck, Darmstadt, Alemania). El agua destilada se obtuvo en un equipo (QUIMIS, Brasil) y posteriormente purificada en un equipo Barnstead TM MicroPure TM.

Instrumentación y software

Para la extracción de los glucósidos del steviol de la matriz estudiada se utilizó un equipo de extracción Soxhlet, una variedad de materiales de vidriería como vasos de precipitados, embudos, varilla de vidrio, soporte universal, bomba al vacío, equipo de reflujo soxhlet entre otros. Una centrífuga de mesa de la marca Presvac DCS-16 RV. La separación cromatográfica de los analitos en estudio se obtuvo utilizando una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm \times 150 mm; 5 μm). El manejo del instrumento, la detección de los picos y la integración de los mismos se llevaron a cabo utilizando el software LCsolution.exe (versión 1.0). Se utilizó una balanza analítica RADWAG (modelo 310.R2) made in Polan (EU) para realizar el peso del estándar, reactivos y las muestras. Se utilizó un software Statgraphics Plus versión 5.0 (Manugistics, Rockville, MD, EE. UU., 2000) para el tratamiento estadístico de los datos. Paquetes Microsoft® Office: Word®, Excel® y PowerPoint® 2010.

Elaboración del extracto

Primeramente, se procedió a la obtención del extracto a partir de las hojas de Stevia que fue-

ron adquiridas de un supermercado ubicada en el Área Metropolitana de Asunción. Para ello se pesaron 1 gramo de las hojas secas de Stevia comercial previamente triturados en un mortero (por triplicado), se llevó a reflujo con 10 mL de agua destilada durante 30 minutos a (100 °C) en un equipo de reflujo soxhlet. Los extractos se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos. Del extracto se tomó una alícuota de 300 μL y se transfirió en un matraz aforado de 10 mL, se diluyó y se llevó a volumen con agua destilada. Se filtró con una jeringa y filtro teflón 0,45 μm en un vial de 2 mL para luego inyectarlo al equipo de HPLC.

Preparación de las muestras patrones

Se ha preparado una disolución madre de Stevia, a partir de 25 mg de la materia prima (*Ka'a he'e* polvo) se disolvieron en un matraz aforado de 25 mL en agua destilada (1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A partir de esta solución madre, se prepararon 5 disoluciones más diluidas de concentraciones de 10, 25, 50, 75, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Stevia:

- 1 mL de solución madre de Stevia de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ /100 mL de agua destilada (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- 5 mL de solución madre de Stevia de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ /200 mL de agua destilada (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- 1 mL de solución madre de Stevia de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ /20 mL de agua destilada (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- 1,5 mL de solución madre de Stevia de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ /20 mL de agua destilada (75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- 5 mL de solución madre de Stevia de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ /25 ml de agua destilada (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- 5 mL de solución madre de Stevia de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ /10 ml de agua destilada (500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Las condiciones cromatográficas fueron optimizadas.

Para la optimización del método cromatográfico del HPLC se empleó una disolución acuosa que contenía los glucósidos del steviol a una concentración de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Dadas las características de los analitos, en el desarrollo de la metodología propuesta se ha empleado la cromatografía en fase reversa (fase estacionaria menos polar que la fase móvil). Se seleccionó una columna con relleno ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm \times 150 mm; 5 μm) de dimensiones y tamaño de partícula de acuerdo a las características fisicoquímicas de los analitos. Se estudiaron las principales variables que afectan a la separación cromatográfico y la intensidad de la señal, fueron evaluados diferentes fases móviles de acuerdo a la naturaleza de los analitos, se ensayaron mezclas de acetonitrilo y solución amortiguadora de fosfato de sodio (10 mmol/L, pH 2.6) a diferentes proporciones (70:30), (80:20) y (90:10). También se evaluó el efecto del caudal, la temperatura de la columna y volúmenes de inyección en la detección los glucósidos del steviol. Se ensayaron velocidades de flujo isocrático de 0,5 a 1,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Se ensayaron temperaturas de la columna de 30 °C a 50 °C. Finalmente se evaluó el volumen de inyección desde 5 a 30 μL . La detección de los analitos fue mediante un detector UV a 210 nm.

Validación del método analítico

Los parámetros de validación que fueron evaluados son la linealidad, límites de detección, límites de cuantificación, rango dinámico lineal, sensibilidad analítica y exactitud del método expresada en términos de precisión y veracidad (USP 32, 2009). Los requisitos de la validación del método analítico se establecieron de la siguiente manera: (a) Linealidad, el coeficiente de determinación (R^2) debe ser igual o mayor que 0,999 y la desviación residual máxima debe ser menor al 25%. (b) La precisión, expresada como desviación estándar relativa DER (precisión entre días) debe ser $\leq 30\%$. (c), la veracidad, expresada como recuperación media, debe estar en el rango

70 a 120%. (d) El límite de cuantificación (LC) debe cumplir con los requisitos (b) y (c). Estos requisitos se ajustan a la Decisión 2002/657 / CE de la Comisión (14).

La calidad, confiabilidad y consistencia de un método analítico validado se determina en base a la sensibilidad, linealidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), exactitud y precisión de cada uno de los glucósidos estudiados. Para ello se han preparado 5 disoluciones estándar partiendo de la solución madre de concentración de 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para obtener otras disoluciones de concentraciones de 10 – 25 – 50 – 75 – 200, 500 y 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ utilizando agua como disolvente detallado mejor en el ítem "Preparación de las muestras patrones".

Cada parámetro de validación se define como sigue: **linealidad** que es la capacidad de un método analítico de obtener resultados proporcionales a la concentración del o los analitos en una muestra dentro de un intervalo determinado; **límite de detección LD** es la cantidad más baja del analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto; **límite de cuantificación LC** es la cantidad más baja de un analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable; **Rango Dinámico Lineal (RDL)** es la que se establece como el intervalo de concentraciones que comprenden entre el límite de cuantificación de los métodos y el límite superior del intervalo de concentraciones en el que se ha aplicado al método analítico (IUPAC 1978); **la sensibilidad analítica de un método analítico o sensibilidad de la calibración** mide la relación entre la señal instrumental y la concentración del analito, y viene dada por la pendiente de la recta de calibración (González, A., *et al.*, 1996); **la exactitud** es la cercanía del acuerdo entre el valor que se acepta ya sea como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado; y la precisión es la cercanía del acuerdo entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestras de una homogénea muestra

en las condiciones prescritas.

Los parámetros de validación fueron calculados de la siguiente manera: **la linealidad** se calculó a partir de siete concentraciones de los estándares en un rango de concentración de 10 - 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; para evaluar la linealidad, se construyó un gráfico de la señal producida por los analitos en función de la concentración de los mismos y la regresión lineal se calculó por el método de los mínimos cuadrados. Además, los coeficientes de correlación y el intercepto fueron calculados para cada glucósido. **El límite de detección** se determinó mediante la fórmula $LD = 3.3 \times S_0$ y el **Límite de cuantificación** se determinó mediante la fórmula $LC = 10 \times S_0$, donde

$$S_0 = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{n-2}{n-1}}$$

($S_{y/x}$ = desviación estándar de la regresión, b = pendiente, n = puntos de calibración). **Rango Dinámico Lineal (RDL)** se establece entre el límite de cuantificación del método y el límite superior del intervalo de concentraciones en la que se aplica al método.

La sensibilidad de un método analítico o sensibilidad de la calibración se propuso como la sensibilidad analítica ($S_{\text{Analítica}}$) que se calcula por el cociente entre la desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}$) y la pendiente del calibrado (b), según la ecuación $S_{\text{Analítica}} = S_{y/x} / b$ (Mandel & Stiehler, 1954). **Exactitud del Método, Precisión y Veracidad**, para establecer la exactitud del método propuesto, se han estudiado la veracidad del mismo en términos de recuperación con muestras dopadas y su precisión en términos de variabilidad inter e intra-día). Para el estudio de exactitud del método en términos de veracidad se ha llevado a cabo un estudio de recuperación a tres niveles de concentración (75, 200, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Las muestras fueron analizadas empleando el procedimiento operatorio descrito a lo largo del artículo y la concentración en los analitos se determinó por interpolación a las curvas de calibración dentro de los rangos dinámico lineal. Los valores

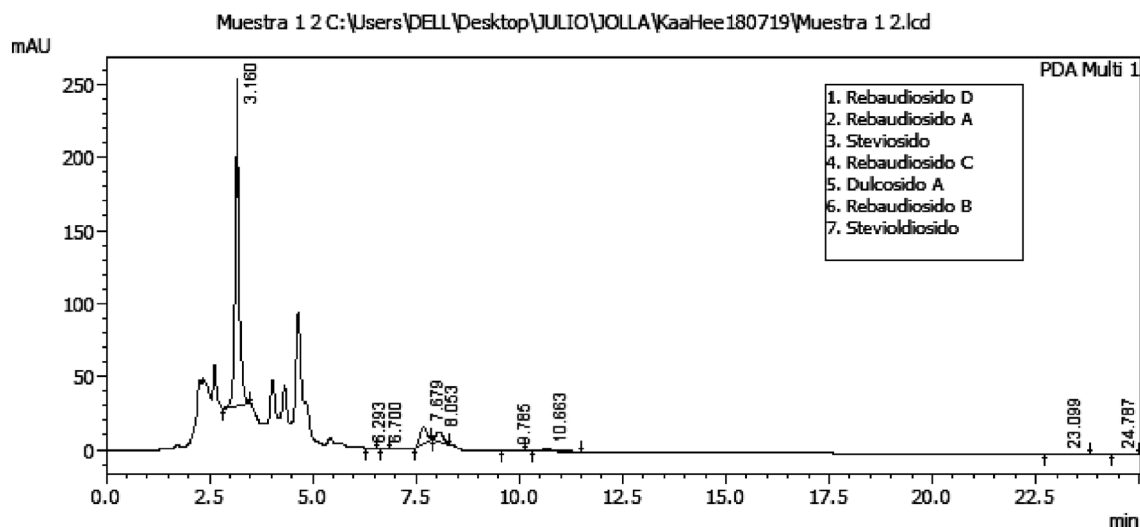


Figura 4. Cromatograma obtenido para la muestra de *Stevia* comercial empleando la técnica de análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC.

de recuperación se obtuvieron por comparación con las cantidades de analito conocidas que fueron añadidas, previamente fueron cuantificadas los glucósidos realizando todo el procedimiento de extracción (Benítez Villalba, J.C., et al, 2018). Cada analito se expresó como porcentaje y se calculó mediante la ecuación: recuperación (%) = $S1 / (S2 + S3) \times 100$, donde S1 = cantidad encontrada ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en la muestra enriquecida, S2 = cantidad presente originalmente en la muestra no enriquecida, y S3 = cantidad ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de analito agregado a la muestra.

Para evaluar la exactitud del método en términos de **precisión**, se estudió la repetibilidad (precisión “intra-día”) y la reproducibilidad (precisión “inter-día”). Para ello, se realizaron diversas réplicas de los análisis llevados a cabo en el estudio de veracidad, durante un mismo día y durante tres días consecutivos. Cada muestra dopada fue extraída y analizada por triplicado (previamente los glucósidos fueron cuantificados), es decir tres réplicas de cada punto en el mismo día para evaluar la variabilidad “intra-día” y se repitió en tres días consecutivos para evaluar la precisión, expresada como desviación estándar relativa (DER) (Norma ISO 5725 1994; Commission Decision 2002/657/EEC 2002; Massart, D.L. et al., 1997).

Resultados y discusión

HPLC

De las condiciones cromatográficas que fueron optimizadas en el HPLC la fase móvil seleccionada fue de acetonitrilo y solución amortiguadora de fosfato de sodio (10 mmol/L, pH 2.6) (30:70) por dar una mejor señal analítica; la velocidad de flujo óptimo fue el de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ya que mejoró significativamente la resolución y las formas de los picos, la intensidad de respuesta y tiempo de retención; la temperatura óptima de la columna fue de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ que mostró una muy buenas forma de los picos mientras que el volumen de inyección óptimo fue de $20 \mu\text{L}$ y la detección UV a una longitud de onda de 210 nm. Los resultados en los picos de una muestra de *Stevia* comercial se pueden observar en la Fig. 4.

Validación del método analítico

Seguidamente se detalla los resultados obtenidos de la validación del método analítico para la determinación y cuantificación de los glucósidos del Steviol de una muestra comercial. Se ha realizado la extracción de los analitos mediante la extracción reflujo en Soxhlet y validado el método analítico, seguida de la detección y cuantificación de los glucósidos por la técnica de la cromatografía de

Tabla 1. Parámetros de calibración en las técnicas analíticas espectrofotométrico y cromatográfico.

	Steviolbiosido	Esteviósido	Rebaudiósido A	Rebaudiósido B	Rebaudiósido C	Rebaudiósido D	Dulcósido A
R^2 (%)	999.494	991.263	99.714	99.466	994.263	992.151	998.469
n	21	21	21	21	21	21	21
b ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	176.508	150.929	120.432	173.879	312.636	504.143	1303.29
s_b	0.17759	0.63367	0.28845	0.56977	106.206	200.534	228.264
a	-817.532	280.293	229.160	109.726	-1058.35	911.243	-1765.85
s_a	765.015	2.729.580	1.242.550	2.454.320	4574.86	8638.12	9832.59
$s_{y/x}$	159.307	568.410	258.748	511.090	9526.72	17988.1	20475.4
% <i>plof</i>	0.0772	0.8589	0.8777	0.8747	0.8942	0.8620	0.9188
LD ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	0.01039447	0.007424621	0.01039447	0.025243712	0.01039447	0.01187939	0.01187939
LC ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	0.03464823	0.024748737	0.03464823	0.084145707	0.03464823	0.03959798	0.03959798
Sensibilidad	902.548.326	3.766.075.439	214.849.873	2.939.342.876	304.722.424	356.805.509	157.105.479
RDL ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)	0.034 - 1000	0.024 - 1000	0.034 - 1000	0.084 - 1000	0.034 - 1000	0.039 - 1000	0.039 - 1000

líquido de alta resolución HPLC. En la Tabla 1 se observan los parámetros de calibración de la técnica analítica en estudio, donde R^2 (%) es el coeficiente de correlación, n = puntos de calibración, b = pendiente, s_b = desviación estándar de la pendiente, a = intercepto, s_a = desviación estándar del intercepto, $s_{y/x}$ = desviación estándar de la regresión, % *plof* = valor P de prueba de falta de ajuste, LD = límite de detección, LC = Límite de cuantificación, RDL = rango dinámico lineal (Mandel & Stiehler, 1954).

Linealidad: Dos aspectos importantes y fundamentales se examinaron en esta validación del método analítico, el **Límite de Detección (LD)** y el **Límite de Cuantificación (LC)** cuyos resultados se pueden observar en la Tabla 1. Para todos los analitos los LD y LC obtenidos en el método propuesto han sido lo suficientemente bajos como para poder ser utilizados en la detección y cuantificación de estos compuestos en esta matriz. De la misma manera se detallan también los valores del **Rango Dinámico Lineal (RDL)** propuestos para cada analito en esta matriz estudiada. Los valores

obtenidos de $\%R^2$ de las curvas de calibrado fueron próximos al 100% en todos los casos, demostrando que existe linealidad en los intervalos estudiados para todos los analitos; además la **sensibilidad del método analítico** o sensibilidad de la calibración que se ha medido mediante la relación entre señal instrumental y la concentración de los analitos del rango lineal viene dada por la pendiente de la recta de calibrado. En la Fig. 5 se observan los gráficos de las curvas de calibrado para cada glucósido de steviol.

Exactitud del Método Analítico: los estudios de recuperación de la técnica analítica se reanlizaron mediante la fortificación de la disolución patrón (que contienen los glucósidos previamente cuantificadas) en la muestra comercial en tres niveles de concentraciones diferentes 75 – 200 y 500 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ (por triplicado). Los cálculos se realizaron de acuerdo a lo descrito en la metodología en el ítem de validación. Se ha obtenido recuperaciones de inter e intra día entre 94.0 % y 104.3 % para todos los glucósidos de steviol estudiado lo que nos

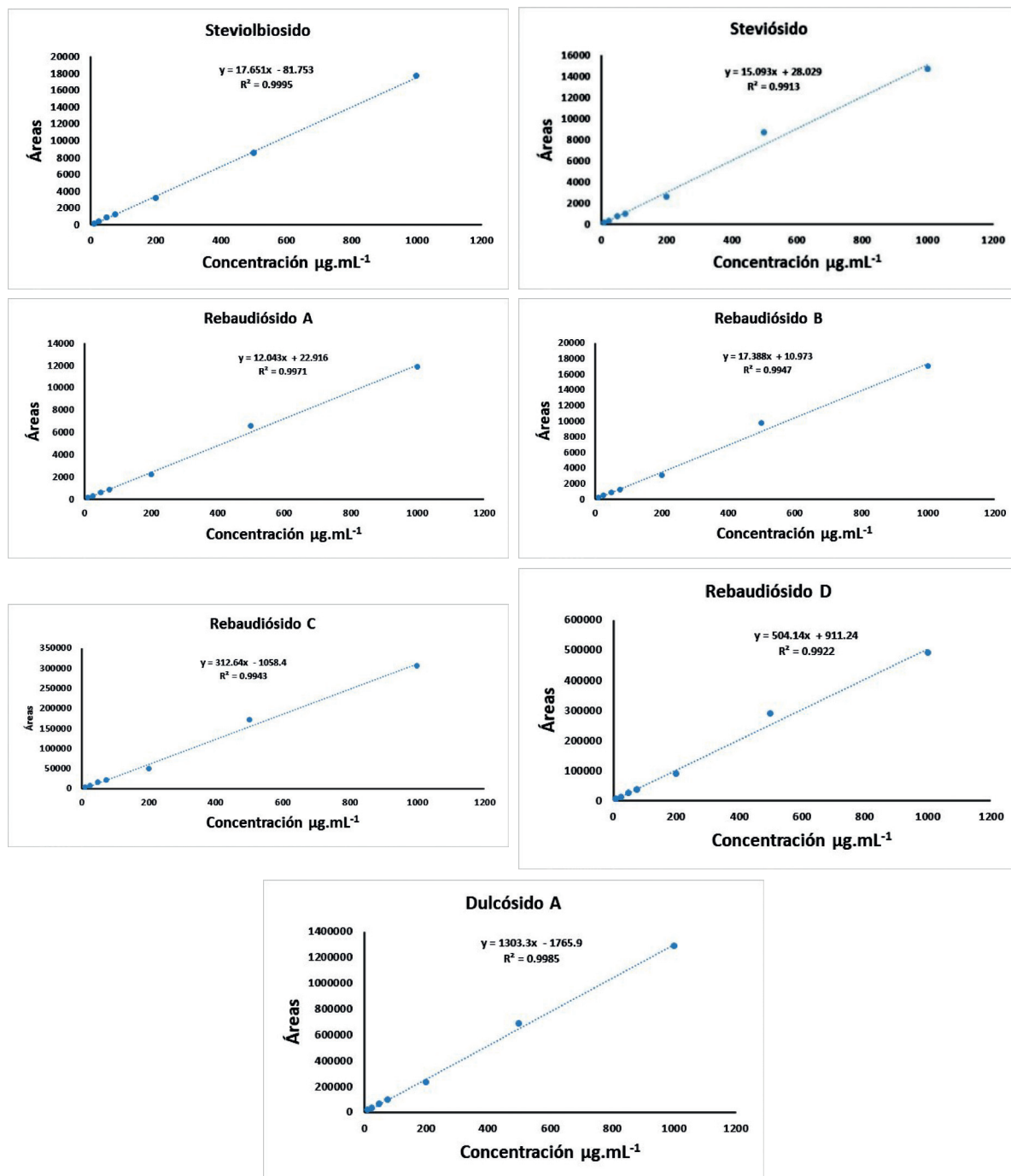


Figura 5. Gráficos de las curvas de calibrados de los de los glucósidos del Steviol estudiados.

lleva a deducir que el procedimiento de extracción es eficiente y el método veraz. Por otro lado, los valores obtenidos en esta técnica analítica la DER fueron menor 5% en todos los casos. Estos datos

se encuentran dentro de límites aceptables para cumplir los requisitos establecidos en la guía de validación empleada, según la cual se consideran aceptables valores iguales o inferiores al 15 % en

Tabla 2. Ensayos intra-día de recuperación para la determinación de la exactitud en términos de veracidad del método utilizando la técnica de extracción líquido-líquido.

Analitos	Dopado µg. mL ⁻¹	Recuperación %	DER %	n
Steviolbiosido	75	101.4	2.6	3
	200	102.7	1.2	3
	500	98.3	3.2	3
Esteviósido	75	104	4.2	3
	200	97.6	1.1	3
	500	96	3.1	3
Rebaudiósido A	75	98.1	4.1	3
	200	103.3	2.9	3
	500	102.4	1.1	3
Rebaudiósido B	75	98.4	1.4	3
	200	95.6	4.7	3
	500	98.8	1.9	3
Rebaudiósido C	75	102.6	4.4	3
	200	95.4	2.6	3
	500	99.8	4.6	3
Rebaudiósido D	75	97	1.1	3
	200	94	3.2	3
	500	98	4.5	3
Dulcósido A	75	103.2	1.2	3
	200	102.3	2.9	3
	500	101.9	1.1	3

general, y al 20 % en la zona próxima al límite de detección del método, por lo que se puede concluir que el método propuesto de la técnica de extracción a reflujo con soxhlet cumple con los requisitos de precisión (Cuadros Rodríguez, L., *et al.*, 1993). Se trata por tanto de un método veraz, preciso y por tanto exacto. En las Tablas 2 y 3 se muestran los valores de recuperación obtenidos para ambas técnicas analíticas.

Aplicación del método analítico en una muestra real

Una vez finalizada el desarrollo y la validación del método analítico se procedió a la determinación y cuantificación de los respectivos glucósidos del

Steviol a partir de la extracción por soxhlet de una muestra comercial, utilizando las curvas de calibrados descrito en la metodología analítica.

Los resultados obtenidos de la extracción de esta técnica analítica para la determinación y cuantificación de los glucósidos del Steviol se pueden observar en la Tabla 4. Los componentes con mayor cantidad en las muestras que fueron analizadas son la **Rebaudiósido A**, **Steviosido** y el **Rebaudiósido C**, con concentraciones de 14.2 %, 7.35 % y 1.59 % respectivamente, mientras que para los demás glucósidos del steviol las concentraciones con menor cantidad fueron el **Stevioldiosido** 0.16 %, **Rebaudiósido B** 0.23 %, **Rebaudiósido D** 0.86 %,

Tabla 3. Ensayos inter-día de recuperación para la determinación de la exactitud en precisión de veracidad del método utilizando la técnica de extracción líquido-líquido.

Analitos	Dopado µg. mL ⁻¹	Recuperación %	DER %	n
Steviolbiosido	75	104.3	4.2	3
	200	102.5	2.1	3
	500	101.2	1.6	3
Esteviósido	75	103.5	2.3	3
	200	96.3	1.9	3
	500	102.9	1.6	3
Rebaudiósido A	75	99.3	3.4	3
	200	100.4	3.9	3
	500	98.7	5.3	3
Rebaudiósido B	75	97.9	4.9	3
	200	98.3	5.1	3
	500	99.5	4.7	3
Rebaudiósido C	75	99.3	3.1	3
	200	103.1	2.5	3
	500	96	1.6	3
Rebaudiósido D	75	98.1	3.1	3
	200	101.6	6.4	3
	500	102.3	4.7	3
Dulcósido A	75	95.7	3	3
	200	101.3	2.3	3
	500	103.1	4.7	3

Tabla 4. Determinación de la concentración de glucósidos del Steviol en muestras de hojas de Stevia comercial por HPLC.

Glucósidos	g/100 g
Stevioldiosido	0.16
Steviosido	7.35
Rebaudiosido A	14.2
Rebaudiosido B	0.23
Rebaudiosido C	1.59
Rebaudiosido D	0.86
Dulcosido A	ND

mientras que el **Dulcosido A** no ha sido detectado en esta técnica analítica ya que la misma podría ser que se encuentre por debajo de los límites de detección.

Conclusión

En este trabajo de investigación se ha puesto a punto y validado un método analítico, que incluye una etapa de extracción de los analitos del material vegetal por la técnica sólido-líquido a reflujo con Soxhlet demostrando ser muy eficiente y optima ya que se ha observado un buen rendimiento a la hora de la extracción de los mismos, seguida de la determinación y cuantificación de estos Glucosidos del Steviol de una muestra comercial mediante la Cromatografía de Líquido de alta Resolución HPLC.

En este vegetal se encuentran números compuestos que se extraen de sus hojas entre ellos los glucósidos de steviol que contienen un total de 4 a 20 % de estos compuestos totales expresados en base seca. El Steviosido, Rebaudiosido A y Rebaudiosido C son los glucósidos que tienen mayor presencia en la Stevia y eso se ha podido corroborar en este estudio realizado observando las concentraciones correspondientes de los mismos en las muestras estudiadas.

El método por Cromatografía de Líquido de Alta resolución (HPLC) para la cuantificación de los Glucosidos del steviol en la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni de uso comercial cumplieron en su totalidad todos los parámetros de calidad estudiado como la R^2 , los Límites de Detección y

Cuantificación, la Exactitud, Precisión, el Rango Dinámico Lineal y la Sensibilidad del Método Analítico demostrando con todo ello que el método cromatográfico es aceptable.

La principal contribución de este trabajo de investigación es el aporte de la metodología analítica para la determinación y cuantificación de los Glucósidos del Steviol en muestras de Stevia que no solo puede ser utilizado con el fin analizarlos en muestras de origen comercial, sino también con diferentes tipos de especies que contienen los analitos.

Literatura citada

- Anton, S., Martin, C., Han, H., Coulon, S., Cefalu, W., Geiselman, P. & Williamson, D.A. (2010). Effects of Stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, 55(1): 37–43.
- Aranda-González, I., Barbosa-Martín, E., Toraya-Avilés, R., Segura-Campos, M., Moguel-Ordoñez, Y. & Betancur-Ancona, D. (2014). Evaluación de la inocuidad de *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivada en el sureste de México como edulcorante de alimentos. *Nutrición Hospitalaria*, 30(3): 594–601.
- Barba, F., Criado, M., Belda Galbis, C., Esteve, M. & Dolores, R. (2014). *Stevia rebaudiana* Bertoni as a natural antioxidant/antimicrobial for high pressure processed fruit extract: Processing parameter optimization. *Food Chemistry*, 148: 261–267.
- Benítez-Villalba, J.C., Dorival-García, N., Villalba-Villalba, N.M. & Vélchez, J.L. (2018). Validación de un método de análisis de benzofenonas en muestras de suelo por extracción con líquidos presurizados y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. *Reportes Científicos de la FACEN*, 9(1): 51–63.
- Brandle, J.E., Starratt, A.N. & Gijzen, M. (1998). *Stevia rebaudiana*: its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science*, 78(4): 527–536.
- Brandle, J.E. (1999). Genetic control of rebaudio-

- side A and C concentration in leaves of the sweet herb, *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal of Plant Science*, 79(1): 85–92.
- Bridel, M. & Lavielle, R. (1931). Le principe à saveur sucrée du Kaà-hê-é (*Stevia rebaudiana*) Bertoni. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, 13: 636–655.
- European Commission. (2002). 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities L 221*, 17.8.2002: 8–36.
- Cuadros Rodríguez, L., García campana, A.M., Jimenez Linares, C. & Roman Ceba, M. (1993). Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters*, 26(6): 1243–1258.
- Curi, R., Alvarez, M., Bazzote, R.B., Botion, L.M., Godoy, J. L. & Bracht, A. (1986). Effect of *Stevia rebaudiana* on glucose tolerance in normal adult humans. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 19(6): 771–774.
- Darise, M., Kohda, H., Mizutani, K., Kasai, R. & Tanaka, O. (1983). Chemical constituents of flowers of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(1): 133–135.
- Gonzalez, A., Cuadros, L., Alonso, E. & Vilchez, J.L. (1996). Estimate of gas chromatographic blanks application to detection limits evaluation as recommended by IUPAC. *Journal of Chromatography A*, 726(1-2): 133–139.
- Goyal, S.K. (2009). *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(1): 1–10.
- Isolabella, S., L. Cogoi, P., Lopez, Anesini, C., Ferraro, G. & Filip, R. (2010). Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. *Food Chemistry*, 122(3): 695–699.
- IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). (1978). Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis – II data interpretation. Analytical chemistry division. *Spectrochimica Acta B: Atomic Spectroscopy*, 33(6): 241–245.
- Jackson, A.U., Tata, A., Wu, C., Perry, R. H., Haas, G. & West, L. (2009). Direct analysis of *Stevia* leaves for diterpene glycosides by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*, 134(5): 867–874.
- Kaneda, N. & Kasai, R. (1977). Chemical studies on sweet diterpene-glycosides of *Stevia rebaudiana*: conversion of stevioside into rebaudioside-A. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 25(9): 2466–2467.
- Kujur, R.S., Singh, V., Ram, M., Yadava, H. N., Singh, K. K. & Kumari, S. (2010). Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Research*, 2(4): 258–263.
- Lewis, W.H. (1992). Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. *Economic Botany*, 46(3): 336–337.
- Madan, S., Ahmad, S., Singh, G., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R. & Garg, M. (2010). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni – a review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1(3): 267–286.
- Mandel, J. & Stiehler, R.D. (1954). Sensitivity—A criterion for the comparison of methods of test. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, 53(3): 155–159.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J. & Smeyers Verbeke, J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Amsterdam: Elsevier Science. 867 pp.
- Melis, M. (1995). Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in rats: renal effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 47(3): 129–134.
- Millones, C., Mori, G., Bacalla, J., Vásquez, E. & Tafur, R. (2014). Obtención de un filtrante de

- anís de monte (*Tagetes filifolia* Lag.) edulcorado con hojas de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Scientia Agropecuaria*, 5: 45–51.
- ISO (International Organization for Standardization). (1994). *ISO 5725-1:1994: Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results*. Ginebra: International Organization for Standardization. 234 pp.
- Sakamoto, I., Yamasaki, K. & Tanaka, O. (1977). Application of ^{13}C NMR spectroscopy to chemistry of plant glycosides. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 25(12): 844–846.
- Shukla, S., Metha, A., Metha, P. & Bajpai, V.K. (2011). Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(7-8): 807–811.
- The Plant List (2013). *The Plant List*. Version 1.1. [Consulted: 8.vi.2022]. <<http://www.theplantlist.org>>.
- USP 32 (United States Pharmacopeial Convention 32). (2009). *General Chapter 1225: Validation of compendial methods*. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 32. [Consulted: 9.iii.2022]. <http://www.uspbpep.com/usp32/pub/data/v32270/usp-32nf27s0_c1225.html>.
- Woelwer Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A. & Wüst, M. (2010). Improved HPLC method for evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research and Technology*, 231: 581–588.
- Wöelwer-Rieck, U. (2012). The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4): 886–895.
- Wood, H.B., Allerton, R., Diehl, H.W. & Fletcher, H.G. (1955). Stevioside I. The structure of the glucose moieties. *Journal of Organic Chemistry*, 20(7): 875–883.
- Yadav, A. K., Singh, S., Dhyan, D. & Ahuja, P.S. (2011). A review on the improvement of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(1): 1–27.
- Yong Heng, Y., Su Zhen, H., Yu Lin, H., Hai Yan, Y. & Chun Sun, G. (2014). Base substitution mutations in uridinediphosphate-dependent glycosyltransferase 76G1 gene of *Stevia rebaudiana* causes the low levels of rebaudioside A Mutations in UGT76G1 A key gene of steviol glycosides synthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80: 220–225.