

## CARACTERIZACIÓN DE CULTIVARES DE *Stevia rebaudiana* Bertoni DE DIFERENTES PROCEDENCIAS

César González<sup>1</sup>, María Soledad Tapia<sup>2</sup>, Elevina Pérez<sup>2</sup>, Manuel Dornier<sup>3</sup> y Gilles Morel<sup>4</sup>

### RESUMEN

Un número reducido de compuestos edulcorantes, bajos en calorías y con perfiles sensoriales similares a la sacarosa, se utilizan comercialmente en diversos productos alimenticios. Entre ellos, se destaca el interés que en la última década han generado los edulcorantes de origen natural, especialmente los glucósidos obtenidos a partir de las hojas de *Stevia rebaudiana* debido a su elevado sabor dulce y sinergismo con otros edulcorantes. El objetivo del presente estudio fue caracterizar dos cultivares de estevia procedentes de Venezuela, Colombia y Francia para establecer diferencias según su genotipo y lugar donde son cultivados. Se determinó la granulometría, materia seca, materia insoluble en alcohol (MIA), cenizas, pH, acidez titulable, grasa, proteínas, polifenoles totales, sólidos solubles totales (SST), color y turbidez en las hojas deshidratadas, así como la cuantificación de esteviolglucósidos (esteviósido y rebaudiósido A). Se encontraron valores similares en cuanto a cenizas, proteínas, pH, acidez y polifenoles en las muestras de diferente procedencia. El cultivar Morita II mostró similitud entre las muestras venezolana y colombiana para la mayoría de las variables analizadas. La variedad clonal francesa registró mayor valor en materia seca, MIA, grasa y turbidez, menor en SST y color, y sin tendencia en granulometría. Con relación al contenido de esteviolglucósidos, el cultivar Morita II presentó mayor proporción del rebaudiósido A mientras que en la variedad clonal francesa la mayor proporción fue del esteviósido. Ambos presentaron buena estabilidad térmica. Dado el mayor rendimiento y mejor perfil sensorial del rebaudiósido A, la Morita II, tanto venezolana como colombiana, luce promisoría para ser utilizada como sustituto de la sacarosa.

**Palabras clave adicionales:** Edulcorante, esteviósido, rebaudiósido A,

### ABSTRACT

#### Characterization of cultivars of *Stevia rebaudiana* Bertoni produced in different countries

A small number of sweetening compounds, low in calories and with sensory profiles similar to sucrose, are commercially used in various food products. Among them, it is notorious the interest that in the last decade have generated natural sweeteners, particularly glycoside obtained from leaves of *Stevia rebaudiana* because of its high sweetness and synergism with other sweeteners. The objective of this study was the characterization of two stevia cultivars coming from Venezuela, Colombia and France to establish differences according to genotype and place of origin. The characterization included particle size, dry matter, matter insoluble in alcohol (MIA), ash, pH, acidity, fat, protein, polyphenols, total soluble solids (TSS), color and turbidity in dehydrated leaves, along with quantification of steviolglycosides (stevioside and rebaudioside A). Similar values were found in terms of ash, protein, pH, acidity and polyphenols in samples of different origin. The Morita II cultivar showed similarity between the Venezuelan and Colombian samples for most of the variables. The French clonal variety recorded higher values of dry matter, MIA, grease and turbidity, lower values of TSS and color, and no trend in grain size. With regard to the contents of steviolglycosides, the cultivar Morita II showed higher proportion of rebaudioside A, while in French clonal variety the stevioside showed the highest proportion. Both of them presented good thermal stability. Given the higher yield and better sensory profile of rebaudioside A, Morita II, both Venezuelan and Colombian, looks promising to be used as a substitute for sucrose.

**Additional key words:** Sweetening compound, stevioside, rebaudioside A

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los edulcorantes más

utilizados en la formulación de alimentos bajos en calorías son compuestos sintéticos, de alta intensidad, no nutritivos y algunos de estos han

Recibido: Octubre 23, 2013

Aceptado: Mayo 5, 2014

<sup>1</sup> Programa Ingeniería Agroindustrial, Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Barquisimeto. Venezuela. e-mail: cesargonzalez@ucla.edu.ve

<sup>2</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología a de Alimentos, Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela. e-mail: mtiapiaucv@gmail.com ; perezee@hotmail.com

<sup>3</sup> Montpellier SupAgro, UMR QualiSud. CIRAD. Montpellier. Francia. e-mail: manuel.dornier@cirad.fr

<sup>4</sup> Département Persyst, UMR QualiSud. CIRAD. Montpellier. Francia. e-mail: gilles.morel@cirad.fr

demostrado ser cancerígenos o están asociados a diversas enfermedades (Keerthi et al., 2011). Por esta razón, en los últimos años la industria alimentaria ha dedicado esfuerzos en el desarrollo de agentes edulcorantes con características y propiedades similares a dichos compuestos, pero obtenidos de fuentes naturales.

Entre ellos se destaca el interés que, en la última década, han generado los edulcorantes obtenidos de la *Stevia rebaudiana*. El cultivo de esta planta se ha incrementado significativamente en las últimas décadas, a partir del momento en el que investigadores japoneses desarrollaron una serie de procesos para la extracción y purificación de los compuestos edulcorantes presentes en sus hojas (Dacome et al., 2005), los cuales son glucósidos de diterpenos responsables de aportar un marcado sabor dulce a las hojas de la planta. De dichos compuestos, más de 30 reportados hasta la fecha, los más conocidos son el esteviósido y rebaudiósido A (Wölwer, 2012). Entre las principales propiedades de estos glucósidos se encuentran su alta solubilidad en agua, elevado sabor dulce, escaso aporte calórico y estabilidad en condiciones ácidas. Los mencionados edulcorantes son extraídos de las hojas de la planta y se encuentran disponibles comercialmente en diversos países a nivel mundial donde han sido ampliamente utilizados para endulzar una gran variedad de alimentos (Sharoba et al., 2012).

Dentro de este marco, y aunado a la creciente atención que ha recibido el mencionado cultivo en Venezuela, la presente investigación da a conocer los resultados obtenidos tras la realización de la caracterización de dos cultivares de *Stevia rebaudiana* procedentes de tres regiones diferentes (Venezuela, Colombia y Francia), con el fin de evaluar la composición de los mismos, y así establecer diferencias o similitudes de acuerdo a su genotipo, así como al lugar donde son cultivados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los análisis fueron ejecutados, en la unidad mixta de Investigación Qualisud del Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le développement (CIRAD), ubicada en la ciudad de Montpellier, Francia. Se analizaron dos cultivares de estevia, los cuales diferían en su lugar de origen.

La muestra Venezolana, estuvo conformada por hojas de *Stevia rebaudiana* de la variedad Morita II, cultivada en el sector Guayabita de la localidad de Cagua, municipio Sucre del estado Aragua, Venezuela. Se removieron las hojas adultas de las ramas de plantas madres (mayores de seis meses de edad), en tres oportunidades diferentes (2 repeticiones), aprovechando las podas periódicas practicadas al cultivo para evitar su floración. Al día siguiente de su recolección fueron lavadas con abundante agua potable y deshidratadas en las instalaciones del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) de la Universidad Central de Venezuela (por espacio de 8 horas a 50 °C) hasta alcanzar una humedad final de 8 %. La muestra proveniente de Colombia estuvo constituida por hojas deshidratadas de estevia, también de la variedad Morita II, proporcionadas en Venezuela, por un importador que las adquiere de la región de Montelíbano, departamento de Córdoba, Colombia. Por último, las hojas de estevia de la variedad clonal IAN/VC-142, que conformaron la muestra francesa, fueron proporcionadas al CIRAD por la comunidad francesa de Marsillargues, provincia de Lunel.

Este material vegetal permitió establecer tres tipos de muestra conformados por dos cultivares de tres diferentes procedencias (dos repeticiones de cada lugar). Antes de su uso, las diferentes muestras de hojas deshidratadas fueron almacenadas, de forma individual, en bolsas de polietileno de alta densidad selladas a vacío, bajo condiciones de refrigeración ( $10 \pm 2$  °C) hasta su posterior uso.

Previo a su análisis las muestras fueron atemperadas por una hora a 25 °C y luego pulverizadas en un molinillo Peabody que redujo el material a partículas menores o iguales a 500 µm.

Se realizaron las siguientes determinaciones mediante tres lecturas en cada muestra:

- Granulometría. Se mezclaron 4 mL de agua con 40 mg de muestra durante 30 segundos en un vortex Stuart, seguido de 1 minuto en ultrasonido (Ultrasonicle 300); este proceso se repitió tres veces. Una vez acondicionada la muestra, se determinó la distribución del tamaño de sus partículas en un analizador de granulometría laser Mastersize 3000.

- Materia seca a vacío. Según AOAC (1995), se

emplearon 5 g de muestra, las cuales fueron introducidas en una estufa dispuesta con bomba a vacío Heraeus, en condición de gravedad cero.

- Materia insoluble en alcohol (MIA). Se emplearon 5 g de muestra y se aplicó el método descrito por Voragen et al. (1983).

- Cenizas. Se colocaron 2 g de muestra en crisoles de porcelana y fueron incinerados en una mufla a 600 °C por 4 horas.

- pH: Se determinó mediante un potenciómetro Orion 420 A.

- Acidez titulable. Según el método AOAC (1995), se utilizaron 5 g de muestra y en un equipo Titroline Schott mod. 96, con una solución titulante de hidróxido de sodio 1N.

- Materia grasa. Se analizaron 4 g de muestra empleando una unidad de autoextracción Soxhlet Avanti.

- Proteínas. Las proteínas totales se determinaron en 200 µL de extracto, según el método de Lowry.

- Polifenoles totales. Se utilizó el método modificado de Folin-Ciocaltu (Wolfe et al., 2003), utilizando la curva de calibración de una solución estándar de ácido gálico.

Por otra parte, se obtuvieron extractos de las hojas de *Stevia* aplicando la metodología descrita por Chhaya et al. (2012). Para ello se adicionaron en tubos de centrífuga 14 mL de agua por cada gramo de hoja pulverizada. La solución resultante se mantuvo por 56 minutos a 78 °C, en un baño termostático con agitación. Luego fueron filtrados (0,45 µm) y vaciados en recipientes de polietileno, dispuestos con tapa.

Los extractos fueron elaborados el mismo día del análisis y se mantuvieron en condiciones de refrigeración. En ellos se determinó lo siguiente:

- Sólidos solubles. Se empleó un refractómetro digital Atago.

- Color y turbidez. Se utilizó un espectrofotómetro UV Shimadzu mod. 2450 empleando longitudes de onda de 670 y 420 nm, para turbidez y color, respectivamente.

- Para la identificación de los principales esteviolglucósidos presentes en los extractos se empleó metodología de HPLC utilizando un cromatógrafo Agilent Technologies mod. 1200 acoplado a un espectrógrafo de masas Shimadzu GC-MS QP-2010. Para la toma de espectros se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Thermo mod. Genesys 10UV, demandado por la naturaleza de la sustancia en estudio. Previamente

se evaluaron dos tipos de columnas: RP C18 de 250 x 4,6 mm DI y Sphercclone 5µ NH<sub>2</sub> de 250 x 4,6mm. Una vez determinada la columna más adecuada para el tipo de constituyente analizado, se efectuaron diversos ensayos en los cuales se varió la proporción de la fase móvil inyectada al equipo (proporción acetonitrilo:agua) a fin de generar curvas apreciables y distantes unas de otras en los cromatogramas que permitieran separar los dos esteviolglucósidos más predominantes y de mayor interés. Una vez estandarizadas las condiciones de operación del cromatógrafo, se inyectaron soluciones estándar de esteviósido y rebaudiósido A (98% de pureza, Sigma-Aldrich) con el propósito de establecer el tiempo de elución requerido por cada uno de los dos esteviolglucósidos y construir las curvas de calibración que permitieran, a través del área de los picos respectivos, cuantificar la concentración de los mismos. Finalmente, se generaron cromatogramas que permitieron apreciar y cuantificar la concentración de esteviósido y rebaudiósido A presentes en las muestras.

Los análisis se realizaron antes y después del tratamiento térmico aplicado al extracto con el fin de evaluar si la alta temperatura producía degradación de los esteviolglucósidos.

Los resultados obtenidos en cada tipo de muestra fueron comparados mediante análisis de la varianza y prueba de medias de Tukey utilizando el programa SigmaPlot versión 12.0 (San José, CA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los tres tipos de muestra exhibieron una granulometría con el mismo patrón de distribución de tamaño de partículas (Cuadro 1). Las partículas, en su mayoría, se ubicaron en tamaños superiores a 40 µm y representaron casi el 90 % del total de muestra. Contrariamente, y en relación a las partículas de menor tamaño, se detectaron diferencias para las categorías de 0,1-7 µm y 7-20 µm ( $P \leq 0,01$ ) y 20-40 µm ( $P \leq 0,05$ ), en las que la variedad clonal francesa IANVC-142 mostró contajes superiores a las muestras de Morita II de Colombia y Venezuela. Aun cuando el predominio de partículas finas puede favorecer la extracción de compuestos por métodos de separación con solventes (Qu et al., 2010; Soria et al., 2010; Wijngaard et al., 2012), el porcentaje tan bajo de

este tipo de partícula en las muestras probablemente no permitió la detección de diferencias en la extracción de compuestos, como quedó evidenciado en los posteriores análisis de sólidos solubles, polifenoles, y cuantificación del esteviósido y rebaudiósido A.

**Cuadro 1.** Porcentaje de partículas según su tamaño en hojas pulverizadas de cultivares de estevia de diferentes procedencias

| Cultivar/<br>procedencia | Rangos de tamaño (µm) |        |         |         |         |
|--------------------------|-----------------------|--------|---------|---------|---------|
|                          | 0,1-7                 | 7-20   | 20-40   | 40-300  | 300-500 |
| Morita II/V              | 1,50 b                | 3,33 b | 5,61 ab | 43,84 a | 45,45 a |
| Morita II/C              | 2,05 a                | 3,54 b | 5,39 b  | 43,98 a | 44,86 a |
| IANVC-142/F              | 2,28 a                | 4,99 a | 5,95 a  | 39,15 b | 47,72 a |

V: Venezuela; C: Colombia; F: Francia

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

Por otra parte, la cuantificación de la materia seca mostró diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre los tres tipos de material (Cuadro 2), con el mayor valor para la variedad clonal francesa (94,85 %) y el menor para la Morita II venezolana (92,52 %). Estos porcentajes de materia seca coinciden con el rango de valores reportados por Savita et al. (2004), Abou et al. (2010) y Mishra et al. (2010) para otros cultivares de diferente procedencia.

**Cuadro 2.** Materia seca, materia insoluble en alcohol (MIA) y cenizas en cultivares de estevia de diferentes procedencias

| Cultivar/<br>procedencia | Materia seca | MIA      | Cenizas |
|--------------------------|--------------|----------|---------|
|                          | (%)          |          |         |
| Morita II/V              | 92,52 c      | 47,33 ab | 7,04 a  |
| Morita II/C              | 94,15 b      | 46,64 b  | 6,27 a  |
| IANVC-142/F              | 94,85 a      | 57,21 a  | 7,55 a  |

V: Venezuela; C: Colombia; F: Francia

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

En general, los valores de materia insoluble en alcohol fueron relativamente altos en las tres muestras en estudio (Cuadro 2). La variedad clonal de Francia superó en más de 10 puntos porcentuales, al cultivar de Colombia, aunque no al de Venezuela. Esto evidencia un mayor contenido en compuestos hidrosolubles en las muestras de Colombia, aspecto favorable para la

obtención de un mayor rendimiento en la elaboración de extractos compuestos por constituyentes bioactivos y edulcorantes a partir de las hojas.

Por otro lado, los porcentajes de ceniza en las muestras oscilaron entre 6,27 y 7,55; sin diferencias entre ellos. Estos valores concuerdan con las cifras de 6,3 y 7,41 % reportadas por Goyal et al. (2010) y Abou et al. (2010), respectivamente.

En el Cuadro 3 puede apreciarse que las tres muestras en estudio mostraron resultados similares en cuanto al pH y acidez titulable. El pH se mantuvo, en promedio, entre 5,41 y 5,59, y la acidez entre 2,45 y 3,34 %, sin diferencias estadísticas entre ellos ( $P > 0,05$ ).

**Cuadro 3.** Valores de pH y acidez titulable en cultivares de estevia de diferentes procedencias

| Cultivar/<br>procedencia | pH     | Acidez titulable (%<br>como ácido láctico) |
|--------------------------|--------|--------------------------------------------|
| Morita II/V              | 5,52 a | 3,34 a                                     |
| Morita II/C              | 5,59 a | 3,22 a                                     |
| IANVC-142/F              | 5,41 a | 2,45 a                                     |

V: Venezuela; C: Colombia; F: Francia

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

Las muestras de hojas de estevia pulverizadas procedentes de Venezuela presentaron menor proporción de materia grasa (1,2 %) en comparación con las muestras de Colombia y Francia (Cuadro 4), las cuales registraron valores estadísticamente iguales entre sí (1,84 y 1,85 %, respectivamente). Estos bajos valores, en general, indican que ninguna de estos cultivares podría representar una conveniente fuente de aceite.

**Cuadro 4.** Materia grasa, proteína y polifenoles totales en cultivares de estevia de diferentes procedencias

| Cultivar/<br>procedencia | Materia<br>grasa | Proteína | Polifenoles<br>totales           |
|--------------------------|------------------|----------|----------------------------------|
|                          | (%)              |          | (mg ác. gálico·g <sup>-1</sup> ) |
| Morita II/V              | 1,20 b           | 11,13 a  | 62,56 a                          |
| Morita II/C              | 1,84 a           | 9,87 a   | 58,90 a                          |
| IANVC-142/F              | 1,85 a           | 10,54 a  | 50,48 a                          |

V: Venezuela; C: Colombia; F: Francia

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

Valores similares de materia grasa fueron señalados por Goyal et al. (2010) quienes reportaron valores de 1,9 %, a diferencia de Kaushik et al. (2010), Atteh et al. (2011) y Yadav et al. (2012) quienes obtuvieron cantidades ligeramente superiores (2,5 a 2,7 %). En este sentido, Tadhani y Subhash (2006) señalaron que entre los diferentes ácidos grasos en el aceite extraído de las hojas de estevia el ácido palmítico es el que se encuentra en mayor proporción, en contraposición con el esteárico el cual presenta el nivel más bajo. En relación al contenido de proteína en las muestras los valores fluctuaron entre 9,87 y 11,13, sin diferencias estadísticas entre ellos. Savita et al. (2004), Mishra et al. (2010) y Abou et al. (2010) encontraron contenidos proteicos cercanos éstos.

La cantidad total de compuestos fenólicos osciló entre 50,48 y 62,56 mg equivalentes de ácido gálico por gramo, sin diferencias estadísticas entre ellos. El valor mayor es similar a los reportados por Shukla et al. (2009) y Jahan et al. (2010). Debido al creciente interés por las propiedades benéficas de los compuestos fenólicos, su incorporación en la industria alimentaria ha aumentado notablemente, ya que además de retardar la degradación oxidativa de los lípidos, mejoran la calidad y el valor nutricional de los alimentos que los contienen. Estos atributos bioactivos fortalecen aun más la conveniencia en el uso de las hojas de estevia como sustituto de la sacarosa.

Al analizar el color en las muestras de estevia (Cuadro 5), se encontró que el índice de claridad y luminosidad (valor L) en la variedad clonal de Francia fue significativamente menor que en el cultivar Morita II. El valor más bajo de dicha muestra era de esperarse por su tonalidad más oscura, afin con un color marrón oscuro. En general, los tres tipos de muestra presentaron valores moderados de reflectancia de la luz, dado su predominante color verde intenso.

En cuanto al matiz o índice de longitud de onda (valor a), la predominancia de valores negativos en las muestras pulverizadas de estevia, indican que éstas poseen mayor afinidad por el color verde grisáceo, con diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre los tres tipos de muestra (Cuadro 5). Al igual que el valor L, la variedad clonal procedente de Francia presentó un valor más bajo en términos absolutos.

En relación al valor b, todas las muestras pulverizadas de estevia presentaron valores positivos (Cuadro 5), exhibiendo cercanía en su tonalidad al color azul, más que al color amarillo.

Las muestras con mayor predominancia al azul (valores más altos), fueron las hojas de Morita II procedentes de Colombia y Venezuela. La variedad clonal proveniente de Francia alcanzó el menor valor, lo que indica más cercanía hacia la tonalidad amarilla grisácea.

**Cuadro 5.** Valores de color (sistema CIE Lab) en cultivares de estevia de diferentes procedencias

| Cultivar/<br>procedencia | L       | a       | b        |
|--------------------------|---------|---------|----------|
| Morita II/V              | 33,59 b | -6,54 a | 11,46 ab |
| Morita II/C              | 38,18 a | -5,19 b | 13,65 a  |
| IANVC-142/F              | 31,07 c | -1,30 c | 9,88 b   |

V: Venezuela; C: Colombia; F: Francia

Letras distintas por parámetro de color en cada columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

La concentración de sólidos solubles fue superior ( $P \leq 0,05$ ) en la variedad Morita II Colombiana y Venezolana, con valores 0,9 y 1,0 °Brix, respectivamente (Cuadro 6). Por otra parte, las muestras venezolanas exhibieron menor turbidez y mayor transparencia (Cuadro 1), atribuido a una menor presencia de partículas muy finas en suspensión (0,1-7,0  $\mu\text{m}$ ). En general, los valores fueron ligeramente inferiores a los reportados por Fernandes et al. (2001), quienes obtuvieron absorbancias de 0,46 a 0,52 para este parámetro.

**Cuadro 6.** Concentración de sólidos solubles totales (SST) y turbidez en cultivares de estevia de diferentes procedencias

| Cultivar/<br>procedencia | SST<br>(°Brix) | Turbidez<br>(absorbancia) |
|--------------------------|----------------|---------------------------|
| Morita II/V              | 0,93 a         | 0,28 b                    |
| Morita II/C              | 1,00 a         | 0,38 a                    |
| IANVC-142/F              | 0,66 b         | 0,40 a                    |

V: Venezuela; C: Colombia; F: Francia

Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

Para la evaluación de los esteviolglucósidos, los ensayos preliminares de evaluación tanto de la

columna a emplear en el cromatógrafo como la proporción de la fase móvil a inyectar, permitieron establecer, como condiciones más convenientes, el uso de la proporción 80:20, acetonitrilo:agua, así como la columna Spheredclone 5  $\mu$  NH<sub>2</sub> de 250 x 4,6 mm. Bajo estas circunstancias se consiguieron cromatogramas con curvas más ondulantes, con picos distantes unos de otros, que facilitaban su interpretación.

Al inyectar las soluciones estándar de esteviósido y rebaudiósido A, se produjeron los cromatogramas que se presentan en las Figuras 1 y 2. En ellos se puede apreciar el tiempo de elución requerido para cada uno de ellos, 15,85 y 24,13 minutos, respectivamente.

En el cromatograma presentado en la Figura 3 puede apreciarse el pico correspondiente a cada muestra para el esteviósido y rebaudiósido A.

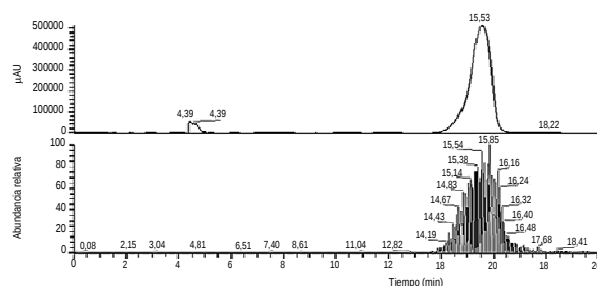
Las curvas patrón construidas a partir de las soluciones estándar permitieron cuantificar, en los mencionados cromatogramas, a través de las áreas exhibidas, los dos esteviolglucósidos de interés (Cuadro 7). De acuerdo con Giraldo et al. (2005), los glucósidos encontrados principalmente en las hojas de estevia, constituyen el 15 % del contenido, dependiendo de la variedad. Su aporte en cada uno de los esteviolglucósidos depende de las condiciones de crecimiento de la planta, así como de su manejo agronómico (Pól et al., 2007). Los extractos purificados obtenidos a partir de ellas, y que se ofrecen actualmente en el mercado, contienen generalmente más del 80 % de esteviósido, o en otros casos, más del 90 % de rebaudiósido A (Gardana et al., 2010).

En relación a la concentración de esteviósido, la variedad clonal de Francia presentó el mayor valor, superando en promedio el 4 % del peso de las hojas deshidratadas de estevia (43,71 mg·g<sup>-1</sup>). Este valor es ligeramente inferior al 6,5 % reportado por Vázquez et al. (2014) en las hojas de la planta. En otros estudios en plantas provenientes de diferentes países los valores han variado entre 2,1 y 15,7 % (Gardana et al., 2010; Yadav et al., 2012; Montoro et al., 2013).

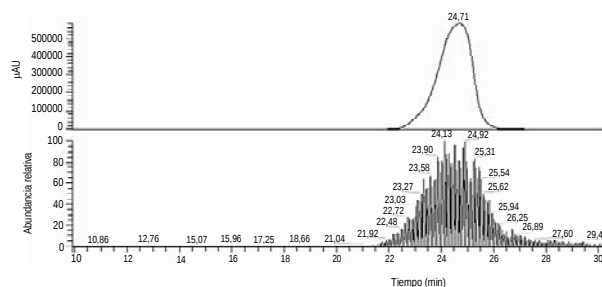
Las muestras de Morita II venezolana y colombiana, registraron cerca de la mitad de este valor (1,9 y 2,2 %, respectivamente). Como era de esperarse, la similitud entre estos dos valores se explica por pertenecer a la misma variedad y la cercanía geográfica de estos países de clima tropical.

Por otra parte, las concentraciones del

rebaudiósido A alcanzaron niveles mayores en la variedad Morita II cultivada tanto en Venezuela como en Colombia, y los cuales casi cuadruplican la concentración encontrada en el esteviósido (Cuadro 7). Por el contrario, la variedad clonal francesa obtuvo un valor bajo (0,0177 g·g<sup>-1</sup>) de este glucósido, coincidiendo con los niveles obtenidos por Jaitak et al. (2009), Afandi et al. (2013) y Gardana et al. (2010) en plantas de estevia provenientes de Himalaya, Malasia e Italia, respectivamente.



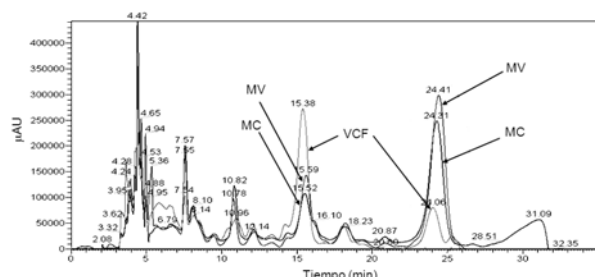
**Figura 1.** Cromatograma generado del análisis de HPLC de la solución estándar de esteviósido



**Figura 2.** Cromatograma generado del análisis de HPLC de la solución estándar de rebaudiósido A

Estos resultados sugieren diferencias entre las variedades provenientes de dos zonas geográficas y evidencian la mejoría genética de la variedad Morita II cultivada en Venezuela y Colombia, dado que presentó mayores niveles de rebaudiósido A que de esteviósido (en la variedad clonal proveniente de Francia los niveles se presentaron al contrario). Como se ha descrito en la literatura (Abou et al., 2010; Li et al., 2013; Musa et al., 2014) el esteviósido tiene mayor incidencia en la generación de un sabor residual amargo que limita la aceptabilidad de los alimentos formulados con extractos de estevia (algunos autores lo describen como sabor residual a hierro), a diferencia del rebaudiósido A, el cual

presenta un perfil sensorial más próximo al gusto deseado de la sacarosa; además, favorece directamente el rendimiento del producto ya que tiene mayor capacidad de endulzar (400 veces más que la sacarosa) según De Paula (2010), (Wölwer et al. (2010) y Carvalho et al. (2013).



**Figura 3.** Contenido de rebaudiósido A en cultivares de estevia de diferentes procedencias. MV: Morita II (venezolana); MC: Morita II (colombiana); VCF: Variedad clonal IANVC-142 (francesa)

**Cuadro 7.** Concentración de esteviolglucósidos ( $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) en cultivares de estevia de diferentes procedencias

| Cultivar/<br>procedencia | Esteviósido | Rebaudiósido<br>A | Esteviósido +<br>Rebaudiósido A |
|--------------------------|-------------|-------------------|---------------------------------|
| Morita II/V              | 0,0191 b    | 0,0747 a          | 0,0938 a                        |
| Morita II/C              | 0,0224 ab   | 0,0695 ab         | 0,0920 a                        |
| IANVC-142/F              | 0,0437 a    | 0,0177 b          | 0,0614 b                        |

V: Venezuela; C: Colombia; F: Francia

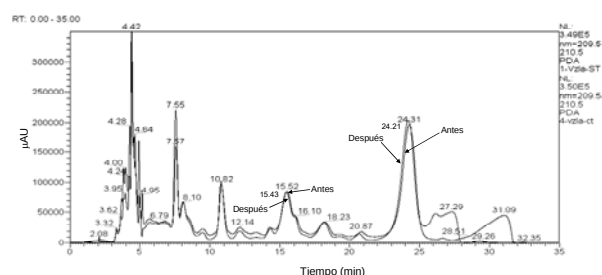
Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas según la prueba de Tukey ( $P \leq 0,05$ )

Lo anterior permite aseverar la conveniencia del uso de la Morita II, venezolana y colombiana, para la elaboración de edulcorantes con mejores propiedades sensoriales debido a su relativamente alta concentración de rebaudiósido A, el componente más importante de los edulcorantes más comercializados en la actualidad a nivel mundial.

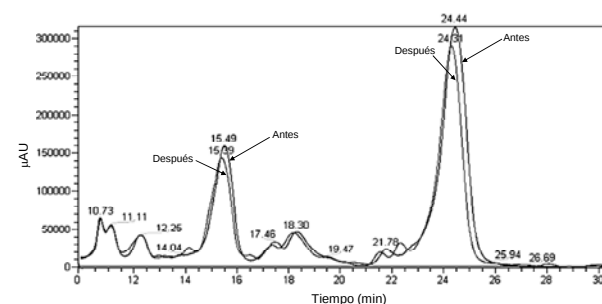
Las figuras 4, 5 y 6 muestran que no hubo una variación importante en la concentración de los mencionados esteviolglucósidos en los extractos antes y después del tratamiento térmico indicando que se mantuvo la estabilidad de ambos compuestos bajo las condiciones ensayadas. Esto coincide con los resultados de Kroyer (1999), Abou et al. (2010) y Lemus et al. (2012), quienes demostraron que extractos sometidos a diversos tratamientos térmicos de hasta 120 °C prácticamente no registran

degradación del esteviósido, y sólo ligeras pérdidas de hasta el 5 %, bajo tratamientos más severos, como condiciones de pH extremas por prolongados periodos de tiempo.

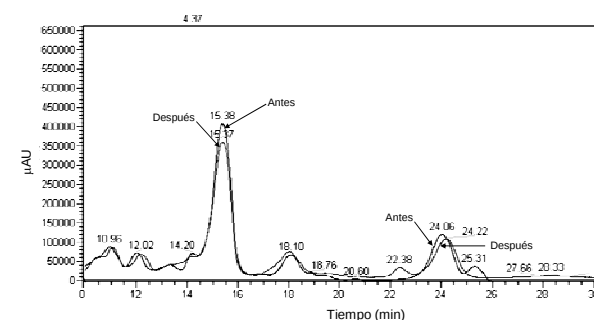
La estabilidad de ambos esteviolglucósidos ante diferentes factores estresantes también ha sido reportada por Prakash et al. (2011), quienes, adicionalmente, analizaron la estabilidad frente a luz fluorescente, y por Gong et al. (2013) frente a diferentes pH y temperaturas durante largos periodos de almacenamiento (9 meses) en los que sólo se registraron pérdidas inferiores al 6 %.



**Figura 4.** Cromatogramas obtenidos en el análisis por HPLC de la muestra del cultivar Morita II venezolano, antes y después de la aplicación del tratamiento térmico



**Figura 5.** Cromatogramas obtenidos en el análisis por HPLC de la muestra del cultivar Morita II colombiano, antes y después de la aplicación del tratamiento térmico



**Figura 6.** Comatogramas obtenidos en el análisis por HPLC de la muestra de la variedad clonal cultivar IANVC-142 francés, antes y después de la aplicación del tratamiento térmico

## CONCLUSIONES

La caracterización de los dos cultivares de estevia de tres procedencias distintas detectó similitud en las muestras de Morita II venezolanas y colombianas para la mayoría de las variables evaluadas. Los valores de ceniza, proteína, polifenoles y pH fueron similares en los tres tipos de muestra. Sin embargo, el contenido de grasa y de materia insoluble en alcohol en la variedad clonal cultivada en Francia registró los mayores valores. Con relación al contenido de esteviolglucósidos, el cultivar Morita II presentó mayor proporción del rebaudiosido A mientras que en la variedad clonal francesa la mayor proporción fue del esteviósido. Dado el mayor rendimiento y mejor perfil sensorial del rebaudiosido A como edulcorante, la Morita II, tanto venezolana como colombiana, luce muy promisorio para ser utilizada como sustituto de la sacarosa ya sea a nivel doméstico o industrial.

## LITERATURA CITADA

1. Abou A., A. Abou y F. Abu. 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African J. Food Sci.* 4(5): 269-281.
2. Afandi, A., S. Sarijan, y K. Shaha. 2013. Optimization of rebaudioside an extraction from *Stevia Rebaudiana* (Bertoni) and quantification by high performance liquid chromatography analysis. *J. Tropical Resources and Sustainable Sci.* 1(1): 62-70.
3. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1995. Official Methods of Analysis. 16<sup>th</sup> edition. Washington, D.C.
4. Atteh, J., O. Onagbesan, K. Tona, J. Buyse, E. Decuypere y J. Geuns. 2011. Potential use of *Stevia rebaudiana* in animal feeds. *Arch. Zootec.* 60 (229): 133-136.
5. Carvalho, A.C., R.C. Oliveira, M.F. Navacchi, C.E. Costa, D. Mantovani, A.S. Dacôme, F.A. Seixas y S.C. Costa. 2013. Evaluation of the potential use of rebaudioside-A as sweetener for diet jam. *Food Sci. Technol (Campinas)* 33(3): 555-560.
6. Chhaya, C., S. Mondal, G. Majumdar y S. De. 2012. Clarification of stevia extracts using cross flow ultrafiltration and concentration by nanofiltration. *Separation and Purification Technology* 89: 125-134.
7. Dacome, A.S., C.C. Da Silva y C.E. Da Costa. 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochem.* 40: 3587-3594.
8. De Paula, C., M. Simanca, Y. Pastrana, A. Carmona y G. Lombana. 2010. Condiciones de utilización del esteviósido en la elaboración de mermelada de guayaba dulce (*Psidium guajava* L.). *Rev. Asoc. Col. Cien. Tecnol. Alim.* 19(21): 1-12.
9. Fernandes, L., N. Curvelo, E. Scolin, O. Curty y S. Da Costa. 2001. Clarificação do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* (Bert.) utilizando o cacto, *Cereus peruvianus*. *Acta Scientiarum* 23(6): 1369-1374.
10. Gardana, C., M. Scaglianti y P. Simonetti. 2010. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217: 1463-1470.
11. Giraldo, C., L. Marín y D. Habeych. 2005. Obtención de edulcorantes de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 36: 3-10.
12. Gong, Q. y L.N. Bell. 2013. Degradation kinetics of rebaudioside A in various buffer solutions. *Int. J. Food Sci. Tech.* Doi: 10.1111/ijfs.12241
13. Goyal, S., A. Samsher y R. Goyal. 2010. *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio- sweetener: A review. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 61: 1-10.
14. Jahan, I.A., M. Mostafa, H. Hossain, I. Nimmi, A. Sattar, A. Alim, y A.M. Iqbal. 2010. Antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* Bert. leaves from Bangladesh. *Bangladesh Pharm. J.* 13(2): 67-75
15. Jaitak, V., B.S. Bandna, y V.K. Kaul. 2009. An efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Phytochem. Anal.* 20:

- 240-245.
16. Kaushik, R., N. Pradeep, V. Vamshi, M. Geetha, y A. Usha. 2010. Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *J. Food Sci. Technol.*, 47: 27-33.
  17. Keerthi, P., M. Vankadari y S. Kalakoti. 2011. Natural sweeteners: A Complete Review. *J. Pharm. Res.* 4: 2034-2039.
  18. Kroyer, G. 1999. The low calorie sweetener stevioside: stability and interaction with food ingredients. *Lebensm.-Wiss. U. Technol.* 32: 509-512.
  19. Li, S., W. Li, Q. Xiao y Y. Xia. 2013. Transglycosylation of stevioside to improve the edulcorant quality by lower substitution using cornstarch hydrolyzate and CGTase. *Food Chem.* 138: 2064-2069.
  20. Mishra, P., R. Singh, U. Kumar, y V. Prakash. 2010. *Stevia rebaudiana*-A magical sweetener. *Global J. Biotechnol. Biochem.* 5: 62-74.
  21. Montoro, P., I. Molfetta, M. Maldini, L. Ceccarini, S. Piacente, C. Pizza y M. Macchia. 2013. Determination of six steviol glycosides of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) from different geographical origin by LC-ESI-MS/MS. *Food Chem.* 141: 745-753.
  22. Musa, A., M. Miao, T. Zhang y B. Jiang. 2014. Biotransformation of stevioside by *Leuconostoc citreum* SK24.002 alternansucrase acceptor reaction. *Food Chem.* 146: 23-29.
  23. Pól, J., B. Hohnová, y T. Hyötyläinen. 2007. Characterization of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1150: 85-92.
  24. Prakash, V., J. Clos y I. Prakash. 2011. Stability study of steviol glycosides in mock beverages using fluorescent light exposure under ICH guidelines. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3(3): 316-323.
  25. Qu, W., Z. Pan y H. Ma. 2010. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *J. Food Eng.* 99(1): 16-23.
  26. Savita, S., K. Sheela, S. Sunanda, A. Shankar y P. Ramakrishna. 2004. *Stevia rebaudiana*-A functional component for food industry. *J. Hum. Ecol.* 15: 261-264.
  27. Sharoba, A.M., A.I. El-Desouky y M.H. Mahmoud. 2012. Effect of addition some hydrocolloids and sweeteners on flow behavior and sensory properties of papaya-apricot nectar blends. *J. Food Process Technol.* 3: 3-8.
  28. Shukla, S., A. Mehta, V. Bajpai, y S. Shukla. 2009. *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food Chem. Toxicol.* 47: 2338-2343.
  29. Soria, A.C. y M. Villamiel. 2010. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends Food Sci. Tech.* 21(7): 323-331.
  30. Tadhani, M. y R. Subhash. 2006. Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *J. Med. Sci.* 6(3): 321-326.
  31. Vázquez-Baxcajay, L., A. Robledo-Paz, A. Muratalla-Lúa y V. Conde-Martínez. 2014. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni y detección de esteviósidos. *Bioagro* 26(1): 49-56.
  32. Voragen, AG, P.J. Jet, J.P. Linsen, H.A. Schols y W. Pilnik. 1983. Methods of Analysis for cell-wall Polysaccharides of fruit and vegetables. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 177(4): 251-256.
  33. Wijngaard, H., M.B. Hossain, D.K. Rai y N. Brunton. 2012. Techniques to extract bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food Res. Int.* 46(2): 505-513.
  34. Wolfe, K., X. Wu y R.H. Liu. 2003. Antioxidant activity of apple peels. *J. Agr. Food Chem.* 51: 609-614.
  35. Wölwer, U. 2012. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. *J. Agric. Food Chem.* 60: 886-895.
  36. Wölwer, U., W. Tomberg, y A. Wawrzun. 2010. Investigations on the stability of Stevioside and Rebaudioside A in soft drinks. *J. Agric. Food Chem.* 58: 12216-12220.

37. Yadav, S.K. y P. Guleria. 2012. Steviol Glycosides from stevia: Biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. Crit. Rev. Food Sci. 52: 988-998.