



Original / *Alimentos funcionales*

## Evaluación de la inocuidad de *Stevia rebaudiana* Bertoni cultivada en el sureste de México como edulcorante de alimentos

Irma Aranda-González<sup>1</sup>, Enrique Barbosa-Martín<sup>1</sup>, Rocío Toraya-Avilés<sup>1</sup>, Maira Segura-Campos<sup>1</sup>, Yolanda Moguel-Ordoñez<sup>2</sup> y David Betancur-Ancona<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo experimental Mochochá, Mochochá, Yucatán. México.

### Resumen

Las hojas de *Stevia rebaudiana* y sus glucósidos recientemente se han comenzado a utilizar de manera importante como edulcorantes. Sin embargo, existen reportes acerca del efecto antihiper glucemiante de extractos y un componente glucósido. El objetivo de este trabajo fue cuantificar los glucósidos de *S. rebaudiana*, evaluar la citotoxicidad y el efecto de la administración aguda y crónica del extracto sobre la glucemia en modelos animales como en humanos. Los glucósidos de los extractos de las variedades Morita II y Criolla se cuantificaron por HPLC, empleando una columna C18 (250 mm x 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 µm), con detector UV a 210 nm, fase móvil de acetonitrilo/amortiguador fosfato de sodio 10 mmol/L, pH 2.6 (32:68 v/v). Se realizó un estudio de citotoxicidad en células Vero, una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal y ensayo de consumo crónico (4 semanas) en un modelo animal de diabetes y finalmente, se determinó el índice glicémico (I.G) en individuos sanos. El contenido de glucósidos fue mayor en la variedad Morita II aunque la CC<sub>50</sub> en ambas es >300 µg/mL. Las áreas bajo la curva de la IPGTT así como la glucosa en ayuno de los animales no fueron significativamente diferentes (p>0.05) y el I.G. del extracto fue 11.11%, lo cual lo clasifica como I.G. bajo. El extracto de *S. rebaudiana* Morita II es de bajo índice glicémico y, en las dosis evaluadas, no es citotóxico ni posee efecto agudo o crónico sobre la glucemia, lo cual lo hace un edulcorante inocuo.

(Nutr Hosp. 2014;30:594-601)

DOI:10.3305/nh.2014.30.3.7634

Palabras clave: *Stevia rebaudiana*. Inocuidad. Índice Glicémico. Diabetes Mellitus. Edulcorante.

### SAFETY ASSESSMENT OF *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI GROWN IN SOUTHEASTERN MEXICO AS FOOD SWEETENER

#### Abstract

*Stevia rebaudiana* leaves and their glycosides have been recently and significantly used so important as sweeteners. However, it has been reported an anti-hyperglycemic effect of the extract and a glycoside. The aim of this study was to quantify *S. rebaudiana* glycosides, assess cytotoxicity of the extract and its acute and chronic effect on blood glucose in animal models and in human. The glycosides of the Morita II and Criolla extract were quantified by HPLC, using a C18 column (250 mm x 4.6 mm and particle size of 5 µm) with UV detection at 210 nm, mobile phase of acetonitrile/sodium phosphate buffer 10 mmol/L, pH 2.6 (32:68 v/v). Cytotoxicity study was performed in Vero cells, whereas an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) and a chronic consumption assay (4 weeks) were executed in an animal model of diabetes; finally the glycemic index (G.I) was determined in healthy individuals. The glycoside content is higher in the Morita variety II although both had a CC<sub>50</sub> >300 µg/mL. The areas under the curve of the IPGTT and fasting glucose of the animals were not significantly different (p> 0.05) and the I.G. extract was 11.11 %, which classifies the extract as low I.G. The extract of *S. rebaudiana* Morita II has a low glycemic index and, in the doses tested, is not cytotoxic nor has acute or chronic effect on blood sugar, which makes it a safe sweetener.

(Nutr Hosp. 2014;30:594-601)

DOI:10.3305/nh.2014.30.3.7634

Key words: *Stevia rebaudiana*. Safety. Glycemic Index. Diabetes Mellitus. Sweetener.

**Correspondencia:** David Betancur-Ancona.  
Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán.  
Periférico Norte Km. 33.5, Tablaje Catastral 13615.  
Col. Chuburna de Hidalgo Inn. Mérida, Yucatán.  
C.P. 97203, México.  
E-mail: bancona@uady.mx

Recibido: 28-V-2014.  
Aceptado: 28-VI-2014.

## Abreviaturas

AUC: Área bajo la curva.

CC<sub>50</sub>: Concentración citotóxica 50.

DMEM: Medio basal de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's médium).

DO: Densidad óptica.

FDA: Administración de Drogas y Alimentos (Food and Drug Administration).

FSANZ: Estándares de Alimentos de Australia y Nueva Zelanda (Food Standards Australia New Zealand).

GRAS: Generalmente reconocido como seguro (Generally Recognized as Safe).

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia (High performance liquid chromatography).

IG: Índice glicémico.

IPGTT: Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (Intraperitoneal Glucose Tolerance Test).

JECFA: Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives).

SFB: Suero fetal bovino.

## Introducción

*Stevia* es un género de plantas nativas de regiones subtropicales y tropicales de Sudamérica y Centroamérica, de las cuales hay 407 especies. Una de sus especies es *Stevia rebaudiana* Bertoni, la cual es conocida en guaraní como ka'a he'ẽ ("hierba dulce"), y es la de mayor potencial edulcorante<sup>1</sup>. 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. El esteviósido es 250–300 más dulce que el azúcar aunque con un sabor ligeramente amargo, mientras que el Rebaudiósido A tiene mayor capacidad edulcorante (350-450 veces más que el azúcar) y sin resabio amargo<sup>1,2</sup>. En menor cantidad, se pueden encontrar el rebaudiósido C y dulcósido A junto con estevolbiósido, rubusósido, rebaudiósido B, D, E y F<sup>1,3,4</sup>.

Los factores que contribuyen a la cantidad y tipo de glucósidos son la variedad de *Stevia* así como las condiciones climáticas y de siembra. Existen variedades de *Stevia* cuya composición de esteviósidos es distinta a las variedades generalmente cultivadas, como es el caso de una variedad que no contiene Rebaudiósido A ni Rebaudiósido C, otra donde el principal componente es Rebaudiósido C<sup>5</sup> y otra denominada Morita que fue mejorada para tener 2.5 veces más Rebaudiósido A que esteviósido<sup>6</sup> y es la que se utiliza principalmente como edulcorante.

En 2008 la Administración de Alimentos y Drogas

en Estados Unidos (FDA) otorgó el estatus de "generalmente reconocido como seguro" (GRAS, por sus siglas en inglés) al rebaudiósido A para usarse como edulcorante y no sólo como suplemento<sup>7</sup> y en ese mismo año el Comité de Expertos en Alimentación FAO/OMS en aditivos alimentarios (JECFA) y Estándares de alimentación de Australia y Nueva Zelanda (FSANZ) establecieron el consumo diario aceptable (ADI por sus siglas en inglés) de 0-4 mg/kg de peso corporal/día de equivalentes molares de esteviol<sup>7</sup>.

Sin embargo, diversos estudios han demostrado que extractos de *S. rebaudiana* y al menos un glucósido derivado de esteviol presente en el mismo –el esteviósido–, tienen capacidad antihiper glucemiante en modelos animales<sup>8-11</sup> y en humanos<sup>12,13</sup>.

Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el contenido de glucósidos de *S. rebaudiana* cultivada en México, evaluar la citotoxicidad y el efecto de la administración aguda y crónica del extracto sobre la glucosa sanguínea tanto en humanos voluntarios como en modelos animales.

## Materiales y métodos

### Elaboración del extracto

Se obtuvo el extracto de hojas de la variedades de *Stevia rebaudiana* B., denominadas Morita II y Criolla, cultivadas en la península de Yucatán, México. Las hojas obtenidas fueron secadas a la sombra y pulverizadas en molino Willey (Thomas Scientific, NJ, E.E.U.U.) con malla de 1 mm y almacenadas en frascos de vidrio ámbar para protegerlas de la luz solar y hasta su uso posterior. Para realizar el extracto se siguió la metodología de Woelwer-Rieck y colaboradores<sup>4</sup>. Se pesó 500 mg de hojas de *Stevia* y se agregó 5 mL de agua; se calentó a baño María a 100 °C (Cole-Parmer, E.E.U.U.) durante 30 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente; posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 2,500 *x g* a 10 °C (Z 300 K, Hermle Labortechnik, Alemania); se decantó el sobrenadante y al residuo sólido nuevamente se agregó 5 mL de agua y se repitió el procedimiento dos veces más. La fase acuosa obtenida de las tres extracciones se aforó en un matraz volumétrico de 25 mL, se filtró con papel filtro y es el que fue empleado para todos los experimentos. Los extractos empleados para el análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) fueron realizados de la misma manera pero con agua grado HPLC y filtrados con membrana de 0.45 µm antes de ser inyectados en el equipo.

### Cuantificación de glucósidos por HPLC

Se utilizó la metodología recomendada por JECFA (2010) para analizar los extractos de *Stevia rebaudiana*<sup>14</sup>. Se utilizó un equipo Agilent serie 100 con una

columna Luna 5 $\mu$  C18(2) 100A (Phenomenex) de 250 mm de longitud, diámetro interno de 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 $\mu$ m, la fase móvil fue una mezcla 32:68 (v/v) de acetonitrilo y solución amortiguadora de fosfato de sodio (10 mmol/L, pH 2.6), con un flujo isocrático de 1 mL/min y detector UV a 210 nm. Los resultados cromatográficos se analizaron con el programa Clarity versión 2.7.3.498 (2000-2009). Para realizar la cuantificación de los glucósidos en los extractos se realizaron curvas de calibración por triplicado con 6 concentraciones (25, 50, 75, 100, 125 y 150  $\mu$ g/mL) de los estándares: esteviolbósido (Chromadex ASB-00019349), dulcósido A (Chromadex ASB-00004949), rebaudiósido D (Chromadex ASB-00018229), rebaudiósido C (Chromadex ASB-00018228) y rebaudiósido B (Chromadex ASB-00018227), esteviósido (Sigma S3572) y rebaudiósido A (Sigma 01432), los cuales se suspendieron en agua grado HPLC, filtraron con membrana de 0.45  $\mu$ m y se congelaron a -20 °C hasta su uso.

#### *Evaluación citotóxica del extracto*

La actividad citotóxica de los extractos se evaluaron sobre las líneas celular Vero. La línea fue cultivada en medio de cultivo basal de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 10,000 U de penicilina, 10 mg/mL de estreptomycin y 2.5  $\mu$ g/mL de anfotericina B. Los cultivos celulares fueron mantenidos en una atmósfera con 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. El bioensayo se realizó en placas de cultivo celular de 96 pozos y a cada pozo se le adicionó 100  $\mu$ L de medio con 5% de SFB con una densidad celular de 50,000 células/mL y se incubó por 24 h. Al término de este tiempo, el medio fue retirado y se añadió 100  $\mu$ L de medio nuevo sin SFB. Posteriormente, se adicionó 100  $\mu$ L de medio donde previamente se disolvieron los extractos y finalmente se realizaron las diluciones seriadas evaluándose los extractos en un rango de 300-18.75  $\mu$ g/mL. Las placas se incubaron por 48 h y al término de este tiempo se desechó el medio y las células fueron fijadas con 50  $\mu$ L de una disolución de ácido tricloroacético al 10%, incubándose las placas a 4 °C durante 30 min. Seguidamente se retiró el sobrenadante y se adicionó 50  $\mu$ L de una disolución de sulforodamina B (0.1% sulforodamina B en ácido acético al 1%) y se dejó reaccionar durante 15 min. Finalmente se desechó el sobrenadante y se realizaron cuatro lavados con una disolución de ácido acético al 1%. La tinción se solubilizó con 100  $\mu$ L de una disolución de tris-base (10 mM) y se determinó la densidad óptica (DO) a 540 nm. La actividad citotóxica se determinó empleando la siguiente fórmula (DO control-DO extracto/DO control) x 100. Las evaluaciones sobre la línea celular se realizaron por cuadruplicado y la concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) se determinó en el programa GraphPad Prism 4.

#### *Modelo animal de diabetes*

Para evaluar el efecto agudo y crónico del extracto de *S. rebaudiana* sobre la glucosa sanguínea, se utilizaron ratas macho Wistar con pesos comprendidos entre 250-250 g. Los animales fueron dispuestos de manera individual en jaulas de plástico con rejillas de acero inoxidable, en condiciones de ciclo luz/oscuridad natural, con temperatura constante a 25 °C y agua *ad libitum* durante todo el experimento. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CCUAL-Facultad de Medicina-Universidad Autónoma de Estado de Morelos) y se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), "Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio"<sup>15</sup> así como todas las regulaciones Federales e institucionales. Antes de iniciar el procedimiento experimental de inducción de diabetes, los animales fueron aclimatados durante 7 días en jaulas individuales con libre acceso al agua y alimento.

El día anterior a la inducción de diabetes, las ratas fueron sometidas a 12 horas de ayuno. La inducción se realizó a través de la inyección de 120 mg/kg de nicotinamida vía intraperitoneal y 15 minutos después se les inyectó 65 mg/kg de streptozotocina disuelto en buffer de citrato-fosfato 0.1 M, pH 4.5 (i.p.)<sup>16</sup>. A las dos semanas posteriores de la inducción de diabetes y posterior a 4 horas de ayuno, la diabetes se determinó mediante la medición de la glucosa en sangre de la punta de la cola y sólo se incluyeron en el estudio aquellos animales con una glucosa sanguínea superior a 150 mg/dL<sup>17</sup>.

#### *Evaluación del efecto agudo sobre la glucosa de S. rebaudiana Morita II*

Para evaluar el efecto agudo sobre la glucosa, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT) en ratas con diabetes. Para ello, los animales tuvieron ayuno matutino de 4 horas y posteriormente se midió la glucosa en la sangre de la punta de la cola (tiempo 0), utilizando el glucómetro Optimun Exceed (Abbot). Posteriormente, a los animales se les administró extracto de *Stevia rebaudiana* (10 mg/kg) o agua destilada como vehículo y ambos grupos recibieron 1g/kg de glucosa vía intraperitoneal; se midió la glucosa a los tiempos 15, 30, 60 y 120 minutos y con los valores de glucosa en los diferentes tiempos, se calculó el área bajo la curva (AUC) para ambos grupos.

#### *Evaluación del efecto crónico sobre la glucosa de S. rebaudiana Morita II*

Al día siguiente de la curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal, se inició el tratamiento crónico con el

extracto de *S. rebaudiana*. Para ello, se emplearon los mismos grupos experimentales formados previamente: grupo control (ratas con diabetes no tratada) y grupo experimental tratadas con extracto de *Stevia rebaudiana* (500 mg/kg/día). La vía de administración del tratamiento con *Stevia* fue oral a través de las croquetas de los animales. Al inicio de cada semana y durante 4 semanas se pesaron a los animales y con base en este peso se elaboraban 7 croquetas de cada animal con la dosis correspondiente (1 para cada día); para ello, se pulverizaba las croquetas Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (2018 Harlan) y se añadía el extracto en la concentración adecuada, se moldeaban las croquetas y se secaban 4 horas en horno a 80 °C para lograr una humedad de 8.25%, similar a la que tenía la croqueta originalmente (10.28%). El grupo control recibió las mismas croquetas pero sin añadir el extracto de *Stevia*. Diariamente se retiraba el alimento de la jaula y se ponía la croqueta que contenía la dosis a administrar o una croqueta estándar; una vez consumida la croqueta se agregaba alimento *ad libitum* para el resto del día. Semanalmente se midió la glucosa en sangre de la punta de la cola posterior a 4 horas de ayuno matutino.

#### Determinación del índice glicémico del extracto de *S. rebaudiana* Morita II

El estudio se realizó de acuerdo al método de Granfeldt y Bjorck (1991)<sup>18</sup>, con la participación de 9 individuos sanos voluntarios, con edades comprendidas entre 18 y 40 años. Este estudio fue conducido de acuerdo con los lineamientos de la Declaración de Helsinki (2013) y los participantes dieron su consentimiento informado para participar.

En primera instancia, a todos los sujetos se le tomó una muestra de sangre capilar posterior a 8 horas de ayuno (tiempo 0). Posteriormente, cada individuo recibió una porción de glucosa correspondiente a 50 g de carbohidratos disponibles (b.s.) que se diluyeron en 100 mL de agua, los sujetos consumieron el total de la porción ofrecida en un plazo menor de 15 min y sólo se les permitió tomar 90 mL de agua adicionales durante toda la prueba. Después de 30 min de la ingestión se tomó la segunda muestra de sangre (t30) y se repitió a los 45, 60, 90, 120 y 180 minutos posteriores. Transcurridos 7 días, se repitió el procedimiento pero con el extracto de 500 mg de *Stevia rebaudiana* Morita II elaborado como se describió previamente.

La glucosa capilar se midió a través de un glucómetro Optimun Exceed (Abbot). Con los valores de glicemia capilar de cada individuo se calculó el porcentaje de variación de la concentración de glucosa para los diferentes tiempos, así como el área bajo la curva (AUC), tanto para la glucosa como para el extracto de *Stevia*. El índice glicémico se determinó con la fórmula:  $IG = AUC_{Stevia} / AUC_{Glucosa} \times 100$ . Se calculó el promedio de los índices glicémicos individuales y éste se reportó como índice glicémico del extracto.

#### Análisis estadístico

La estimación cuantitativa de los metabolitos en la muestra se hizo con base en el área bajo el pico utilizando el programa Microsoft Office Excel, a partir de las curvas de regresión lineal de los estándares. Los resultados de los grupos experimentales se analizaron por medio de prueba t. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de  $p < 0.05$ .

## Resultados

#### Cuantificación de glucósidos

Se analizaron los extractos de ambas variedades de *S. rebaudiana* Bertoni para cuantificar los glucósidos derivados de esteviol presentes en ambas. Cada muestra se analizó por duplicado y se calculó la concentración a través de la ecuación de la recta de regresión lineal construida con los estándares. Como se observa en la tabla I, en la variedad Morita II hay 23.4 g de glucósidos en 100 g de hoja, mientras que en la variedad Criolla hay sólo 16.93 g. El contenido de glucósidos es diferente dependiendo de la variedad, con excepción del Rebaudiósido D que no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Dado el mayor contenido de glucósidos totales en la variedad Morita II, se seleccionó esta variedad para hacer las evaluaciones de la inocuidad en humanos y modelos animales.

#### Citotoxicidad de los extractos

Para ambos extractos de *Stevia* elaborados con las variedades Morita II y Criolla, la Concentración Citotóxica 50 sobre células Vero fue  $> 300 \mu\text{g/mL}$ .

**Tabla I**  
Contenido de glucósidos en g/100g de hojas secas de *S. rebaudiana* Morita II y Criolla

Glucósido	Morita II	Criolla
	Promedio $\pm$ D.E.	Promedio $\pm$ D.E.
Dulcósido A	0.61 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
Rebaudiósido B	0.65 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Rebaudiósido C	2.24 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	2.05 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Rebaudiósido D	0.43 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.46 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>
Esteviolbósido	0.35 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.58 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Rebaudiósido A	15.15 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	4.03 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
Esteviolósido	3.97 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	8.80 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>

Los valores están expresados como media  $\pm$  Desviación estándar. Letras diferentes en una misma fila denotan que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ , prueba t-de Student).



### Evaluación del efecto agudo sobre la glucosa

Las áreas bajo la curva de glucosa en la prueba de tolerancia de glucosa intraperitoneal (mg/dL de glucosa x 120 min.) fueron en promedio: 37,901.5 para el grupo control y 37,972.6 para el grupo tratado con *S. rebaudiana* (figura 1). El análisis estadístico mostró que no hubieron diferencias significativas entre los grupos ( $p = 0.748$ ).

### Evaluación del efecto crónico sobre la glucosa

Con el antecedente de la evidencia científica acerca del efecto hipoglucemiante tanto del extracto comple-

to de *Stevia rebaudiana*<sup>19,20</sup>, así como del estevósido a dosis tan bajas como 5 mg/kg de peso en ratas con diabetes inducida<sup>21</sup>, se evaluó la inocuidad en el consumo crónico del extracto sobre la glucosa sanguínea en un modelo animal de diabetes. Como se observa en la figura 2, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los grupos en ninguna de las semanas evaluadas.

### Índice glicémico

Para el análisis de los resultados de la evaluación del índice glicémico se elaboraron curvas de variación de glucosa para el extracto de *S. rebaudiana* Morita II

Fig. 1.—Curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en ratas con diabetes inducida con Streptozotocina. A los animales se les administró agua destilada ó 10 mg/kg extracto de *S. rebaudiana* e inmediatamente después 1g/kg de glucosa (tiempo 0). Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de cada grupo ( $n = 5$ ).

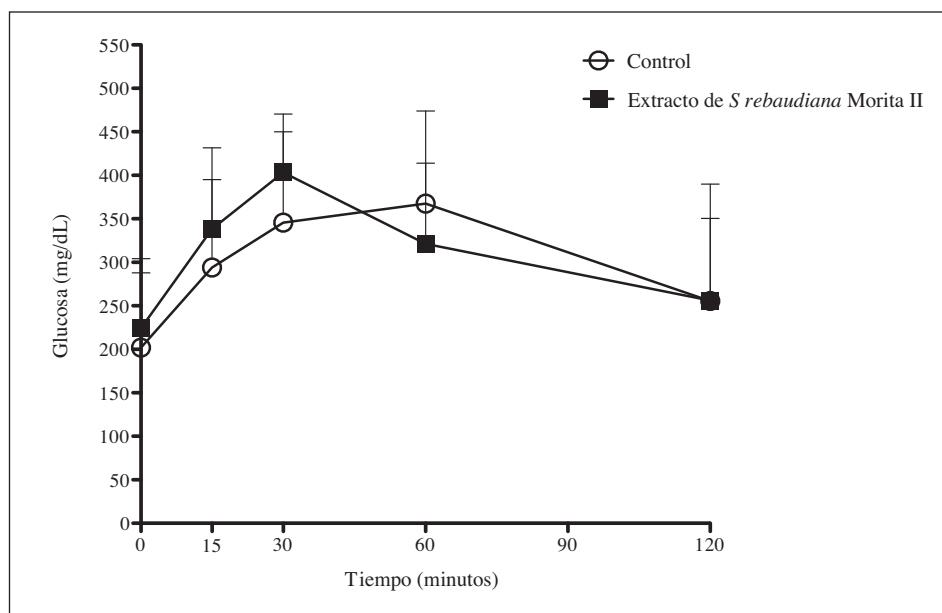
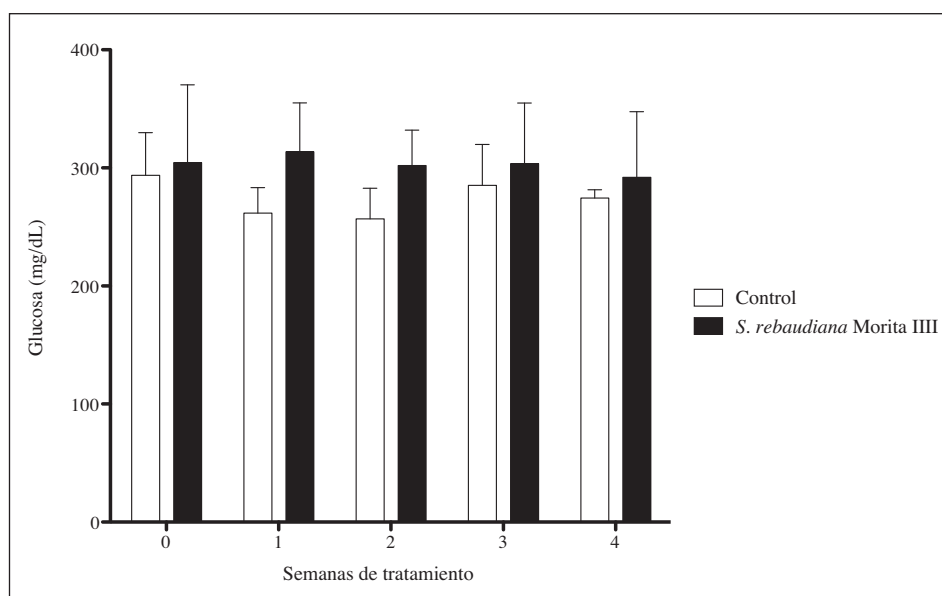


Fig. 2.—Efecto del consumo crónico de extracto de *Stevia* sobre la glicemia en ratas con diabetes. Los valores representan el promedio de glucosa en ayuno  $\pm$  SEM antes y durante 4 semanas de tratamiento. No hubieron diferencias significativas en ninguna de las semanas evaluadas ( $p > 0.05$ , prueba *t*-Student). ( $n = 5$ ).



y para la glucosa (estándar). Se observó que los valores promedio de la variación de la glucosa en la curva de tolerancia fue (54.4, 49, 35.6, 16.6, 3.6 y -9.8 %), mientras que para el caso del extracto de *Stevia* fue (0.8, 4.1, -1.9, -4.3, -5.7, -2.1 %) para los tiempos 30, 45, 60, 90, 120 y 180 minutos, respectivamente (figura 3). El área bajo la curva promedio de glucosa (mg/dL x 120 min.) fue de 3,903.4 ( $\pm$  2,150.6 D.E.), mientras que el del extracto fue de 385.1 ( $\pm$  532.4 D.E.). El análisis estadístico reflejó que el área bajo la curva de *S. rebaudiana* fue significativamente menor que el de glucosa ( $p = 0.000097$ ). Con los valores del área bajo la curva, se calculó el índice glicémico del extracto de *Stevia* que fue de 11.11 %, lo cual la clasifica como un ingrediente de bajo índice glicémico.

## Discusión

Se sabe que no sólo la variedad de la planta sino también la cantidad de radiación solar y la densidad de cultivo afectan el contenido de glucósidos en la hoja de *S. rebaudiana* Berton<sup>22</sup>.

A nivel internacional se ha reportado concentraciones de rebaudiósido A y de esteviósido tan altas como 61.2%<sup>23</sup> y 22%<sup>24</sup>, dependiendo de la variedad y el lugar de cultivo. Sin embargo en la península de Yucatán el reporte previo de Rebaudiósido A en la variedad Morita II es de 9.12%  $\pm$  0.99 mientras que en la variedad Criolla es de 2.42%  $\pm$  0.08<sup>25</sup>, ambos menores a lo encontrado en este trabajo. Comparando el contenido de esteviósido encontrado en este proyecto, con lo reportado en la variedad Morita II (2.18  $\pm$  0.40)<sup>25</sup>, resulta 1.8 veces más lo encontrado en este estudio que lo publicado previamente. En la variedad Criolla sucede lo mismo, ya que lo encontrado fue de 8.80  $\pm$  0.14 y lo reportado por Moguel y colaboradores es de 5.09  $\pm$  0.04<sup>25</sup> lo que representa 1.7 veces más. Tomando en consideración que los resultados encontrados son comparables únicamente con lo que se ha reportado

para cultivos de *S. rebaudiana* en el sureste de México, no se puede descartar el efecto probable de la temporada de cultivo o cosecha (relacionados con la radiación solar y precipitación pluvial) que pudiera explicar las diferencias encontradas, sobre todo porque el rango de incremento fue similar (1.7–1.8%) para ambos glucósidos y en ambas variedades.

De los glucósidos minoritarios, este es el primer estudio al respecto, no hay reportes previos de variedades cultivadas en la Península de Yucatán por lo que se debe recurrir a la literatura internacional. Para el caso del Dulcósido A y Rebaudiósido C, la concentración encontrada en ambas variedades es similar a lo reportado previamente de 0.4-0.7% y de 1-2%, respectivamente<sup>4</sup>. Se ha reportado una concentración <0.4% para el rebaudiósido B y el Esteviolbiósido aunque sin especificar la variedad<sup>1,3,4</sup>, lo que coincide con el rebaudiósido B de la variedad Criolla y el esteviolbiósido de la variedad Morita II, pero no con el esteviolbiósido de la variedad Criolla y el rebaudiósido B de la variedad Morita II, los cuales se encontraron en mayor concentración a lo reportado. Por otra parte, el rebaudiósido D encontrado en este trabajo es ligeramente mayor a lo reportado anteriormente de <0.4%<sup>3</sup>.

A pesar de las diferencias en el contenido de los glucósidos minoritarios en ambas variedades de *Stevia* (4.19% en promedio), la diferencia más importante es el contenido de rebaudiósido A y esteviósido, por lo que la elección de la variedad dependerá del uso destinado. Se sabe que el esteviósido es 250–300 veces más dulce que el azúcar aunque con un sabor ligeramente amargo, mientras que el Rebaudiósido A tiene mayor capacidad edulcorante (350-450 veces más que el azúcar) y sin resabio amargo<sup>1,2</sup> y es precisamente esta capacidad edulcorante la que hace a la variedad Morita II más adecuada para la industria alimentaria.

La administración aguda de 10mg/kg de *Stevia rebaudiana* Morita II no tuvo efecto sobre la prueba de tolerancia a la glucosa en el modelo de ratas con diabetes inducida lo cual coincide con lo reportado por

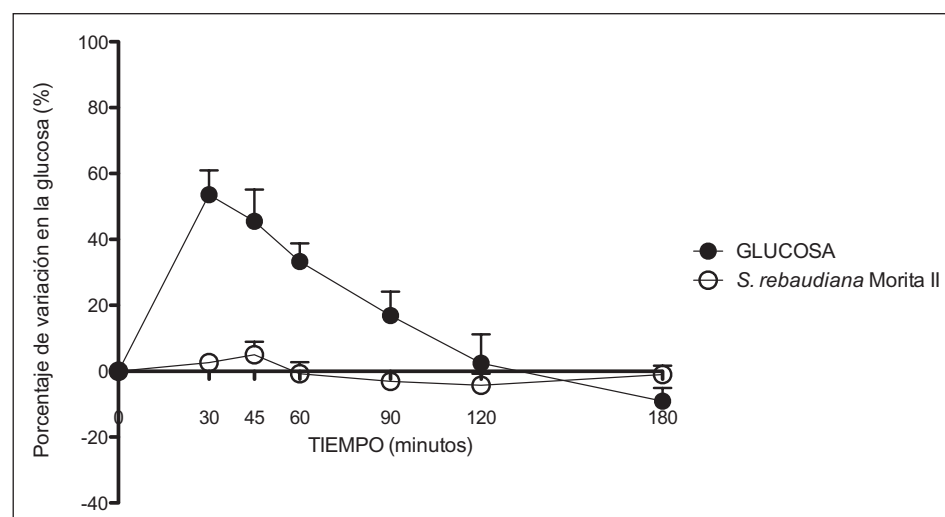


Fig. 3.—Curva de tolerancia a la glucosa y extracto de *Stevia rebaudiana* Morita II en individuos sanos. Los valores representan el promedio  $\pm$  SEM de cada grupo ( $n = 9$ ).

Fujita y colaboradores<sup>26</sup>, quienes emplearon ratas Zucker con diabetes y obesidad, vía de administración oral y una dosis máxima de 1g/kg. Las diferencias en la metodología usada en este trabajo y la usada por Fujita y colaboradores, sugieren que la administración aguda de extracto de *S. rebaudiana* no tiene efecto antihiper-glucemiante en la prueba de tolerancia a la glucosa independientemente del modelo animal, dosis o vía de administración.

Por otra parte, se ha reportado que la administración crónica de extractos de *Stevia* vía oral a dosis desde 50, 100 mg/kg<sup>6</sup>, 200 ó 400 mg/kg<sup>7</sup>, tienen efecto hipoglucemiante en ratas con diabetes inducida con aloxano<sup>19,20</sup>. Sin embargo, en este trabajo la administración de una dosis aún mayor de la reportada, no tuvo efecto significativo ( $p > 0.05$ ) sobre la glucosa sanguínea después de administrarla durante 4 semanas. En el caso del trabajo realizado por Misra y colaboradores<sup>7</sup> ellos emplearon el modelo de diabetes inducida con aloxano y un extracto realizado con benceno y acetona donde encontraron una disminución de la glucosa de más de 300 mg/dL al día 10 del experimento, mientras que el experimento realizado por Kujur y colaboradores<sup>6</sup> usando el mismo modelo de diabetes con aloxano pero con un extracto acuoso (extracción durante 24 horas) la disminución de glucosa fue menor (80 mg/dL) y requirió un mayor lapso de tiempo para lograrse (28 días). Por lo tanto, la diferencia entre lo encontrado en el presente trabajo y lo reportado por estos autores puede deberse al modelo de diabetes empleado, la forma de elaboración del extracto (polaridad y tiempo de extracción) o incluso la concentración de glucosa inicial antes del tratamiento crónico.

Por otra parte, se ha reportado que 20 mg/kg de esteviósido es capaz de inducir hipoglucemia en ratas sanas o con diabetes sólo si se administra en forma de bomba subcutánea<sup>27</sup>. A este respecto, la dosis del extracto de *S. rebaudiana* (500 mg/kg/día de peso) evaluada aquí contiene 19.5 mg/kg/día de esteviósido según lo cuantificado por HPLC pero aún así no tuvo efecto hipoglucemiante en ratas con diabetes.

Tomando estos datos en cuenta, se puede considerar que el modelo de diabetes empleado en este trabajo fue más apegado a la realidad clínica, ya que se considera de diabetes tipo 2 a diferencia del aloxano<sup>28</sup>, la cual es el tipo de diabetes que afecta al 90-95% de las personas con esta enfermedad<sup>29</sup>, cuya administración habitual de *Stevia* será vía oral a través del consumo de alimentos o infusiones (y por tanto, extracto acuoso) y con una dosis de consumo mucho menor a la evaluada en este proyecto, que representa casi 30 veces más de lo permitido como edulcorante que es de 4mg/kg peso de glucósidos de esteviol<sup>7</sup>.

Más aún, en la prevención y control de la diabetes se usa el concepto de índice glicémico (I.G.); el cual es una herramienta que categoriza a los alimentos que contienen hidratos de carbono en relación a su capacidad de incrementar los niveles de glucemia (velocidad y magnitud). Con base en su índice glicémico, los

alimentos se pueden agrupar en tres categorías: I.G. alto  $\geq 70$ , I.G. intermedio 56-69 e I.G. bajo de 0-55<sup>30</sup>. Diversas investigaciones han postulado que las dietas con I.G. alto llevan a un incremento de los niveles de glucosa e insulina sérica, lo cual se ha relacionado con el desarrollo de patologías cardiovasculares, obesidad y cáncer, además de Diabetes Mellitus. Por otra parte, también existe evidencia suficiente que sugiere que las dietas con bajo I.G. pueden tener un papel importante en el tratamiento y la prevención de las enfermedades crónicas antes mencionadas, al mejorar el perfil lipídico, reducir la proteína C reactiva (PCR), contribuir en el control del peso, además de generar niveles adecuados de glucemia postprandial<sup>31,32</sup>. El bajo índice glicémico que posee el extracto de *S. rebaudiana* se explica por el hecho de que las enzimas digestivas en el ser humano no pueden degradar el esteviósido o el rebaudiósido A presentes en el extracto de *Stevia*<sup>33</sup> aunque la flora bacteriana (particularmente la familia *bacteroidaceae*) presente en el ciego sí puede hacerlo, removiendo unidades de glucosa sucesivamente<sup>34</sup>.

Dado el bajo índice glicémico del extracto de *S. rebaudiana* Morita, su inocuidad y su alta capacidad edulcorante, es un producto adecuado para formar parte de una dieta que prevenga la aparición de enfermedades crónicas.

## Conclusiones

El extracto de *Stevia rebaudiana* variedad Morita II cultivada en el sureste de México tiene un bajo índice glicémico y en las dosis evaluadas no presentó citotoxicidad, efecto agudo o crónico sobre la glucosa sanguínea en animales con diabetes, por lo cual lo hace un endulzante adecuado e inocuo para poder ser consumido por personas sanas o con diabetes.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el Programa de Mejoramiento al Profesorado PROMEP-SEP, a la Fundación Educación Superior Empresa (FESE), los Fondos Fiscales-INIFAP y a CONACYT por la beca proporcionada a Aranda-González para sus estudios de posgrado. Así mismo, a la Unidad de Investigación Médica Yucatán, Unidad Médica de Alta Especialidad "Lic. Ignacio García Téllez" del Instituto Mexicano del Seguro Social por los ensayos de citotoxicidad.

## Referencias

1. Goyal SK, Samsher, Goyal RK. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *Int J Food Sci Nutr* 2009;61(1):1-10.
2. WHO. Stability testing of active substances and pharmaceutical products. 2006 2006/10/04. Report No.: QAS/06.179.

3. Jackson AU, Tata A, Wu C, Perry RH, Haas G, West L, et al. Direct analysis of Stevia leaves for diterpene glycosides by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst* 2009;134(5):867-74.
4. Woelwer-Rieck U, Lankes C, Wawrzun A, Wüst M. Improved HPLC method for evaluation of the major steviol glycosides in leaves of Stevia rebaudiana. *Eur Food Res Technol* 2010;231:581-8.
5. Brandle JE. Genetic control of rebaudioside A and C concentration in leaves of the sweet herb, Stevia rebaudiana. *Can J Plant Sci* 1999;79:85-92.
6. Morita T, Bu Y. Variety of Stevia rebaudiana Bertoni. 2000;6,031,157(09/013,029).
7. FDA. GRAS assessment. In: Nutrition Center for Food Safety and Applied Nutrition, editor. 2008.
8. Lailerd N, Saengsirisuwan V, Sloniger JA, Toskulkao C, Henriksen EJ. Effects of stevioside on glucose transport activity in insulin-sensitive and insulin-resistant rat skeletal muscle. *Metabolism* 2004;53(1):101-7.
9. Jeppesen PB, Gregersen S, Alstrup KK, Hermansen K. Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine* 2002;9(1):9-14.
10. Raskovic A, Gavrilovic M, Jakovljevic V, Sabo J. Glucose concentration in the blood of intact and alloxan-treated mice after pretreatment with commercial preparations of Stevia rebaudiana (Bertoni). *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2004;29(2):87-90.
11. Raskovic A, Jakovljevic V, Mikov M, Gavrilovic M. Joint effect of commercial preparations of Stevia rebaudiana Bertoni and sodium monoketocholate on glycemia in mice. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2004;29(2):83-6.
12. Curi R, Alvarez M, Bazotte RB, Botion LM, Godoy JL, Bracht A. Effect of Stevia rebaudiana on glucose tolerance in normal adult humans. *Braz J Med Biol Res* 1986;19(6):771-4.
13. Gregersen S, Jeppesen PB, Holst JJ, Hermansen K. Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects. *Metabolism* 2004;53(1):73-6.
14. JECFA. Steviol glycosides. In: FAO, editor. FAO JECFA Monographs 2010. p. 17-21.
15. Diario Oficial. Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). "Especificaciones técnicas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio". México; 2001.
16. Zhou F, Xin H, Liu T, Li GY, Gao ZZ, Liu J, et al. Effects of Icariside II on improving erectile function in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *J Androl* 2012;33(5):832-44
17. Ortiz-Andrade R, Torres-Piedra M, Sánchez-Delgado JC, García-Jiménez S, Villalobos-Molina R, Ibarra-Barajas M, et al. Acute and sub-chronic effects of Cochlospermum vitifolium in blood glucose levels in normoglycemic and STZ-Nicotinamide-Induced Diabetic rats. *Rev Latinoamer Quím* 2009;37(2):122-32.
18. Granfeldt Y, Björck I. Glycemic response to starch in pasta: a study of mechanisms of limited enzyme availability. *Journal of Cereal Sciences* 1991;14:47-61.
19. Kujur RS, Singh V, Ram M, Yadava HN, Singh KK, Kumari S, et al. Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of Stevia rebaudiana in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacognosy Res* 2010;2(4):258-63.
20. Misra H, Soni M, Silawat N, Mehta D, Mehta BK, Jain DC. Antidiabetic activity of medium-polar extract from the leaves of Stevia rebaudiana Bert. (Bertoni) on alloxan-induced diabetic rats. *J Pharm Bioallied Sci* 2011;3(2):242-8.
21. Chang JC, Wu MC, Liu IM, Cheng JT. Increase of insulin sensitivity by stevioside in fructose-rich chow-fed rats. *Horm Metab Res* 2005;37(10):610-6.
22. Jarma-Orozco A, Araméndiz-Tatis H, Cleves-Leguizamo. Phenotypic stability and plant densities of stevia (Stevia rebaudiana Bert.) genotypes in the Caribbean Region of Colombia. *Acta Agronómica* 2011;60(2).
23. Ohta M, Sasa S. Characterization of Novel Steviol Glycosides from Leaves of Stevia rebaudiana Morita. *Phytochemistry* 2010;57:199-209.
24. Wöelwer-Rieck U. The Leaves of Stevia rebaudiana (Bertoni), Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review. *J Agric Food Chem* 2012;60:886-95.
25. Moguel O, Ruiz R, Ramírez J, Avilés B, García A. Glycosides content in leaves of four genotypes of Stevia rebaudiana Bertoni in plantations established in Quintana Roo, México. VI Reunión Nacional de Innovación Agrícola; León, Gto. 2011. p. 268.
26. Fujita Y, Wideman RD, Speck M, Asadi A, King DS, Webber TD, et al. Incretin release from gut is acutely enhanced by sugar but not by sweeteners in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296(3):E473-9.
27. Raskovic A, Mikov M, Skrbic R, Jakovljevic V, Vasovic V, Posa M, et al. Effect of stevioside and sodium salt of monoketocholic acid on glycemia in normoglycemic and diabetic rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2008;33(1):17-22.
28. Szkudelski T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Experimental Biology and Medicine* 2012;237:481-90.
29. ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010;33 Suppl 1:S62-9.
30. Arteaga. El índice glicémico. Una controversia actual. *Nutrición Hospitalaria* 2006;21(2):55-60.
31. Brand-Miller J, Hayne S, Petocz P, Colagiuri S. Low-glycemic index diets in the management of diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes Care* 2003;26(8):2261-7.
32. Esfahani A, Wong JM, Mirrahimi A, Srichaikul K, Jenkins DJ, Kendall CW. The glycemic index: physiological significance. *J Am Coll Nutr* 2009;28 Suppl:439S-45S.
33. Wingard RE, Jr., Brown JP, Enderlin FE, Dale JA, Hale RL, Seitz CT. Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Experientia* 1980;36(5):519-20.
34. Koyama E, Sakai N, Ohori Y, Kitazawa K, Izawa O, Kakegawa K, et al. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. *Food Chem Toxicol* 2003;41(6):875-83.