



Extracción de Steviósido y Rebaudiósido A por métodos no convencionales

Ada María Ríos Cortés^a, Victor Gabriel Canuas Landero^b, Claudia Fernanda Romero Medina^b,
Sandra Luz Cabrera Hilerio^b, Gabriel Ríos Cortés^c y Minerva Rosas Morales^a

^a CIBA-IPN, Tlaxcala. adarioscort@yahoo.com.mx, mormin@hotmail.com

^b Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
mijo_055@hotmail.com, kan_k_u@hotmail.com, cabrerahilerio_s@hotmail.com

^c Instituto Tecnológico de Orizaba, Veracruz. grabrico0875@gmail.com

RESUMEN: El esteviósido y rebaudiósido A, son glucósidos diterpenoides extraídos de *Stevia rebaudiana* (Bertoni), los cuales cada día cobran mayor interés ya que poseen un poder edulcorante 300 veces mayor que el azúcar, son no calóricos y tienen propiedades medicinales. La extracción de dichos compuestos hasta el momento se ha realizado únicamente por métodos convencionales. No obstante; los métodos no convencionales han ganado mayor popularidad en los procesos industriales a causa de los buenos rendimientos que generan, así como la reducción en la velocidad de extracción y el uso de disolventes, lo que hace un proceso ecoamigable. Por todo esto, en el presente trabajo se planteó la extracción de dichos compuestos combinando dos métodos no convencionales. En este caso se empleó una extracción enzimática y una extracción por ultrasonificación, de igual forma se aplicó una extracción enzimática asistida por ultrasonido. La cuantificación se realizó por HPLC logrando la separación e identificación del esteviósido a un tiempo de 5.6 min. y del rebaudiósido a un tiempo de 5.35 min. Los métodos aplicados favorecieron la extracción del rebaudiósido A, el cual posee mayor interés comercial debido al sabor y potencia. Los métodos no convencionales realizados fueron efectivos en la extracción de los glucósidos ya que reducen el tiempo del proceso y el uso de disolventes.

1. INTRODUCCIÓN: La *Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta nativa de la región Amambay en Paraguay, ha sido utilizada como endulzante natural, así como por sus efectos benéficos sobre la salud. Las hojas de la planta son 30 veces más dulces que el azúcar y el extracto hasta 300 veces. El extracto está mayormente compuesto por glucósidos derivados del esteviol como el esteviósido y rebaudiósido "A", es éste último el que posee una capacidad edulcorante de hasta 450 veces más que el azúcar (1). Estos compuestos edulcorantes se encuentran en las hojas de la planta, en las cuales, el esteviósido se encuentra como componente dulce mayoritario llegando hasta un 20% del total de la hoja. El rebaudiósido A, por otra parte, ocupa un máximo del 4% en el total de la hoja, sin embargo, el rebaudiósido A está libre de sabores amargos o metálicos característicos de los edulcorantes sintéticos. Otra característica de importancia es su estabilidad, esto debido a que resisten temperaturas de hasta 140 °C y soportan un amplio rango de pH, el cual va desde el pH 2 hasta el pH 10. Es debido a todo ello que estos edulcorantes naturales tienen un importante papel en la industria alimenticia.

2. TEORÍA: Los métodos de extracción para obtener esteviósido y rebaudiósido A han estado en constante avance, principalmente aquellos en los que se utilizan nuevas tecnologías, a los cuales se les determinan métodos no convencionales (2). Los métodos convencionales de extracción de acuerdo a Puri *et al.* son (2) aquellos en los que se utilizan solventes con calentamiento; una extracción acuosa acoplada con agentes decolorantes; cromatografía de absorción, entre otros. En general, se ha descrito que los procesos convencionales que han mostrado los mejores



rendimientos tienen cuatro etapas: extracción solvente (acuoso u orgánico), un intercambio iónico, precipitación o coagulación después del filtrado y por último la cristalización y el secado (2). Por otro lado, el uso de nuevas tecnologías aplicadas a la extracción de los glucósidos de esteviol buscan como objetivo la reducción del tiempo de extracción, así como la reducción de gastos en los solventes. Ejemplo de lo anterior fue el uso de fluidos supercríticos utilizando CO₂ y disolventes como etanol, con los cuales se reportaron mejores rendimientos en comparación al uso del sistema Soxhlet como método convencional (3), sin embargo, el uso de fluidos supercríticos implica el uso de instrumentaria de alto costo como también la presencia de cierto riesgo en el proceso. Otro método no convencional utiliza las microondas para disminuir de manera importante el tiempo (4), con este método se logró una mayor extracción que el método con Soxhlet al igual que el método no convencional con agua a alta temperatura y presión. Dado este comportamiento en las extracciones utilizando radiación se empleó el uso de ultrasonido, con el cual se exponía a las hojas secas de la planta a una rápida rehidratación y a una destrucción de la pared celular (5), esta técnica de extracción claramente mejoró los rendimientos del esteviósido y rebaudiósido A en comparación al método convencional (6), a la par que el uso de instrumentaria para ultrasonido es de menor costo en comparación a los métodos no convencionales previamente descritos.

El uso de agentes biológicos, tales como enzimas, para la extracción de estos compuestos dulces obtuvo un rendimiento comparable con los mejores métodos convencionales, sin embargo, en el trabajo donde se realizó este experimento no se hizo comparación con ningún otro método de extracción (7). Las enzimas utilizadas en dicho experimento fueron celulasa, hemicelulasa y pectinasa, todas a concentraciones distintas. El uso de enzimas asociado a ultrasonido como asistente para la extracción de compuestos de interés en vegetales demostró una recuperación de dichos compuestos por encima de cualquier método (8-11). A diferencia de lo que se creía anteriormente, el uso de ultrasonido a una frecuencia y potencia adecuada favorece la actividad enzimática, encontrándose un mejoramiento hasta del 23% para el caso de la celulasa (12). El uso de este método, extracción enzimática asistida por ultrasonido (EEAU), no se ha implementado para la obtención de esteviósido y rebaudiósido A, por lo que el principal objetivo fue la aplicación de esta técnica a *S. rebaudiana*.

3. PARTE EXPERIMENTAL: Se utilizaron hojas de *Stevia rebaudiana* secas (humedad no mayor al 3%) de la variedad criolla, posteriormente fueron pulverizadas y tamizadas para obtener un tamaño de partícula uniforme.

Para la extracción convencional con equipo Soxhlet se utilizó 5 gramos de pulverizado de hoja el cual fue posteriormente extraído con metanol en una proporción de 1:10 (w/v) y una temperatura de 50°C por 2 horas (equivalente a 4 reflujos).

La extracción asistida por ultrasonido se utilizó el pulverizado de hoja, 2.5 g de hoja, se disolvió en una mezcla de 12.5 ml de una solución buffer de acetato de sodio (0.02 M, pH 5) y 25 ml de metanol. La mezcla fue expuesta a sonicación en un baño de ultrasonido de 44 kHz por 60 min a temperatura ambiente.

En el caso de la extracción enzimática se pesaron 2.5 g de hoja pulverizada en un matraz Erlenmeyer y se disolvieron en una mezcla de 12.5 ml de solución buffer de acetato de sodio (0.02 M, pH 5) y 25 ml de metanol. Por otra parte se realizó una mezcla de tres enzimas: celulasa, hemicelulasa y pectinasa para obtener una concentración de 0.2 g/ml de cada enzima. La mezcla del extracto fue tratada con dos cantidades diferentes de enzimas, al 0.5% y al 3.0% con respecto



al peso total del material vegetal, posteriormente la mezcla se trató a diferentes temperaturas, 50, 55 y 60°C por 60 min.

Para la extracción enzimática asistida por ultrasonido (EEAU) se pesaron 2.5 g de pulverizado de hoja y se disolvieron en 12.5ml de solución buffer de acetato de sodio y 25 ml de metanol. Se agregó 0.5% de enzimas, la mezcla se expuso a sonicación en un baño de ultrasonido por 1 hora.

El método de clarificación de los extractos se realizó mediante un aclaramiento con carbón activado (1 g de carbón por cada 50 ml de extracto), después un proceso de filtrado junto con enjuagues de metanol. Por último una concentración del extracto hasta obtención de polvo mediante el uso de rotaevaporador acoplado a vacío.

Para la determinación de esteviósido y rebaudiósido “A” se ocupó el método analítico de HPLC con equipo HP 1100 (Módulo de separación DAD) y un sistema cuantificador (Agilent OpenLAB CDS Chem Station 490 Micro GC Driver v1.9.0. Software). Se utilizó una columna LiChrospher® 100, 250-4 mm RP-18c (5 µm, Agilent) a 20°C. Las muestras (10 µL) fueron eluidas a un flujo de 0.7 mL/min, utilizando una fase móvil isocrática de agua (H₂O) y acetonitrilo (CH₃CN) relación 65:35 respectivamente. Los compuestos fueron detectados a 210 nm utilizando un detector de arreglo de diodos (DAD Agilent HP 1100 G1312A). La cuantificación de esteviósido y rebaudiósido “A” se realizó por el método estándar externo, por lo que se construyeron curvas de calibración con soluciones estándar de 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL en agua con los compuestos puros de Esteviósido (TCl) rebaudiósido “A” (TCl).

Para el análisis de datos se realizó un ANOVA ($p < 0.05$) utilizando el software Minitab® 17.1.0.0

4. CONCLUSIONES: El método de extracción enzimática obtuvo los mayores rendimientos, siendo de 20.56 ± 2.21 y 68.40 ± 7.88 mg/ g de hoja para esteviósido y rebaudiósido “A” respectivamente. Sin embargo, el método propuesto en el presente trabajo, EEAU, fue el método con los menores rendimientos (esteviósido: 16.19 ± 2.73 y rebaudiósido A: 56.72 ± 9.40), incluso menores a los encontrados por el método convencional. El método con ultrasonido demostró ser mejor que el método convencional con Soxhlet, pero no mejor que el método enzimático, esto de acuerdo a lo presentado en la tabla 1, donde se muestran todos los resultados de los métodos desarrollados en el presente estudio.

Tabla 1. Rendimiento de esteviósido y rebaudiósido “A” por los distintos métodos empleados.

Método de extracción	Glucósidos totales (mg/g de hoja)	Esteviósido (mg/g de hoja)	Rebaudiósido A (mg/g de hoja)
Enzimático 0.5%	88.96 ± 10.08	$20.56 \pm 2.21_a$	$68.40 \pm 7.88_a$
Ultrasonido	78.12 ± 4.64	$16.81 \pm 1.09_b$	$61.31 \pm 3.55_b$
Soxhlet	76.97 ± 0.68	$17.39 \pm 0.40_c$	$59.58 \pm 0.30_c$
EEAU	72.91 ± 12.13	$16.19 \pm 2.73_d$	$56.72 \pm 9.40_d$

El efecto de la disminución en la los glucósidos de esteviol observada en el método EEAU puede ser debido a un tiempo mayor de exposición a radiación ultrasónica según lo sugerido por Subhedar *et al.* (12) donde menciona que una exposición por arriba de los 50 minutos decrece significativamente el rendimiento de la enzima, encontrando cantidades inclusive por debajo de un tratamiento enzimático simple.

El método de extracción ultrasónica resultó con menores rendimientos en comparación al método enzimático debido a la temperatura, según distintos autores (6, 13) mencionan que la extracción de esteviósido y rebaudiósido A se ve favorecida al aumentar la temperatura, de forma que este factor tiene efecto importante en la extracción.



La extracción de rebaudiósido “A” fue en promedio 77.4% mayor en comparación con el esteviósido, esto observado en todos los métodos de extracción realizados en el presente estudio. Este fenómeno fue debido a la variedad de la planta (criolla) tanto como por el uso de metanol. La temperatura tiene una importante influencia en la actividad enzimática ($p < 0.05$) encontrándose que a los 50°C se obtuvieron los mejores rendimientos tanto de esteviósido (20.56 ± 2.21 mg/g de hoja) como de rebaudiósido “A” (68.40 ± 7.88 mg/g de hoja). Conforme se incrementó la temperatura, el rendimiento disminuía gradualmente para el caso del uso de celulasa, hemicelulasa y pectinasa, observándose el menor rendimiento a la temperatura de 60°C (19.25 ± 0.78 mg/g de hoja para esteviósido y 61.97 ± 2.88 mg/g de hoja para rebaudiósido “A”), sin embargo, dichos rendimientos son mayores a los blancos (Tablas 2 y 3). Estos resultados concuerdan con los encontrados por Puri *et al.* (7) debido que a los 50°C existe una sinergia entre la mezcla enzimática y la posible degradación de la pared celular, logrando así rendimientos mayores que a temperaturas cercanas a los 60°C. Se menciona que la pectinasa y celulasa tienen un descenso en el rendimiento sobrepasando los 60°C, siendo similar al observado en este trabajo, esto es debido a la desnaturalización de la proteína y evidente inactivación de la misma, sin embargo, la hemicelulasa tiene su mayor rendimiento a los 60°C. Para el caso de la concentración de enzima, el uso de 0.5% de la mezcla de enzimas resultó la mejor ya que se obtuvieron los mejores rendimientos (68.40 ± 7.88 mg/g de hoja) en comparación por los observados con el uso de enzimas al 3% (66.22 ± 2.65 mg/g de hoja). Esto es benéfico debido a que se puede obtener mayores concentraciones de glucósidos de esteviol con un menor gasto de enzimas.

Tabla 2. Rendimiento de esteviósido por el método enzimático.

Temperatura (°C)	Rendimiento (mg/g de hoja seca)		
	Blanco	0.50%	3.00%
50	$12.38 \pm 0.12_a$	$20.56 \pm 2.21_c$	$20.32 \pm 1.18_c$
55	$16.01 \pm 0.04_b$	$19.81 \pm 1.78_d$	$19.52 \pm 1.06_{d,f}$
60	$15.93 \pm 0.27_b$	$17.92 \pm 0.70_e$	$19.25 \pm 0.78_f$

Tabla 3. Rendimiento de rebaudiósido A por el método enzimático.

Temperatura (°C)	Rendimiento (mg/g de hoja seca)		
	Blanco	0.50%	3.00%
50	$43.15 \pm 0.10_a$	$68.40 \pm 7.88_c$	$67.77 \pm 3.41_c$
55	$53.59 \pm 0.15_b$	$68.32 \pm 5.29_c$	$66.22 \pm 2.65_e$
60	$53.14 \pm 0.19_b$	$61.97 \pm 2.88_d$	$65.03 \pm 2.10_f$

El sistema de gradientes usado en el presente trabajo logró una adecuada separación de los glucósidos de interés (Figura 1), con un tiempo de retención de 5.201 min para el esteviósido y



4.928 min para rebaudiósido "A". Con reproducibilidad en los diferentes métodos de extracción (Figura 2).

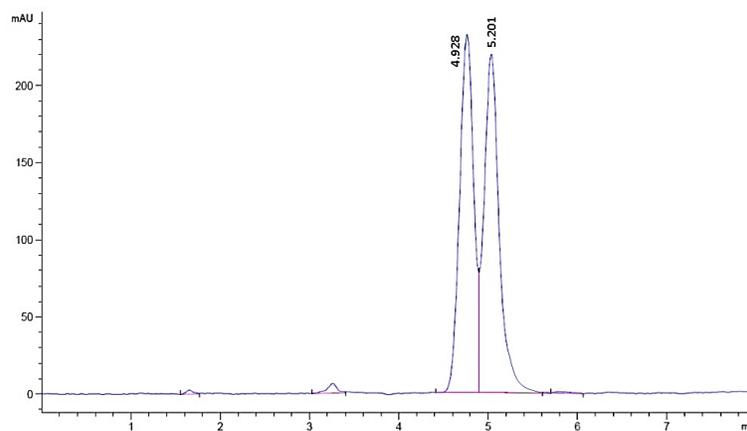


Figura 1. Cromatograma de la mezcla de esteviósido y rebaudiósido "A"

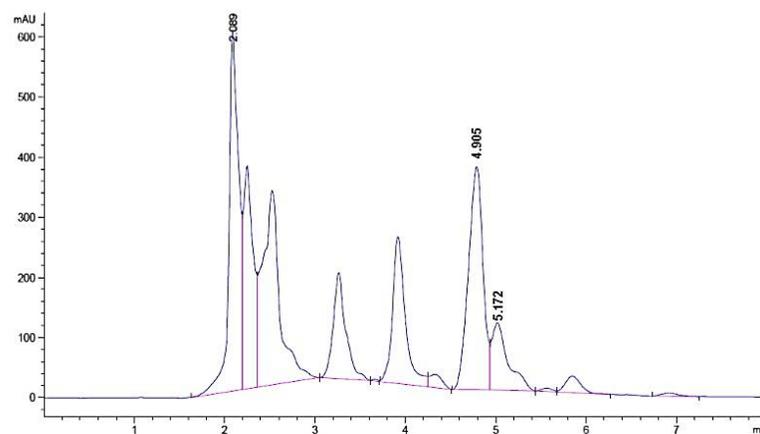


Figura 2. Cromatograma de extracción química convencional con sistema Soxhlet. Señal de esteviósido a 5.172 min (0.98 mg/ml) y señal de rebaudiósido "A" a 4.90 5min (3.40 mg/ml).



Pudiendo concluir con todo esto que:

- La extracción enzimática obtuvo el mayor rendimiento de glucósidos de esteviol en el presente estudio, al usar 0.5% de la combinación de celulasa, hemicelulasa y pectinasa a una temperatura de 50°C por un lapso de 60 minutos. Bajo las condiciones anteriores se logró un rendimiento de 13.9% mayor al obtenido por el método convencional.
- El uso de ultrasonido a temperatura ambiente, con una frecuencia de 44 kHz y por un lapso de 60 minutos mostró un rendimiento de 10.4% menor al método enzimático, pero 2.9% mayor al método convencional.
- El método de extracción enzimática asistida por ultrasonido demostró tener menor rendimiento en comparación con el método convencional (4.9%) y los no convencionales (17.1%), debido a una posible inactivación enzimática a las condiciones expuestas en el presente estudio.
- La extracción de rebaudiósido "A" fue en promedio 77.4% mayor en comparación con el esteviósido, esto observado en todos los métodos de extracción realizados en el presente estudio. Este fenómeno fue debido a la variedad de la planta (criolla) tanto como por el uso de metanol.
- La extracción del rebaudiósido A fue mayor a la del esteviósido debido a la variedad de planta utilizada, así como el uso de metanol para su extracción

BIBLIOGRAFÍA:

1. J.M.C, Genus. "Molecules of Interest: Stevioside". *Phytochemistry*, Vol. 64, 2003, pp. 913–921.
2. M. Puri, D. Sharma, A. K. Tiwary. "Downstream processing of stevioside and its potential applications". *Biotechnology Advances*, Vol, 29, 2011, pp. 781–791.
3. J. Pol, J., E.V. Ostra, P. Karasek, M. Roth, K. Benesova, P. Kotlarikova, *et al.* "Comparison of two different solvents employed for pressurized fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water". *Anal. Bioanal. Chem.*, Vol, 388, 2007, pp. 1847–57.
4. C. C. Teo, S. N. Tan, J. W. Hong Yong, C. S. Hew, E. S. Ong. "Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni". *J. Sep. Sci.* Vol. 32, 2009, pp. 613 – 622.
5. M. Toma, M. Vinatour, L. Paniwnyk, T. J. Mason. "Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction". *Ultrasonics Sonochemistry*, Vol, 8, 2001, pp. 137-142.
6. J. Liu, L. Jin-Wei, J. Tang. "Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts, short communication". *Food and bioproducts processing*, 88, 2010, pp. 215–221.
7. M. Puri, D. Sharma, A. C. J. Barrow, K. Tiwary. "Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves". *Food Chemistry*, Vol, 132, 2012, pp. 1113–1120.
8. G. Vale, R. Rial-Otero, A. Mota, L. Fonseca, J.L. Capelo. "Ultrasonic-assisted enzymatic digestion (USAED) for total elemental determination and elemental speciation: A tutorial". *Talanta*, Vol 75, 2008, pp. 872–884.
9. Z. Qian, Z. Ming-Ming, C. Pei-Lin, C. Yun-Ying, T. Xiang-Ling. "Optimization of Ultrasonic-Assisted Enzymatic Hydrolysis for the Extraction of Luteolin and Apigenin from Celery". *Journal of Food Science*, Vol, 76(5), 2011, pp. 680–685.



10. V. Romaris-Hortas, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro. "Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis for iodinated amino acid extraction from edible seaweed before reversed-phase high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, Vol, 1309, 2013, pp. 33– 40.
11. J. Wang, B. Sun, Y. Liu, H. Zhang. "Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction of arabinoxylan from wheat bran". *Food Chemistry*, Vol, 150, 2014, pp. 482–488.
12. P. B. Subhedar, P. R. Gogate. "Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonicirradiations". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Vol, 101, 2014, pp. 108–114.
13. M.A.A. Gasmalla, R. Yang, A. Musa, X. Hua, Y. Faying. "Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from *Stevia rebaudiana bertonii* leaves". *Arabian Journal of Chemistry*, 2014 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.06.012>.