

Estevia y Glucósidos de Esteviol

**Propiedades, técnicas, usos, exposición, toxicología,
efectos farmacológicos**

Prof. Dr. Jan M.C. Geuns
Laboratory of Functional Biology,
Kasteelpark Arenberg 31
B-3001 Leuven, Belgium
Tel.:+32-16 321510 Fax: +32-16321509
e-mail: Jan.Geuns@bio.kuleuven.be

Abreviatura propuesta

El usar SV por esteviol, permite la utilización de las siguientes abreviaturas:
SVgly para glicósidos de esteviol; SVglu para glucurónido de esteviol;
SVEq para equivalentes de esteviol; SM para monósido de esteviol ; SVE
para esteviol 19-éster; ST: esteviósido, RebA – G: Rebaudiósido A – G; SB
esteviolbiósido; DulA: dulcósido A; Rub: rubusósido

Tabla de contenidos

Terminología	9
Sumario	11
Parte I. GLICÓSIDOS DE ESTEVIOL	
Capítulo 1. Identificación	19
1.1 Datos Espectroscópica	24
1) RMN	24
2) CL-EM	31
3) IR	44
4) UV	46
1.2 Descripción de estado físico	48
1.3 Dulzura	48
1.4 Estándares Industriales	50
Capítulo 2. Pureza de los glicósidos de esteviol: especificación	51
2.1 Impurezas: naturaleza, porcentaje y métodos de determinación	53
2.2 Características Microbiológicas	54
2.3 Especificaciones químicas y microbiológicas propuestas	54
Capítulo 3. Proceso de fabricación	55
Capítulo 4. Técnicas válidas de análisis	61
4.1 Glicósidos de esteviol	61
1) Aislamiento de los estándares de SVgly	62
2) Coeficientes de Extinción Molar de SVgly y esteviol	66
3) Curvas de calibración de SVgly: Linealidad y rango de medidas	69
4) Medida de SVgly en la presencia de impurezas	74
5) Límite de detección, límites de cuantificación, rangos de medida	78
6) Certeza o Veracidad	78
7) Precisión	79
8) Elección de columnas: C18 vs. NH ₂	80
9) Organización de una prueba de Round-robin	82
10) Cómo mejorar el análisis de SVgly	95
4.2 Análisis de Esteviol (SV)	111
1) Síntesis del Estándar Interno dihidroisiteviol	112
2) Derivación de IS y SV	113

Parte II. USO DE TÉCNICAS VÁLIDAS	
Capítulo 5. Extracción de Hojas de Esteviol	117
5.1 Análisis de Glicósidos de Esteviol	117
5.2 Análisis de Esteviol	117
Capítulo 6. Control de Calidad de SVgly	121
6.1 Observaciones generales	121
6.2 Métodos	121
1) Contenido en agua	122
2) Metales pesados	122
3) Herbicidas y pesticidas	123
6.3 Análisis de SVgly	123
6.4 Análisis de Esteviol	124
Capítulo 7. Métodos de análisis en alimentos	125
7.1 Análisis de bebidas sin alcohol	125
1) Glicósidos de Esteviol	125
2) Esteviol	126
7.2 Análisis de bebidas alcohólicas	127
1) Glicósidos de Esteviol	127
2) Esteviol	127
7.3 Extracción de comidas complejas	127
1) Glicósidos de Esteviol	127
2) Esteviol	127
7.4 Síntesis de un Estándar Interno	128
Capítulo 8. Reacción y destino en los alimentos	131
8.1 Estabilidad, productos de degradación o productos de reacción	131
8.2 Posibles efectos en nutrientes	133
Capítulo 9. Casos de necesidad y usos propuestos	137
9.1 Necesidad tecnológica	137
1) Uso previsto	138
2) Beneficio al consumidor	139
3) Beneficios para la salud	140
4) Atención al cliente	140
5) Impacto por la autorización de glicósidos de esteviol en Europa	141
6) Beneficios sociales	141
7) Beneficios económicos e industriales	142
8) Impacto ambiental	143
9.2 Cantidad a ser añadida (niveles de uso previstos o máximos niveles de uso) – Residuos en los alimentos	144
9.3 Eficacia del efecto previsto en el nivel propuesto	147

Capítulo 10. Exposición	149
10.1 Exposición humana conocida o anticipada al aditivo propuesto	149
- Peor caso hipotético: todo el azúcar remplazado por SVgly	149
10.2 Cálculos de exposición	150
1) Fuentes de exposición humana	151
2) Evaluación de la exposición alimentaria	151
3) Evaluación de grupos de población	153
4) Niveles de concentración de los glicósidos de esteviol	153
5) Escenarios para la evaluación de la exposición alimentaria	154
6) Resultados	162
7) Caracterización de riesgos	176
Capítulo 11. Autorizaciones existentes y evaluaciones	185
11.1 Autorización nacional existente y evaluaciones y/o evaluaciones por otros órganos	185
Parte III. DATOS TOXICOLÓGICO	
Estructura general para la evaluación toxicológica de aditivos alimentarios	195
Protocolos de estudio	195
Capítulo 12. Metabolismo/ Toxicokinesia	197
12.1 Absorción	197
1) Ensayos <i>In vitro</i>	197
2) Absorción en animales y voluntarios	201
3) Conclusiones de los estudios de absorción	203
12.2 Metabolismo en los ensayos <i>in vitro</i>	203
1) Metabolismo por bacterias del colon	204
2) Metabolismo por bacterias de la soja	207
12.3 Metabolismo <i>in vivo</i>	210
1) Animales	210
2) Voluntarios	214
3) Comentarios y conclusiones	219
Capítulo 13. Toxicidad: aguda y subcrónica	223
13.1 Toxicidad aguda	223
13.2 Toxicidad subaguda	224
13.3 Conclusión	225
Capítulo 14. Genotoxicidad	227
14.1 Inducción de mutaciones de genes en bacteria	227
1) Glicósidos de Esteviol (Esteviósido, rebaudiósido A)	227
2) Esteviol	230

14.2 Inducción de mutaciones de genes en células mamíferas in vitro	232
1) Glicósidos de Esteviol (esteviósido, rebaudiósido A)	232
2) Esteviol	234
14.3. Inducción de la aberración cromosómica en células mamíferas	236
1) Glicósidos de Esteviol (esteviósido, rebaudiósido A)	236
2) Esteviol	240
Capítulo 15. Toxicidad crónica y carcinogenicidad	243
15.1 Glicósidos de Esteviol (esteviósido, rebaudiósido A)	243
15.2 Esteviol	250
15.3 Conclusión	252
Capítulo 16. Reproducción y desarrollo de la toxicidad	255
16.1 Reproducción	255
1) Estudios con glicósidos de esteviol	255
2) Resultados obtenidos con extractos de Estevia cruda	259
16.2 Toxicidad prenatal desarrollada	262
16.3 Toxicidad postnatal desarrollada	275
16.4 Aditivos para fórmula infantil: caso especial	275
Capítulo 17. Otros estudios	277
17.1 Bio-disponibilidad de nutrientes de la dieta	277
17.2 El esteviósido y la caries	280
17.3 Efectos farmacológicos	281
1) Bajada de presión sanguínea	282
2) Efectos en niveles de glucosa en sangre	285
3) Efectos inmunológicos	291
4) Efecto en Aterosclerosis	301
5) Alergenicidad: ¿problemas?	305
6) Glucurónido de esteviol: ¿el principio activo?	306
PARTE IV. DISCUSIÓN GENERAL	307
Cantidad diaria recomendada	310
Literatura citada	313

Estevia y Glicósidos de Esteviol

Terminología

¿Qué se quiere decir con “Estevia - extractos crudos - Glicósidos de Esteviol - Glicósidos de Esteviol modificados”?

Estevia: en este libro emplearemos el término *Stevia rebaudiana* (Bertoni) o simplemente Estevia para referirnos a las plantas o sus hojas secas. Existe suficiente información acerca de la Estevia en el libro de Kinghorn (2002) Kinghorn, AD (Ed) *Stevia, género Stevia. Plantas Medicinales y Aromáticas-Perfiles Industriales*, vol. 19. Taylor y Francis, London y NY pp 211, ISBN 0-415-26830-3. El libro da una excelente descripción general de la botánica, constituyentes dulces o no dulces, fotoquímica, investigaciones sintéticas, métodos para mejorar el sabor de los edulcorantes y el uso de edulcorantes en Japón y Corea. En Europa, se decidió que la Estevia es un Alimento Novel, aunque se puede comprobar que grandes cantidades de éste han sido importadas y consumidas en Europa. Este punto se trata más en detalle en un capítulo posterior.

Glicósidos de Esteviol: son edulcorantes purificados de hojas de Estevia. La pureza de la mezcla (que contiene, en su mayoría, de los edulcorantes esteviósido y rebaudiósido A) debe ser >95 % sobre una base de peso seco. Rebaudiósido A de alta pureza (>95 %) también puede ser encontrado en el mercado. Tiene un mejor sabor que el esteviósido y los demás edulcorantes que aparecerán a lo largo de este libro. En algunos países, la mezcla de glicósidos de esteviol se denomina “esteviósidos”. Sin embargo, este término es confuso y debe ser evitado ya que el esteviósido es un componente específico de la mezcla.

Pureza de glicósidos de esteviol. La pureza de los glicósidos de esteviol se define como la suma de los glicósidos de esteviol presentes (en una mezcla) y expresados en base a su peso seco.

Una pureza de >95 % quiere decir que la suma de los glicósidos de esteviol alcanzan por lo menos un 95 % de la muestra seca. El peso seco correcto de una muestra se obtiene tras secar la muestra hasta un peso constante y se realiza en recipientes especiales de pesado (ver más adelante).

Equivalentes del esteviol. Todos los edulcorantes tienen pesos moleculares distintos, y se degradan hasta esteviol por la acción de las bacterias del colon. Por tanto, JECFA (Joint Expert Committee for Food Additives, Comité de Expertos de Aditivos Alimentarios) propuso emplear el término “equivalentes del esteviol” para fijar una CDR de 0-4 mg de equivalentes de esteviol/kg de peso corporal; por ejemplo, 10mg de esteviósido o 12 mg de rebaudiósido A/kg de peso corporal, respectivamente.

Extractos crudos de Estevia: son los extractos impuros del agua u hojas alcohólicas. Se venden como jarabes de Estevia. Su color es marrón oscuro. Siguiendo el BfR (Instituto de Evaluación de Riesgo) alemán, estos jarabes deben ser excluidos de una aplicación Alimentos Nuevos (Novel Food, NF). Esto hace la situación más compleja, ya que estos jarabes pueden no ser considerados como aditivos alimentarios.

Glicósidos de Esteviol modificados. Los glicósidos de esteviol modificados enzimáticamente son aquellos glicósidos a los que se les añadió unidades adicionales de azúcar por medio de enzimas. El sabor de la mezcla de estos componentes es muy bueno. Sin embargo, su dulzura solo es 100 veces la de una solución del 0.4 % de sacarosa, mientras que los glicósidos de esteviol sin

modificar son unas 250-350 veces más dulces. Hasta ahora, estos glicósidos de esteviol modificados no están incluidos en las autorizaciones para glicósidos de esteviol. El uso de estos edulcorantes puede llegar a exceder las CDR de 0-4 mg de equivalentes de esteviol.

Sumario

- A los glicósidos de esteviol se les ha asignado el número (E-) 960 por el Codex Alimentarius.

- En la parte I del libro, se da una descripción e identificación detallada de los diferentes glicósidos de esteviol, incluyendo los datos espectroscópicos, estado físico y la dulzura, comparados con un 0.4 % de sacarosa (Capítulo 1). La especificación de la pureza de los glicósidos de esteviol del 95 % se explica en el Capítulo 2 y un esquema general del proceso de fabricación se detalla en el Capítulo 3. El Capítulo 4 está dedicado las técnicas válidas para el análisis de glicósidos de esteviol. Esto permite a los inspectores de alimentos controlar la calidad de los glicósidos de esteviol en el mercado.

Además, la Industria de la Estevia se beneficiará de estas técnicas, ya que el análisis de los glicósidos de esteviol debe ser preciso. De esta manera, solo estará disponible en el mercado un producto de calidad. El desarrollo de un estándar interno (IS) también está descrito, lo que posibilitará correcciones de pérdidas durante los procesos de purificación cuando se llevan a cabo análisis de alimentos complejos.

- La Parte II describe el uso de las técnicas válidas para la extracción de hojas (Capítulo 5), el control de calidad de los glicósidos de esteviol (Capítulo 6) y el análisis de diferentes alimentos, bebidas y comidas complejas (Capítulo 7). El Capítulo 8 está dedicado a la reacción y destino de los glicósidos de esteviol en los alimentos, mientras que el Capítulo 9 trata sobre las necesidades tecnológicas y los

usos propuestos del edulcorante. En el Capítulo 10, la exposición se calcula haciendo uso de 2 escenarios: un peor caso (todo el azúcar reemplazado) y uno más realista de un 30 % de sustitución del azúcar.

- La Parte III expone una encuesta detallada sobre los datos toxicológicos. Una gran cantidad de estudios toxicológicos de glicósidos de esteviol se han llevado a cabo por diferentes laboratorios en diferentes países. Casi todos los estudios confirman la seguridad de los glicósidos de esteviol como aditivo para los alimentos.

- La absorción y los estudios del metabolismo (Capítulo 11) revelaron que la absorvancia de glicósidos de esteviol es extremadamente baja. Las enzimas del tracto digestivo no son capaces de degradar glicósidos de esteviol en esteviol, tampoco lo es el jugo gástrico. Solamente el grupo de bacterias del colon son capaces de degradar glicósidos de esteviol en esteviol. Parte del esteviol es expulsado con las heces, el resto es absorbido por el colon y glucuronado en el hígado. Los riñones filtran el glucurónido de esteviol en la orina y es expulsado. No existen acumulaciones de derivados en el cuerpo. Además del glucurónido de esteviol, ningún otro derivado pudo ser detectado. En la sangre, solo fue detectado el glucurónido de esteviol, pero no esteviol libre. Sin embargo, el grupo de investigación de Milán demostró la presencia de esteviósido en sangre, pero las cantidades fueron muy pequeñas para ser cuantificadas.

- Los estudios de toxicidad aguda y crónica revelaron que los glicósidos de esteviol tienen una toxicidad muy baja. No se observó ninguna toxicidad en las pruebas crónicas (Capítulo 12).

- Los estudios de genotoxicidad (Capítulo 13) mostraron que los glicósidos de esteviol no indujeron mutaciones de genes de las bacterias. Sin embargo, después

de la activación metabólica, se observó que metabolitos de esteviol desconocidos causaron mutaciones en una cepa muy sensible de *Salmonella typhimurium* TM677, pero no en otras cepas o en otras bacterias. Los glicósidos de esteviol no indujeron mutaciones en genes de células mamíferas in vitro. No obstante, después de la activación metabólica del esteviol (99 % de pureza), se encontró cierta mutación de genes y aberración cromosómica en los fibroblastos del pulmón de un hamster chino en concentraciones altas, por encima de los 300 µg/mL, sin embargo, estas jamás serán alcanzadas en el plasma ya que las administraciones de altas dosis, hasta 750 mg diarios, no revelaron trazas de esteviol en la sangre (límite de detección de derivados del esteviol analizados: 100 pg). Además, el metabolismo de los roedores y los humanos es totalmente diferente. En el ensayo de mutación de genes (MOLY) no hubo signos de acrecentamiento de la frecuencia de mutación por esteviol en el linfoma L5178Y tk+/-3.7.2C del ratón, mientras que el control positivo mostró la estimulación esperada. Los glicósidos de esteviol, así como el esteviol, fueron inactivos en todas las pruebas de aberración cromosómica llevadas a cabo.

Debido al resultado positivo de las dos pruebas de genotoxicidad a concentraciones relativamente altas, el esteviol libre también fue testado in vivo en diferentes modelos de animales. No hubo señales de efectos nocivos. Esto se corresponde bien con los estudios de metabolismo hechos con voluntarios donde no hubo restos de esteviol en sangre. Por ello, la conclusión general es que el uso de glicósidos de esteviol como edulcorante es seguro. En los modelos de animales se demostró que grandes dosis de glicósidos de esteviol inhiben la formación de tumores. Sin embargo, debido a la absorción extremadamente reducida a nivel intestinal y las pequeñas cantidades requeridas para propósitos edulcorantes, las ventajas de glicósidos de esteviol orales como agentes quemopreventivos parece ser menos relevante.

- En los estudios de toxicidad crónica y carcinogenicidad (Capítulo 14) con glicósidos de esteviol y esteviol libre, y usando diferentes modelos de animales, no se detectaron efectos nocivos.

- No hubo efectos detectables de los glicósidos de esteviol o esteviol en reproducción, ni toxicidad en el desarrollo embrionario (Capítulo 15). El estudio realizado por Planas y Kuć (1968) llevó, en el pasado, a cierta confusión y controversia en cuanto a temas de fertilidad. Sin embargo, estos resultados fueron refutados por Shiotsu (1996) quién realizó experimentos más fiables con muchos más animales. Muchos otros autores han descrito la ausencia de efectos de los glicósidos de esteviol en la reproducción masculina y femenina. La importancia de la administración de únicamente una gran dosis de extracto de Estevia cruda a ratas jóvenes debe ser cuestionada. En este caso, extractos de hojas frescas de Estevia en cantidades superiores al 50 % del peso del cuerpo fueron administradas diariamente a ratas jóvenes. En muchos estudios sobre la toxicidad en el desarrollo prenatal, los glicósidos de esteviol y esteviol no hicieron efecto, incluso cuando se administraron dosis muy elevadas. Tampoco hubo efecto alguno en los estudios de la toxicidad en el desarrollo postnatal. El uso de los glicósidos de esteviol no está destinado para fórmulas infantiles, fórmulas de seguimiento o papillas.

- Muchos estudios del Capítulo 16 revelaron que no existen efectos en la biodisponibilidad de los nutrientes en una dieta. Hay un efecto claramente beneficioso en el uso de glicósidos de esteviol en cuanto a la formación de caries, probablemente debido a la sustitución de la sacarosa de los alimentos por una sustancia no cariogénica.

Aunque puedan aparecer efectos farmacológicos al ingerir grandes dosis de glicósidos de esteviol como la bajada de glucosa en la sangre, la bajada de hipertensión y la prevención de aterosclerosis, estos no ocurrirán cuando se tomen

pequeñas dosis de glicósidos de esteviol para propósitos edulcorantes. Para provocar estos efectos beneficiosos, se deben administrar grandes cantidades (por ejemplo, 250-500mg tres veces al día, en cápsulas...). Los glicósidos de esteviol no suelen acentuar problemas nutricionales, microbiológicos, toxicológicos y/o alérgicos.

La parte IV es una discusión general.

- La evaluación de la exposición a una dieta que contenga glicósidos de esteviol estimó que para la mayoría de consumidores la CDR (0-4 mg equivalentes de esteviol/Kg de peso corporal) no se excedía cuando los glicósidos de esteviol se añadían al rango de alimentos solicitados en la aplicación. La exposición estimada para altos consumidores (niños de 2-6 años) excedió marginalmente la CDR. Sin embargo, esta estimación estaba basada en hipótesis muy conservadoras y cuando la estimación de la exposición alimentaria se llevó a cabo mediante niveles de glicósidos de esteviol más realistas, se estimó que una exposición alimentaria para altos consumidores (niños de 2-6 años) solo alcanzaba el 50 % de la CDR. Además, el valor de la CDR es bastante bajo y se deberían considerar valores más elevados, como se sugiere en la tabla 42.

- Los estudios toxicológicos revelan que los glicósidos de esteviol son seguros y deben ser autorizados como aditivos alimentarios en Europa. No existen afectaciones en cuanto a salud pública y seguridad en el uso de glicósidos de esteviol cuando son empleados como aditivos alimentarios en los niveles máximos propuestos en la tabla 28. Habrá un continuo seguimiento de calidad en el mercado europeo. Además el grupo de glicósidos de esteviol no es un aditivo alimentario novedoso y ya ha sido aprobado en muchos países y continentes. Se estima que

más de 150 millones de personas consumen **diariamente** glicósidos de esteviol como aditivos o como componentes de hojas secas de Estevia.

- La introducción de glicósidos de esteviol en el mercado europeo podría tener muchos beneficios para el consumidor mediante una reducción de ingesta de energía, la posibilidad de consumir productos totalmente naturales y serían posibles las comidas completamente orgánicas. Además los glicósidos de esteviol son muy dulces, y solo se necesitan en pequeñas cantidades. Los glicósidos de esteviol son muy estables y pueden ser cocinados y horneados a temperaturas de 200 °C sin llegar a su descomposición. Son incluso seguros para pacientes de fenilcetonuria (PKU).

- También habrá un impacto beneficioso para toda la UE; como beneficios sociales, beneficios de salud por medio de la reducción de costes de cuidado médico, y por supuesto habrán grandes beneficios económicos e industriales. A parte de la posibilidad de cultivar Estevia en regiones donde se cultiva ya el tabaco, se crearán nuevos puestos de trabajo en la agronomía europea, en institutos de investigación y en la industria alimentaria. También hay un impacto beneficioso en el medio ambiente, ya que se puede hacer uso de técnicas sostenibles para el cultivo y procesamiento de la Estevia. Asimismo, las compañías europeas ganarán competitividad con respecto a compañías extranjeras al usar y desarrollar productos derivados de la Estevia, sobretodo ya que los glicósidos de esteviol ya están aprobados en un gran número de países.

- En el 23 de mayo del 2007, los Estándares de Alimentos de Australia Nueva Zelanda (FSANZ) decidieron publicar el borrador de su informe de evaluación incluyendo una autorización en su página web. En este documento, ellos escriben explícitamente que no esperaron a que JECFA hubiera hecho estudios adicionales que evaluaran posibles efectos farmacológicos de los glicósidos de esteviol, ya que

FSANZ consideró que la seguridad del uso de glicósidos de esteviol como edulcorante estaba completamente probada. El Dr. O'Calaghan (2006) también concluyó que no había riesgos en el uso de glicósidos de esteviol. Realizó una revisión de la literatura publicada en efectos farmacológicos. Como especialista en hiper- e hipotensión, concluyó que no había ningún riesgo en el empleo de Estevia, ni si quiera en el caso de hipotensión. FSANZ ha concluido que los glicósidos de esteviol son bien tolerados y es improbable que aparezcan efectos secundarios en la presión sanguínea, glucosa de la sangre u otros parámetros en sujetos normales, hipotensos o diabéticos en dosis hasta 11mg/kg peso corporal/día (o sobre 4 mg SVEq/kg peso corporal). La exactitud de la base de datos existente y un nuevo estudio en humanos proporciona una base para revisar los factores inciertos que fueron empleados por JECFA para deducir las CDR temporales para glicósidos de esteviol en 2005. En particular, la evidencia en torno a los efectos farmacológicos de los glicósidos de esteviol en la presión sanguínea y en la glucosa de la sangre ha sido reforzada, por lo que el factor de seguridad adicional por incertidumbre relativa a los efectos en individuos normotensivos o diabéticos no es necesaria. Por ello la CDR de 0-4mg de equivalentes de esteviol/kg peso corporal/día, deducida al aplicar un factor de seguridad 100x al NOEL de 970 mg/kg peso corporal/día (equivalente a 383 mg/kg peso corporal/ día esteviol) en un estudio a una rata que duró 2 años, ha sido establecida.

- En 2003, La *Stevia rebaudiana* fue aprobada para su uso como ingrediente activo y/o excipiente en las listas de medicinas en Australia (FSANZ, 2007). El esteviósido está permitido solo acompañado del uso de la *Stevia rebaudiana* (y no está aprobado como ingrediente por sí solo). No se han reportado efectos adversos conocidos por el esteviósido a la Administración Terapéutica de Sustancias hasta la fecha.

Esta importante información viene del propio FSANZ.

- A partir de una extensiva revisión de la literatura científica, se puede sugerir un valor para la CDR entre 0 y 10 mg de equivalentes de esteviol/kg peso corporal. JECFA (2008) recomendó una CDR final de 0-4 equivalentes de esteviol (con factor de seguridad 100x). FSANZ fijó un valor de 0-4 mg de equivalentes de esteviol/kg peso corporal. Finalmente, en diciembre de 2008, la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos) (EEUU) aceptó el estado GRAS del rebaudiósido A y, en 2009, la mezcla de glicósidos de esteviol. En septiembre de 2009, las autoridades francesas autorizaron el rebA (con pureza >97 %) como aditivo de alimentos, excluyendo su uso como edulcorante de mesa. Sin embargo, en enero de 2010, rebA fue también autorizado como un edulcorante de mesa. El 14 de abril del 2010, EFSA publicó una opinión positiva sobre los glicósidos de esteviol y el rebaudiósido A.