



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ESTEVIÓSIDOS Y REBAUDIÓSIDOS, DE
LA PLANTA *STEVIA REBAUDIANA* DESARROLLADA *IN VITRO*, ASÍ COMO SU
ANÁLISIS COMPARATIVO EN EJEMPLARES CULTIVADOS EN CAMPO.**

PRESENTA

L.N. Karla Berenice Infante González

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.**

TUTOR:

M.C. José Luis Moreno Hernández Duque

COMITÉ TUTORAL:

M.C. Lucía Isabel Chávez Ortíz

Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

Aguascalientes, Ags., Noviembre de 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
Comemoración del Bicentenario del inicio de la Independencia de México
y del Centenario de la Revolución Mexicana

MC. JOSE DE JESUS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
PRESENTE

Por medio de la presente y como miembro del comité tutorial de la estudiante de Maestría Área Biotecnología Vegetal KARLA BERENICE INFANTE GONZÁLEZ con ID 299, quien realizó la tesis titulada “Determinación del contenido de steviosidos y rebaudiósidos de la planta *Stevia rebaudiana* desarrollada in vitro, así como su análisis comparativo en especies cultivadas en campo.” y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el VOTO APROBATORIO para que ella proceda a imprimir su tesis y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo

ATENTAMENTE
“ Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags, a 31 de Octubre de 2016.

M. en C. Jose Luis Moreno Hernández Duque
Miembro del Comité Tutorial

c.c.p Interesado
c.c.p Secretario de Investigación y Posgrado
c.c.p Jefatura del Dpto de Química.
c.c.p Consejero Académico
c.c.p Minuta Secretario Técnico.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
Comemoración del Bicentenario del inicio de la Independencia de México
y del Centenario de la Revolución Mexicana

**MC. JOSE DE JESUS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
PRESENTE**

Por medio de la presente y como miembro del comité tutorial de la estudiante de Maestría Área Biotecnología Vegetal **KARLA BERENICE INFANTE GONZÁLEZ** con ID 299, quien realizó la tesis titulada “Determinación del contenido de steviosidos y rebaudiósidos de la planta *Stevia rebaudiana* desarrollada in vitro, así como su análisis comparativo en especies cultivadas en campo.” y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO** para que ella proceda a imprimir su tesis y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Sin más por el momento, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo

ATENTAMENTE
“ Se Lumen Proferre”
Aguascalientes, Ags, a 31 de Octubre de 2016.

M. en C. Lucía Isabel Chávez Ortiz
Miembro del Comité Tutorial

c.c.p Interesado
c.c.p Secretarío de Investigación y Posgrado
c.c.p Jefatura del Dpto de Química.
c.c.p Consejero Académico
c.c.p Minuta Secretarío Técnico.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES



M EN C JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como asesor designado de la estudiante **KARLA BERENICE INFANTE GONZALEZ** con ID 299 quien realizó la tesis titulada: **DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ESTEVIÓSIDOS Y REBAUDIÓSIDOS DE LA PLANTA STEVIA REBAUDIANA DESARROLLADA IN VITRO, ASÍ COMO SU ANÁLISIS COMPARATIVO EN EJEMPLARES CULTIVADOS EN CAMPO**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 1 de noviembre de 2016

Yenny Adriana Gómez A.
Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre
Asesor de tesis

c.c.p.- Karla Berenice Infante González
c.c.p.- Dr. Juan Jáuregui Rincón - Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Consejero Académico (Dr. José Francisco Morales Domínguez -Para área terminal Biotecnología Vegetal)
c.c.p.- Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch - Secretario Técnico

AGRADECIMIENTOS:

A mi casa de estudios, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES, por las facilidades brindadas a sus estudiantes, para seguir creciendo, ofreciéndonos programas de posgrado de gran nivel.

A CONACYT por su continuo apoyo a la investigación y al desarrollo de profesionales de la Investigación en este programa de PNPC.

A la Biofábrica Stevia Maya, por las facilidades otorgadas y el material brindado para la realización de esta tesis.

A mi comité Tutoral

M.C. José Luis Moreno Hernández Duque por su IMPORTANTE apoyo, consejos y paciencia en todos los aspectos de ésta etapa y proceso de aprendizaje.

M.C Lucía Isabel Chávez Ortiz, por su disposición, consejos, guía, atención y el reto constante a desarrollar siempre un trabajo de calidad para mi crecimiento como investigadora y profesional.

Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre por su disposición y paciencia en las revisiones enfocadas a mejorar mi trabajo.

A todas las personas presentes que me apoyaron incondicionalmente durante la realización de mi proyecto.

A la T.L.Q Ma. Del Carmen Rubio, por su constante apoyo y paciencia en mi estancia en el laboratorio.

A todos los maestros que participan en éste posgrado en Biotecnología Vegetal, por brindarme cimientos para el desarrollo de mi trabajo de Tesis

A mis compañeros de Maestría y Doctorado Directo, por su continuo apoyo y amistad, por hacer de ésta parte del viaje algo realmente inolvidable, respecto a lecciones, vivencias, experiencias y retos personales.

DEDICATORIAS

A mi padre Dios; fuente de todas mis ganas de continuar, a pesar de cualquier circunstancia...

A mi familia: papá, mamá, Oscar, Noé... que siempre han sido la base de mi vida, la motivación constante de crecer y mi máximo orgullo.

Amigos y personas que con su aliento enriquecen el camino IRRR, LCGA.

Karla Berenice Infante González

ÍNDICE GENERAL

| | | |
|---------------------------------|--|--------------|
| RESUMEN | | 6,7 |
| SUMMARY | | 8,9 |
| I. INTRODUCCIÓN | | 10,11 |
| II. ANTECEDENTES | | 12-42 |
| II.1 | Stevia..... | 12-14 |
| II.2 | Compuestos edulcorantes de Stevia..... | 14-18 |
| II.3 | Requerimientos agroecológicos básicos para el cultivo de Stevia..... | 18-20 |
| II.4 | Rutas de síntesis de estevioglucósidos..... | 20-23 |
| II.5 | Técnicas de extracción y análisis de estevioglucósidos de Stevia..... | 23,24 |
| II.5.1 | Extracción de compuestos por soxhlet..... | 25,26 |
| II.5.2 | Etapas de extracción soxhlet..... | 26-28 |
| II.5.2.1 | Generalidades de extracción soxhlet en Stevia..... | 28-30 |
| II.5.3 | Separación y análisis de compuestos por cromatografía..... | 31 |
| II.5.3.1 | Cromatografía en capa fina..... | 31-33 |
| II.5.3.2 | Análisis semicuantitativo de estevioglucósidos por medio de cromatografía en capa fina..... | 33,34 |
| II.5.4 | Cromatografía líquida de alta resolución HPLC..... | 34 |
| II.5.4.1 | Características en el uso de HPLC para análisis cuantitativos de estevioglucósidos..... | 34-36 |
| II.6 | Alternativas para la producción de Stevia..... | 36-38 |
| II.6.1 | Cultivo de tejidos vegetales..... | 38,39 |
| II.6.2 | Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales..... | 39,40 |
| II.7 | Enfoques de la demanda de producción de Stevia para el combate a problemáticas de salud..... | 40-42 |
| III. JUSTIFICACIÓN | | 43 |
| IV. HIPÓTESIS | | 43 |

| | | |
|--------------|---|---------------|
| V. | OBJETIVOS..... | 44 |
| V.1 | Objetivo general..... | 44 |
| V.2 | Objetivos específicos..... | 44 |
| VI. | METODOLOGÍA..... | 45-54 |
| VI.1 | Obtención de material vegetal..... | 45,46 |
| VI.2 | Esterilización del material vegetal..... | 47 |
| VI.3 | Cultivo de tejidos vegetales..... | 48 |
| VI.4 | Extracción de compuestos de Stevia..... | 49 |
| VI.5 | Análisis semicuantitativo de estevioglucósidos..... | 49-51 |
| VI.6 | Análisis de concentración de compuestos de interés en cromatografía en capa fina..... | 51,52 |
| VI.7 | Análisis cuantitativos de estevioglucósidos..... | 53,54 |
| VII. | RESULTADOS..... | 55-80 |
| VII.1 | Material vegetal..... | 55-57 |
| VII.2 | Esterilización del material vegetal..... | 57 |
| VII.3 | Cultivo de tejidos vegetales..... | 58 |
| VII.4 | Formación de brotes y tejido calloso..... | 59-60 |
| VII.5 | Extractos de Stevia para cromatografía en capa fina en placa..... | 60 |
| VII.6 | Análisis Semicuantitativo de estevioglucósidos..... | 61-68 |
| VII.7 | Análisis de Esteviosido y Reb A, utilizando el Software JustTLC (SWEDAY)..... | 69-74 |
| VII.8 | Extractos para análisis en HPLC..... | 75 |
| VII.9 | Análisis cuantitativos por medio de HPLC..... | 76-80 |
| VIII. | DISCUSIONES..... | 81-93 |
| IX. | CONCLUSIONES..... | 94,95 |
| X. | BIBLIOGRAFÍA..... | 96-100 |
| | ANEXOS | |

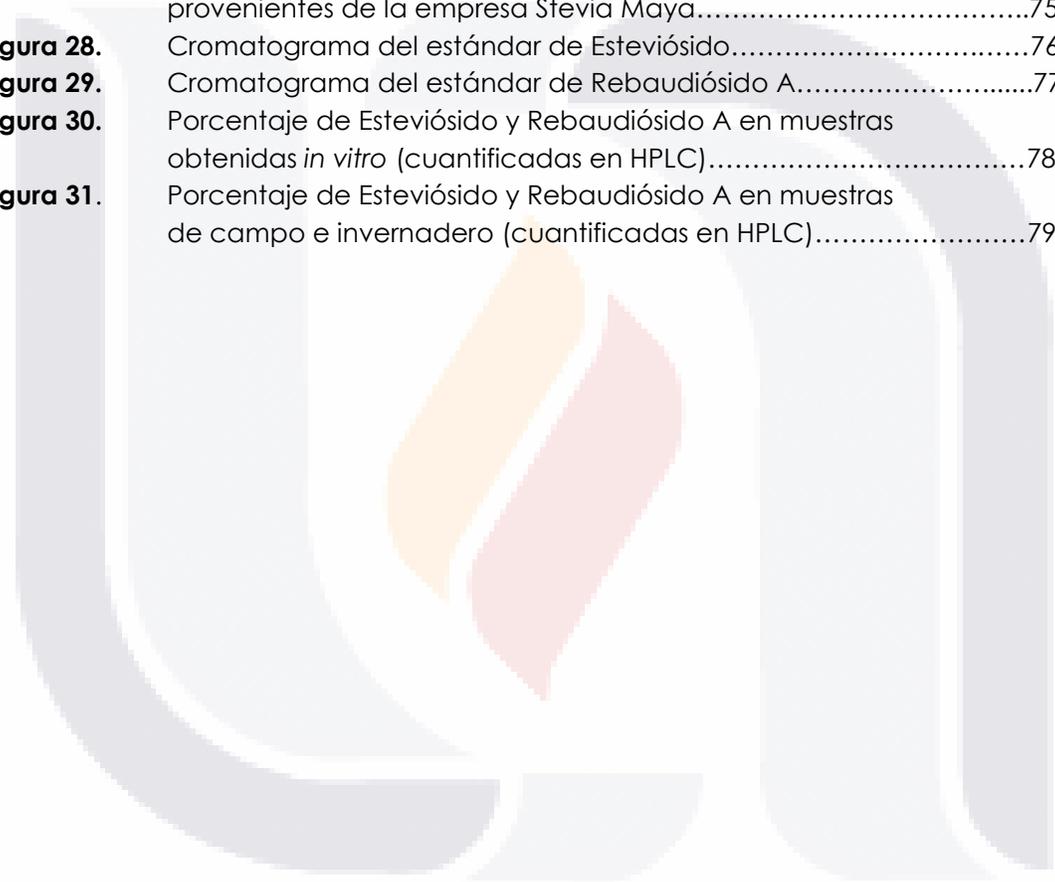
ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|------------------|--|-------|
| Tabla 1. | Jerarquía taxonómica <i>Stevia</i> | 13 |
| Tabla 2. | Estructura, fórmula y peso molecular de los derivados de glucósidos de esteviol | 15,16 |
| Tabla 3. | Puntos de ebullición de solventes °C..... | 28 |
| Tabla 4. | Efecto de la polaridad del disolvente sobre el rendimiento en extracto de rebaudiósido A a partir de dos muestras de hojas secas de <i>Stevia</i> | 30 |
| Tabla 5. | Micropropagación de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni en diferentes sistemas..... | 37,38 |
| Tabla 6. | Muestras cultivadas en campo proporcionadas por la empresa "Stevia Maya" para su análisis..... | 45 |
| Tabla 7. | Muestras cultivadas en campo proporcionadas por la empresa <i>Stevia Maya</i> para su análisis (lote 2)..... | 46 |
| Tabla 8. | Componentes del reactivo revelador para placa..... | 51 |
| Tabla 9. | Tratamientos de desinfección de material vegetal..... | 57 |
| Tabla 10. | Respuesta de los explantes de <i>S. rebaudiana</i> tratados con BA y TDZ a diferentes concentraciones..... | 59 |
| Tabla 11. | Variedades Morita II "Stevia Maya"..... | 61 |
| Tabla 12. | Cálculos de RF placa con muestras de variedad Morita II..... | 64 |
| Tabla 13. | Descripción del resto de las variedades <i>Stevia Maya</i> | 65 |
| Tabla 14. | RF placa variedades alternas a Morita II..... | 67 |
| Tabla 15. | Concentraciones y cuantificación de área de la mancha y volumen de esteviósido y Rebaudiósido A en variedades Morita II..... | 70 |
| Tabla 16. | Concentraciones y cuantificación de área de la mancha y volumen de esteviósido y Rebaudiósido A en variedades distintas a Morita II..... | 72 |
| Tabla 17. | Concentraciones y cuantificación de area de la mancha y volumen de esteviósido y Rebaudiósido a en variedades de campo e invernadero así como las producidas <i>in vitro</i> | 74 |
| Tabla 18. | Concentraciones de esteviósido y Rebaudiósido A, en muestras cultivadas <i>in vitro</i> | 78 |
| Tabla 19. | Concentraciones de esteviósido y Rebaudiósido A en muestras cultivadas en campo empresa <i>Stevia Maya</i> | 79 |
| Tabla 20. | Promedio de concentraciones de esteviósido y Rebaudiósido A de variedades Morita II cuantificadas con HPLC..... | 80 |
| Tabla 21. | Promedio de concentraciones de esteviósido y Rebaudiósido A de variedades distintas Morita II cuantificadas con HPLC..... | 80 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 1. | <i>Stevia rebaudiana</i> | 12 |
| Figura 2. | Estructura química de la aglicona de los glucósidos de esteviol..... | 15 |
| Figura 3. | Plantas de <i>S. rebaudiana</i> cultivadas en suelo..... | 19 |
| Figura 4. | Distribución de las áreas potenciales para el cultivo de <i>S. rebaudiana</i> en la república mexicana..... | 20 |
| Figura 5. | Enzimas que intervienen en el alargamiento de la cadena terpénica en la ruta de síntesis del steviol..... | 23 |
| Figura 6. | Franz Ritter von Soxhlet | 25 |
| Figura 7. | Ensamble de equipo de extracción soxhlet para muestras de <i>S. rebaudiana</i> Universidad Autónoma de Aguascalientes..... | 27 |
| Figura 8. | Separación de seis colorantes, con el densitograma relevante, en una placa de SiO ₂ , desarrollado con tolueno..... | 33 |
| Figura 9. | Vista de control Análisis Plate en software Just TLC..... | 52 |
| Figura 10. | Lote 1 de muestras proporcionado por Stevia Maya..... | 55 |
| Figura 11. | Lote 2 de muestras proporcionado por Stevia Maya..... | 56 |
| Figura 12. | Ejemplares utilizados para el cultivo de tejidos vegetales..... | 57 |
| Figura 13. | Explantos de <i>S. rebaudiana</i> sembrada para su crecimiento con tratamiento A, C y D con presencia de contaminantes..... | 58 |
| Figura 14. | Frascos con explantes de <i>S. rebaudiana</i> sembrados para su crecimiento con tratamiento B..... | 58 |
| Figura 15. | Placa de Sílica gel para cromatografía en capa fina, con muestras inyectadas bajo la metodología de lavado con etanol y centrifugación..... | 60 |
| Figura 16. | Placa de Sílica gel para cromatografía en capa fina, con muestras de la empresa "stevia maya", vista en transiluminador UV..... | 62 |
| Figura 17. | Placa de cromatografía en capa fina variedades de Morita II para análisis semicuantitativo..... | 63 |
| Figura 18. | Placa de cromatografía en capa fina, Variedades distintas a Morita II para análisis semicuantitativo..... | 66 |
| Figura 19. | Cromatografía comparativa entre muestras de campo e invernadero y muestras obtenidas durante el cultivo de tejidos <i>in vitro</i> (callo y brotes)..... | 68 |
| Figura 20. | Placa de Cromatografía variedades Morita II con áreas definidas y cuantificadas en el software Just TLC Sweday..... | 69 |
| Figura 21. | Concentraciones de etevióside y Rebaudiósido A en Variedades Morita II..... | 70 |
| Figura 22. | Placa de Cromatografía variedades distintas a Morita II con áreas definidas y cuantificadas en el software TLC Sweday..... | 71 |
| Figura 23. | Concentraciones y cuantificación de volumen de Esteviósido y Rebaudiósido A en variedades distintas a Morita II..... | 71 |
| Figura 24. | Placa de Cromatografía variedades de campo e invernadero y | |

| | |
|-------------------|--|
| | variedades <i>in vitro</i> con áreas definidas y cuantificadas en el software TLC Sweday73. |
| Figura 25. | Concentraciones y cuantificación de volumen de Esteviósido y Rebaudiósido A en variedades de campo e invernadero así como de muestras producidas <i>in vitro</i>73 |
| Figura 26. | Muestras obtenidos mediante la técnica de extracción de Soxhlet en variedades de <i>S. rebaudiana</i> cosechadas en campo provenientes de la empresa Stevia Maya.....75 |
| Figura 27. | Muestras obtenidos mediante la técnica de extracción de Soxhlet en variedades de <i>S. rebaudiana</i> cosechadas en campo provenientes de la empresa Stevia Maya.....75 |
| Figura 28. | Cromatograma del estándar de Esteviósido.....76 |
| Figura 29. | Cromatograma del estándar de Rebaudiósido A.....77 |
| Figura 30. | Porcentaje de Esteviósido y Rebaudiósido A en muestras obtenidas <i>in vitro</i> (cuantificadas en HPLC).....78 |
| Figura 31. | Porcentaje de Esteviósido y Rebaudiósido A en muestras de campo e invernadero (cuantificadas en HPLC).....79 |



RESUMEN

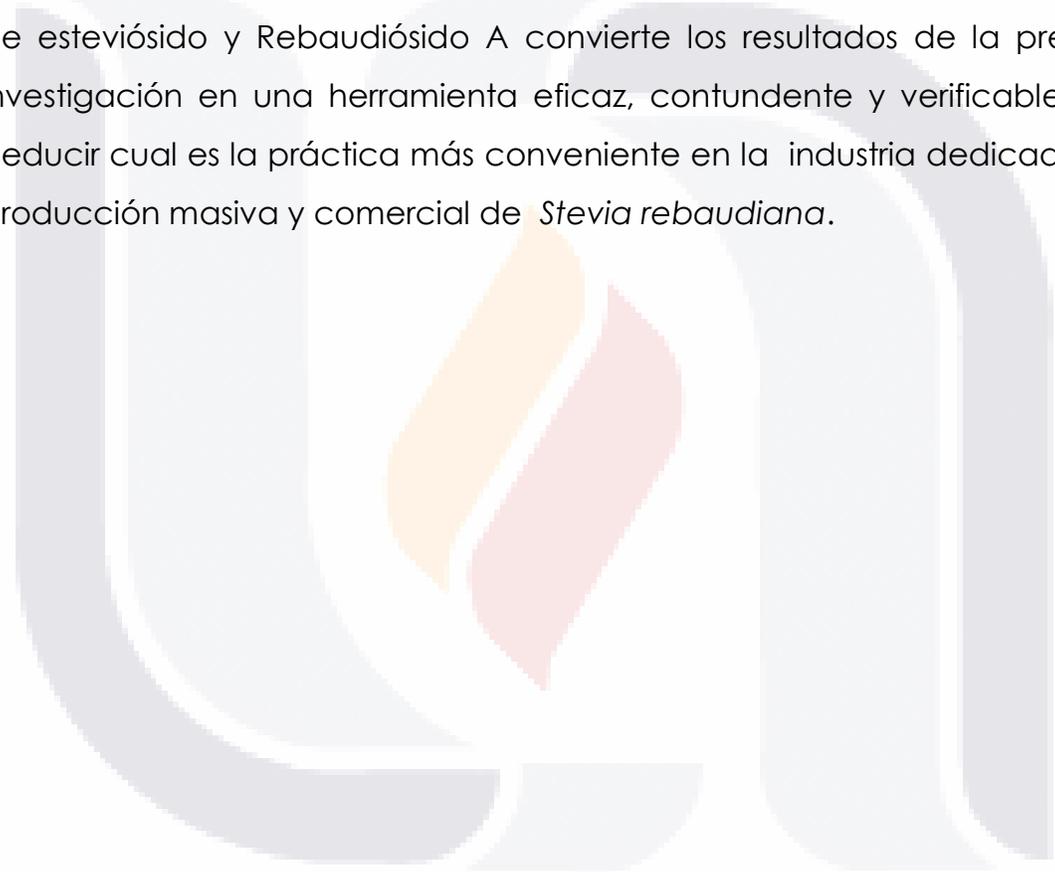
Stevia rebaudiana produce compuestos que pueden ser utilizados como edulcorantes dietéticos. El presente trabajo se enfocó en realizar una serie de técnicas semicuantitativas y cuantitativas para llevar a cabo un análisis comparativo de la producción de estevioglucósidos en diferentes tejidos de *Stevia rebaudiana* cultivados *in vitro*, en contraste con ejemplares cultivados en campo.

Se obtuvieron muestras *in vitro* a partir de ejemplares provenientes de Aguascalientes y de Zacatecas, cuyos segmentos nodales fueron cultivados en medio Murashige y Skoog suplementado, los brotes se formaron a los 25 días de cultivo, obteniéndose hasta cinco por cada explante. El mejor tratamiento para inducción de brotes fue BA 1 mg L⁻¹ y para inducción de tejido calloso fue TDZ 1 mg L⁻¹; el resto de las muestras fueron variedades cultivadas en campo, originarias del sureste de México.

Los extractos obtenidos a partir de todas las muestras se analizaron a través de cromatografía en capa fina y el software Sweday® para detectar la presencia de esteviósido y Rebaudiósido A. Además se realizó el análisis por cromatografía líquida de alta resolución simple y sensible (HPLC) para la cuantificación de los mismos, con un equipo de HPLC Perkin Elmer series 200, columna de fase reversa C18, (longitud: 250 mm; diámetro interior: 4,6 mm, tamaño de partícula: 5 micras) DETECTOR-UV-VIS, los resultados señalan que las muestras obtenidas *in vitro* presentaron muy baja concentración de esteviósido y Reb. A. Las muestras de campo variedad Morita II, presentan un promedio de 1.96% de esteviósido y un promedio de 9.20% de Rebaudiósido A; la variedad criolla estudiada en este trabajo tiene una concentración promedio de esteviósido de 1.03% y de

Rebaudiósido A de 4.86%; las variedades SM5 y SM4 mostraron un promedio de concentración de esteviósido de 2.34% y de rebaudiósido de 10.54%.

En México no existen estudios enfocados en la cuantificación y comparación sobre la producción de los compuestos dulces entre plantas de distinto origen (campo/*in vitro*), por lo tanto el análisis de la producción de esteviósido y Rebaudiósido A convierte los resultados de la presente investigación en una herramienta eficaz, contundente y verificable para deducir cual es la práctica más conveniente en la industria dedicada a la producción masiva y comercial de *Stevia rebaudiana*.



SUMMARY

Stevia rebaudiana produces compounds that can be used as dietary sweeteners. The present work focused on a series of semiquantitative and quantitative techniques to carry out a comparative analysis of the production of steviolglucósidos in different tissues of *Stevia rebaudiana* cultivated *in vitro*, in contrast with cultivated specimens in the field.

In vitro samples were obtained from specimens from Aguascalientes and Zacatecas, whose nodal segments were cultivated in Murashige and Skoog in a supplemented medium; shoots were formed at 25 days of culture, obtaining up to five for each explant. The best treatment for induction of outbreaks was BA 1 mg L⁻¹ and for induction of callous tissue was TDZ 1 mg L⁻¹; the rest of the samples were varieties of the plant cultivated in field of the southeast of Mexico.

The extracts obtained from all the samples were analyzed through thin layer chromatography and Sweday® software to detect the presence of etesvoside and Rebaudioside A. In addition, the analysis was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) for the quantification thereof, with a Perkin Elmer 200 series HPLC equipment, C18 reverse phase column (length: 250 mm, inside diameter: 4.6 mm, particle size: 5 micron) DETECTOR-UV-VIS. The results indicate that all the samples obtained *in vitro* had very low concentrations of stevioside and Reb. A. Samples of Morita II variety field present an average of 1.96% of stevioside and an average of 9.20% of Rebaudioside A; the criolla variety studied in this study has an average stevioside concentration of 1.03% and Rebaudioside A of 4.86%; SM5 and SM4 showed an average stevioside concentration of 2.34% and rebaudioside of 10.54%.

Mexico, don't have studies focused on quantification and comparison on the production of sweet compounds between plants of different origin (field / *in vitro*), therefore the analysis of the production of stevioside and Rebaudioside A converts the results of the present investigation In an effective, forceful and verifiable tool to deduce which is the most suitable practice in the industry dedicated to the mass production and commercial of *Stevia rebaudiana*.



I. INTRODUCCIÓN

La planta *Stevia rebaudiana* es una especie del género *Stevia* de la familia Asteraceae, nativa de la zona tropical de Sudamérica. Es una planta utilizada desde tiempos remotos por los nativos guaraníes de esa región para endulzar bebidas gracias a su característico y potente sabor dulce (Martínez, 2015).

Con el desarrollo de la tecnología y basados en la farmacopea tradicional, las industrias farmacéuticas han buscado diferentes compuestos útiles para que las personas con diabetes, obesidad y otros trastornos relacionados con el metabolismo, logren disminuir el consumo calórico y los niveles de glucosa en sangre, en sustitución del uso de azúcares refinados. Entre estos compuestos desarrollados a nivel comercial se encuentra la sacarina encontrada con múltiples nombres comerciales: Sucaryl®, Sugar Twin®, Sweet Magic®, Sweet-n-Low®, Zero-cal®, el acesulfamo: K Sunette®, Sweet One®, la sucralosa: Splenda®, el aspartamo: Nutrasweet®, Equal®, SweetMate®, entre muchos otros (Handelsman et. al 2007).

Recientemente, muchas actividades de investigación se han basado en conocer las propiedades químicas y biológicas de la planta de *Stevia*, ya que se sabe que sus hojas producen un edulcorante natural alternativo a los edulcorantes sintéticos, además de ser considerada medicinal, pues varios estudios demuestran que puede tener efectos benéficos sobre enfermedades como la diabetes tipo II, por poseer glucósidos con propiedades edulcorantes sin calorías.

Debido al interés productivo y comercial así como a los enormes beneficios que representa para el campo de la investigación el nuevo aporte de conocimiento sobre las propiedades endulzantes exclusivas de ésta planta,

se realizó este trabajo, en colaboración con la compañía: Biofábrica Stevia Maya, durante el cual fue llevado a cabo un análisis de las concentraciones de dos de los componentes edulcorantes más importantes de la planta: rebaudiósido A y esteviósido, en muestras proporcionadas por dicha compañía de gran parte de las variedades que cultivan en campo, en invernadero, e *in vitro*; así como en diferentes épocas de colecta. A la par se realizaron procesos de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* y micropropagación de Stevia en la Universidad Autónoma de Aguascalientes, para el análisis de la presencia y concentración de los mismos componentes edulcorantes producidos en plantas cultivadas bajo esta técnica, así como de tejido calloso obtenido durante los cultivos *in vitro*.

Los resultados mostrados en el presente escrito sobre el proceso de investigación sientan la base para que éste tipo de compañías con previo conocimiento, elaboren sus propios mecanismos y planes de acción sobre la mejora de sus cultivos, en base a las variedades de planta que sean consideradas potencialmente idóneas para la producción de los compuestos edulcorantes de interés.

II.- ANTECEDENTES

II.1 Stevia

Stevia rebaudiana es una planta herbácea perenne (Fig. 1) miembro de la familia Asteraceae (tabla 1), que incluye plantas tan conocidas como el diente de león, el girasol, la achicoria y el crisantemo. Las hojas lanceoladas tienen aproximadamente 5cm de longitud y 2cm de ancho y se disponen alternadas, enfrentadas de dos en dos. En la naturaleza, la altura de las plantas varía entre 40 y 80cm, pero cultivadas pueden llegar a 1,0 m de altura. La planta se adapta fácilmente a cualquier región tropical y subtropical que presente condiciones ideales cuando se desarrolla en una altitud que va desde el nivel del mar hasta los 1,200 metros de altura (Douglas, 2002). Es originaria del noroeste de Paraguay y del sureste de Brasil en los distritos Amambay Iguazú (frontera entre ambos países) (Brandle, 1998).



Figura. 1 *Stevia rebaudiana* (Madan, et. al., 2010)

| | |
|----------------------|--|
| REINO | Plantae |
| SUBREINO | Viridiplantae |
| INFREINO | Streptophyta |
| SUPERDIVISION | Embryophyta |
| DIVISIÓN | Tracheophyta |
| SUBDIVISIÓN | Spermatophytina |
| CLASE | Magnoliopsida |
| SUPERORDEN | Asteranae |
| ORDEN | Asterales |
| FAMILIA | Asteraceae |
| GÉNERO | Stevia |
| ESPECIE | <i>Stevia rebaudiana</i> (Bertoni) Bertoni |

Tabla 1. Jerarquía Taxonómica *Stevia* (Fuente: *Integrated Taxonomic Information System*)

Jerarquía taxonómica

Originalmente, *Stevia* era utilizada por los nativos guaraníes de la región subtropical de Paraguay y Brasil para endulzar té y otras bebidas refrescantes, así que por la virtud de tener propiedades similares al azúcar logró atraer atención comercial en las industrias farmacéuticas para el control de la Diabetes y en cuestiones nutricionales como suplemento alimenticio, para disminuir la obesidad (Saikat, et. al., 2015).

Existen 154 miembros del género *Stevia*; diferentes especies de *Stevia* contienen varios compuestos edulcorantes, sin embargo *Stevia rebaudiana* es la más dulce de todas (Goyal, et. al., 2009; Douglas, 2002); contiene como principios activos esteviósidos y rebaudiósidos que son una serie de glucósidos, responsables del sabor dulce de la planta y con un poder edulcorante de 100 a 400 veces mayor que la D-glucosa. Se han realizado muchos estudios de esta planta, enfocados a su papel benéfico en un gran número de aplicaciones para la salud. Se tienen reportes sobre su actividad antiácida, cardiotónica, su actividad anticáncer y propiedades como coadyuvante al tratamiento contra el rotavirus (Brandle, 1998); sus efectos antihiperlipidémicos e insulinoatrópicos que ayudan al tratamiento

de Diabetes mellitus tipo 2 y como estimulante en la secreción de insulina actuando sobre las células del páncreas (Jeppesen, P. et. al., 2002), estas propiedades atribuidas al consumo de la planta han favorecido su uso como alternativa del azúcar común. En base a esto, el cultivo de *S. rebaudiana* se ha convertido en una práctica económicamente atractiva (Jarma, et. al., 2010). Las hojas secas y molidas de la planta son 30 veces más dulces que el azúcar y enteras frescas 15 veces más (Douglas, 2002; Jentzer, et al., 2015).

También ha sido descrita la estabilidad de los componentes activos en Stevia. Se sugirió que el esteviósido y rebaudiósido A son dos de los principales agentes edulcorantes termoestables incluso hasta 200°C, lo que los hace adecuados para su uso en alimentos cocinados o sometidos a altas temperaturas, lo cual vuelca nuevamente la mirada para productores de la rama de alimentos a nivel mundial (Lemus et al., 2012).

II.2.- Compuestos edulcorantes de Stevia

Los principios edulcorantes aislados a partir de hojas de esta planta, pueden llegar a ser hasta 300 veces más dulces que la sacarosa, principalmente esteviósido, rebaudiósido A, C y D, y dulcósido A. (Jiménez, et. al., 2010).

Su interés principal es el alto contenido de edulcorantes naturales dietéticos en hojas: aproximadamente 4-20% en las hojas en base a peso seco. Estos componentes son glucósidos dipertenoides y hoy en día mas de 30 tipos son reconocidos en la literatura científica.

Estos compuestos son glucósidos derivados del diterpeno esteviol (entero-13-hidroxi-kaureno-16-en-19-oicoácido) que se forman mediante la sustitución del átomo de hidrógeno del grupo carboxilo con glucosa, xilosa y ramnosa para formar un éter (Chaturvedula, et. al., 2011). El esteviol tiene dos grupos hidroxilo, uno unido al carbono 19 (C-19) y el otro unido al carbono 13 (C-13) (Figura 1), que puede ser glicosilado para formar diversos compuestos derivados conocidos como glucósidos de esteviol (Tabla 2) (Aranda et. al. 2014).

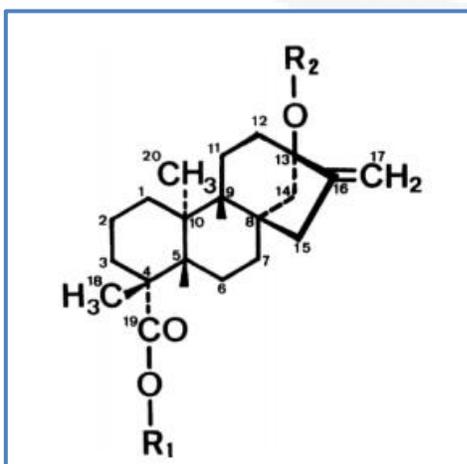


Figura 2. Estructura química de la aglicona de los glucósidos de esteviol (Aranda et. al. 2014).

| COMPONENTE | R1 | R2 | Peso Molecular |
|----------------|---|--|----------------|
| Steviósido | β -Glc | β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) | 804.88 |
| Rebaudiósido A | β -Glc | β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) \downarrow β -Glc(3 \rightarrow 1) | 967.01 |
| Rebaudiósido B | H | β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) \downarrow β -Glc(3 \rightarrow 1) | 804.87 |
| Rebaudiósido C | β -Glc | β -Glc β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1) \downarrow β -Glc(3 \rightarrow 1) | 951.03 |
| Rebaudiósido D | β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) | β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) \downarrow β -Glc(3 \rightarrow 1) | 1129.17 |
| Rebaudiósido E | β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) | β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) | 966.43 |

| | | | |
|----------------|--------------|--|----------|
| Rebaudiósido F | β -Glc | β -Glc- β -Xyl(2 \rightarrow 1) \downarrow β -Glc(3 \rightarrow 1) | 936.98 |
| Dulcósido A | β -Glc | β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1) | 788.87 |
| Rubosósido | β -Glc | β -Glc | 642.7316 |
| Steviolbiosido | H | β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) | 642.73 |

Glc: glucosa, **Rha:** rhamnosa **Xyl:** xylosa.

Tabla 2. Estructura, fórmula y el peso molecular de los derivados de glucósidos de esteviol (Aranda et. al. 2014).

En las variedades cultivadas, los principales compuestos glucósidos de esteviol que se presentan son cuatro: esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido C y rebaudiósido dulcósido. Y en pequeñas cantidades, rebaudiósido D (<0,4%) junto con rebaudiósido C (1% - 2%), dulcósido A (0,4% - 0,7%), esteviolbiosido rubusósido, rebaudiósido B, E y F (<0,4% cada uno) (Aranda et. al. 2014).

Los glucósidos de esteviol son moléculas diterpeno que al conjugarse forman un polvo cristalino blanco, considerado un producto 100% natural, no tóxico, ni mutagénico, cuyo consumo no aporta calorías; las hojas pueden utilizarse en su estado natural y solo son necesarias cantidades pequeñas del producto para aportar la sensación dulce al paladar, sin incrementar la glucosa en sangre, debido a que los enlaces glucosídicos de estos compuestos, no son degradados en el tracto intestinal (Jarma, et. al., 2010).

El uso de edulcorantes intensos, bajos en calorías seguros y eficaces en los alimentos procesados está ganando popularidad debido a una mayor concienciación de los consumidores sobre la ingesta de calorías en la dieta. El Comité Mixto FAO / OMS de expertos en aditivos alimentarios revisó la seguridad de los glucósidos de esteviol (en equivalentes de

esteviol) y recomienda un límite aceptable de ingesta diaria (IDA) de 4 mg / kg de peso corporal / día (EFSA, 2010).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que el consumo de edulcorantes como el aspartame, sacarinas y ciclamatos, los cuales son compuestos que han sido utilizados por las personas que buscan el control de su glucosa y/o de su peso, están implicados en la aparición de ciertos efectos secundarios adversos, los cuales no se han reportado en personas que utilizan *Stevia rebaudiana* como edulcorante (Duran, et. al., 2013). En Japón prohibieron el uso de edulcorantes sintéticos desde 1970 y se han enfocado en la producción de edulcorantes naturales a base de *S. rebaudiana*, práctica que ya se está realizando en otros países, incluido México (González, et. al., 2011).

S. rebaudiana constituye una alternativa prometedora, más aun cuando los endulzantes sintéticos están seriamente cuestionados por los efectos de su consumo a corto y largo plazo. Es interesante observar cómo el consumo de esta planta, ya sea como hierba o como un producto industrializados derivado de la planta, está convirtiéndose en competencia para el mercado de los edulcorantes sintéticos (Duran, et. al., 2013).

La Agencia de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos aprobó en 2008 el uso de los glucósidos diterpenoides como edulcorantes naturales no calóricos en alimentos y bebidas favoreciendo así el mercado de los edulcorantes así como el de la agricultura, ganadería, farmacéutica y cosmetología. Cultivar *S. rebaudiana* es una práctica innovadora y muy rentable, pues presenta condiciones promisorias en los mercados nacionales y mundiales (Jarma, et. al., 2010).

Japón fue el país asiático pionero en popularizar el uso de los esteviósidos como edulcorantes en alimentos y medicamentos como un próspero negocio. Desde entonces, el cultivo de la *S. rebaudinana* se ha extendido a una serie de países de Asia, a saber, China, Malasia, Singapur, Corea del Sur, Taiwán y Tailandia. También se ha estado experimentando un crecimiento rentable en los Estados Unidos de América, México, Canadá y Europa (Ramírez et. al., 2011; Saikat, et. al., 2015).

Se estima que la demanda de hojas secas de *S. rebaudiana* podría llegar a ser de 202,500 toneladas al año, lo que lleva a buscar nuevas alternativas de producción (Madan, et. al., 2010).

II.3.- Requerimientos agroecológicos básicos para el cultivo de Stevia

INIFAP y SAGARPA establecieron las condiciones óptimas para la realización del cultivo de stevia en México, donde señalan que debido al origen tropical y subtropical de la planta, esta requiere humedad alta y constante. Es por eso que los cultivos se dan mayormente en zonas con precipitaciones medias anuales altas (1,400 mm a 1,600 mm) y uniformes (100 a 120 mm mensuales). Es importante resaltar que la planta no es resistente a periodos largos de sequía, por lo que si se pretende cultivar en regiones que no cumplan con las características anteriores, se deberá contar con un sistema de irrigación adecuado; la temperatura promedio de sus regiones de origen es de 24°C, con extremos de la misma que oscilan entre los -6 a 43°C. La altura óptima sobre el nivel del mar en la que la planta se desarrolla está entre los 0 a los 600 msnm (metros sobre el nivel del mar). Por otra parte, altitudes mayores a los 1,200 msnm tienen un efecto negativo sobre el crecimiento de las plantas y el tamaño de las hojas, esto incide negativamente en su producción de esteviósidos ya que

se sabe que la superficie foliar y tamaño de las hojas está relacionado directamente con la tasa fotosintética de la planta y a su vez sobre la producción de metabolitos secundarios. La planta soporta un porcentaje de humedad relativa no mayor al 85% y los fotoperiodos largos a los cuales es sometida aumentan su área foliar y la aparición de hojas, con una cifra crítica de 13 horas, aunque dicha cifra es relativa y el fotoperiodo ideal es dependiente de la variedad cultivada. Por otra parte los suelos arenos-arcillosos, francos y franco-arenosos (Figura 3), con regular proporción de humus, son los reportados como los idóneos, teniendo la planta una mejor adaptación a suelos no salinos con buen drenaje y con un pH de entre 6.5 a 7.5 en comparación a suelos con exceso de humedad (Ramírez et. al., 2011).

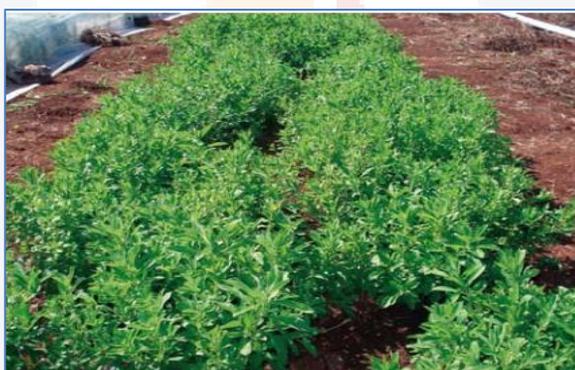


Figura 3. Plantas de *S. rebaudiana* cultivadas en suelo (Ramírez, et. al., 2011)

Las zonas de alto potencial para el cultivo de *Stevia* en México se distribuyen principalmente en los estados del Pacífico como son Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas; no obstante existen algunas áreas importantes en la región del Golfo de México también con un alto potencial, sobre todo en los estados de Tamaulipas, Veracruz y en menor medida en Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Figura 4) (Ramírez, et. al., 2011).

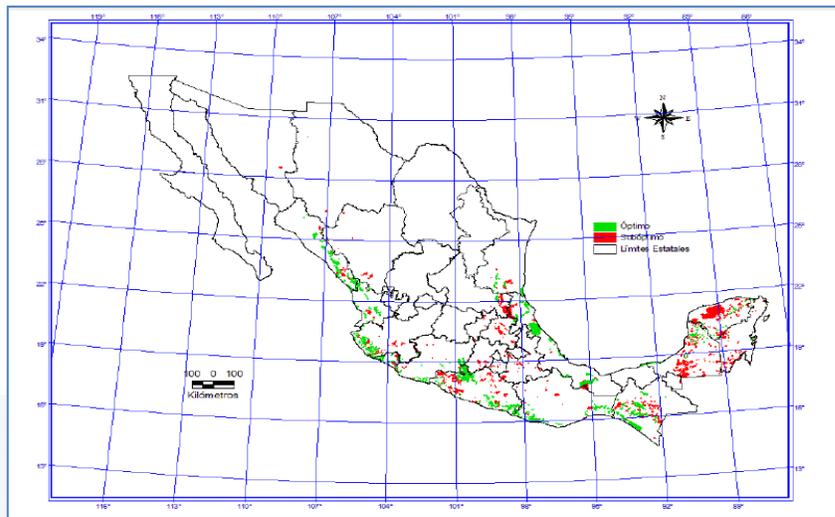


Figura 4.- Distribución de las áreas potenciales para el cultivo de *S. rebaudiana* en la República Mexicana (Ramírez, et. al., 2011).

La planta, de manera tradicional se propaga principalmente por semillas que resultan de la polinización cruzada. Esta forma de reproducción implica recombinación genética y, por lo tanto, alta heterogeneidad en cuanto al crecimiento de las plantas y la producción de esteviósidos. Se ha recurrido a la reproducción asexual mediante estacas para tratar de obtener materiales homogéneos; sin embargo, con esta forma de reproducción se obtiene bajo número de individuos por planta (Sakaguchi et, al. 1982).

II.4 Rutas de síntesis de estevioglucósidos

La adaptación de las plantas al ambiente que las rodea en aspectos tales como la exposición a condiciones adversas ya sea bióticas o abióticas como depredación por insectos o sequías, la simbiosis con otros organismos y la atracción de polinizadores y dispersores de semillas o frutos, son procesos en los cuales existe la participación activa de compuestos de bajo peso molecular llamados metabolitos secundarios (Sepúlveda et al. 2004).

Más de 200.000 metabolitos secundarios son los descubiertos hasta ahora procedentes del reino de las plantas, pero sólo la mitad de ellos tienen una estructura completamente conocida. Se caracterizan por una enorme diversidad química, y cada planta tiene su propio conjunto característico de metabolitos (Christou, et. al., 2013).

Los metabolitos están clasificados en 2 grupos: nitrogenados (alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos) y no nitrogenados (terpenoides poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides). En un mismo grupo de metabolitos secundarios puede haber variedades en cuanto a la estructura, debido a modificaciones y reacciones químicas en su estructura básica como lo son la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Sepúlveda et al. 2004).

En la biosíntesis de estos metabolitos sus precursores tienen origen en rutas como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato, es decir, rutas de metabolismo primario, sin embargo además de no tener una función bien definida en procesos como la fotosíntesis de la planta, la asimilación de nutrientes y otros procesos de metabolismo primario difieren de estos en que su distribución no es equitativa en todo el reino vegetal, en otras palabras no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas, a menudo su producción está restringida a un género familia o especie (Ávalos et. al. 2009).

“Los compuestos edulcorantes de las hojas de stevia son glucósidos de diterpeno sintetizados a partir la ruta del ácido giberélico. Estos diterpenos se sintetizan a partir de unidades de acetato del acetil-coenzima A en la ruta del ácido mevalónico (MVA). Este último ingresa al cloroplasto y se convierte en pirofosfato de isopentenilo (IPP) que es considerado el

isopreno activo; luego, se convierte en pirofosfato de geranilgeranilo, un compuesto de 20 carbonos que sirve como donador de todos los átomos de carbono de las giberelinas; más tarde, en pirofosfato de copalillo, con dos sistemas de anillos, y por último, en kaureno, un compuesto que tiene cuatro sistemas de anillos. El kaureno es el compuesto donde divergen los glucósidos de esteviol y las giberelinas. En stevia, el kaureno es convertido a esteviol estructura básica de los glucosidos de diterpeno en el retículo endoplasmico; este esteviol puede ser glucosilado o rhamnosilado en el aparato de Golgi, para formar los principales edulcorantes, como el esteviósido, los rebaudiósidos A y C y el dulcósido A, que van finalmente a las vacuolas" (Jarma et. al., 2005).

"Las enzimas que catalizan el alargamiento de la cadena terpénica son las prenil transferasas, de las cuales se han aislado, hasta ahora, la *geranil pirofosfato sintasa*, enzima identificada en plastos que requieren Mg^{2+} o Mn^{2+} como cofactores, la *farnesil pirofosfato sintasa*, que requiere Mg^{2+} como cofactor, se localiza en el citoplasma y cataliza la formación de farnesil pirofosfato (FPP) en dos etapas; por último, la *geranil geranil pirofosfato sintasa*, que requiere Mn^{2+} para su máxima actividad, se localiza en plastos y forma el geranil geranil pirofosfato (GGPP) en tres etapas. (Figura 5). Por otra parte el gen de stevia que codifica para la enzima copalil pirofosfato sintasa, responsable de la conversión de GGPP a CPP ha sido clonado, estudiado y secuenciado, por lo cual se afirma que la hidroxilación del ácido ent-kaurenoico en la posición C13 es el punto de divergencia para la síntesis del esteviol y las giberelinas. Esta hidroxilación, que requiere NADPH y oxígeno molecular proveniente del estroma, es catalizada por la enzima ácido ent-kaurenoico 13-hidroxilasa" (Jarma et al., 2010).

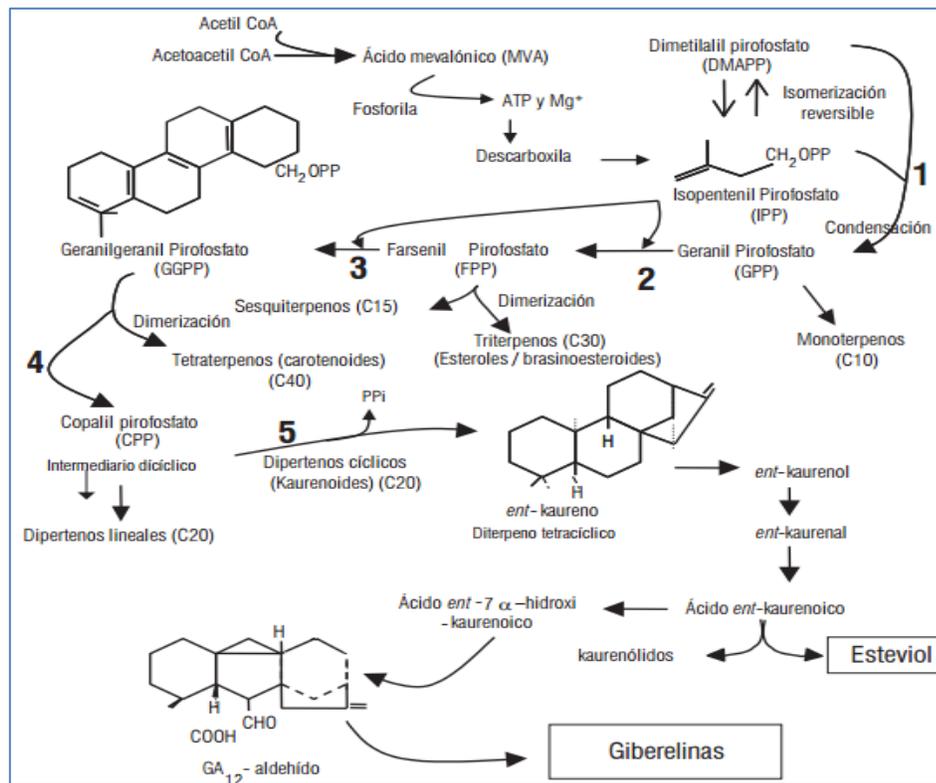


Figura 5. Enzimas que intervienen en el alargamiento de la cadena terpénica en la ruta de síntesis del esteviol: 1. GPP-sintasa; 2. FPP-sintasa; 3. GGPP-sintasa; 4. CPP-sintasa; 5. Kaureno sintetasa. (Jarma et. al 2010).

La función o propósito de la síntesis de estos compuestos aún no está definida, sin embargo su alta concentración en la hoja así como la conservación de la vía metabólica en todas sus especies y variedades puede ser indicador de ventaja durante su proceso evolutivo. Algunas teorías son que estos compuestos pueden actuar para rechazar ciertos insectos o para controlar los niveles de ácido giberélico (Jarma et. al., 2005).

II.5.- Técnicas de extracción y análisis de estevioglucósidos de Stevia.

La industria alimentaria utiliza tradicionalmente azúcar como agente edulcorante. Sin embargo, la creciente demanda de otros edulcorantes

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

como respuesta a las preferencias del consumidor debe cumplir con los requisitos relativos a la naturaleza no tóxica, las características de sabor similar al azúcar, bajo valor calórico, el calor y la estabilidad del pH (Afandi et. al., 2013).

Los compuestos dulces (glucósidos de esteviol) propios de las hojas de *Stevia rebaudiana*, se extraen con agua caliente o alcoholes. En algunos casos, las hojas se tratan previamente con disolventes no polares, tales como cloroformo o hexano para eliminar los aceites esenciales, lípidos, clorofila y otras sustancias no polares. El extracto se aclara mediante precipitación con soluciones salinas o alcalinas, luego se concentra y se disuelve de nuevo en metanol para la cristalización de los glucósidos. Los cristales que se logran formar mediante esta técnica están constituidos casi por esteviósido puro (Afandi et. al., 2013).

En muchos casos, es difícil encontrar condiciones experimentales adecuadas para una tarea de separación dada. Algunos estudios, como el de Afandi (2013) pretenden encontrar las condiciones óptimas de extracción de rebaudiósidos y esteviósidos a partir de las hojas de la *Stevia rebaudiana* para optimizar el rendimiento de ambos compuestos.

Diferentes técnicas de análisis han sido reportadas para la determinación de los glucósidos de esteviol en *S. rebaudiana*. Estos incluyen, extracción por soxhlet, electroforesis capilar LC/espectrometría de masas, espectrometría de ionización por electro pulverización de masas (ESI-MS), espectroscopia infrarroja, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC) entre otros. Sin embargo, uno de los métodos más simples y más fiables es la HPLC y por lo tanto en 2010, el comité de Expertos FAO/OMS de la 73ª reunión sobre

Aditivos Alimentarios (JECFA) recomienda un método de HPLC para la determinación de glucósidos de esteviol (JECFA, 2010).

II. 5.1.- Extracción de compuestos por Soxhlet:

El químico agrícola alemán, Franz Ritter von Soxhlet en 1879 documenta por primera vez en un experimento referente a la determinación de la grasa en la leche, la propuesta del extractor Soxhlet es el uso de sifón a nivel constante para devolver el extracto a un matraz con disolvente después de la finalización de un ciclo determinado de extracción; Soxhlet se atribuye el invento (actualmente muy conocido) por señalar que tanto la optimización de las dimensiones del extractor y las condiciones adecuadas para su uso fueron el resultado de sus propios estudios de laboratorio (Jensen, 2007).

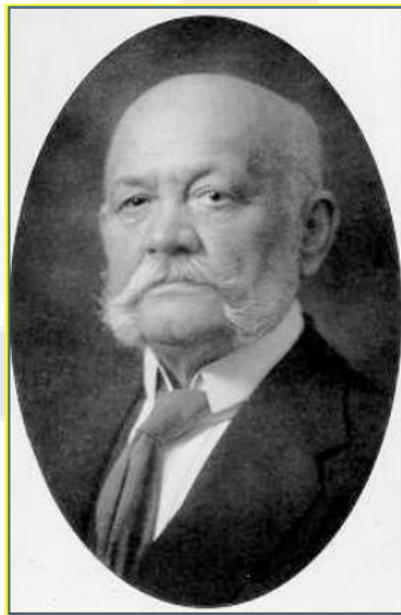


Figura 6. Franz Ritter von Soxhlet (Jensen, 2007).

La extracción sólido-líquido es muy antigua, a mediados del siglo XIX se describieron diversas versiones de éste proceso (maceración, infusión,

decocción, lixiviación y el desplazamiento), cuyos dos últimas fases descritas en 1849 por Morfit, son el embalaje de la materia orgánica extraída en un percolador, que se llena con un disolvente caliente que se deja percolar lentamente a través de la materia orgánica y una abertura en la parte inferior para el drenaje cuyo producto se colecta en un recipiente. El proceso se repite varias y por último los disolventes se evaporan para recuperar la materia extraída. Soxhlet automatizó y optimizó el proceso para realizar determinaciones cuantitativas y es caracterizado como un extractor por lotes automatizado, ya que el extracto drena sólo después de que ha alcanzado el volumen crítico determinado por la altura del sifón, así su aparato llegó a dominar las prácticas de laboratorio (Jensen, 2007).

II. 5. 2.-Etapas de extracción Soxhlet:

La extracción consiste en algunas etapas para montar el sistema, la primera de ellas consiste en la preparación de la muestra, ésta por lo general debe estar fragmentada en y el tamaño de la misma dependerá del resultado que quiera lograrse o del material con el cuál se está trabajando; una vez lista la muestra, esta se carga en un cartucho de extracción (recipiente cilíndrico con base semiesférica), hecho por lo general de algodón prensado o porcelana. La cantidad de muestra lo condiciona el tamaño del cartucho; una vez cargado el material, se debe colocar un tapón, hecho con una torunda de algodón, en ocasiones envuelta en una gasa. En cuanto al solvente se debe cuidar que el volumen sea suficiente para que al ascender al cartucho y antes de que se haga la sifonada, el matraz no quede seco ya que la muestra puede secarse o quemarse, o si cae el líquido de la sifonada sobre el vidrio caliente se puede producir una explosión y provocar un accidente. Todo proceso de extracción requiere ser estandarizado y utilizar distintas

combinaciones de solventes para lograr un buen resultado. Conviene conocer el tipo de sustancias que se pueden utilizar, así como la temperatura máxima y mínima de ebullición en la que el equipo funciona adecuadamente (Tabla 3). Para el calentamiento lo más común son los calentadores eléctricos múltiples, que además poseen reóstatos para variar el tiempo en el que las resistencias están encendidas (figura 7), además el equipo requiere de un sistema o mecanismo de refrigeración que consiste en una serie de conexiones de manguera por donde pasa agua directa de la toma de agua a través de refrigerantes y que debe al final debe tener un desagüe. El flujo de agua debe regularse para utilizar solamente lo necesario, dado que el consumo es muy alto, particularmente en el caso de que se use agua potable (Núñez, 2008).



Fig.7. Ensamble de equipo de extracción soxhlet para muestras *S. rebaudiana* Universidad Autónoma de Aguascalientes

| Solvente | °C |
|------------------|-------|
| Éter | 35 |
| Dicloro-metano | 40 |
| Éter de petróleo | 35-50 |
| Cloroformo | 62 |
| Metanol | 65 |
| Etanol-benceno | 65 |
| Hexano | 69 |
| Etanol tolueno | 73 |
| Acetato de etilo | 77 |
| Etanol | 78 |
| Benceno | 80 |
| Ciclohexano | 81 |
| Acido fórmico | 101 |
| Dioxano | 102 |
| Tolueno | 111 |

Tabla 3. Puntos de ebullición de solventes °C (Núñez, 2008).

Instalado el equipo y comenzado el proceso, las sifonadas se producen a intervalos regulares, los tiempos comunes de sifonado están entre 5 y 20 minutos, según la potencia del calentador, el solvente, la temperatura externa, etc. el número se determinará por el equipo de personas que esté realizando la extracción. Al terminar el proceso de extracción se deja enfriar el sistema, frenar el flujo de agua, desarmar el equipo, extraer el cartucho que está saturado de solvente, y dejarlo secar. El equipo se deberá enjuagar para ser utilizado en ocasiones posteriores (Núñez, 2008).

II.5.2.1 Generalidades de extracción Soxhlet en Stevia

Las condiciones para una determinada tarea de separación dependerán de lo que se busque obtener en los resultados, por ejemplo, si nos referimos a un proceso de separación que busca obtener un extracto a nivel industrial para su comercialización, el uso de disolventes como metanol aumentan la eficacia de la extracción y la separación de los esteviósidos, sin embargo es la razón por la cual la FDA (Food and Drug Administration) no califica a los extractos de Stevia como productos naturales y seguros.

Por otra parte si dentro del estudio se buscan las condiciones óptimas para extraer rebaudiósido A y esteviósido a partir de diversas muestras de Stevia rebaudiana, con el fin de explorar un proceso adecuado para optimizar la cuantificación de los mismos, el uso de estos disolventes así como de técnicas de extracción como Soxhlet se vuelven importantes en el proceso, en estos casos, por lo general se utiliza cierto gramaje de polvo fino de la hoja seca para la extracción con diversos disolventes y a cierta temperatura usando un aparato Soxhlet durante un tiempo dependiente de la pureza que se desea en el extracto.

Los principales factores que afectan a la extracción de rebaudiósido A y de esteviósido por el método de Soxhlet son la relación de materiales (peso de las hojas pulverizadas: volumen del agente de extracción), donde el agente de extracción, por ejemplo, 100%, 75%, 50% de disolvente y el número de la extracción deben ser manipulados individualmente para determinar la condición óptima, así como la temperatura, el tiempo de extracción (Afandi, et. al., 2013).

Los mayores rendimientos de rebaudiósido A en extractos se obtienen empleando disolventes orgánicos polares que contiene un grupo hidroxilo como metanol, etanol y acetona acuosa; se obtienen rendimientos bajos cuando la extracción se realiza utilizando disolventes orgánicos no polares, tal como hexano y éter de petróleo. El análisis de los extractos de S. rebaudiana indica un gran rendimiento de rebaudiósido A cuando las extracciones se llevan a cabo utilizando metanol y etanol como disolventes en comparación con agua (Afandi, et. al., 2013).

| Solvente | * PI ¹⁰ | Rendimiento de Reb A en extracto. | |
|------------------|--------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| | | Muestra stevia variedad ms007 | Muestra stevia variedad ms012 |
| Hexano | 0.1 | 0.007 | - |
| Éter de petróleo | 0.1 | 0.003 | - |
| Acetona 100% | 5.4 | 1.22 | 1.20 |
| Acetona 70% | 6.5 | 1.4 | 1.35 |
| Etanol absoluto | 5.2 | 1.81 | 1.72 |
| Etanol 75% | 6.2 | 1.53 | 1.46 |
| Etanol 50% | 7.1 | 1.20 | 1.11 |
| Metanol absoluto | 6.6 | 1.84 | 1.72 |
| El metanol 75% | 7.2 | 1.70 | 1.59 |
| El metanol 50% | 7.8 | 1.42 | 1.35 |
| Agua | 9.0 | 0.16 | 0.10 |

* PI = índice de polaridad (-) = no hay cristales formados

Tabla 4. Efecto de la polaridad del disolvente sobre el rendimiento en extracto de rebaudiósido A (hojas g / 100 g secos) a partir de 2 muestras de hojas secas de Stevia (Afandi, et. al., 2013).

Es importante destacar que en cada experimento las condiciones varían, pero en general, en cuanto al efecto de la relación de material en la extracción de rebaudiósido A y esteviósido, el contenido más alto se encuentra en una relación de 1:10 ya que cuando la relación de material alcanza un cierto nivel, el extracto puede estar disuelto en la solución, además existe un aumento gradual de concentración de rebaudiósido A y esteviósido dependiente del número de extracciones, siendo la óptima 4 veces, refiriéndose esto al número de vueltas o sifones durante el proceso (Afandi, et. al., 2013).

II.5.3.- Separación y análisis de compuestos por cromatografía

La cromatografía puede definirse como una técnica que separa una mezcla de solutos basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida.

Según la forma de llevar a cabo la separación cromatográfica, es decir, según el dispositivo utilizado para conseguir el contacto entre la fase móvil y la estacionaria, cabe distinguir dos grandes tipos de técnicas de cromatográficas: a) Cromatografía en columna b) Cromatografía en placa (Varcárcel y Gómez, 1994).

II. 5. 3.1 Cromatografía en capa fina

El avance esencial de TLC, tanto como un método de separación analítica y en el establecimiento de su nombre, fue el logro de Stahl (1924-1986). De 1955 en adelante se estandarizó definitivamente la técnica de separación y se introdujo como un análisis de rutina. Stahl utilizó placas de vidrio de 20 por 20 cm cubiertas con diferentes compuestos y publicó su manual de 1962. Las siguientes mejoras se hicieron a principios de la década de 1970 por Kaiser en el Instituto de cromatografía en Alemania. Preparó placas de gel de sílice sin un aglutinante usando partículas de sílice de un tamaño pequeño (5 mm) con una estrecha distribución de tamaños. El tiempo de separación se reduce de manera decisiva de horas a minutos, mejorando al mismo tiempo la resolución. Esto llevó a la 1977 publicación del libro de Kaiser HPTLC - alto rendimiento cromatografía en capa fina, lo que facilitó la adopción de esta técnica mejorada. A mediados de los años 1970, Halpaap (Alemania) inventó la cromatografía en capa fina llamada de alto rendimiento (HPTLC) en placas de gel de sílice de 10 por 10 cm, estos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

avances han tenido mejoras continuas que permiten realizar esta técnica de identificación de manera muy frecuente en los laboratorios (Spangenberg et. al., 2010).

En este tipo de análisis, una cantidad de muestra definida se inyecta en una fase móvil que fluye. La mezcla de la muestra y la fase móvil a migran, y si las condiciones están dispuestos de tal manera que la tasa de migración de los componentes de la muestra es diferente, entonces se obtiene una separación (Spangenberg et. al., 2010).

Para separaciones planas como TLC (thin layer chromatography), diferentes muestras se aplican generalmente a la fase estacionaria antes de ponerse en contacto con una fase móvil, que comienza a migrar a través de una placa en una dirección definida. El movimiento de la fase móvil a través de la fase estacionaria se conoce como la etapa de revelado. Después del desarrollo de la fase móvil se elimina por evaporación y la detección se realiza en la fase estacionaria. El registro de la respuesta del detector representada frente a la distancia de separación se denomina densitograma. Las separaciones por cromatografía plana se producen en paralelo, esta situación tiene ventajas y desventajas: un proceso secuencial como cromatografía en columna facilita la automatización en el que un protocolo fijo se emplea comúnmente para un lote de muestras. Las cromatografías planas son más flexibles pero no fácilmente automatizadas y la secuencia de pasos manuales de uso común hace que la validación del método más difícil (Spangenberg et. al., 2010).

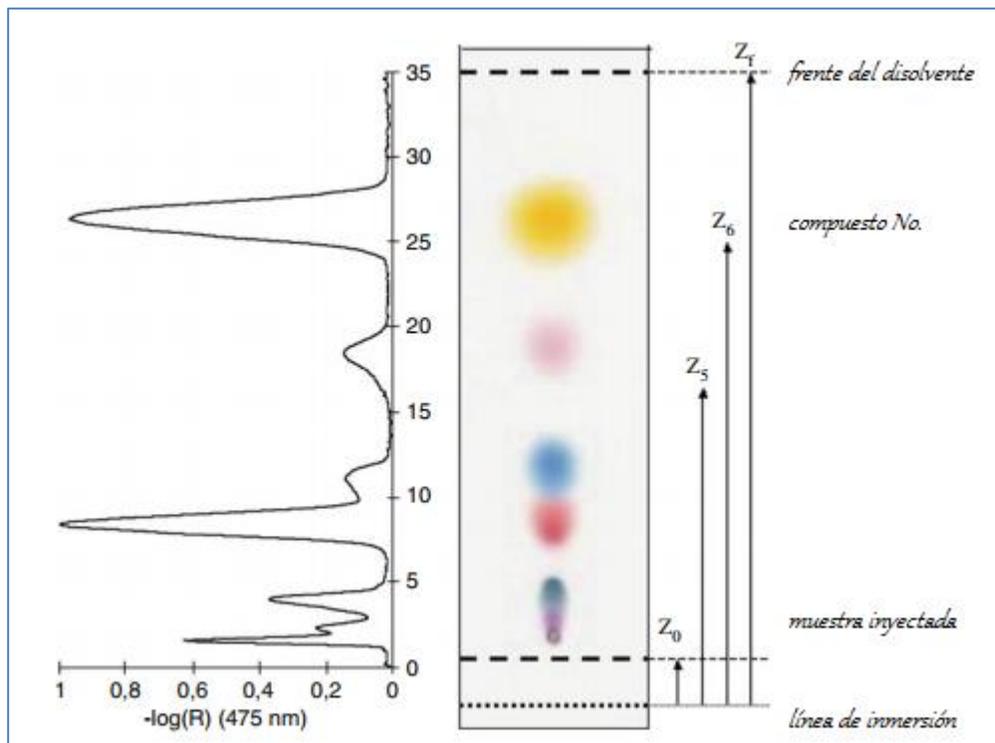


Figura 8. Separación de seis colorantes (CAMAG mezcla III, no. 032.8003), con el densitograma relevante, en una placa de SiO₂, desarrollado con tolueno. Con el aumento de los valores de R_f: Ciba F-II (violeta), indofenol (azul índigo), rojo ariabel (rojo), sudán azul II (azul), Sudán IV (rojo escarlata) y (6) de N, N-dimetilaminobenceno (amarillo) (Spangenberg et. al., 2010).

II.5.3.2 Análisis semicuantitativo de estevioglucósidos por medio de cromatografía en capa fina

Para la identificación y análisis semicuantitativo de los compuestos rebaudiósido A y esteviósido, de la planta *Stevia rebaudiana*, se realiza una cromatografía en capa fina, que consiste en una serie de inyecciones de extracto crudo sobre una placa de Sílica gel en fase normal, cuya polaridad es mayor que la fase móvil (seleccionada así debido a la estructura de los glucósidos de la planta), junto con inyecciones de estándares purificados de dichos compuestos. Una vez revelada la placa mediante compuestos cromógenos se logran evidenciar y distinguir bandas, que al compararse con las bandas de los estándares nos indican

la presencia de las mismas estructuras en el extracto de las muestras inyectadas. Al analizar las bandas, una que aparece a la misma distancia del estándar de rebaudiósido A, otra a la distancia del estándar de esteviósido, u otras más a diferentes distancias, sugieren la presencia de otros glucósidos en la muestra. Según la intensidad de las bandas las muestras deberán presentar mayor concentración relativa de glucósidos (Vázquez, et. al., 2014).

II.5.4 Cromatografía líquida de alta resolución HPLC

Es una técnica de separación para compuestos que no son volátiles, en la cual se pueden hacer análisis en fase normal, fase reversa, intercambio iónico, exclusión y afinidad, además de permitirnos separar compuestos y hacer análisis cuantitativos en base a estándares. La sensibilidad de detección del HPLC no es muy grande ya que se pueden detectar mg/l, así que una de las limitaciones del método es que desarrollarlo o estandarizarlo es un proceso tardado, sin embargo para el tipo o preparaciones de las muestras no existen limitantes. HPLC es la técnica de separación más ampliamente utilizada ya que tiene una aplicación enorme en el análisis de sustancias de interés en para la industria alimentaria, farmacéutica, en campos de la ciencia de la biotecnología, de la agricultura, ganadería, química, biología, ramo automotriz, de obra civil, entre otros (Gomis, 2008).

II.5.4.1 Características en el uso de HPLC para análisis cuantitativos de estevioglucósidos

El HPLC consiste en una determinación analítica cuantitativa que presenta ciertas dificultades a la hora de tratar con glucósidos de

diterpeno ya que las estructuras químicas de los glucósidos son muy parecidas y a que los extractos acuosos de stevia presentan muchas impurezas. Existen abundantes trabajos documentados respecto a métodos de purificación de estos extractos y otros más sobre el análisis de estas muestras, siendo el HPLC el más utilizado. La cromatografía líquida de alta resolución o *high performance liquid chromatography* (HPLC) se trata de una cromatografía en columna utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y una columna cromatográfica (Lorenzo et al. 2014).

Existen dos tipos de cromatografía, inicialmente, la cromatografía de líquidos utilizaba fases estacionarias de elevada polaridad como agua, colocadas sobre partículas de sílice o alúmina, a este tipo de cromatografía se le conoce como "fase normal". En la cromatografía en fase inversa (o reversa), la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo, y la fase móvil es relativamente polar (como el agua, el metanol o el acetonitrilo) la cual, una vez amplificada y registrada, proporciona el cromatograma, donde en fase normal, eluye primero el componente menos polar, debido a que es el más soluble en la fase móvil el aumento de la polaridad de la misma, provoca una disminución del tiempo de elución. En fase reversa, aparecen primero los componentes más polares y un aumento de la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución (Gomis, 2008).

En TLC, la fase móvil se retira antes de la detección, por lo que no puede interferir con las mediciones. En principio, los procesos y las columnas cromatográficas plana representan diferentes métodos de separación, cada uno con sus propias fortalezas y debilidades. Mucha gente ve la

rivalidad inexistente entre el TLC y HPLC, pero ambos métodos se pueden aplicar en su caso, ya que se complementan entre sí (Gomis, 2008).

II. 6.- Alternativas para la producción de Stevia

En el cultivo de *S. rebaudiana* existen materiales criollos principalmente provenientes de Paraguay y Brasil; cuando las plantaciones se realizan provenientes de estos materiales, se tienen plantas que presentan diferencias morfológicas y fenológicas, por lo tanto existe variabilidad en el tamaño de la planta, longitud y ancho de hoja, así como época de floración y cosecha (Sivaram Y Mukundan, 2003; Madan, et. al., 2010).

El rendimiento de los compuestos edulcorantes depende del genotipo, del método de propagación de la planta y de las técnicas agronómicas empleadas. La planta se puede propagar naturalmente mediante esquejes y por semillas. En el primero de los casos, se corre el riesgo fitosanitario de propagar plantas contaminadas con enfermedades. En el caso de propagación por semillas, éstas presentan una baja viabilidad y un bajo porcentaje de germinación, entre el 10 y el 38 %. En este sentido, es indispensable desarrollar programas de selección de plantas con mejores características fenológicas y con un perfil químico deseable para satisfacer las necesidades de los productores (Oviedo et al., 2015).

Debido a las dificultades antes mencionadas, el cultivo de tejidos como herramienta biotecnológica es la única alternativa para la rápida propagación masiva de *Stevia rebaudiana*.

En un estudio llevado a cabo en 2003, sobre cultivo de tejidos para estevia, por Sivaram y Mukundan, segmentos nodales, apicales y explantes de hojas de *Stevia rebaudiana* mostraron que se pueden

generar brotes cuando se cultivan en medio Murashige y Skoog (MS) complementado con 6-benciladenina (BA; 8,87 μ M) y ácido indol-3-acético (5,71 μ M). En general existen pocos estudios sobre producción masiva *in vitro* de Stevia, y la mayor parte de estos marcan el interés por encontrar técnicas de producción *in vitro* de los compuestos comerciales más utilizados de la planta (esteviósidos y rebaudiósidos) o incremento del material vegetativo vía organogénesis, la Tabla 4, engloba una síntesis de los trabajos sobre la micropropagación y aclimatación con *S. rebaudiana* (Oviedo et al., 2015).

| EXPLANTES | ME D I O | REGULADORES DEL CRECIMIENTO* | SISTEMA | TASA DE MULTIPLICACIÓN (BROTOS POR EXPLANTE) | SUSTRATO DE ACLIMATACIÓN | SOBREVIVENCIA DE LA PLANTA (%) | REFERENCIA |
|------------------------------|----------|------------------------------|-------------------------|--|---------------------------------|--------------------------------|--|
| Segmento nodal y yema axilar | MS | BA, AIB, KIN, AIA | Frascos Gerber | 11 | Tierra, abono, arena | 82 | Das, et al., 2011 |
| Yema axilar | MS | BA, AIB, AIA, ANA | Tubos de ensayo | 21.6 | Tierra vermiculita | No reportado | Preethi et al., 2011 |
| Hoja cotiledonar | MS | BA, AIB, KIN, CCO | Tubos de ensayo | No reportado | Tierra, soilrite | 92.3 | Dey et al., 2013 |
| Segmento nodal | MS | BA, AIB, KIN, AIA, ANA | Frascos Gerber | 17.5 | Tierra, arena, vermiculita | 94.8 | Verma et al., 2011 |
| Segmento nodal | MS | BA, KIN, TDZ, AIA, ANA | Frascos Gerber | 9.48 | Tierra, peat moss®, vermiculita | 97.0 | Soliman, 2013 |
| Segmento nodal | MS | BA, AIB, AIA | Tubos de ensayo | 4.25 | Tierra, abono | 67.0 | Laribi et al, 2012 |
| Segmento nodal | MS | BA, AIB, KIN, AIA, NAA | Tubos de ensayo | 15.7 | Tierra | 65.8 | Thiyagarajan & Venkatachalam, 2012 |
| Segmento nodal y apicales | MS | BA, ANA | Frascos Gerber | 6 | Peat moss® agrolita® | 75.0 | Vargas Gutiérrez, 2012 |
| Segmentos nodales | MS | AG ₃ | RIT® y BIT® | 14.2 | No realizado | No realizado | Jiménez Quesada, 2011 |
| Segmentos nodales | MS | BA, KIN, AIB | Tubos de ensayo | 3.42 | Tierra, arena, peat moss® | 90 | Jitendra et al., 2012 |
| Segmentos nodales | MS | AIA, BA, KIN | Frascos Gerber | 2.68 | Turba | Mas de 80 | Vasquez Baxkajay et al., 2014 |
| Segmentos nodales | MS | BA, KIN, ANA | Tubos de Ensayo | 9.31 | Tierra, arena, vermicompost | 80 | Choticadac hanarong & Dheeranup attana, 2013 |
| Yema axilar y apical | MS | BA, KIN, ANA, AIA | Tubos de ensayo | 8.6 | Arena, tierra, turba | 90 | Ali et al., 2010 |
| Microtallos | MS | BA, Zeatin, ANA, AIA | Matraz | 8.9 | Turba, perlita | 90 | Shatnawi et al., 2011 |
| Brotos Apicales y segmentos | MS | Ba, KIN, IBA | Frascos Gerber, Matraz, | 9.56 | No reportado | Mas de 80 | Modi et al., 2012 |

| nodales | | | frasco de plástico | | | | |
|--|----|------------------------------|--------------------------------|------|--------------------|--------------|---------------------|
| Segmentos nodales | MS | BA, KIN, AIB | Frascos Gerber | 5.28 | Coco picado, arena | 80 | Autade et al., 2014 |
| Segmentos nodales | MS | BA, KIN, AIB, ANA | Tubo de ensayo, frascos gerber | 36.9 | Peat moss®, arena | 75 | Mohamed, 2011 |
| Segmentos nodales, brotes apicales y segmentos internodales | MS | BA, KIN, AIB, ANA, AG, 2-4-D | Tubos de ensayo y matraz | 3 | Tierra y arena | No reportado | Singh et al., 2013 |

BA: Bencil Adenina, AIB ácido 3-indolbutirico, KIN: Cinetina, CCO: Cloruro de Colocolina, AIA: ácido indolacético, TDZ Tidiázuron, AG: ácido giberelico, Zeatin: Zeatina, 2-4-D : 2-4 ácido diclofenoxiacético

Tabla 5. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni en diferentes sistemas, (Oviedo et al., 2015).

En esta revisión generada por Oviedo, se destaca la organogénesis como la principal vía de propagación, el tipo de explante más utilizado en las investigaciones publicadas son los segmentos nodales, el medio preferido para la siembra de explantes en la mayoría de las publicaciones revisadas, fue el semisólido en frascos tipo Gerber o en tubos de ensayo (Oviedo et al., 2015).

Las revisiones sobre la publicación de resultados de distintos sistemas de micropropagación proporcionan una gran ventaja en la realización de nuevas investigaciones donde se requiere generar material suficiente a través de estas técnicas para trabajar en el análisis y descubrimiento de nuevo conocimiento.

II.6.1 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos Vegetales es una técnica enfocada a introducir, establecer desarrollar y mantener una planta, desde su nivel celular o de forma completa bajo condiciones reguladas y controladas artificialmente.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Es una técnica sumamente útil, cuyas aplicaciones principales son la micropropagación, preservación de germoplasma, mejoramiento genético, biosíntesis de metabolitos (puede ser una valiosa alternativa para la obtención de metabolitos secundarios de interés) o incluso la obtención de plantas libres de patógenos, que se utilizan para la clonación, conservación o manipulación *in vitro* de cualquier material vegetal.

La base del cultivo de tejidos vegetales, se sustenta en la totipotencia, un principio que señala que “cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa”(Pérez, 1999).

II.6.2 Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales

Cualquier fragmento de tejido vegetal que contenga células vivas puede utilizarse como explante, pero cada uno tendrá respuestas y comportamientos distintos (Pérez et al., 1999).

El proceso también requiere un medio de cultivo, compuesto de sustancias esenciales (nutrientes minerales, la fuente de carbono y algunas vitaminas) y no esenciales (fitohormonas o reguladores de crecimiento vegetal), que se debe elegir y formular estudiando previamente las especificaciones de la planta con la que se trabajará y lo que se desea obtener como resultado del cultivo de la misma.

Otras condiciones como luz, fotoperiodo, temperatura y humedad también necesitan consideraciones y estudio previo pues influirán en la respuesta del explante, por último, de debe considerar la asepsia, es decir, la eliminación de cualquier contaminante para el próspero crecimiento y

desarrollo de un cultivo, por lo anterior tanto el material vegetal como el medio de cultivo deben esterilizarse (Pérez et al., 1999).

II.7 Enfoques de la demanda de producción de Stevia para el combate a problemáticas de salud.

El incremento de la prevalencia de obesidad se ha acelerado en las últimas 3 décadas y apenas hace algunos años la importancia que esta tiene en el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles ha sido reconocida y estudiada. Por otra parte la diabetes es un reto de salud global; estimaciones de la OMS indican que en 1995 había en el mundo 30 millones de personas con diabetes, hoy se estima que 347 millones de personas la padecen. La diabetes es considerada una emergencia de salud pública. Es una enfermedad crónica multifactorial que en sus primeras etapas no produce síntomas, por lo que su detección temprana en muchos casos es inadecuada; si la enfermedad no se trata de manera oportuna, se presentan problemas de salud graves y costosos tanto para el paciente como para los sistemas de salud (ENSANUT 2012).

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 señala que en las últimas décadas el número de personas que padecen diabetes en México se ha incrementado y figura entre las primeras causas de muerte en el país, señalando a 6.4 millones de adultos mexicanos con diabetes, es decir, 9.2% de los adultos en México han recibido ya un diagnóstico de diabetes (ENSANUT 2012).

Las cifras anteriores sobre estas enfermedades han movilizad la mirada hacia la demanda por productos bajos en carbohidratos y bajos en azúcar, con el plus de la búsqueda de alternativas "naturales", dicho

incremento tan acelerado ha visto en la stevia un potente candidato como alimento alternativo. La industria de la stevia es un mercado en expansión durante los últimos 20 años, países como Japón e Israel la utilizan desde hace más de 40 años y en la actualidad su nivel de consumo alcanza a más de la mitad de su población total. Egipto, Gran Bretaña, Arabia Saudita e Israel entre otros, son países que se han sumado a la demanda de endulzantes de origen natural. Ante esto, la atención se enfoca en el desarrollo de sistemas de producción altamente eficaces, por lo cual, herramientas biotecnológicas basadas en la micropropagación de la planta por cultivo de tejidos vegetales, representan una herramienta potencial para la propagación y mejoramiento de la planta (Millán et. al., 2012; Oviedo et al., 2015).

En México el 52 % de las empresas dedicadas al ramo biotecnológico en el sector agropecuario, utilizan tecnologías de cultivo de tejidos vegetales. (Oviedo et al., 2015). Aun cuando se han desarrollado algunos protocolos de micropropagación de plantas de *S. rebaudiana*, se necesita mayor investigación, ya que la naturaleza heterogénea de esta planta requiere establecer protocolos de regeneración *in vitro* para cada genotipo, como ha sido reconocido por varios autores (Mitra, et. al., 2007).

Actualmente la técnica más usada en este campo es la micro propagación, (propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales), cuyas mayores ventajas son: a) que no existe una variabilidad de carácter genético y por lo tanto las plantas producidas tienen un genotipo exclusivo o seleccionado por ser un sistema clonal b) se realiza en un laboratorio con un ambiente controlado e independiente de las condiciones climáticas (estaciones del año, sequías, heladas, altas temperaturas u otros factores ambientales). c) Sistema de obtención

ilimitado d) El tiempo y espacio requeridos son relativamente cortos. e) Las plantas que se obtienen están libres de bacterias, hongos y nemátodos fitopatógenos, y con técnicas más específicas se pueden liberar incluso de virus y viroides (Domínguez, et al., 2008).



III. JUSTIFICACIÓN

Por las ventajas que parece presentar la técnica de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* sobre la practica tradicional de siembra y cultivo en campo, se analizará la producción de los principales metabolitos secundarios de interés (esteviósido y Rebaudiósido A), en plantas de Stevia rebaudiana), obtenidas mediante ambas técnicas; dicho análisis y cuantificación nos brindará un comparativo para deducir cual es la práctica más conveniente en la producción de dicha planta.

IV.- HIPÓTESIS:

Las plantas cultivadas en campo producen compuestos edulcorantes conocidos como esteviolglucosidos y cada célula de esa planta contiene la información genética para producir dichos compuestos, Por lo tanto se espera que en plantas cultivadas *in vitro* y bajo ciertas condiciones, diferentes tejidos expresen y produzcan dichos compuestos.

V.- OBJETIVOS

V. 1 Objetivo general.

Realizar un análisis comparativo en la producción de esteviolglucósidos en diferentes tejidos de *S. rebaudiana* cultivados *in vitro*, en comparación con los producidos en campo.

V.2.- Objetivos específicos:

- Establecer las condiciones para la micropropagación de *S. rebaudiana*, como material de inicio del proyecto, para la producción de plantas y tratar de obtener tejido caloso
- Realizar análisis semicuantitativos de la producción de esteviósidos y rebaudosidos en diferentes tejidos cultivados *in vitro* y los producidos en plantas cultivadas en campo, utilizando técnicas de cromatografía en capa fina.
- Estandarizar una técnica cuantitativa en el laboratorio utilizando HPLC, para la determinación del contenido de esteviósidos y rebaudiósidos en los diferentes tejidos obtenidos *in vitro* y de diferentes variedades de la planta *S. rebaudiana*, cultivada en campo.

VI. METODOLOGÍA:

VI.1.- Obtención de material vegetal

Parte del material vegetal utilizado en este trabajo, fue proporcionado por la compañía "Stevia Maya" y consistió en muestras secas colectadas en diferentes épocas del año y de diferentes variedades, así como plantas vivas que se utilizaron para su propagación *in vitro* y obtención de tejido calloso, a partir de las cuales se realizaron los análisis de cuantificación de Rebaudiósido A y esteviósido. La empresa "Stevia Maya" proporcionó 2 lotes de muestras, cuyas variantes se refirieron principalmente a los tiempos de cosecha, así como al origen (campo/invernadero). Los lotes se describen en las tablas 5 y 6.

| # | Nombre | Variiedad Stevia Maya | Origen | Presentación | FECHA | OBSERVACIONES |
|----|-----------------------------|-----------------------|-------------------|--------------|---------|---|
| 1 | QRA1 | QRA1 | Vivero Aire Libre | HOJA SECA | 16-1-15 | Origen planta en tierra, secado a la sombra |
| 2 | MORITA 2 | Morita 2 | Invernadero | HOJA SECA | 16-1-15 | Planta en maceta secado a sombra |
| 3 | QRC | QRC | CAMPO | HOJA SECA | 16-1-15 | Origen planta en tierra secado sombra |
| 4 | QRD | QRD | Invernadero | HOJA SECA | 16-1-15 | Planta maceta secado sombra |
| 5 | QRE | QRE | Invernadero | HOJA SECA | 16-1-15 | Maceta, secado sombra |
| 6 | CRIOLLA | CRIOLLA | CAMPO | HOJA SECA | 16-1-15 | Tierra secado sombra |
| 7 | HOJA DE PRIMERA DE CAMPO | MORITA 95% | CAMPO | HOJA SECA | 22-1-15 | Almacén, producto para venta secado sombra |
| 8 | HOJA DE PRIMERA DE CAMPO | MEZCLA DE VARIEDADES | CAMPO | POLVO | 21-1-15 | Producto para venta muestra almacén |
| 9 | HOJA DE SEGUNDA DE CAMPO | MEZCLA DE VARIEDADES | CAMPO | HOJA SECA | 21-1-15 | Producto para venta muestra almacén |
| 10 | HOJA SECA DE SEGUNDA +TALLO | MEZCLA DE VARIEDADES | | HOJA SECA | 21-1-15 | Producto para venta muestra almacén |

Tabla 6. Muestras cultivadas en campo proporcionadas por la empresa "Stevia Maya" para su análisis (Lote 1, cosecha enero 2015)

| Nombre | Núm. Variedad Stevia Maya | Origen | Presentación | FECHA de Cosecha |
|--------|---------------------------|-------------|-------------------------|------------------|
| 11 | MORITA II | CAMPO | HOJA | 02-15 |
| 12 | MORITA II | CAMPO | HOJA | 04-15 |
| 13 | MORITA II | CAMPO | HOJA | 05-15 |
| 14 | MORITA II | CAMPO | HOJA | 06-15 |
| 15 | MORITA II | CAMPO | HOJA | 09-15 |
| 16 | SM5 | | HOJA | 08-15 |
| 17 | MORITA II | | HOJA MOLIDA CAMPECHE | 2014 |
| 18 | MORTIA II | | HOJA MOLIDA CAMPECHE | 2015 |
| 19 | MORITA II | | TALLO | 2015 |
| 20 | MORITA II | | TALLO | 2015 |
| 21 | MORITA II | INVERNADERO | HOJA | 09-15 |
| 22 | SM4 | INVERNADERO | HOJA | 09-15 |
| 23 | SM5 | INVERNADERO | HOJA | 0915 |
| 24 | CRIOLLA | CAMPO | HOJA | 09-15 |

TABLA 7. Muestras cultivadas en campo proporcionadas por la empresa "STEVIA MAYA" para su análisis (lote 2, cosecha febrero-septiembre 2015)

Otra parte del material vegetal fueron plantas de *Stevia* previamente identificadas, cuyo origen fue: Variedad *in vitro* cultivada en laboratorio de la UAA, planta completa de Invernadero procedente de Zacatecas y planta completa aclimatada en Calvillo, municipio de Aguascalientes proveniente de campo; estas fueron utilizadas para el cultivo de tejidos y la obtención de plántulas *in vitro*, así como para la generación de tejido calloso.

Para la segunda parte del material vegetal, proveniente de invernadero en Zacatecas y de campo en Calvillo, se comenzó con la selección de los mejores métodos de micropropagación basados en bibliografía específica para esta especie (Sairkar, et. al., 2009), cuyo objetivo fue la obtención de material suficiente para los análisis cuantitativos comparativos de los 2 tipos de muestras vegetales.

VI.2.- Esterilización del material vegetal

Se realizaron pruebas preliminares de esterilización superficial del material, para facilitar el establecimiento *in vitro* del cultivo.

El protocolo general de esterilización fue el siguiente:

1. Deshojar las ramas, las cuales contienen nodos, lavarlas con agua destilada esterilizada.
2. En los tratamientos en los que se indica, se desinfectaron las ramas con alcohol. Luego escurrirlos completamente.
3. Sumergir las ramas en una solución desinfectante de NaOCl. Mantener en agitación constante.
4. Enjuagar con agua destilada
5. A nivel de la cámara de flujo laminar nuevamente realizar un enjuague con agua destilada estéril.

Se probaron dos concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) y dos tiempos de exposición de los materiales a los procesos de desinfección, para un total de cuatro tratamientos sobre segmentos nodales de la planta. En el primer tratamiento, los segmentos nodales se sometieron a 1 lavado con hipoclorito de sodio a una concentración de 1.2% durante 10 minutos; en el segundo tratamiento los segmentos nodales se sometieron a 1 lavado con hipoclorito de sodio a una concentración de 1.2% durante 15 minutos; el tercer tratamiento consistió de 2 lavados con etanol al 70% más una exposición a NaOCl al 1.6% durante 10 minutos, el tratamiento número 4 consistió de 2 lavados más etanol al 70% y una exposición final de NaOCl al 1.6% durante 15 minutos de los segmentos nodales seleccionados previamente.

VI.3 – Cultivo de tejidos vegetales

Para la micropropagación *in vitro* de las plantas y la obtención de tejido calloso, se utilizó el medio de Murashige y Skoog (MS), adicionado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal, específicamente: bencil adenina y de tiazurón, los cuales se definieron con base en ensayos estudiados en fuentes bibliográficas (Sairkar, et. al., 2009), y con ensayos propios realizados en la Universidad Autónoma de Aguascalientes, donde se usaron distintas concentraciones de los mismos. Se realizó el cultivo de tejidos *in vitro* de las plantas para tener material suficiente generando plántulas y tejido calloso. Posteriormente, se evaluó el porcentaje de explantes que formaron brotes adventicios y el número de brotes por explante.

También se establecieron las condiciones experimentales para inducir la formación de callo en explantes nodales *S. rebaudiana* para su posterior análisis.

Se utilizaron segmentos nodales de plantas de *S. rebaudiana* de variedades SM5, SM4 y Morita II, provenientes de la empresa “Stevia Maya”, además de ejemplares provenientes de campo en Calvillo, municipio de Aguascalientes, y otro ejemplar proveniente de un invernadero en Zacatecas, todos estos fueron sembrados en medio MS suplementado con dos concentraciones de BA y de TDZ 1mg/L y 2.0 mg/L. Los cultivos fueron incubados bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad y en temperatura continua promedio de 25°C + 2°C.

VI.4.-Extracción de compuestos de Stevia

Una parte del material original así como de las muestras obtenidas por cultivo de tejidos *in vitro*, se utilizaron para el análisis semicuantitativo, cuya primera etapa consistió en la extracción de los compuestos de la planta; para ello se utilizaron muestras de hojas y tallo de distintas variedades de *S. rebaudiana* secas.

Las muestras cultivadas *in vitro* tanto de tejido calloso, como de hoja fresca y tallo se deshidrataron en la estufa a 50°C durante 24 horas; una vez deshidratadas se machacaron en un mortero hasta obtener un polvo fino. Se pesaron 500mg. de cada muestra y se vaciaron en tubos de ensayo. La extracción de los compuestos se realizó añadiendo a cada tubo 2 ml de etanol 96%, las muestras se homogenizaron con una varilla de vidrio y posteriormente se sonicaron durante 15 minutos. El sobrenadante se pasó a tubos eppendorf y se procedió a centrifugar las muestras por 5 min a 1500 rpm a 4°C, la pastilla se desechó y el sobrenadante se utilizó para realizar análisis por cromatografía en capa fina en placa.

VI. 5.- Análisis semicuantitativo de esteviolglucósidos

Una vez obtenidos los extractos de las muestras, se realizaron las cromatografías en capa fina para el análisis semicuantitativo de las mismas. Para ello se utilizaron placas de 20 x 20 cm, la fase estacionaria, utilizada fue Sílica gel G-60, 0.25 mm de espesor. Se aplicaron cantidades variables de cada muestra de 6 hasta 20 microlitros en las distintas placas realizadas, con aplicaciones de 3 microlitros en cada vuelta, secando muy bien entre cada aplicación. Antes de colocar las muestras en la placa de Sílica Gel y con la finalidad de no dañar la placa y evitar perforarla con la manipulación de un lápiz, se procedió a calcular en número total de

muestras y marcar la distancia entre ellas en una hoja de papel, en ésta hoja se marcó una distancia de dos centímetros un uno de los extremos de la hoja que correspondió a la misma distancia desde donde corrieron las muestras de la placa, esto se realizó para evitar que la fase móvil tape los sitios donde se colocaron las muestras y evitar que las pudiera diluir, así como también se midió un pequeño espacio equivalente entre cada muestra con el fin de evitar que se mezclen. La hoja marcada se puso debajo de la placa para apreciar los sitios de aplicación de cada muestra, evitando así marcar la placa con lápiz y logrando una mejor precisión.

Las placas se introdujeron en la cámara cromatográfica, la cual contenía la fase móvil que consistió en una mezcla de solventes de diferente polaridad, basándose en tablas elutrópicas, en este caso la fase móvil fué acetona: acetato de etilo: agua, en una proporción 5:4:1. Para cada placa utilizada se prepararon 100 ml (50ml acetona, 40 ml acetato de etilo, 10 ml agua destilada).

Una vez preparada la fase móvil se aplicó a la orilla superior de la cámara cromatográfica una capa de vaselina y se puso una tapa para evitar la volatilización de los solventes; se dejaron las placas dentro de la cámara durante un promedio de hora y media, esto para que la fase móvil se desplazara a unos 2 centímetros antes de alcanzar el extremo superior de la placa, terminada la corrida las placas se secaron.

La detección de los compuestos en la cromatografía en capa fina, se realizó primero con un transiluminador de luz UV para observar con mayor precisión la separación de los compuestos obtenidos, luego se procedió con un revelado por rociado de compuestos cromógenos cuya solución reveladora se describe a continuación:

| 100 ml REACTIVO | |
|-----------------|-----------------------------|
| 0.5 ml | Anisaldehído |
| 10 ml | Ácido acético |
| 85 ml | Etanol |
| 5 ml | Ácido sulfúrico concentrado |

Tabla 8. Componentes del reactivo revelador utilizado para la placa.

La placa de 20 cm x 20 cm se roció con 20 ml de esta solución, con la ayuda de una bomba de vacío y una jeringa se bañó la placa uniformemente. Una vez bañada la placa se secó y se introdujo a un horno de secado a una temperatura de 105°C durante 3 a 5 minutos aproximadamente, para visualizar las marcas de compuestos que no se lograron observar con luz UV.

Los estándares utilizados de rebaudiósido A (01.432) y el esteviósido (S3572) se adquirieron de Sigma-Aldrich (EE.UU.) con una pureza de 96% y 98%, respectivamente (establecida por la fábrica); por último se determinaron los RF en las placas cromatográficas realizadas, para realizar dicho cálculo se midieron las distancias recorridas de la muestra desde su origen en centímetros y se dividieron entre distancia del eluyente desde su origen.

La distancia recorrida por el compuesto se midió desde el centro de la mancha, el máximo valor de RF que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un RF entre 0.3 y 0.7.

VI.6.- Análisis de concentración de compuestos de interés en cromatografía en capa fina

Para realizar una cuantificación de las concentraciones de glucósidos en las cromatografías en capa fina, se utilizó un software llamado JustTLC (nueva generación de software de análisis de TLC) con el cual se

realizaron mediciones exactas y adecuadas para un cribado de alto rendimiento.

Como punto de partida, todos los análisis de JustTLC se basan en placas digitalizadas (imágenes) ya sean en fotografía o con una imagen escaneada de la placa; estas se añaden haciendo clic en el botón agregar, se selecciona la placa que se quiere analizar, una vez agregada la imagen se da clic en el botón Aceptar para completar la creación del proyecto.

En la vista de control "Análisis Plate" se pueden detectar y cuantificar los objetos y prepararlos, es decir, seleccionar completamente las manchas con diferentes comandos que contiene el programa. Una vez que se tienen identificados los espacios correctos, el programa arroja un análisis comparativo en gráficas donde determina una concentración promedio dependiendo del tamaño y de la intensidad de las manchas detectadas.

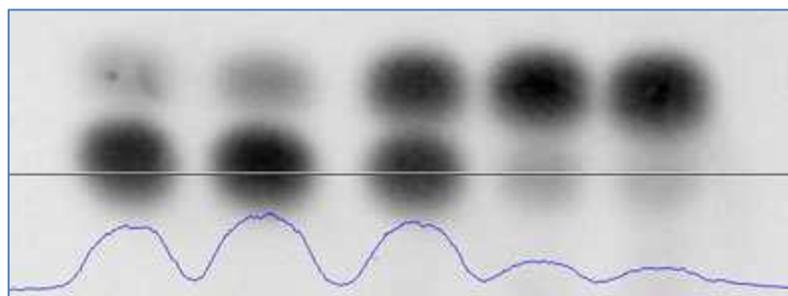


Figura 9. Vista de control Análisis Plate en software Just TLC. Es posible inspeccionar la imagen de la placa mediante el uso de un gráfico de intensidad. Se representa la intensidad inversa de una fila o columna en la imagen, donde lo más oscuro del píxel será el valor gráfico superior (viceversa en modo de color negativo).

VI.7.- Análisis cuantitativos de esteviolglucósidos

Para realizar la cuantificación de la producción total de los compuestos de interés (esteviósido y Rebaudiósido A) se utilizó un proceso de extracción distinto al realizado en la cromatografía en capa fina, cuyo objetivo fue purificar al máximo las muestras para poder obtener cromatogramas con resultados más claros. La técnica de extracción se describe a continuación: Se utilizaron muestras de hojas, tallo y tejido caloso de distintas variedades de *S. rebaudiana*, tanto las cultivadas en forma tradicional (campo), como las obtenidas *in vitro* durante el transcurso del trabajo de investigación, las muestras campo e *in vitro* tanto de tejido caloso, como de hoja fresca y tallo se deshidrataron en la estufa a 50°C durante 24 horas. Las muestras deshidratadas se machacaron en un mortero hasta obtener un polvo fino que se pesó para tener 1g de cada muestra, cada gramo se colocó en un cartucho de extracción Soxhlet tapado con algodón.

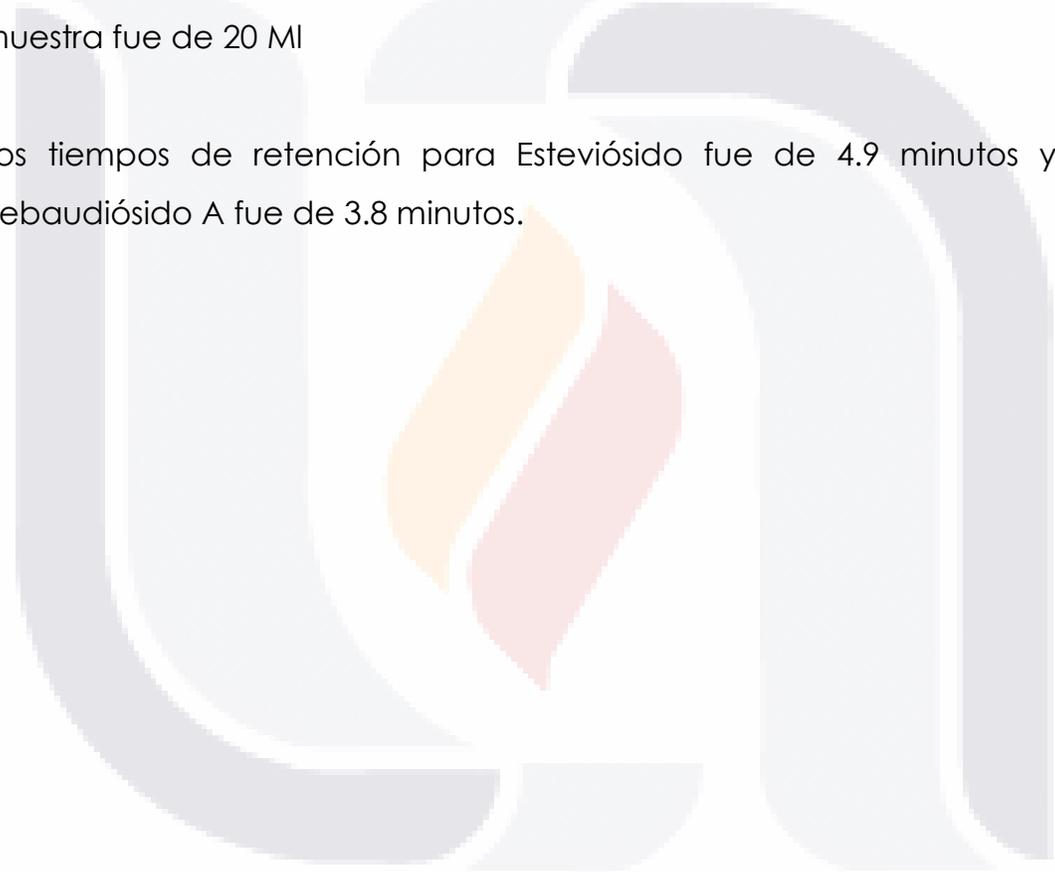
La extracción de los compuestos se realizó utilizando en primer lugar hexano, añadiendo 200 ml en un matraz, utilizando el Soxhlet durante un promedio de 2 horas por cada muestra, para posteriormente utilizar como solvente etanol por un promedio de 3 horas. Una vez realizados los lavados, se evaporó el solvente para obtener un promedio de 16 ml de cada una de las muestras. Se procedió a centrifugar las muestras por 5 min a 1500 rpm a 40°C, la pastilla se desechó y el sobrenadante se pasó a sus respectivos viales para ser inyectados y analizados en el equipo para HPLC.

La fase móvil para HPLC se preparó en una proporción 30:70 acetonitrilo/buffer fosfato de sodio 10 mM, con un pH 2.6, al cual se le añadió al final un total de 100 ml de etanol. Los componentes del buffer

fueron: ácido fosfórico 0.171 ml/L y fosfato de sodio 1.025 g/L, ambos disueltos en agua destilada aforados a un litro.

Se utilizó un equipo de HPLC Perkin Elmer series 200, con una columna de fase reversa C18, (longitud: 250 mm; diámetro interior: 4,6 mm, tamaño de partícula: 5 micras) DETECTOR-UV-VIS con arreglo de diodos a una longitud de onda de 210 nm con un flujo: 1 ml/min. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 μ l

Los tiempos de retención para Esteviósido fue de 4.9 minutos y para Rebaudiósido A fue de 3.8 minutos.



VII.-RESULTADOS

VII.1.- Material vegetal.

En las fig. 10 y 11 se muestran las plantas secas proporcionadas por la compañía Stevia Maya, trituradas en mortero y tamizadas, que se utilizaron para hacer los análisis de Esteviosio y Rebaudiósido A. En la fig. 12 se muestran los ejemplares provenientes de Calvillo, municipio del estado de Aguascalientes y de Zacatecas, los cuales se utilizaron para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

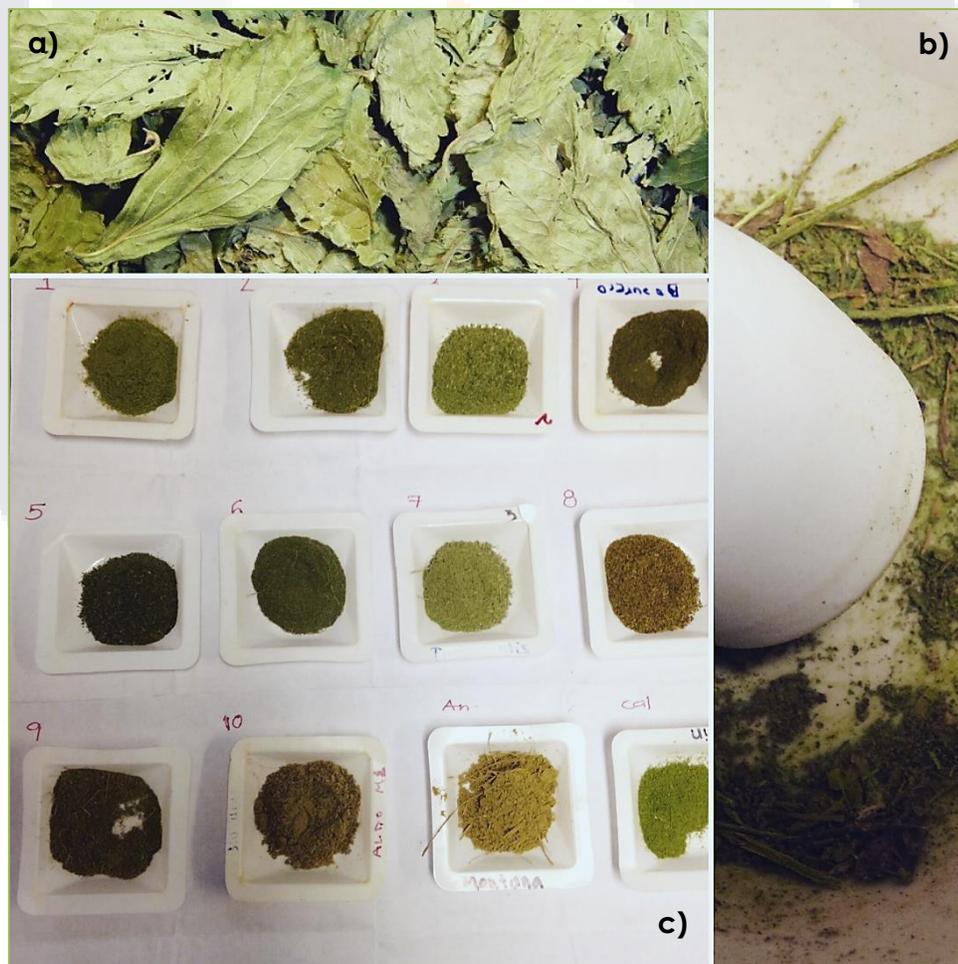


Fig 10. Lote 1 de muestras proporcionado por Stevia maya **a).**- muestra de hoja seca **b).**- proceso de pulverización **c).**- resultado final de tamizaje.

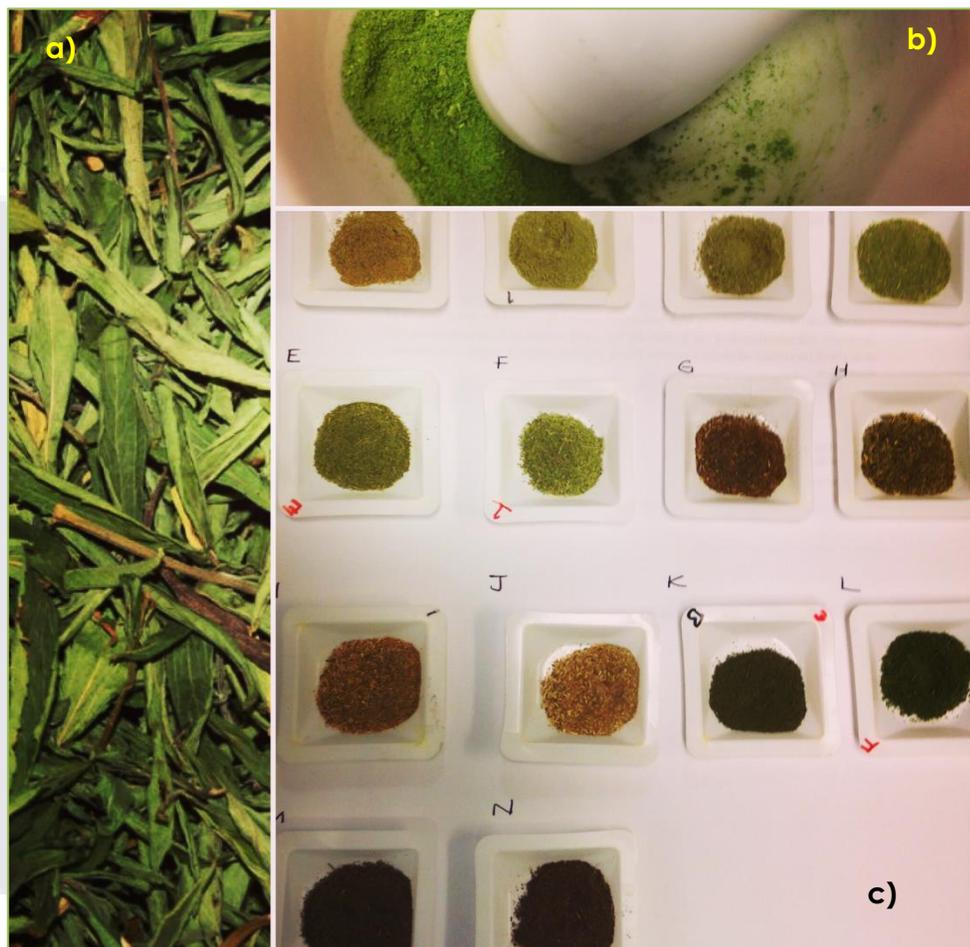


Fig 11. Lote 2 de muestras proporcionado por Stevia maya **a)**.- muestra de hoja seca **b)**.- proceso de pulverización **c)**.-resultado final de tamizaje.



Figura 12. Ejemplares utilizados para el cultivo de tejidos vegetales **a).**-Stevia de campo proveniente de Calvillo, Ags. **b)** Stevia proveniente de Zacatecas en invernadero.

VII.2 - Esterilización del material vegetal.

Los diferentes tratamientos realizados para la esterilización del material vegetal utilizado, se presentan en la tabla 8, la cual nos muestra que la menor contaminación (0%) se presentó tratando los explantes con un lavado de hipoclorito de sodio en concentración de 1.2% durante 15 minutos.

| Tratamiento | Número de explantes | No. de explantes contaminados | Porcentaje de contaminación |
|--|---------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| A: 1 lavado + cloralex 1.2% 10 minutos | 36 | 3 | 8.33% |
| B: 1 lavado + cloralex 1.2% 15 minutos | 36 | 0 | 0% |
| C: 2 lavados + etanol 70% +cloralex1.6% 10 minutos | 36 | 6 | 16.66 % |
| D: 2 lavados + etanol 70% + cloralex 1.6% 15 minutos | 36 | 9 | 25 % |

Tabla 9. Tratamientos de desinfección de material vegetal, numero de explantes contaminados y porcentajes finales de contaminación. La menor contaminación (0%) se presentó con la exposición de los explantes durante 15 min. a una solución de cloralex 1.2%.

VII.3.- Cultivo de tejidos vegetales

En las figuras 13 y 14 se muestran los resultados obtenidos en los cultivos de tejidos *in vitro* en diversos tratamientos de esterilización del material vegetal; la fig.13 muestra que con los tratamientos A, C y D hay crecimiento de hongos, en los frascos sembrados con estos tratamientos, a los tres días se observó un crecimiento bacteriano y/o fúngico alrededor de los segmentos nodales sembrados, con un tamaño que incluso duplicaba el explante, comenzando con un halo blanco, que después se tornó verde-marrón.

En contraste, la figura 14 muestra las plantas micro propagadas por cultivo *in vitro* libre de contaminantes (tratamiento de esterilización B) que se utilizaron para la obtención de tejido calloso y su posterior análisis de glucósidos.



Figura 13. Explantes de *S. rebaudiana* sembrada para su crecimiento con tratamiento A, C y D con presencia de contaminantes.



Figura 14. Frascos con explantes de *S. rebaudiana* sembrados para su crecimiento con tratamiento B.

VII.4 Formación de brotes y tejido calloso.

Los brotes se formaron a los 25 días de cultivo, obteniéndose hasta cinco por cada explante. La respuesta morfogénica a la presencia de TDZ fue la formación de brotes pero sobre todo de tejido calloso en los explantes nodales a lo largo de todo el tallo, principalmente en la superficie que se encontraba en contacto con el medio. No se aplicaron compuestos antioxidantes en el medio por lo cual fue evidente la oxidación de los explantes que generaron tejido calloso. El explante que favoreció una mayor producción de callo fueron los segmentos nodales de la planta.

La Citocinina BA empleada en distintas concentraciones de manera individual no generó formación de callo en explantes nodales y foliares de *S. Rebaudiana*, pero si generó formación de brotes.

En cuanto a las concentraciones utilizadas de reguladores de crecimiento vegetal, la tabla 9 expresa el porcentaje de explantes que generaron brotes así como el porcentaje de explantes que generaron tejido calloso, resultando el mejor tratamiento para inducción de brotes BA 1 mg L⁻¹ y el mejor tratamientos para inducción de tejido calloso TDZ 1 mg L⁻¹.

| TRATAMIENTO | Porcentaje de explantes que generaron brotes | Promedio de brotes generados por cada explante | Porcentaje de explantes necrosados | Porcentaje de explantes que generaron tejido calloso |
|-------------|--|--|------------------------------------|--|
| 2mg/L BA | 60% | 3 | 40% | 0% |
| 1mg/L BA | 90% | 5 | 10% | 0% |
| 2mg/L TZD | 40% | 2 | 10% | 50% |
| 1mg/L TDZ | 30% | 1 | 7% | 63% |

Tabla 10. Respuesta de los explantes de *S. rebaudiana* tratados con BA y TDZ a diferentes concentraciones. Mejor tratamiento para inducción de brotes BA 1 mg L⁻¹ y el mejor tratamientos para inducción de tejido calloso TDZ 1 mg L⁻¹

A partir de los anteriores resultados, se utilizaron las mejores concentraciones de reguladores de crecimiento a lo largo del proyecto de investigación, donde se buscó tener siempre el material suficiente para la obtención de las cantidades adecuadas de extractos de la planta para su posterior análisis semicuantitativo y cuantitativo.

VII.5.- Extractos de *Stevia* para cromatografía en capa fina en placa.

Los extractos de las muestras de la planta, se obtuvieron a través de dos metodologías (descritas en dicho apartado); la primera se utilizó para realizar análisis por cromatografía en capa fina en placa, donde con un lavado en etanol, se logro purificar cada muestra para que las inyecciones en la placa no generaran manchas o tuvieran residuos que alteraran el resultado.

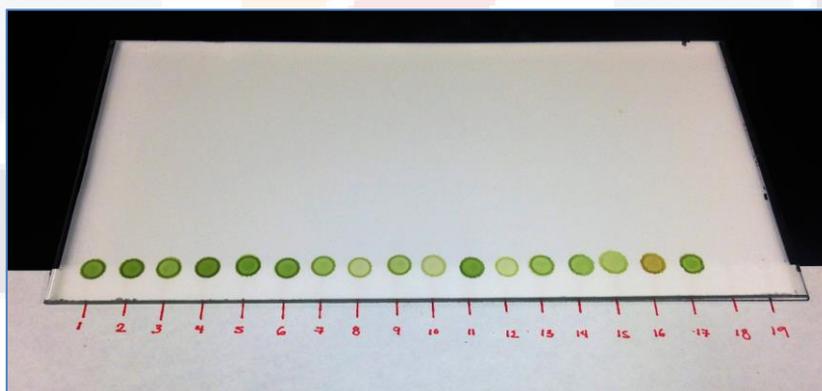


Figura 15. Placa de Sílica gel para cromatografía en capa fina, con muestras inyectadas bajo la metodología de lavado con etanol y centrifugación.

VII.6 Análisis semicuantitativos de esteviolglucósidos

Para el análisis semicuantitativo, las muestras proporcionadas por la empresa Stevia Maya fueron separadas; la tabla 10, describe exclusivamente todas las muestras de la variedad Morita II, debido a que la bibliografía la reporta como una variedad mejorada y se busca hacer una comprobación en las muestras proporcionadas por la compañía.

| # MUESTRA | Variedad Stevia Maya | Origen | Presentación | FECHA |
|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|----------|
| 11 | MORITA II | CAMPO | HOJA | 02-15 |
| 12 | MORITA II | CAMPO | HOJA | 04-15 |
| 13 | MORITA II | CAMPO | HOJA | 05-15 |
| 14 | MORITA II | CAMPO | HOJA | 06-15 |
| 15 | MORITA II | CAMPO | HOJA | 09-15 |
| 17 | MORITA II | | HOJA CAMPECHE | 2014 |
| 18 | MORTIA II | | HOJA CAMPECHE | 2015 |
| 19 | MORITA II | | TALLO | 2014 |
| 20 | MORITA II | | TALLO | 2015 |
| 21 | MORITA II | INVERNADER O | HOJA | 09-15 |
| 2 (primer lote) | MORITA II | INVERNADER O | HOJA SECA | 16-01-15 |
| 7(primer lote) | MORITA II 95% | CAMPO | HOJA SECA PRIMERA | 22-01-15 |

Tabla 11. Variedades Morita II "Stevia Maya"

Para el análisis semicuantitativo en las placas de Sílica gel utilizadas durante la cromatografía en capa fina, antes de ser reveladas, se observaron en el transiluminador de luz ultravioleta donde ciertas manchas se pueden apreciar.

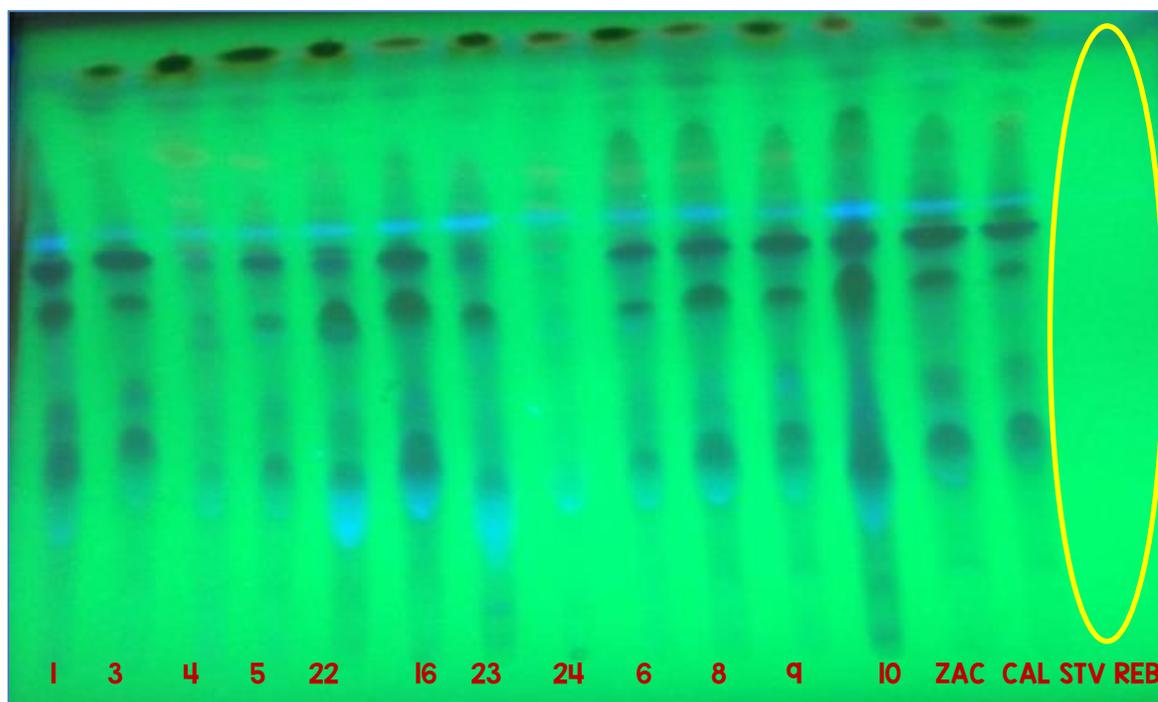


Figura 16. Placa de Sílica gel para cromatografía en capa fina, con muestras de la empresa “STEVIA MAYA”, vista en transiluminador UV. 1. Variedad QRA1 origen vivero aire libre hoja seca cosechada enero 2015 3. QRC origen campo hoja seca cosechada enero 2015 4. QRD origen invernadero hoja seca cosechada enero 2015. 5 QRE origen invernadero hoja seca cosechada enero 2015. 22 SM4 origen invernadero hoja seca cosechada septiembre 2015. 16 SM5 hoja, cosechada agosto 2015. 23 SM5 invernadero hoja cosechada septiembre 2015. 24 CRIOLLA origen campo hoja cosechada septiembre 2015, 6 CRIOLLA campo hoja cosechada enero 2015 8 HOJA DE PRIMERA DE CAMPO origen campo cosechada enero 2015. 9 HOJA DE SEGUNDA DE CAMPO campo hoja cosechada enero 2015. 10 HOJA SECA DE SEGUNDA MANCHADA + TALLO HOJA SECA cosechada enero 2015. ZAC Origen Zacatecas, invernadero hoja colectada junio 2015 CAL Origen campo Calvillo hoja colectada julio 2015 *STV: Mancha estándar Esteviósido*REB: Mancha estándar Rebaudiósido A. El aro amarillo muestra la ausencia de manchas en los carriles donde fueron aplicados los estándares de Rebaudiósido A y esteviósido.

En la fig. 17 se muestra un cromatograma obtenido en capa fina todas las muestras de la variedad “Morita II” que se mencionan en la tabla 10.

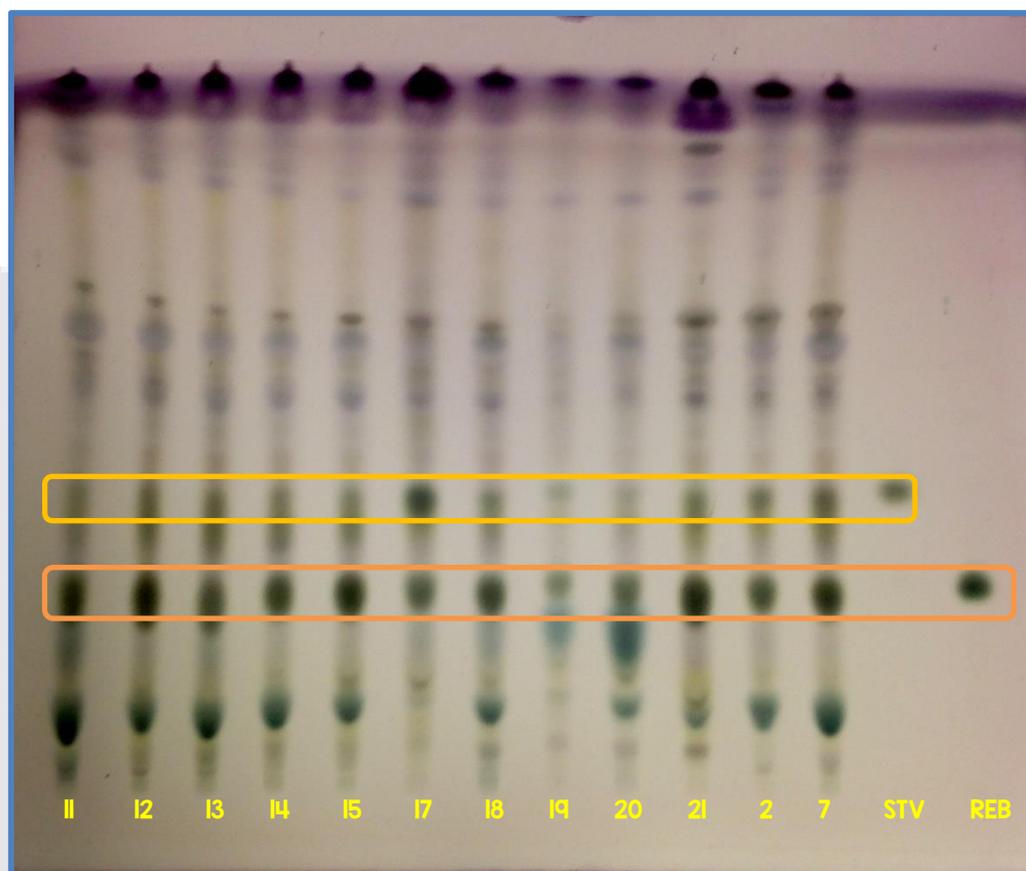


Figura 17. Placa de cromatografía en capa fina variedades de MORITA II para análisis semicuantitativo 11. Origen campo (SM), hoja cosechada febrero 2015 12. Origen campo (SM), hoja cosechada abril 2015 13 .Origen campo (SM), hoja cosechada mayo 2015 14. Origen campo (SM), hoja cosechada junio 2015 15. Origen campo (SM), hoja cosechada septiembre 2015 17. Hoja Campeche cosechada 2014 18. Hoja Campeche cosechada 2015 19. Tallo (SM) cosechado 2014 20. Tallo (SM) cosechado 2015 21. Invernadero (SM), hoja cosechada septiembre 2015 2. Invernadero (SM), hoja seca cosechada enero 2015 7. Origen campo (SM) Hoja seca, cosechada enero 2015 *SM (Campo de Stevia Maya Quintana Roo) *STV: Mancha estándar Esteviósido*REB: Mancha estándar Rebaudiósido A

En la Tabla 11, se muestran los R_F (Ratio of Front) de Esteviosido y Reb A que expresan la posición de un compuesto sobre la placa como una fracción decimal. El resultado del cálculo del R_f , es que para esteviosidos y Rebaudiósido A, se puede apreciar que al correr las muestras y analizar las posiciones de las manchas de los estándares, se trata de los mismos compuestos.

| #MANCHA | *ESTEVIÓSIDO (cm) | *REBAUDIÓSIDO A (cm) | **RF ESTEVIÓSIDO (cm) | **RF REBAUDIÓSIDO A (cm) |
|---------|----------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| 11 | 8 | 5.8 | 0.479041916 | 0.347305389 |
| 12 | 8.6 | 6.5 | 0.51497006 | 0.389221557 |
| 13 | 8.7 | 6.4 | 0.520958084 | 0.383233533 |
| 14 | 8.7 | 6.5 | 0.520958084 | 0.389221557 |
| 15 | 8.6 | 6.5 | 0.51497006 | 0.389221557 |
| 17 | 8.7 | 6.5 | 0.520958084 | 0.389221557 |
| 18 | 8.6 | 6.5 | 0.51497006 | 0.389221557 |
| 19 | 8.6 | 6.5 | 0.51497006 | 0.389221557 |
| 20 | 8.6 | 6.4 | 0.51497006 | 0.383233533 |
| 21 | 8.6 | 6.5 | 0.51497006 | 0.389221557 |
| 2 | 8.4 | 6.6 | 0.502994012 | 0.395209581 |
| 7 | 8.4 | 6.5 | 0.502994012 | 0.389221557 |
| STV | 8.7 | | 0.520958084 | 0 |
| REB | | 6.6 | 0 | 0.395209581 |

Tabla 12. Cálculos de R_F placa con muestras de variedad Morita II. Columna 1: Número de muestra. Columna 2: distancia de corrimiento de las manchas de esteviosido producto de cromatografía de los extractos de variedades de *S. rebaudiana*. Columna 3: distancia de corrimiento de las manchas de Rebaudiósido A producto de cromatografía de los extractos de variedades de *S. rebaudiana*. Columna 4: R_f esteviosidos. Columna 5: R_f Reb. Distancia fase móvil 16.7 cm

Después de la separación de las muestras de la variedad Morita II, el resto de las mismas consistió en otras variedades, nombradas y desarrolladas por la propia empresa como SM5, SM4, Criolla, etc., además de contemplar los ejemplares conseguidos en Calvillo y Zacatecas; en la tabla número 12, se presenta su descripción.

| # | Nombre | Origen | Presentación | FECHA |
|-----|---------------------------------------|-------------------|--------------|---------|
| 1 | QRA1 | Vivero Aire Libre | HOJA SECA | 16-1-15 |
| 3 | QRC | CAMPO | HOJA SECA | 16-1-15 |
| 4 | QRD | Invernadero | HOJA SECA | 16-1-15 |
| 5 | QRE | Invernadero | HOJA SECA | 16-1-15 |
| 22 | SM4 | INVERNADERO | HOJA SECA | 09-15 |
| 16 | SM5 | | HOJA | 08-15 |
| 23 | SM5 | INVERNADERO | HOJA | 09-15 |
| 24 | CRIOLLA | CAMPO | HOJA | 09-15 |
| 6 | CRIOLLA | CAMPO | HOJA | 16-1-15 |
| 8 | HOJA DE PRIMERA DE CAMPO | CAMPO | HOJA | 21-1-15 |
| 9 | HOJA DE SEGUNDA DE CAMPO | CAMPO | HOJA | 21-1-15 |
| 10 | HOJA SECA DE SEGUNDA MANCHADA + TALLO | | HOJA | 21-1-15 |
| ZAC | ZACATECAS | INVERNADERO | HOJA | 06-15 |
| CAL | CALVILLO | INVERNADERO | HOJA | 07-15 |

Tabla 13. Descripción del resto de las variedades proporcionadas por Stevia Maya

En la Fig. 18 se muestra un cromatograma de variedades diferentes a "Morita II", que corresponden a las mencionadas en la Tabla 12.

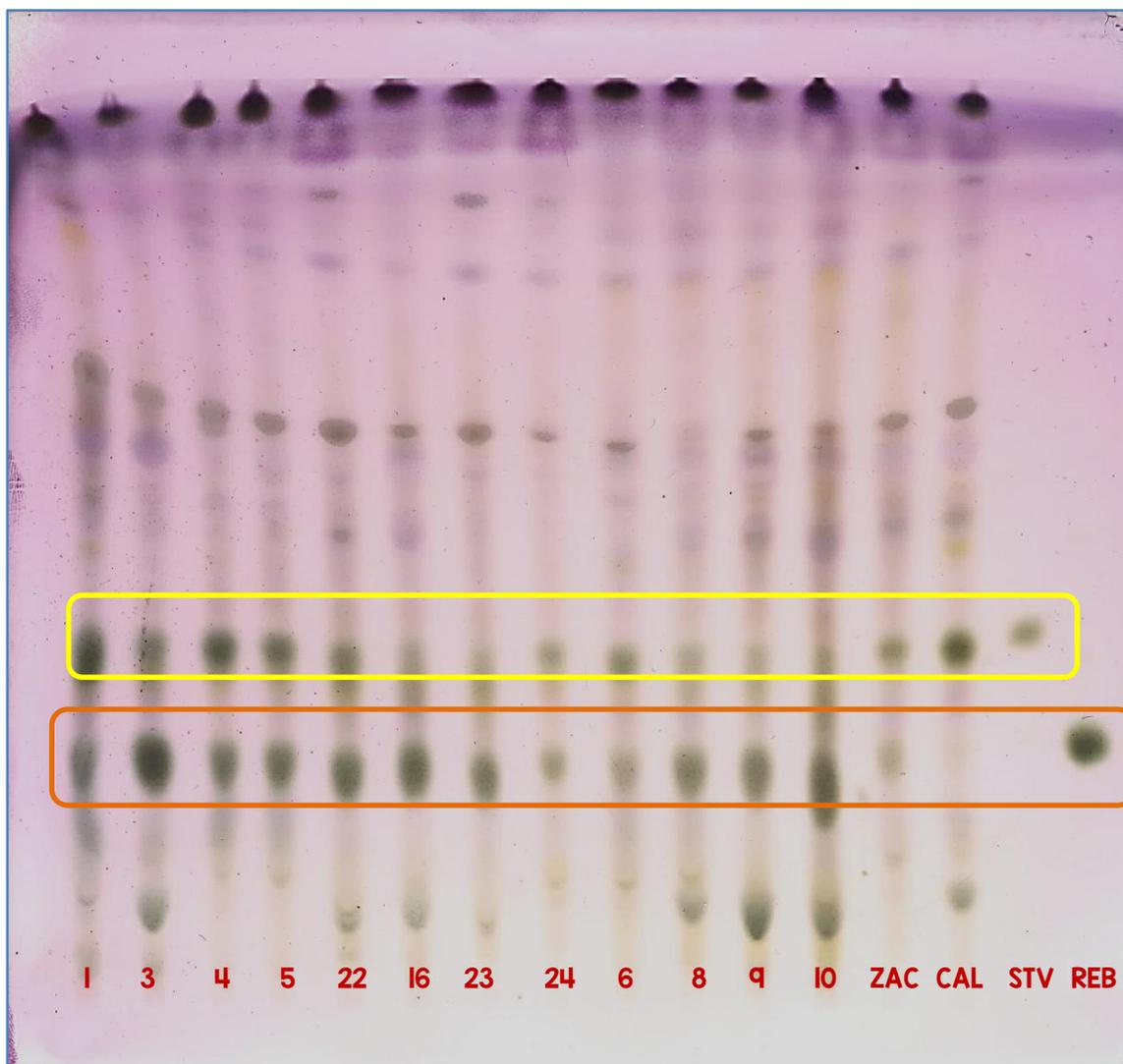


Figura 18. Placa de cromatografía en capa fina, variedades distintas a Morita II para análisis semicuantitativo 1. Variedad QRA1 origen vivero aire libre hoja seca cosechada enero 2015; 3.QRC origen campo hoja seca cosechada enero 2015; 4.QRD origen invernadero hoja seca cosechada enero 2015; 5.QRE origen invernadero hoja seca cosechada enero 2015; 22.SM4 origen invernadero hoja seca cosechada septiembre 2015; 6.SM5 hoja, cosechada agosto 2015; 23.SM5 invernadero hoja cosechada septiembre 2015; 24.CRIOLLA origen campo hoja cosechada septiembre 2015; 6.CRIOLLA campo hoja cosechada enero 2015; 8. HOJA DE PRIMERA DE CAMPO origen campo cosechada enero 2015; 9. HOJA DE SEGUNDA DE CAMPO campo hoja cosechada enero 2015; 10.HOJA SECA DE SEGUNDA MANCHADA + TALLO HOJA SECA cosechada enero 2015; ZAC Origen Zacatecas, invernadero hoja colectada junio 2015; CAL Origen campo Calvillo hoja colectada julio 2015; *STV: Mancha estándar Esteviósido*REB: Mancha estándar Rebaudiósido A.

La tabla 13, muestra los R_F (Ratio of Front) de Esteviosido y Reb A que se expresan en las variedades descritas en la tabla 12, es decir, las distintas a Morita II

| MANCHA | *ESTEVIÓSIDO A (cm) | *REBAUDIOSIDO A (cm) | RF ESTEVIÓSIDO (cm) | RF REBAUDIOSIDO A (cm) |
|-----------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| 1 | 8.7 | 6.5 | 0.502890173 | 0.375722543 |
| 3 | 8.7 | 6.5 | 0.502890173 | 0.375722543 |
| 4 | 8.7 | 6.5 | 0.502890173 | 0.375722543 |
| 5 | 8.7 | 6.5 | 0.502890173 | 0.375722543 |
| 22 | 8.6 | 6.5 | 0.497109827 | 0.375722543 |
| 16 | 8.6 | 6.5 | 0.497109827 | 0.375722543 |
| 23 | 8.6 | 6.4 | 0.497109827 | 0.369942197 |
| 24 | 8.6 | 6.4 | 0.497109827 | 0.369942197 |
| 6 | 8.5 | 6.4 | 0.49132948 | 0.369942197 |
| 8 | 8.5 | 6.4 | 0.49132948 | 0.369942197 |
| 9 | 8.5 | 6.4 | 0.49132948 | 0.369942197 |
| 10 | 8.5 | 6.5 | 0.49132948 | 0.375722543 |
| ZAC | 8.7 | 6.3 | 0.502890173 | 0.36416185 |
| CALVILLO | 8.7 | 0 | 0.502890173 | 0 |
| STV | 8.8 | 0 | 0.50867052 | 0 |
| REB | | 6.5 | 0 | 0.375722543 |

TABLA 14 RF Placavarietades alternas a Morita II. Distancia recorrida de la fase móvil: 17.3 cm.

La Fig. 19 muestra el cromatograma de la placa revelada donde fueron inyectadas muestras tanto de variedades cultivadas en campo, como de muestras de ejemplares *in vitro* así como de tejido caloso para llevar a cabo una comparación sobre la presencia y concentración de los compuestos de interés.

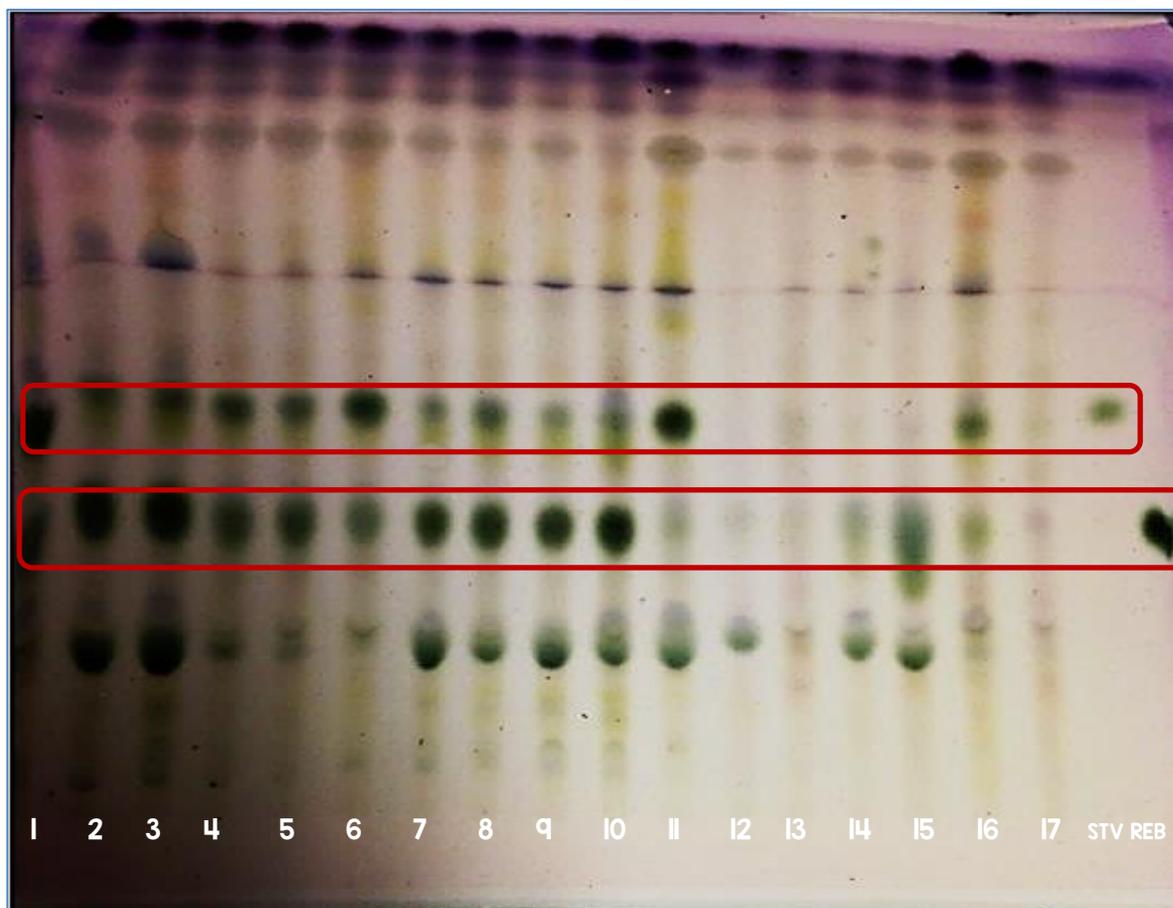


Figura 19. Cromatografía comparativa entre muestras de campo e invernadero y muestras obtenidas durante el cultivo de tejidos *in vitro* (callo y brotes) 1.-QRA1 vivero aire libre, hoja cosechada 16-1-15; 2 Morita II, invernadero hoja cosechada 16-1-15; 3 QRC campo hoja cosechada 16-1-15; 4 QRD invernadero hoja cosechada 16-1-15; 5 QRE invernadero hoja cosechada 16-1-15; 6 CRIOLLA campo hoja cosechada 16-1-15; 7 HOJA DE PRIMERA DE CAMPO campo hoja cosechada 22-1-15; 8 HOJA DE PRIMERA DE CAMPO campo trazas cosechada 21-1-15; 9 HOJA DE SEGUNDA DE CAMPO campo hoja cosechada 21-1-15; 10 HOJA SECA DE SEGUNDA MANCHADA + TALLO HOJA cosechada 21-1-15; 11 CALVILLO campo hoja 08-15; 12 CALVILLO *in vitro* stevia tdz callo 09-15; 13 SM5 *in vitro* hoja 09-15; 14 MORITA II *in vitro* con tdz brotes 09-15; 15 UAA *in vitro* ms brotes 08-15; 16 ZAC hoja+ tallo 07-15; 17 ZAC *in vitro* contaminada ba brotes 09-15 *STV: Mancha estándar Esteviósido *REB: Mancha estándar Rebaudiósido A

VII.7 Análisis de Esteviosido y Reb A, utilizando el Software JustTLC (SWEDAY)

En la fig. 20. Se muestra la imagen digitalizada de una misma placa, las áreas seleccionadas para el análisis son seleccionadas en el software, el cual dibuja un cuadro color azul alrededor de las muestras de interés. El software recibe la imagen digitalizada y realiza un análisis trazando automáticamente una marca alrededor de las manchas (contorno color rojo) que indican el pixelaje de cada mancha, haciendo una cuantificación de la concentración de la sustancia de interés de acuerdo a la intensidad de la mancha percibida por la computadora, para posteriormente arrojar gráficos respecto a área y volumen (Figura 21).

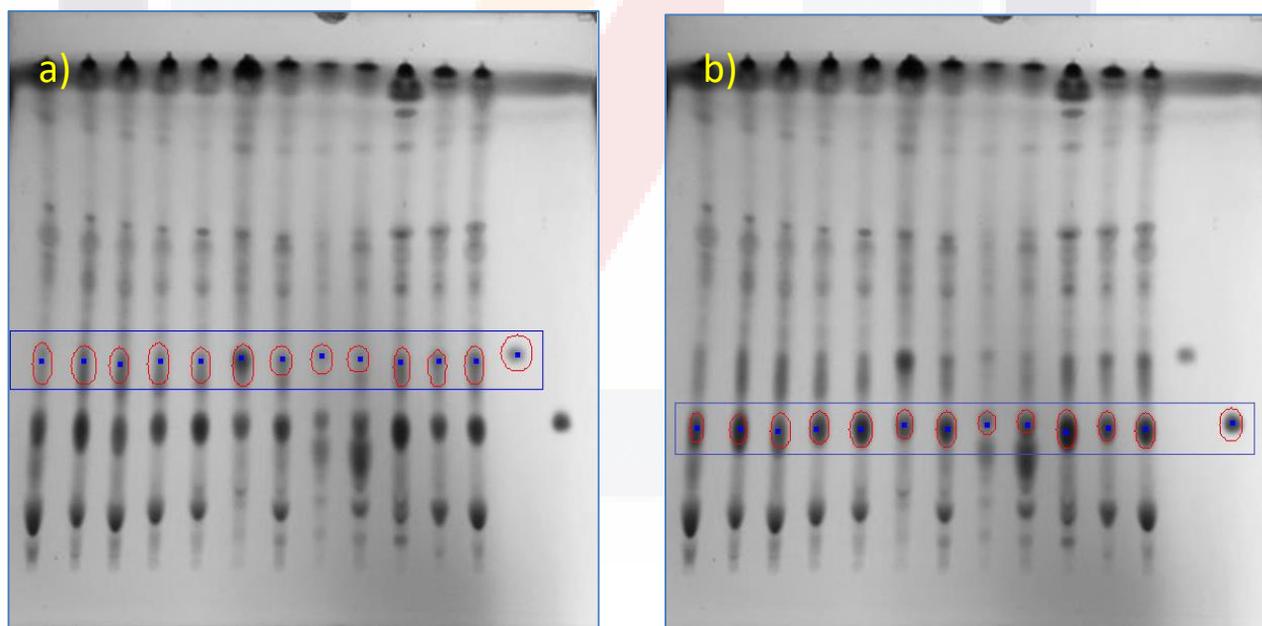


Figura 20. Placa de cromatografía variedades Morita II con áreas definidas y cuantificadas en el software Just TLC Sweday se muestras aros color rojo que el mismo software crea de **a).**- Esteviósidos **b).**- Rebaudiósido A

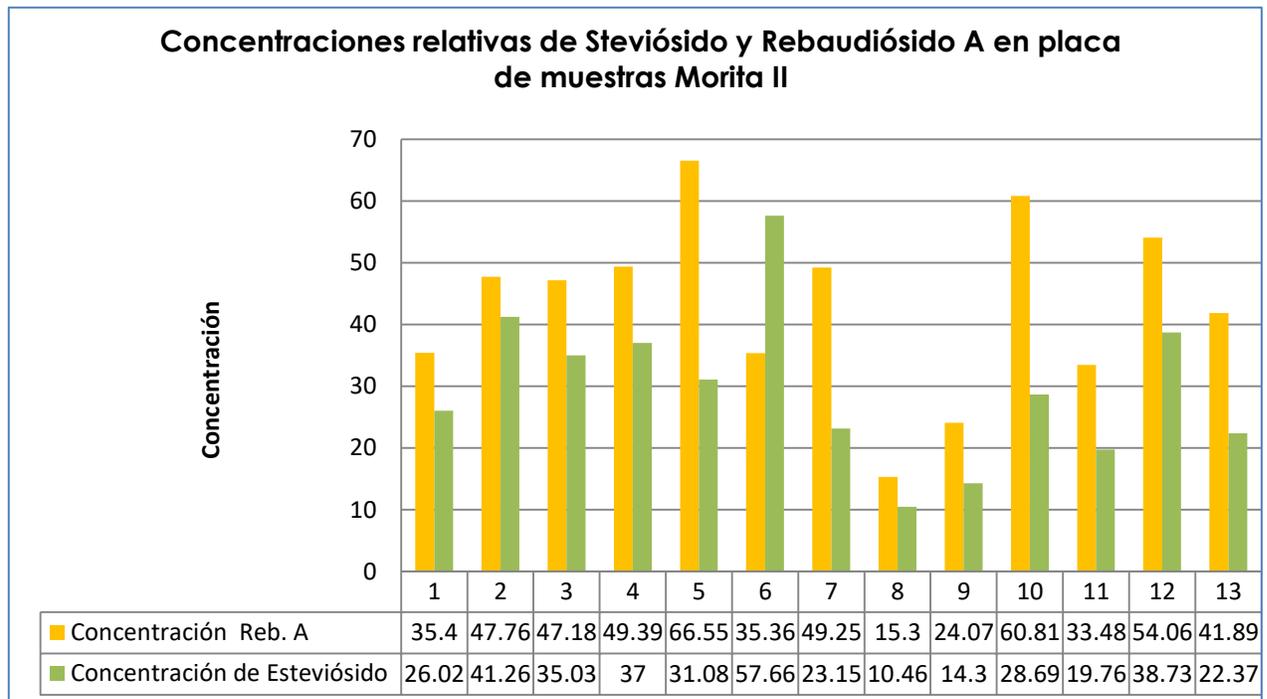


Figura 21 Concentraciones de Esteviósido y Rebaudiósido A en Variedades Morita II.

| ID | # en Placa | Área Reb A | Área Esteviósido | Concentración relativa Reb. A | Concentración relativa Esteviósido | DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS |
|----|------------|------------|------------------|-------------------------------|------------------------------------|--|
| 1 | 11 | 155 | 301 | 35.4 | 26.02 | Origen campo (SM), hoja cosechada febrero 2015 12. |
| 2 | 12 | 183 | 359 | 47.76 | 41.26 | Origen campo (SM), hoja cosechada abril 2015 |
| 3 | 13 | 257 | 257 | 47.18 | 35.03 | Origen campo (SM), hoja cosechada mayo 2015 |
| 4 | 14 | 235 | 343 | 49.39 | 37 | Origen campo (SM), hoja cosechada junio 2015 |
| 5 | 15 | 295 | 257 | 66.55 | 31.08 | Origen campo (SM), hoja cosechada septiembre 2015 |
| 6 | 17 | 183 | 343 | 35.36 | 57.66 | Hoja Campeche cosechada 2014 |
| 7 | 18 | 257 | 243 | 49.25 | 23.15 | Hoja Campeche cosechada 2015 |
| 8 | 19 | 143 | 243 | 15.3 | 10.46 | Tallo (SM) cosechado 2014 |
| 9 | 20 | 143 | 221 | 24.07 | 14.3 | Tallo (SM) cosechado 2015 |
| 10 | 21 | 279 | 241 | 60.81 | 28.69 | Invernadero (SM), hoja cosechada septiembre 2015 |
| 11 | 2 | 183 | 242 | 33.48 | 19.76 | Invernadero (SM), hoja seca cosechada enero 2015 |
| 12 | 7 | 257 | 279 | 54.06 | 38.73 | Origen campo (SM) Hoja seca de primera, enero 2015 |
| 13 | REB A/ STV | 273 | 409 | 41.89 | 22.37 | *REB/ STV Mancha estándar Rebaudiósido A/ STEVIOSIDO |

Tabla 15. Concentraciones y cuantificación de Área de la mancha y volumen de Esteviósido y Rebaudiósido A en Variedades Morita II arrojadas por el software Sweday.

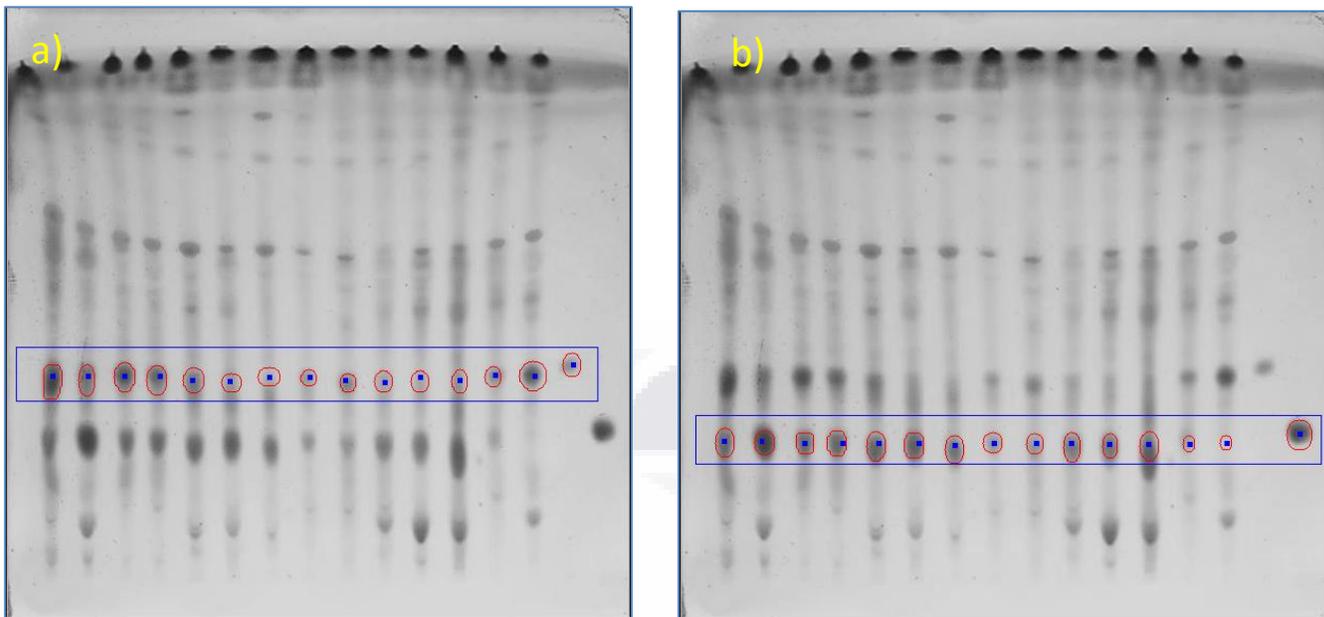


Figura 22. Placa de Cromatografía variedades distintas a Morita II con áreas definidas y cuantificadas en el software TLC Sweday de a) Esteviósidos b) Rebaudiósido A

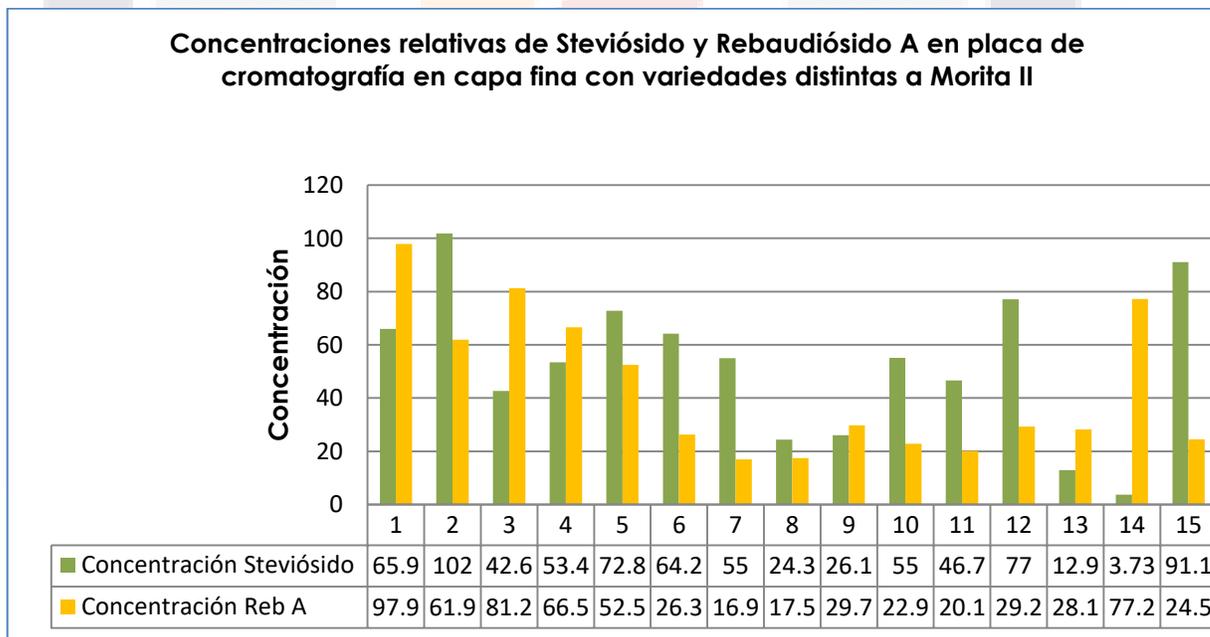


Figura 23. Concentraciones y cuantificación de volumen de Steviósido A y Rebaudiósido a en Variedades distintas a Morita II

| ID | # en Placa | Area steviósido | Concentración relativa Steviósido | Área Reb A | Concentración relativa Reb A | Descripción de la muestra |
|----|------------|-----------------|-----------------------------------|------------|------------------------------|---|
| 1 | 1 | 389 | 65.94 | 512 | 97.86 | Variedad QRA1 origen vivero aire libre hoja seca cosechada enero 2015 |
| 2 | 3 | 371 | 101.85 | 365 | 61.86 | QRC origen campo hoja seca cosechada enero 2015 |
| 3 | 4 | 297 | 42.63 | 435 | 81.23 | QRD origen invernadero hoja seca cosechada enero 2015 |
| 4 | 5 | 376 | 53.37 | 435 | 66.52 | QRE origen invernadero hoja seca cosechada enero 2015. |
| 5 | 22 | 389 | 72.8 | 371 | 52.51 | SM4 origen invernadero hoja seca cosechada septiembre 2015 |
| 6 | 16 | 384 | 64.21 | 277 | 26.32 | SM5 hoja, cosechada agosto 2015. |
| 7 | 23 | 359 | 55.02 | 307 | 16.93 | SM5 invernadero hoja cosechada septiembre 2015 |
| 8 | 24 | 277 | 24.33 | 195 | 17.45 | CRIOLLA origen campo hoja cosechada septiembre 2015 |
| 9 | 6 | 243 | 26.05 | 221 | 29.69 | CRIOLLA campo hoja cosechada enero 2015 |
| 10 | 8 | 343 | 55.04 | 277 | 22.86 | HOJA DE PRIMERA DE CAMPO origen campo cosechada enero 2015. |
| 11 | 9 | 257 | 46.65 | 277 | 20.07 | HOJA DE SEGUNDA DE CAMPO hoja cosechada enero 2015. |
| 12 | 10 | 389 | 77.02 | 273 | 29.24 | HOJA SECA DE SEGUNDA MANCHADA + TALLO HOJA SECA cosechada enero 2015. |
| 13 | ZAC | 143 | 12.91 | 243 | 28.14 | Origen Zacatecas, invernadero hoja colectada junio 2015 |
| 14 | CAL | 129 | 3.73 | 565 | 77.21 | Origen campo Calvillo hoja colectada julio 2015 |
| 15 | STEV/REB A | 523 | 91.1 | 307 | 24.53 | Estándar Steviósido Y Rebaudiósido A |

Tabla 16. Concentraciones y cuantificación de área de la mancha y volumen de Esteviósido y Rebaudiósido A en variedades distintas a Morita II arrojadas por el software Sweday.

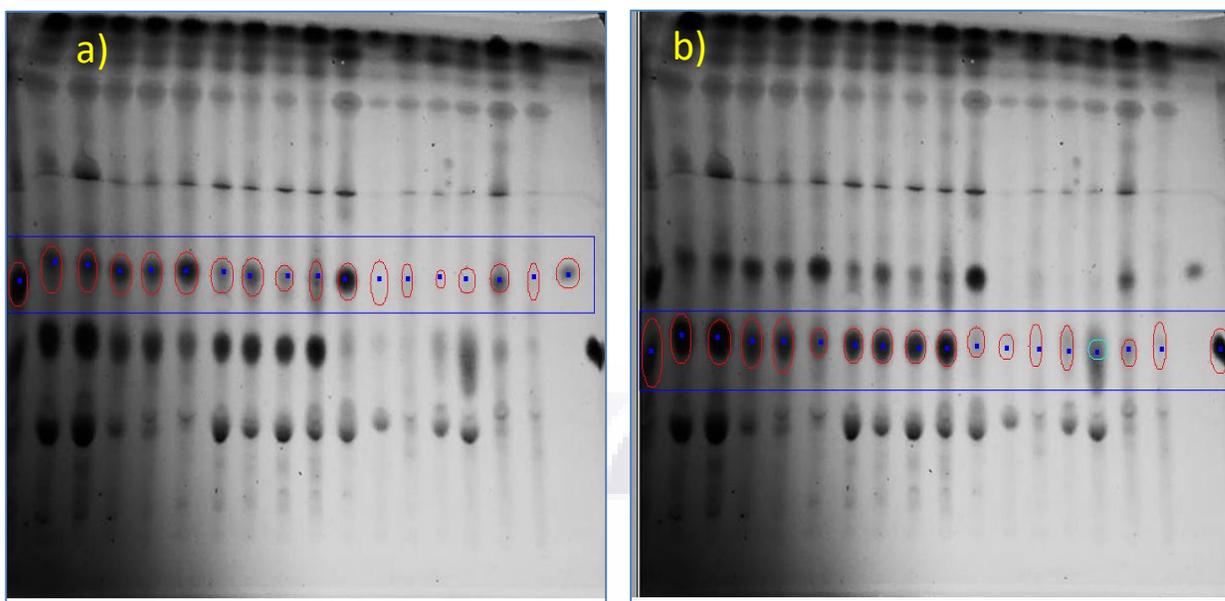


Figura 24. Placa de cromatografía variedades de campo e invernadero y variedades *IN VITRO* con áreas definidas y cuantificadas en el software TLC Sweday de a) Esteviosidos b) Rebaudiósido A

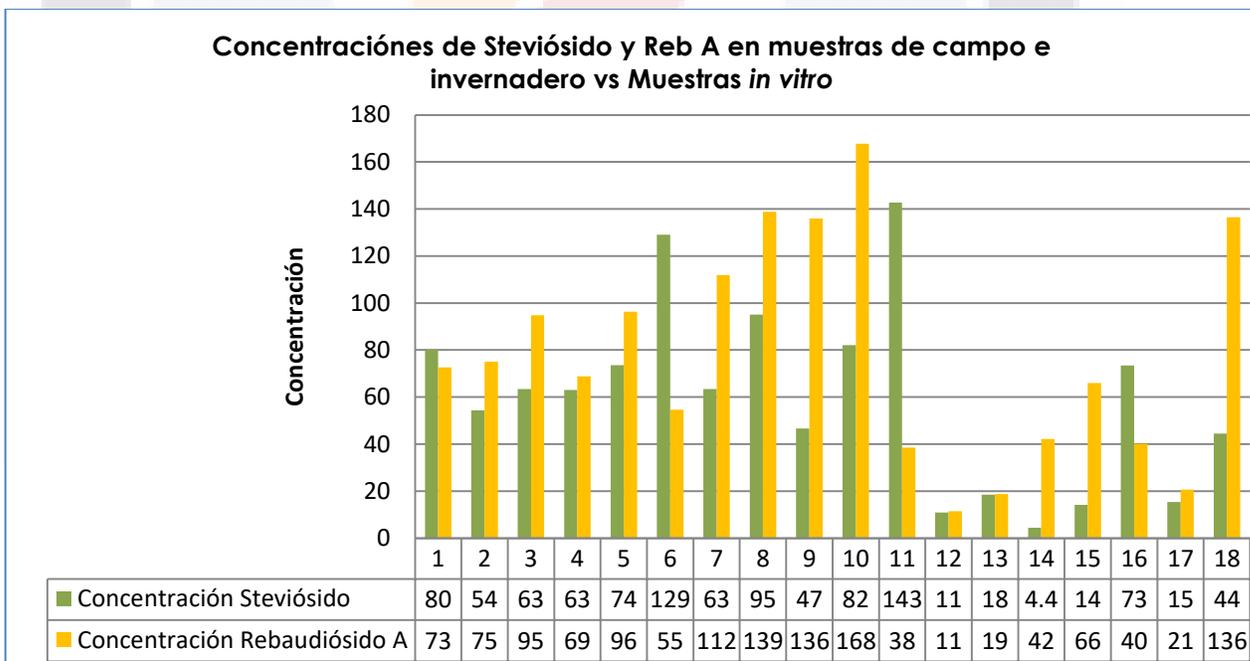


Figura 25. Concentraciones y cuantificación de volumen de Steviosido A y Rebaudiósido a en Variedades de campo e invernadero así como de muestras producidas *in vitro*

| ID | Descripción | Área Estevisido | Área Reb A | Concentración relativa Estevisido | Concentración relativa REB A |
|----|--|-----------------|------------|-----------------------------------|------------------------------|
| 1 | QRA1 Vivero Aire Libre HOJA cosechada 16-1-15 | 593 | 991 | 80.21 | 72.63 |
| 2 | MORITA II Invernadero HOJA cosechada 16-1-15 | 681 | 719 | 54.3 | 75.06 |
| 3 | QRC CAMPO HOJA cosechada 16-1-15 | 555 | 709 | 63.39 | 94.77 |
| 4 | QRD Invernadero HOJA cosechada 16-1-15 | 583 | 719 | 63.07 | 68.77 |
| 5 | QRE Invernadero HOJA cosechada 16-1-15 | 617 | 787 | 73.56 | 96.24 |
| 6 | CRIOLLA CAMPO HOJA cosechada 16-1-15 | 667 | 329 | 129.02 | 54.55 |
| 7 | HOJA DE PRIMERA DE CAMPO CAMPO HOJA cosechada 22-1-15 | 557 | 463 | 63.47 | 111.81 |
| 8 | HOJA DE PRIMERA DE CAMPO CAMPO TRAZAS cosechada 21-1-15 | 545 | 511 | 95.04 | 138.81 |
| 9 | HOJA DE SEGUNDA DE CAMPO CAMPO HOJA cosechada 21-1-15 | 307 | 477 | 46.64 | 135.95 |
| 10 | HOJA SECA DE SEGUNDA MANCHADA + TALLO HOJA cosechada 21-1-15 | 363 | 491 | 82.05 | 167.74 |
| 11 | CALVILLO CAMPO HOJA 08-15 | 491 | 359 | 142.77 | 38.46 |
| 12 | CALVILLO <i>In vitro</i> STEVIA TDZ CALLO 09-15 | 527 | 273 | 10.88 | 11.4 |
| 13 | SM5 <i>In vitro</i> HOJA 09-15 | 259 | 389 | 18.49 | 18.75 |
| 14 | MORITA II <i>In vitro</i> con TDZ BROTES 09-15 | 121 | 411 | 4.42 | 42.19 |
| 15 | UAA <i>In vitro</i> MS BROTES 08-15 | 307 | 277 | 14.2 | 65.98 |
| 16 | ZAC HOJA+ TALLO 07-15 | 371 | 295 | 73.49 | 40.15 |
| 17 | ZAC <i>In vitro</i> CONTAMINADA BA BROTES 09-15 | 291 | 433 | 15.35 | 20.6 |
| 18 | *STV, REB A Mancha estándares | 485 | 593 | 44.48 | 136.48 |

Tabla 17. Concentraciones y cuantificación de Área de la mancha y volumen de Estevisido y Rebaudisido A en Variedades de campo e invernadero así como las producidas *in vitro*.

VII.8 Extractos para análisis en HPLC

Para la cuantificación en HPLC de los rebaudiósidos y esteviósidos de las muestras, fue necesaria la implementación del método Soxhlet, con la finalidad de purificar los extractos obtenidos y poder cuantificar de forma más certera.

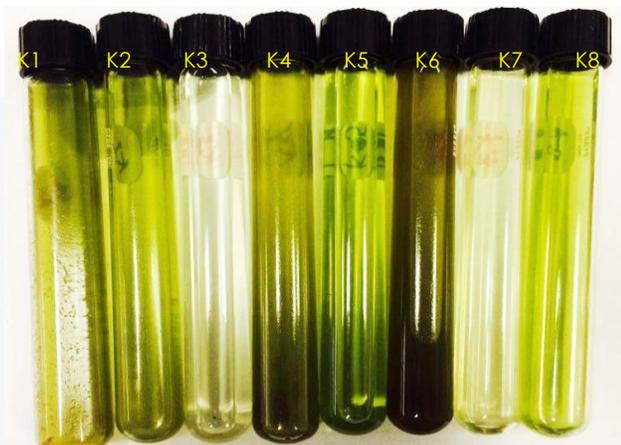


Figura 26. Muestras obtenidos mediante la técnica de extracción de Soxhlet en variedades de *S. rebaudiana* cosechadas en campo provenientes de la empresa Stevia Maya.

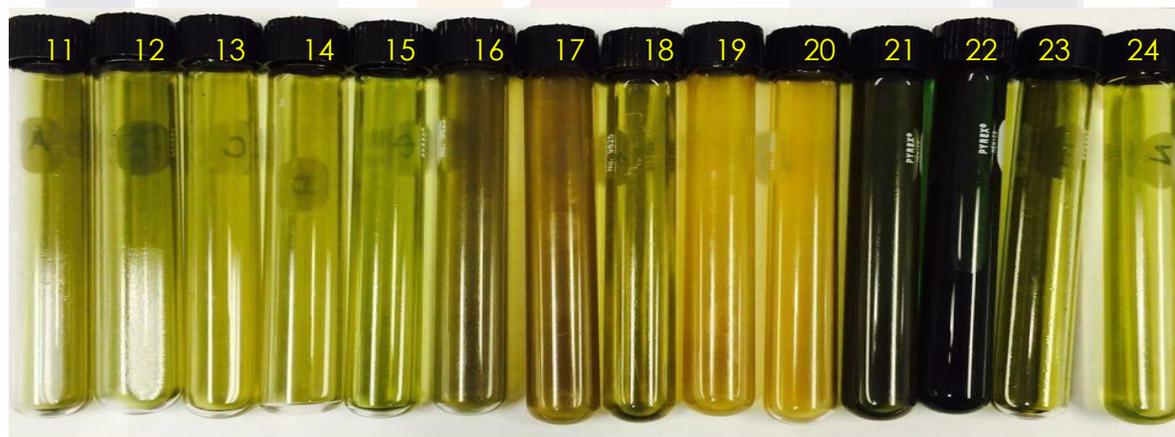


Figura 27. Muestras obtenidos mediante la técnica de extracción de Soxhlet en variedades de *S. rebaudiana* cosechadas en **campo** provenientes de la empresa Stevia Maya.

VII.9 Análisis cuantitativos por medio de HPLC

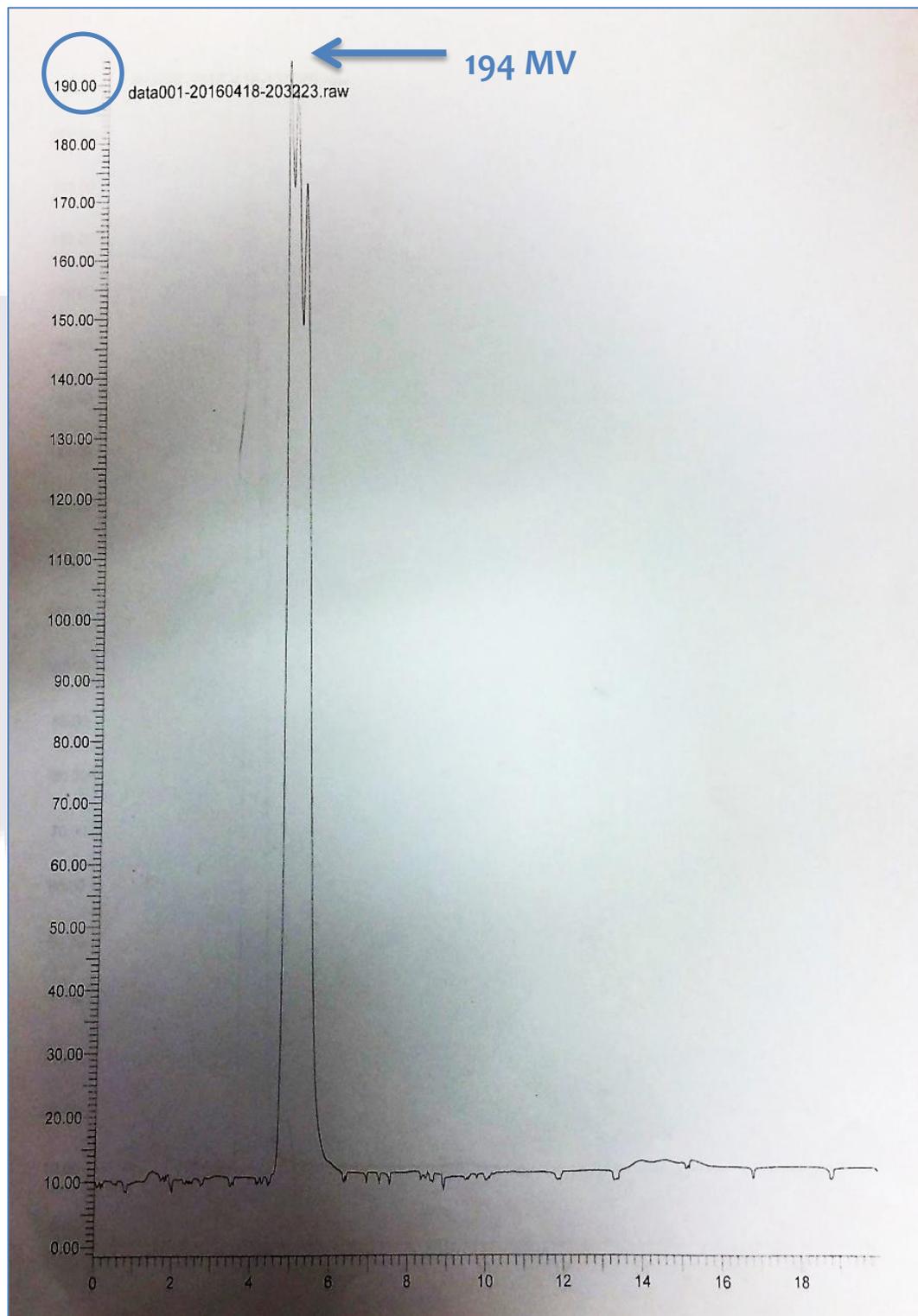


Figura 28. Cromatograma del estándar de esteviósido, el pico máximo se reporta a 194 MV. Tiempo de retención esteviósido 4.9 min.

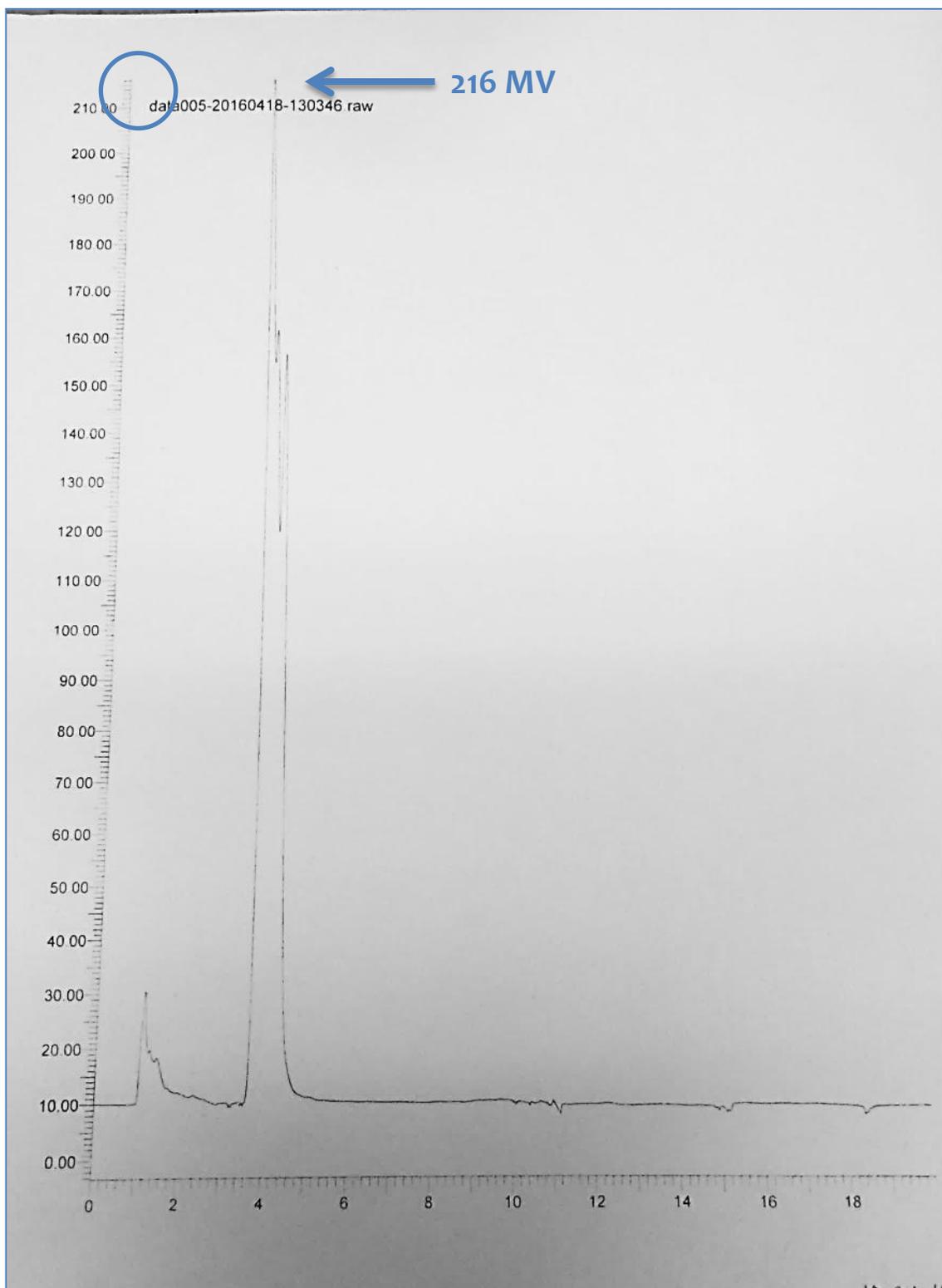


Figura 29. Cromatograma del estándar de Rebaudiósido A, el pico máximo se reporta a 216 MV. Tiempo de retención esteviósido 3.8 min.

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml de muestra | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|---------|---|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| K1 | Muestra SM5 sembrada en TDZ (tejido calloso) 09-15 | 19.1 | inexistente | 0% | 30 | **0.07 |
| K2 | Stevia IV UAA (tejido calloso) | 18.4 | inexistente | 0% | 20 | 0.05 |
| K3 | SM5 BA. (tejido calloso) | 22.2 | inexistente | 0% | 0 | 0 |
| K4 | Brotos de stevia IV UAA (HOJA Y TALLO MS) 09-15 | 20.3 | inexistente | 0% | 30 | **0.07 |
| K5 | Stevia Calvillo IV TDZ (tejido calloso) | 23.3 | inexistente | 0% | 0 | 0 |
| K6 | Brotos de Morita II con IV, TDZ 09-15 | 25 | inexistente | 0% | 32 | **0.07 |
| K7 | Brotos Stevia IV UAA / Resembradas con TDZ (hoja y tallo) | 14.3 | inexistente | 0% | 20 | 0.05 |
| K8 | Morita II Tejido Calloso TDZ | 18 | inexistente | 0% | 0 | 0 |

TABLA 18. Concentraciones de esteviósido y Rebaudiósido A, a en muestras cultivadas *in vitro* por HPLC

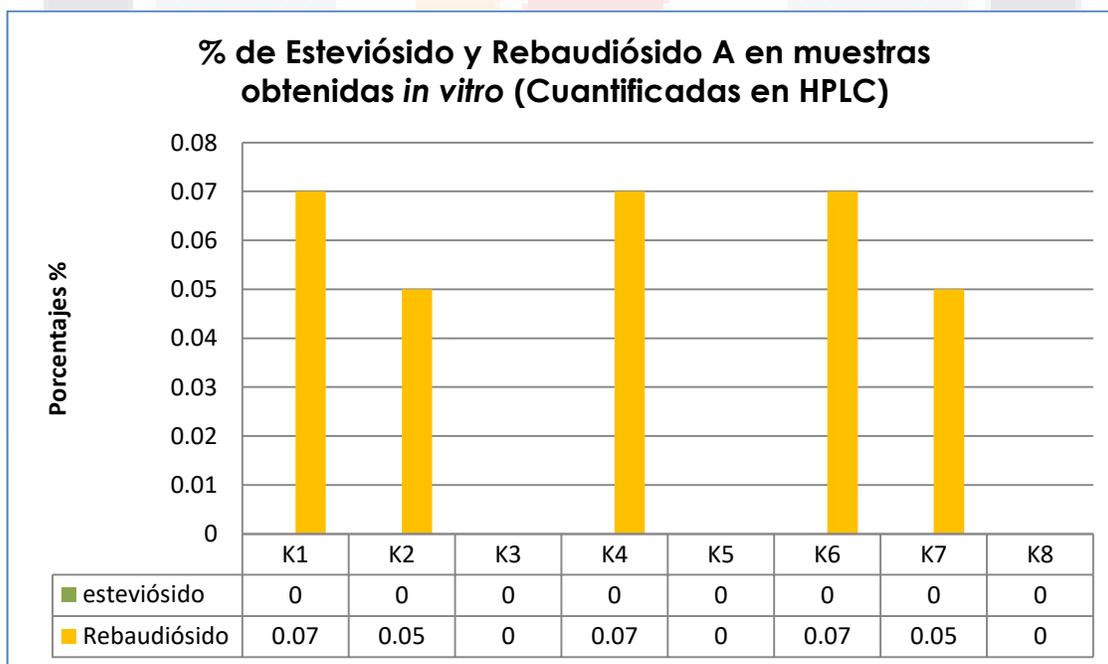


Figura 30.- Porcentaje de Esteviósido y Rebaudiósido A en muestras obtenidas *in vitro* (Cuantificadas en HPLC)

| MUE STRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|----------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 11 | Morita II 02/15 | 13 | 35 | 1.17 | 241 | 7.25 |
| 12 | Morita II 04/15 | 14 | 55 | 1.98 | 349 | 11.3 |
| 13 | Morita II 05/15 | 15 | 50 | 1.93 | 321 | 11.1 |
| 14 | Morita II 06/15 | 12 | 60 | 1.85 | 360 | 10 |
| 15 | Morita II 09/15 | 12 | 70 | **2.16 | 430 | **11.9 |
| 16 | SM5 08/15 | 15 | 49 | 1.89 | 302 | 10.5 |
| 17 | Morita II CAMPECHE 2015 | 20 | 32 | 1.65 | 195 | 9.03 |
| 18 | Morita II CAMPECHE 2014 | 21 | 20 | 1.08 | 100 | 4.86 |
| 19 | Morita II TALLO /15 | 16 | 43 | 1.77 | 265 | 9.81 |
| 20 | Morita II TALLO / 14 | 13.3 | 30 | 1.28 | 150 | 4.62 |
| 21 | Morita II Invernadero 09/15 | 21.1 | 39 | **2.12 | 250 | **12.2 |
| 22 | SM4 invernadero 09/15 | 26 | 30 | 2.01 | 165 | 9.93 |
| 23 | SM5 invernadero 09/15 | 11 | 110 | **3.12 | 440 | **11.2 |
| 24 | Variedad Criolla 09/15 | 21 | 20 | 1.03 | 100 | 4.86 |

TABLA 19. Concentraciones de esteviósido y rebaudiósido A en muestras cultivadas en campo empresa stevia Maya, por HPLC

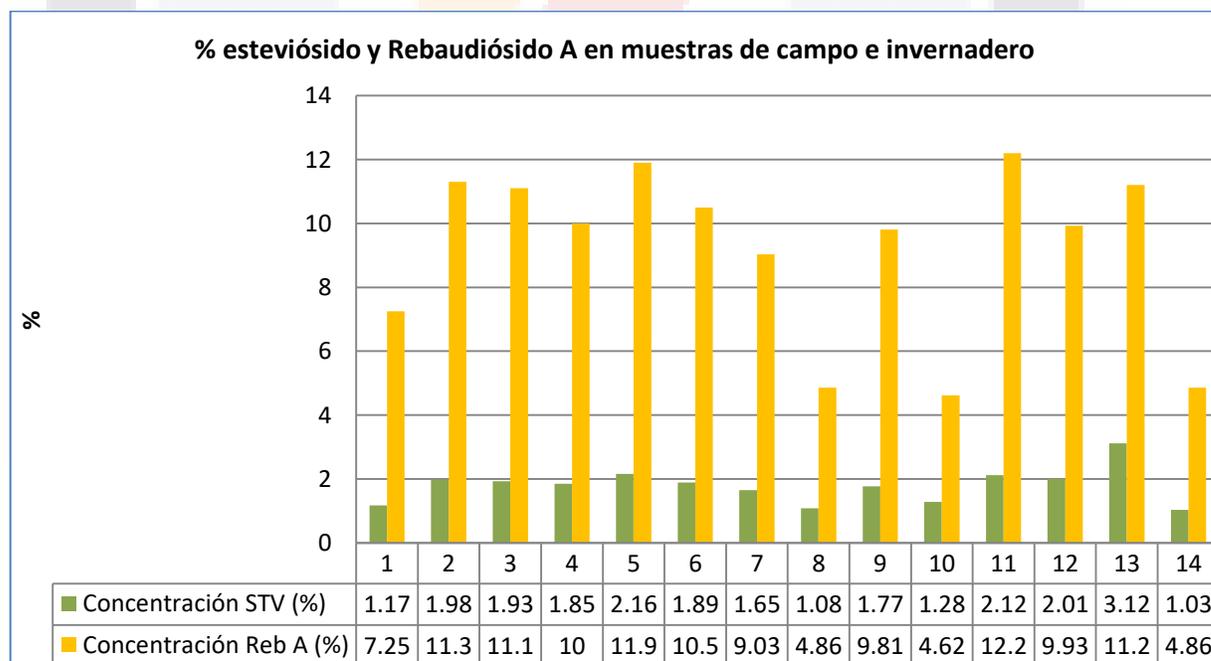


Figura 31- Porcentaje de Esteviósido y Rebaudiósido A en muestras de campo e invernadero (Cuantificadas en HPLC)

| MUESTRA | Descripción de la muestra | Concentración STV (%) | Concentración Reb A (%) |
|---------|------------------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 11 | Morita II 02/15 | 1.17 | 7.25 |
| 12 | Morita II 04/15 | 1.98 | 11.3 |
| 13 | Morita II 05/15 | 1.93 | 11.1 |
| 14 | Morita II 06/15 | 1.85 | 10 |
| 15 | Morita II 09/15 | **2.16 | **11.9 |
| 17 | Morita II CAMPECHE 2015 | 1.65 | 9.03 |
| 18 | Morita II CAMPECHE 2014 | 1.08 | 4.86 |
| 19 | Morita II TALLO /15 | 1.77 | 9.81 |
| 20 | Morita II TALLO / 14 | 1.28 | 4.62 |
| 21 | Morita II Invernadero 09/15 | **2.12 | **12.2 |
| | PROMEDIO DE CONCENTRACIONES | 1.96 | 9.20 |

Tabla 20. Promedio de concentraciones de esteviósido y Rebaudiósido A. de variedades Morita II. Cuantificadas con HPLC

| MUESTRA | Descripción de la muestra | Concentración STV (%) | Concentración Reb A (%) |
|---------|---------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 16 | SM5 08/15 | 1.89 | 10.5 |
| 22 | SM4 invernadero 09/15 | 2.01 | 9.93 |
| 23 | SM5 invernadero 09/15 | 3.12 | 11.2 |
| | PROMEDIO | 2.34 | 10.54 |

Tabla 21. Promedio de concentraciones de esteviósido y Rebaudiósido A. de variedades distintas a Morita II. Cuantificadas con HPLC

VIII.-DISCUSIONES

En cuanto a los tratamientos de desinfección, se optó por tratar los segmentos nodales con una exposición durante 15 minutos en una solución de cloralex 1.2%. Estos resultados coinciden con un estudio publicado en (Delvalle W, 2001) para estandarizar el proceso de micropropagación de Stevia. En dicho estudio se realizaron unas pruebas preliminares de esterilización superficial del material, para facilitar el establecimiento *in vitro* del cultivo. Se probaron cuatro concentraciones de hipoclorito de sodio de sodio (NaOCl) y cuatro tiempos de exposición de los materiales. La menor contaminación (11%) se presentó con la exposición de los explantes durante 15 min. a una solución de NaOCl al 1.2%, considerando el número de explantes y contenedores contaminados, el tipo de contaminación: se identificó contaminación por hongos bacterias, el grado de clorosis y el número de explantes brotados. Se logró un adecuado control de elementos contaminantes, es decir el método seleccionado cumplió su cometido de realizar un cultivo de tejidos aséptico.

Al observar los frascos sembrados bajo el tratamiento A, C y D, se puede precisar que los contaminantes presentes para esta planta son en su mayor parte fúngicos pues su crecimiento es visible en forma de colonias aisladas o alrededor de los explantes.

En cuanto al cultivo de tejidos, los brotes se formaron a los 25 días de cultivo, obteniéndose hasta cinco brotes por explante. La respuesta morfogénica al uso de TDZ fue la formación de brotes y callo. El explante que favoreció una mayor producción de callo fueron los segmentos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

nodales. La citocinina BA empleada en distintas concentraciones de manera aislada no produjo formación de tejido calloso en los explantes nodales y foliares de *S. Rebaudiana*.

El Mejor tratamiento para inducción de brotes BA 1 mg L⁻¹ y el mejor tratamientos para inducción de tejido calloso TDZ 1 mg L⁻¹

En un estudio realizado en Tamailnadu, India (Anbazhagan M., 2010) para la estandarización de las técnicas de cultivo *in vitro* para la propagación masiva de la Stevia rebaudiana, segmentos nodales y hojas se usaron como explantes y se cultivaron en medio Murashige y Skoog (MS) complementado con diferentes concentraciones de BA, Kn y IAA tanto de manera individual y como combinada, para la inducción de brotes y raíces, los brotes se hicieron visibles a los 28 días después de la siembra los mejores resultados se obtuvieron a partir medio MS suplementado con BA + IAA a las concentraciones de 1.0 mg / 0.5 mg respectivamente. Nuestros resultados coinciden en que el uso de concentraciones entre 0.5 y 1 mg/L resultan en una óptima formación de brotes, mientras que concentraciones mayores de éstos reguladores ocasionan resultados no tan favorables, como necrosis de los explantes.

En otro estudio, la propagación *in vitro* de Stevia se intentó a través de la regeneración de brotes a partir de segmentos nodales cultivado en medio Murashige y Skoog (MS) complementado con diversos reguladores: BA, NAA, IAA y TDZ. El número máximo de brotes axilares por explante (3.24) se observaron con medio MS suplementado con 1.0 mg l⁻¹ BA + 0.05 mg l⁻¹ NAA. En este caso se puede apreciar que a pesar de la combinación realizada en este estudio de BA a la misma concentración, sumado al uso de NAA, los resultados son menores que con el simple uso de BA (Soliman, 2013).

Un estudio publicado en Egipto, señala una producción media de brotes por explante de 36.9, utilizando 2.0 mg l^{-1} BA + 0.5 mg l^{-1} de Kin, en sus resultados se señala que a mayor concentración de BA el número de brotes incrementa considerablemente. La diferencia es notoria respecto a otros estudios a nivel mundial, no señalan la variedad utilizada, sin embargo el conteo se llevó a cabo a las 6 semanas de cultivo lo que explicaría el incremento de brotes generados (Mohamed, 2011).

Existen estudios en los cuales el total de brotes generados durante el cultivo de tejidos *in vitro*, superan a los obtenidos durante el presente trabajo, sin embargo señalan el uso de fitohormonas consideradas más costosas. En la revisión general de trabajos publicados sobre generación de brotes *in vitro*, el promedio está entre 3 y 7 brotes por explante, que son visibles durante la tercer y cuarta semana de cultivo.

Durante este proyecto, se lograron generar 5 brotes por explante, por lo que el material que se necesitó para los análisis cuantitativos y semicuantitativos fue producido en cantidad suficiente.

Análisis semicuantitativo de esteviolglucósidos

Para el análisis semicuantitativo, se comenzó con la selección de muestras de "MORITA II", por ser ésta una variedad reportada en bibliografía como productora de altas concentraciones de Rebaudiósido A. (Carrascal, 2010); luego se seleccionaron todas las variedades de campo distintas a "Morita II" y por último se realizaron análisis en placas con una combinación de muestras tanto de extractos de ejemplares de stevia obtenidos en campo y en invernadero así como cultivados *in vitro*.

En el análisis semicuantitativo de la Cromatografía en Capa fina, ciertas manchas se pueden diferenciar a través de un transiluminador de luz UV visible, donde se aprecia la separación de los compuestos de las muestras de *S. rebaudiana*. Sin embargo en el Transiluminador UV, no se aprecian las marcas de los carriles donde se aplicaron los estándares ya que en la estructura del esteviósido y Rebaudiósido A, no existen dobles ligaduras conjugadas que absorban a la longitud de onda que emiten las lámparas del transiluminador UV es decir 254 nm.

Por otra parte, una vez rociadas las placas con el compuesto cromógeno revelador, y estar listas, se pueden realizar a simple vista los análisis en cuanto a la concentración de acuerdo a la intensidad de las manchas observadas. El compuesto revelador se formuló de manera correcta, ya que no se presentaron manchas extra, quemaduras o corrosión en las placas.

En la figura 17, de la placa de cromatografía en capa fina con variedades de MORITA II, las muestras coincidentes con los RF correspondientes al estándar de Rebaudiósido A, más visibles e intensas son las de los carriles señalados con el número 15 (Origen campo, hoja cosechada septiembre 2015), la 21 (Invernadero hoja cosechada septiembre 2015) y la 7 (Origen campo, hoja seca de primera, cosechada enero 2015).

En cuanto a la correspondencia de Rf con el estándar de esteviósido, la muestra cuyo carril presenta una mancha más intensa de Esteviósido es la señalada con el número 17, que corresponde a la muestra de hoja Campeche cosechada en 2014.

En la Figura 18, se muestra la placa revelada de cromatografía en capa fina con variedades distintas a Morita II, donde la muestra 1 (variedad

QRA1, origen vivero al aire libre, hoja seca cosechada en enero de 2015), 3 (QRC origen campo, hoja seca cosechada enero 2015), 4 (QRD, origen invernadero, hoja seca cosechada enero 2015), 5(QRE, origen invernadero hoja seca cosechada enero 2015), ZAC (origen Zacatecas, invernadero hoja colectada junio 2015) y CAL(origen campo Calvillo hoja colectada julio 2015) son las que en apariencia poseen una mayor concentración de esteviósidos.

Las muestras señaladas con los números 24(criolla, origen campo hoja cosechada septiembre 2015), 6(criolla, campo hoja cosechada enero 2015), Zac (origen Zacatecas, invernadero hoja colectada junio 2015) y Cal (origen campo Calvillo hoja colectada julio 2015), son las muestras con las manchas más intensas y por lo tanto las que al parecer tienen mayor concentración de Rebaudiósido A.

Las variedades obtenidas de Zacatecas y Calvillo tienen una concentración o intensidad de manchas semejante entre ellas y mayor de Esteviósido y Rebaudiósido A, respecto a las variedades distintas a Morita II.

La figura 19 muestra la placa de cromatografía comparativa entre muestras de campo e invernadero, además de muestras obtenidas durante el cultivo de tejidos *in vitro* (callo y brotes). Existe una clara diferencia entre la intensidad de las manchas en los carriles inyectados con muestras de campo, comparado a las muestras *in vitro*, donde las manchas son apenas visibles.

Las muestras 12 (Calvillo *in vitro* stevia TDZ tejido calloso 09-15), 13 (SM5 *in vitro*, hoja 09-15), 14(Morita II *in vitro* con TDZ brotes 09-15), 17(Zac *in vitro* contaminada BA brotes 09-15), presentan las menores concentraciones de esteviósido y Reb A.

Software SWEDAY

Se puede realizar a simple vista un análisis adicional de acuerdo a la visibilidad de la intensidad de las manchas observadas, que puede ir a la par de sus concentraciones, sin embargo el software utilizado para hacer el análisis de concentración relativa, arroja de en la mayoría de los casos las manchas más grandes o intensas son las que presentan una mayor concentración de los compuestos de interés. El software ayuda a analizar el área total de la mancha de una manera más exacta que la que podemos generar a simple vista sobre las placas ya que utiliza el número de píxeles de la imagen digitalizada.

El software dio como resultado que las muestras de Morita II tienen concentraciones superiores de Rebaudiósido A, respecto a esteviósido, y comprobó la diferencia de concentraciones entre las muestras de ejemplares producidos *in vitro* y las de plantas de campo e invernadero.

Contar con este tipo de herramientas es importante para brindar mayor seguridad al presentar los resultados de un análisis semicuantitativo y definitivamente arroja resultados sobre la presencia o ausencia de los compuestos de interés.

Análisis cuantitativos, por medio del HPLC

Respecto a la cuantificación de las muestras por medio de HPLC, cabe mencionar que es un método cuantitativo, pero es mucho menos sensible que la cromatografía en capa fina, ya que en ésta pueden presentarse manchas que señalen la mínima presencia de un compuesto, sin embargo en los cromatogramas de HPLC, si el compuesto tiene una concentración muy baja, el pico correspondiente a la misma mancha, es nulo, o no alcanza a ser cuantificado.

Los resultados expresados en la figura 30, indican que ninguna de las muestras obtenidas *in vitro* presenta algún contenido de esteviósido y en cuanto a Rebaudiósido A, solo las muestras K1 (SM5, TDZ, tejido calloso 09-15), K4 (MS brotes de stevia *in vitro* UAA 09-15) y K6 (brotes de Morita II *in vitro*, TDZ 09-15) muestran una mínima presencia de concentración.

En las muestras de campo e invernadero, el panorama es distinto, ya que los picos correspondientes a las manchas, se expresan perfectamente dando lugar a una cuantificación adecuada y exacta de las concentraciones de los compuestos de interés. Así tenemos que las muestras 13 (SM5 invernadero 09/15), 5 (Morita II campo 09/15) y 11 (Morita II invernadero 09/15), en orden descendente son las que mayor concentración de Rebaudiósido A y coincidentemente de esteviósido contienen.

En cuanto a los datos obtenidos por HPLC, las muestras de MORITA II, presentan un promedio de 1.96% de concentración de esteviósido y un promedio de 9.20% para Rebaudiósido A, siendo las muestras cosechadas en septiembre de 2015 de campo e invernadero las que presentan mayores concentraciones de ambos compuestos (tabla 19).

Un estudio en 2015 cuantificó las concentraciones de Rebaudiósido A y esteviósido; utilizaron dos variedades de *S. rebaudiana*, Criolla y Morita II, cultivadas y cosechadas en el Sureste de México. Pesaron 500 mg de hojas secas, se extrajeron tres veces con 5 ml de agua en un baño de agua hirviendo (100 ° C) durante 30 minutos. Enfriaron los extractos, los centrifugaron a 2500rpm por 10 minutos. Las fases acuosas se transfirieron a un matraz aforado de 25 ml y por último la solución se filtró a través de un filtro de membrana de 0.45 micras antes del análisis HPLC. Usaron el sistema HPLC Agilent 1100 en una columna C18 (longitud: 250 mm; diámetro

interior: 4.6 mm, tamaño de partícula: 5 micras) columna (Phenomenex Co., Ltd., CA, EE.UU.) sin control de temperatura con detector UV-Vis ajustado a una longitud de onda de 210 nm. La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo y buffer de fosfato de sodio 10 mmol/L (pH 2.6) en una relación 32:68 a un flujo de 1 ml/min. El volumen de inyección de muestra fue de 20 μ L y el análisis se realizó con el software Claridad 2.7.3.498 versión 2009. Para las muestras de Morita II el contenido de Rebaudiósido A (g/100g) fue 15.15 ± 0.02 , mientras que el esteviósido fue de 3.97 ± 0.003 (Aranda, 2015).

Estas cifras tienen diferencias con nuestros resultados debido a que las muestras de nuestro estudio presentaron dos variantes; la primera es que se cuantificó una muestra cuyo origen fue el tallo de la planta, la otra fue el origen y la fecha de cosecha de la planta (Campeche 2014, 2015), estas muestras tienen una concentración muy inferior al resto. El estudio de Aranda no señala exactamente las fechas de recolección de las muestras, cabe señalar que su método de extracción fue distinto y en cuanto al método de HPLC a pesar de tener prácticamente las mismas características, el equipo es más reciente y por lo tanto más preciso.

En la variedad Criolla estudiada en este trabajo la concentración de esteviósido fue de 1.03% y de Rebaudiósido A fue de 4.86%. Respecto a estos resultados, el mismo estudio (Aranda, 2015), las concentraciones de esteviósido y Rebaudiósido A fueron 4.03 ± 0.01 y 8.80 ± 0.14 , respectivamente ($p < 0,001$); las cifras del estudio publicado tienen un rango de diferencia bastante amplio respecto al presente trabajo, lo cual puede deberse a la fecha de cosecha y al origen de las variedades criollas estudiadas.

Respecto a las muestras de otras variedades SM5 y SM4 el promedio de concentración de esteviósido fue de 2.34% y de rebaudiósido fue de 10.54%, estos ejemplares no han sido plenamente identificadas como variedades mejoradas, sin embargo se sugiere un mayor análisis ya que presentan una concentración promedio mayor a las de Morita II para Reb A. Un seguimiento de estudios respecto a estas variedades, que pudieran ser factibles para la micropropagación.

En Paraguay, se realizó un estudio con un muestreo de hojas de 140 individuos cosechados entre los años 1998 y 1999; estas muestras fueron secadas a temperatura ambiente entre 25 y 30 °C y luego molidas en molino eléctrico hasta obtener un polvo fino. Un gramo de cada muestra fue disuelto en 100 ml de agua, la solución se mantuvo a 80 °C, 45 minutos con agitación periódica. Una vez filtradas las muestras se procedió al lavado con acetonitrilo al 20%. El producto lavado fue colectado en tubos de ensayo e inmediatamente se realizó la elución con acetonitrilo al 80%. La muestra fue filtrada con una membrana de 0.45 µm de teflón PTFE (Millex-LCR Millipore) y colocadas en ampollas para ser inyectadas al equipo HPLC. Se empleó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (Shimadzu Japón) equipado con inyección manual, compresor de aire y un detector UV/Vis a una longitud de onda de 210 nm., se inyectaron 10 µl de disoluciones de patrones y muestras y se utilizó una columna Chemcosorb 5NH2-U de 4.6 mm x 150 mm (Chemco, Japón) a temperatura de 25°C. Fue utilizada una fase móvil de acetonitrilo y agua en proporción 80:20. Se aplicó un flujo de 1 mL/min. Las muestras analizadas se compararon con estándares conocido de esteviósido de 99.6% y rebaudiósido A, pureza de 98.2% (Wako Chemicals, Japón) (Jiménez et. al 2010).

El promedio de contenido de esteviósido en las muestras analizadas (140) fue de 9,14%, mientras que el de rebaudiósido A fue de 4.63%. En cuanto al contenido de Rebaudiósido A, la concentración varía entre 0 y 12% concentrándose el 68% entre los valores de 3.1 a 9,0% (95 individuos) (Jiménez et. al 2010).

Respecto a lo anterior, las muestras analizadas en nuestro estudio presentan una diferente concentración esteviósidos (mayor), no así para rebaudiósido A. En los resultados presentados existe una gran variabilidad para los contenidos de esteviósido y rebaudiósido A, ya que la stevia se reproduce sexualmente por fecundación cruzada, por lo que no debe extrañar la diversidad fenotípica que se observa en plantas que crecen espontáneamente, así como en cultivos comerciales. El trabajo de Jiménez y colaboradores no señala la variedad de sus muestras analizadas, cabe señalarse también la diferencia en los métodos de extracción de las muestras.

Analizando los resultados de todos los estudios, la síntesis de glucósidos de esteviol son características gobernadas por genes de herencia cuantitativa por lo que es de esperar influencias de factores ambientales sobre los mismos, como época de cosecha, post cosecha, temperatura, humedad, fotoperiodo, etc.

En otro estudio se analizaron ejemplares de tres orígenes distintos, la muestra venezolana estuvo conformada por hojas de *Stevia rebaudiana* de la variedad Morita II, cultivada en el sector de Guayabita de la localidad Cagua, municipio Sucre, estado Aragua, Venezuela. Se removieron las hojas adultas de las ramas de plantas madre (mayores a 6 meses de edad), se recolectaron, se lavaron y se deshidrataron 8 horas a 50°C. La muestra colombiana consistió en hojas deshidratadas de stevia

de la variedad Morita II originarias de la región de Montelíbano departamento de Córdoba, Colombia. La última muestra fue de una variedad clonal IAN/VC-142, de la comunidad francesa de Marsillargues, provincia de Lunel (González et. al 2014). Las tres muestras fueron analizadas por medio de HPLC, no se especifica el método de extracción; se utilizó una columna Sphereclone 5 μ NH₂ de 250 por 4.6 mm. Con una fase móvil en proporción de 80:20 acetonitrilo, agua.

En cuanto a las concentraciones de esteviósido de la variedad Clonal presento el mayor valor, con un promedio de 4% de concentración. Las muestras de Morita II venezolana y colombiana registraron una concentración promedio de 1.9% y 2.2% respectivamente. La similitud de estos valores se explica por pertenecer a la misma variedad y a la cercanía geográfica de estos países de clima tropical (González et. al 2014).

Por otra parte las concentraciones de Reb. A alcanzaron niveles casi 4 veces mayores en la variedad Morita cultivada en Venezuela y Colombia respecto a la variedad clonal, con una concentración promedio de 7.4%, 6.9% y 1.7% respectivamente los resultados reafirman la evidencia de la mejoría genética de la variedad Morita II respecto a la producción de este compuesto (González et. al 2014).

Estos resultados hablan de que las variedades Morita II que se están cultivando en campos mexicanos, tienen concentraciones de estos compuestos dulces aún mayores a las de plantas colombianas y venezolanas, lo que les agrega un valor comercial bastante amplio (tabla 19).

En otro estudio llevado a cabo en Malasia, muestra frescas de hojas maduras de plantas sanas de 2 años de edad de *Stevia rebaudiana* se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

obtuvieron del Instituto de Investigación para el Desarrollo Agrícola de Malasia (MARDI), Bachok, Kelantan, Malasia. Las muestras provienen de dos variedades originadas en Canadá: MS007 y MS012. Las hojas se secaron a la luz solar directa (temperatura entre 25 y 30°C) durante 24-48 horas, una vez secas se pulverizaron. Los extractos se prepararon con 5 g de polvo de la hoja seca, con 50 ml de metanol caliente usando un aparato soxhlet durante 2 horas. El extracto se filtró y el residuo se volvió a extraer dos veces con metanol. El filtrado se concentró aún más en el evaporador rotatorio a 60 ° C de flash y se añadió una cantidad de 50 ml de agua destilada para disolverlo. Para el análisis de HPLC, usaron una Columna Nuclosil 100 C18 (25 cm x 4.6 mm de diámetro interno, 5 micras). La temperatura de la columna se mantuvo a 27-28 ° C y la detección de UV se ajustó a 210 nm. La fase móvil empleada fue acetonitrilo grado HPLC y agua (80:20) y el pH se ajustó a 3.0 con ácido fosfórico (85% de grado reactivo). Las muestras se filtraron a través de un filtro de 0.22 micras Millipore o equivalente. El volumen de inyección se fijó a 10µL a un caudal de 1 ml/min. El estándar esteviósido (> 99.3% de pureza) y el rebaudiósido A (> 97% de pureza) (Wako Pure Chemical Industries) (Afandi et. al 2013).

El estudio se basó en encontrar las condiciones óptimas de temperatura, lavados y solventes para la extracción exclusiva de Reb. A, donde el mayor porcentaje de concentración analizando todas las combinaciones fue de 2.24% , esta cifra es menor a las concentraciones reportadas en el presente trabajo, debido a las variedades utilizadas en el estudio, sin embargo marcaron la pauta para generar nuestras condiciones de extracción y así obtener mejores resultados de cuantificación (Afandi et. al 2013).

En general en este tipo de trabajos se busca generar un proceso adecuado tanto de extracción como de cuantificación de los compuestos de interés, esto fue logrado y se puede observar que las cantidades de

estevioglucósidos son muy variables entre metodologías. Esta clase de investigaciones recopilan e informan al lector sobre las técnicas mas adecuadas que se buscan basándonos en estudios previos, con el afán siempre de encontrar los mejores resultados posibles.

Los datos de los análisis cuantitativos y semicuantitativos son coincidentes en que hay una clara reducción en la producción de metabolitos secundarios en cultivos generados *in vitro*. En muchas plantas, la síntesis de metabolitos de interés puede ser potenciada al ser desarrolladas *in vitro*, pero en este caso, al parecer la planta produce estos compuestos en respuesta a factores propios del medio que pueden dar lugar a su proceso completo de madurez y polinización. Las rutas de síntesis de estevioglucósidos nos hablan del papel fotosintético y su efecto sobre la producción de estos metabolitos; es necesario extender este tipo de investigaciones para someter a la planta a todos los tipos de ambiente posibles, que nos aporten más evidencia para la mejora de técnicas de producción masiva de estos compuestos, pues comercialmente es de gran relevancia encontrar las condiciones en las que stevia produzca una mayor cantidad de esteviósidos y rebaudósidos.

IX. CONCLUSIONES

- Se logró la correcta esterilización del material el cual consistió en tratar los segmentos nodales con una exposición durante 15 min. en una solución de cloralex 1.2%.
- Se logró obtener un promedio de cinco brotes por explante formados a los 25 días del cultivo a través del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.
- El mejor tratamiento para inducción de brotes fue de medio MS suplementado con BA 1 mg L⁻¹ y para la inducción de tejido calloso fue medio MS suplementado con TDZ 1 mg L⁻¹.
- Ambas técnicas de extracción realizadas permitieron la detección y/o cuantificación de los compuestos de interés.
- Las variedades Morita II presentaron siempre una mayor concentración de Rebaudiósido A, con respecto a esteviósidos
- Las variedades Morita II, Criolla, SM4 y SM5 presentan promedios de concentración menores de esteviósidos que de Rebaudiósido A en su cuantificación por HPLC.
- Las variedades obtenidas de Zacatecas y Calvillo presentaron una concentración mayor de esteviósido y rebaudiósido A respecto a las otras variedades cosechadas en la empresa Stevia Maya.
- La producción de esteviósidos y rebaudiósidos de ejemplares cultivados y cosechados en campo e invernadero, supera de manera evidente la síntesis de estos compuestos *in vitro*.
- Las muestras obtenidas *in vitro* presentaron nulo o muy bajo porcentaje de concentración de esteviósido y Reb A, a través de la cuantificación por medio de HPLC.
- Las muestras 13 (SM5 invernadero 09/15), 5 (Morita II campo 09/15) y 11 (Morita II invernadero 09/15), en orden descendente son las que

mayor concentración de Rebaudiósido A y coincidentemente de esteviósido contienen.

- En el análisis por HPLC las muestras de MORITA II, presentan un promedio de 1.96% de concentración de esteviósido y un promedio de 9.20% para Rebaudiósido A, siendo las muestras cosechadas en septiembre de 2015 de campo e invernadero las que mayores concentraciones de ambos compuestos presentan.
- En la variedad criolla estudiada en este trabajo la concentración de esteviósido fue de 1.03% y de Rebaudiósido A fue de 4.86%.
- Las variedades SM5 y SM4 mostraron un promedio de concentración de esteviósido de 2.34% y de rebaudiósido A fue de 10.54%.
- En el presente estudio las variedades con mayor promedio de estevioglucósidos de interés fueron SM5 y SM4, se sugiere extender éste análisis para líneas de mejora.
- Las variedades Morita II que se están cultivando en campos mexicanos, tienen producción de estos compuestos dulces aún mayores que otras plantas analizadas en diferentes países de la misma variedad, según lo reportado en otros trabajos consultados.
- El total de plantas cultivadas *in vitro* de *Stevia rebaudiana* mostró menor producción de metabolitos secundarios que las cultivados en campo e invernadero.
- Tres de las líneas de stevia cultivadas por la compañía Stevia Maya, presentan altas concentraciones de rebaudiósido A, con respecto a lo reportado por estudios en otros países, incluso en otros continentes, por lo que a partir de ésta selección se pueden comenzar líneas clonales o programas de cruza.
- Las condiciones en invernadero aumentan la producción de Rebaudiósido A y esteviósido en las plantas de *Stevia Rebaudiana*.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Afandi A., Sarijan S., Kumar, S. (2013). Optimization of Rebaudioside A extraction from Stevia Rebaudiana (Bertoni) and quantification by high performance liquid chromatography analysis. *Journal of Tropical Resources and Sustainable Science*. 1:1:62-70
2. Anbazhagan, M., Kalpana, M., Rajendran, R., Natarajan, V., Dhanavel, D. (2010) *In vitro* production of Stevia rebaudiana Bertoni. *Emirates Journal of Food and Agriculture* . 22.3:216-222.
3. Aranda I., Barbosa E., Toraya R., Segura M., Ordoñez Y., Berancur D. (2014). Evaluación de la inocuidad de Stevia rebaudiana Bertoni cultivada en el sureste de México como edulcorante de alimentos *Nutr Hosp*. 30:3:594-601.
4. Aranda, I., Ordoñez, M., Betancur, D. (2014). Determination of rebaudioside and stevioside in leaves of S. Rebaudiana Bertoni grown in México by a validated HPLC method. *American journal of analytical chemistry*. 5:878-875.
5. Ávalos, A., Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca. Serie Fisiología Vegetal*. 2:3:119-145.
6. Brandle J. (1998). Stevia rebaudiana: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Can j plant sci*. 78:4:527-536.
7. Chaturvedula, S., Upreti, M. (2011). Diterpene glycosides from stevia rebaudiana. *Molecules*. 16: 3552-3562.
8. Christou, P., Savin, R., Pierce, B., Misztal, I., Whitelaw, B. (2013). *Sustainable food production*. Springer-Verlag New York. 1:3
9. Domínguez M., González M., Rosales, C., Quiñones, C., Delgadillo, S., Mireles, S., Pérez, E. (2008) El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del

- género Agave. Revista Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. 41:53-62
10. Douglas., A. (2002). Stevia: The Genus Stevia Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles. Londres: Taylor and Francis. 1:1-23
 11. Duran, S., Córdón, K. y Rodríguez, M. (2013). Edulcorantes no nutritivos, riesgos, apetito y ganancia de peso. Revista chilena de nutrición. 40: 309-314
 12. EFSA(2010)Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre¹ EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA)^{2, 3} European Food Safety Authority. Gomis, V. Técnicas instrumentales en el análisis industrial. (2008) - rua.ua.es
 13. González C., Tapia, M., Pérez, E., Dornier, M., Morel, G. (2014) Caracterización de Cultivares de Stevia rebaudiana Bernoni de diferentes procedencias. Bioagro.26:2:79-88.
 14. González, A., Moralejo, S. (2011). Aproximación a la comprensión de un endulzante natural alternativo, la Stevia Rebaudiana Bertoni: producción, consumo y demanda potencial. Agroalimentaria. 17:32:57-69
 15. Goyal, K., Samsher, Goyal, K. (2009). Stevia (Stevia rebaudiana) a bio-sweetener: A review. International journal of food sciences and nutrition. 61:1-10.
 16. Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados nacionales. 2a. ed. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2013.
 17. Handelsman, Y., Bloomgarden, Z., Grunberger, G., Umpierrez, G., Zimmerman, R., Bailey, T., Blonde, L., Bray, G., Cohen, J., Dagogo-Jack, S. (2007). American association of clinical endocrinologists.

Medical guidelines for clinical practice for the management of diabetes mellitus. *Endocrine practice*. 1:3-68.

18. ITIS, (Integrated Taxonomic Information System) <http://www.itis.gov/>
19. Jarma, A., Espitia, M., Fischer, G. (2010). Síntesis de Esteviósidos en *Stevia (Stevia rebaudiana BERT)*. *Acta biol. Colomb.* 15:1: 289 – 294.
20. Jarma, A., Rengifo, T., Araméndiz, H. (2005). Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana Bertoni*) en el Caribe colombiano: Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomasa. *Agronomía Colombiana*. 23:2:207-216.
21. JECFA (2010) Steviol Glycosides, FAO JECFA Monographs. FAO, Rome
22. Jensen, W. (2007). The origin of the Soxhlet extractor. *Journal of Chemical Education*. 84:12
23. Jentzer, B., Alignan M., Garcia, V., Rigal, L., Vilarem, G. (2015). Response surface methodology to optimise accelerated solvent extraction of steviol glycosides from *stevia rebaudiana bertoni* leaves. *Food chemistry*. 166:561–567.
24. Jeppesen, P., Gregersen, S., Alstrup, K., Hermansen, K. (2002). Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: Studies in the Diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine*. 09:4:9-14.
25. Jiménez, T., Cabrera, G., Álvarez, E., y Gómez, F. (2010). Evaluación del contenido de esteviósido y rebaudiósido A en una población de *Stevia rebaudiana Bertoni* (kañahuate) cultivada comercialmente. Estudio preliminar. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*. 8:1:47-53
26. Lemus, R., Vega, A., Zura, L., Ah-Hen, K., (2012). *Stevia rebaudiana Bertoni*, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*. 132:3:1121–1132.

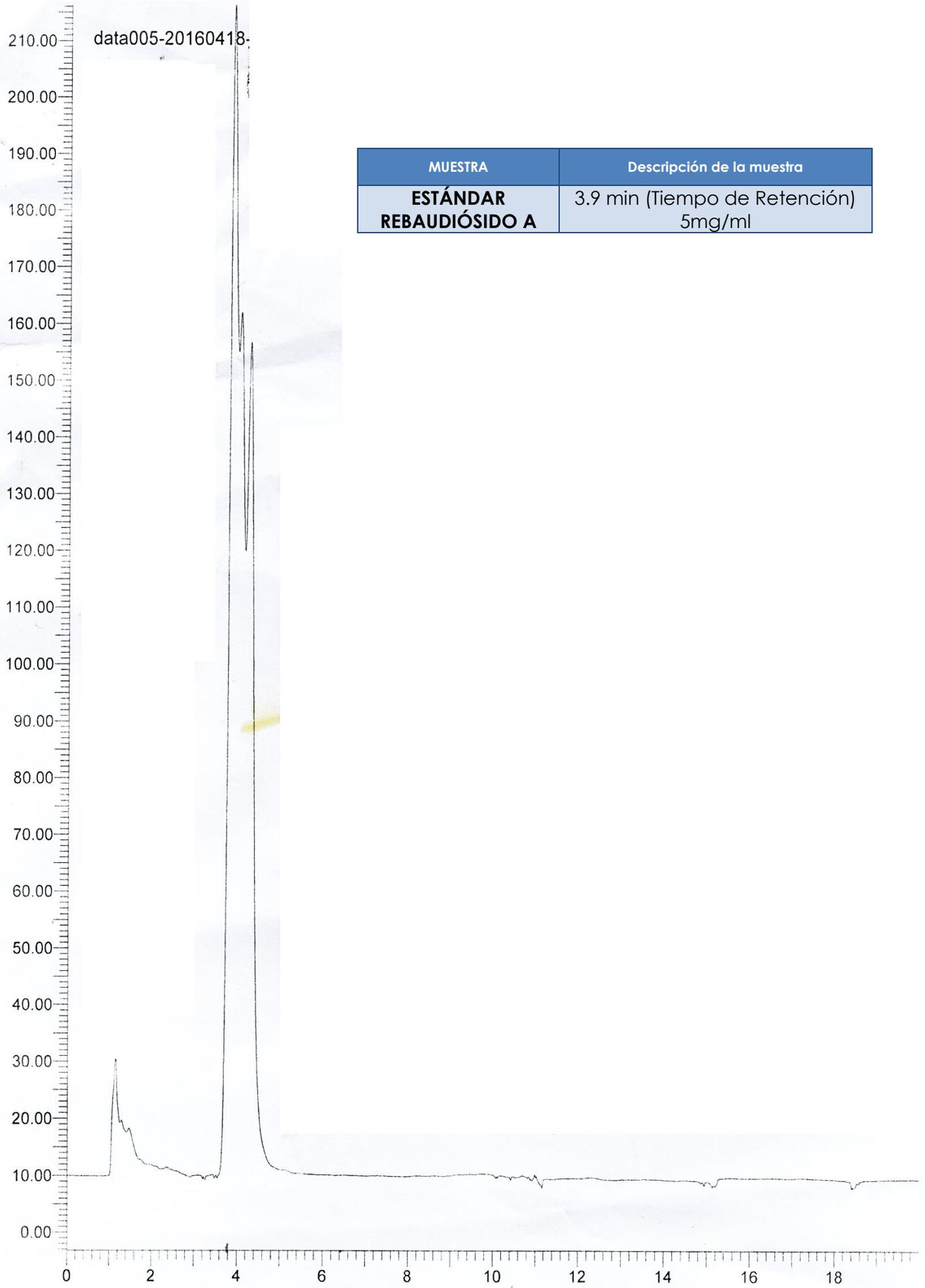
27. Lorenzo C., Serrano J., Plaza M., Quintanilla C., Alonso, G. (2014). Fast methodology of analysing major steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves. Food Chemistry. 157:518-523.
28. Madan, S., Ahmad, S., Singh, G., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R., Garg, M. (2010). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. A review. Indian journal of natural products and resources. 1:3:267-286.
29. Martínez, M. (2015). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Una revisión. Cultivos Tropicales. 35:1: 5-15.
30. Millán, E., Pacheco, W., Morales, J. (2012). Estudio económico para la producción y comercialización de hoja de *Stevia* (*Stevia rebaudiana* bertoni) deshidratada en Chinú Córdoba. Orinoquia, 16:2:24-31
31. Mitra, A., Pal, A. (2007). *In vitro* regeneration of *Stevia rebaudiana* (Bert) from the nodal explant. Plant Biochemistry & Biotechnology 16:1:59-62.
32. Mohamed, R. (2011) Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. A new sweetening crop in Egypt. Global J. Biotechnol. Biochem. 6:4:178–182.
33. Núñez, E. (2008). Extracciones con Soxhlet. Rev Clin Arg. 27:2:5-10
34. Oviedo, D., Alverenga, s., Evangelista, S., Sepúlveda, J., Rodríguez, M., 2015. Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un Cultivo Promisorio para México. BioTecnología. 19:2:14-27.
35. Pérez, E. (1999) Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Aguascalientes, México. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
36. Ramírez, G., Avilés, W., Moguel, Y., Góngora, S., May, C. (2011). *Estevia* (*Stevia rebaudiana*, Bertoni), un cultivo con potencial productivo en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Sureste. Mérida, Yucatán, México. 88 p.

37. Saikat, G., Arpita, D., Nirmal, M. (2015) A Comprehensive Review on Ethnopharmacological Properties and *in Vitro* Regeneration. Sugar Tech 17:2:95–106.
38. Sairkar, P., Chandravanshi, M., Shukla, P., Mehrotra, N. (2009) Mass production of an economically important medicinal plant *Stevia rebaudiana* using *in vitro* propagation techniques. Journal of Medicinal Plants Research. 3:4:266-270.
39. Sakaguchi, M.; Kan, T. (1982). Japanese researches on *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni and stevioside. Ci Cult. 34:235-248
40. Sepúlveda, G., Porta H., Rocha M. (2004). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista mexicana de fitopatología. 21:3:355-363
41. Sivaram, L., Mukundan, U. (2003). *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In vitro* cellular and developmental biology plant. 39: 520–523.
42. Soliman, I (2013) Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and assessment of genetic stability of *in vitro* regenerated plants using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. Archives Des Sciences. 66:3:343– 359.
43. Spangenberg, B., Poole, F., Weins, C. (2011). Quantitative thin-layer chromatography. USA: Springer Berlin Heidelberg.
44. Varcácel, M., Gómez, A. (1994). Técnicas analíticas de separación. Barcelona, España: Reverte S.A
45. Vázquez, L., Robledo, A., Muratalla. A., Conde, V. (2014). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* Bertoni y detección de steviósidos. Bioagro. 26:1:49-56.

ANEXOS

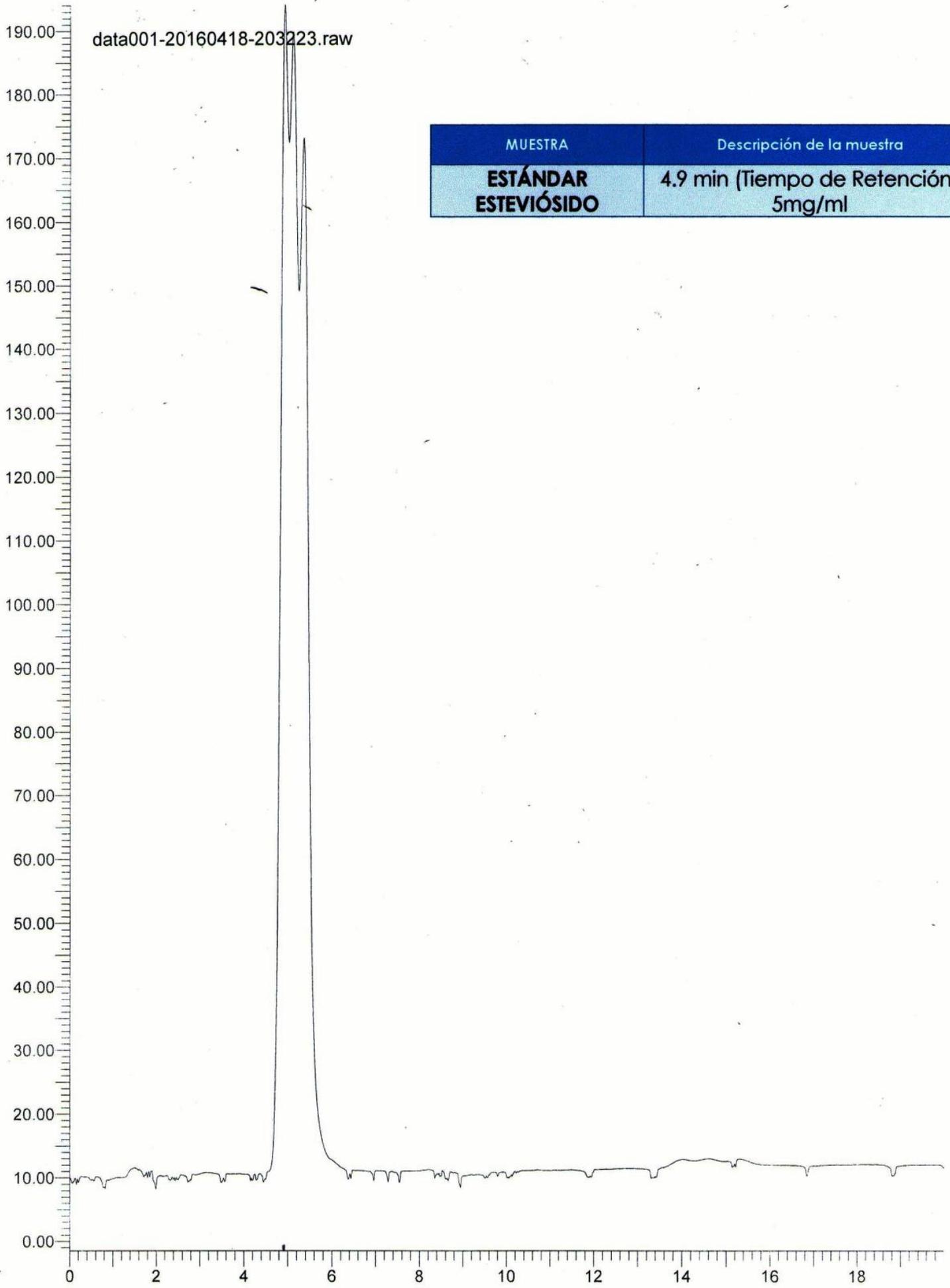
A continuación se muestran los cromatogramas utilizados para el análisis y cuantificación de esteviósidos y Rebaudiosido A en las muestras de campo e invernadero proporcionadas por la empresa Stevia Maya, y de las muestras obtenidas *in vitro*.

Se marca la altura de cada pico, y se analizan las correspondencias de acuerdo a los tiempos de retención de los estándares.



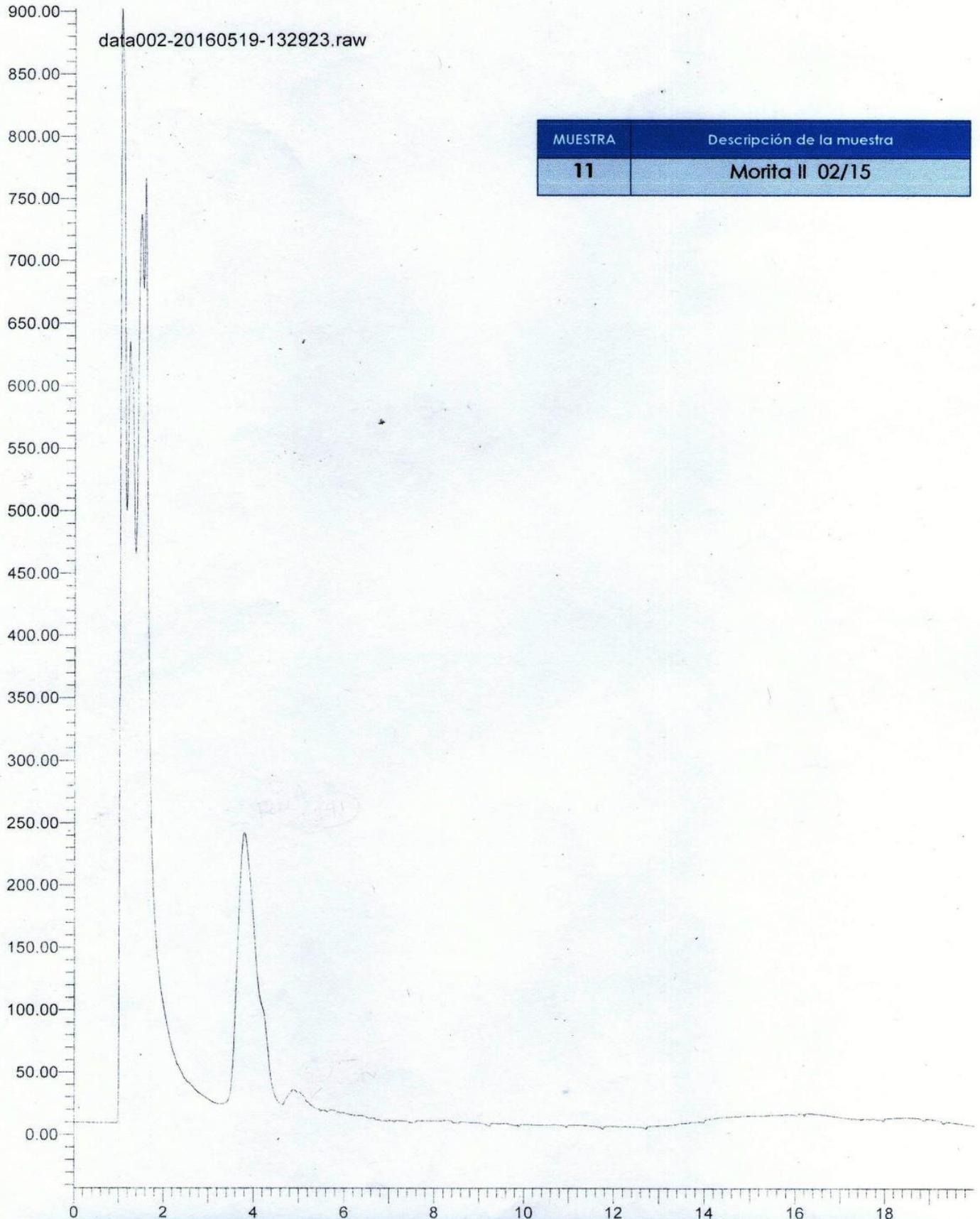
data005-20160418-

data001-20160418-203223.raw



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|---------------------------------|---|
| ESTÁNDAR ESTEVIÓSIDO | 4.9 min (Tiempo de Retención) 5mg/ml |

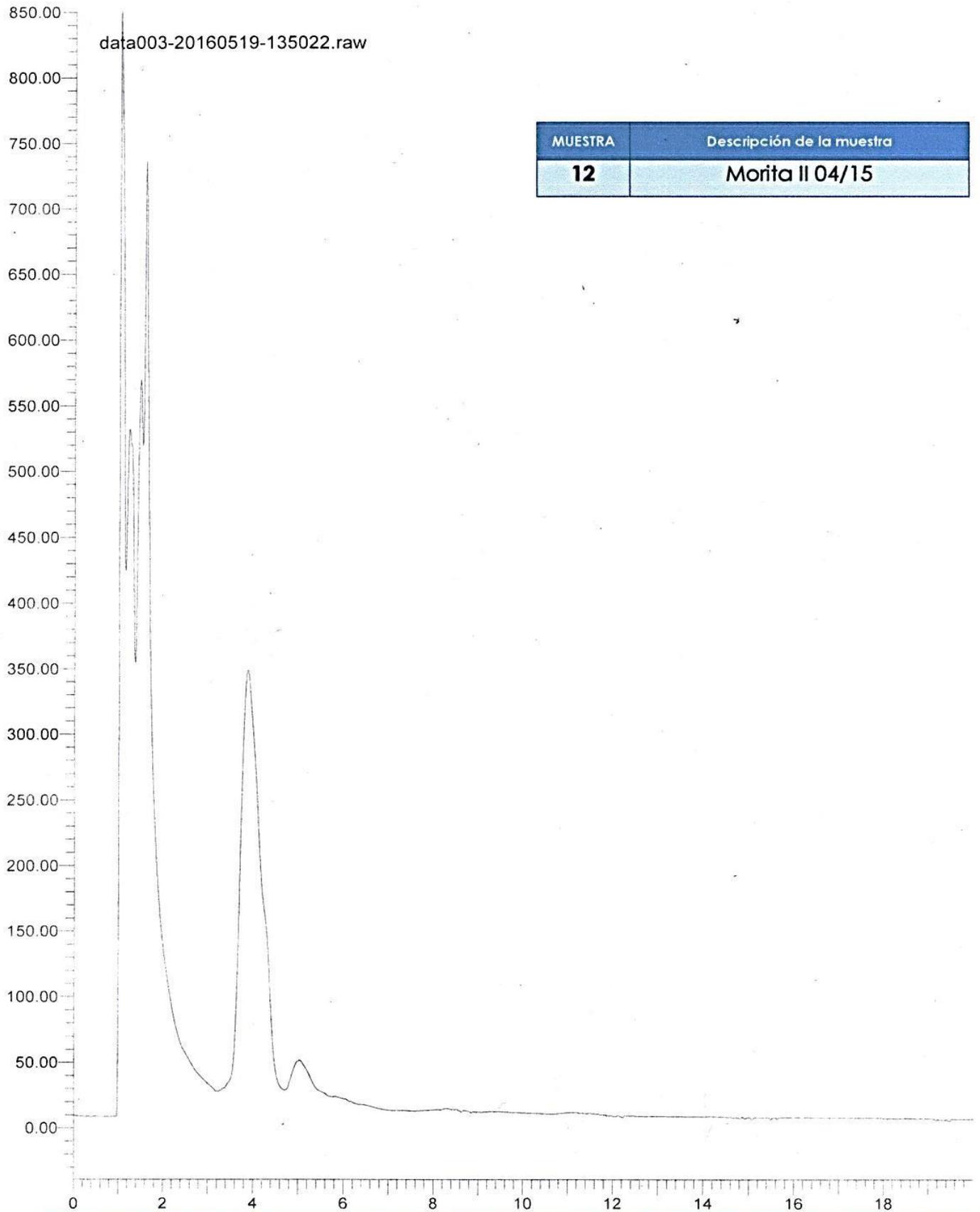
data002-20160519-132923.raw



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|---------|---------------------------|
| 11 | Morita II 02/15 |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|---------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 11 | Morita II 02/15 | 13 | 35 | 1.17 | 241 | 7.25 |

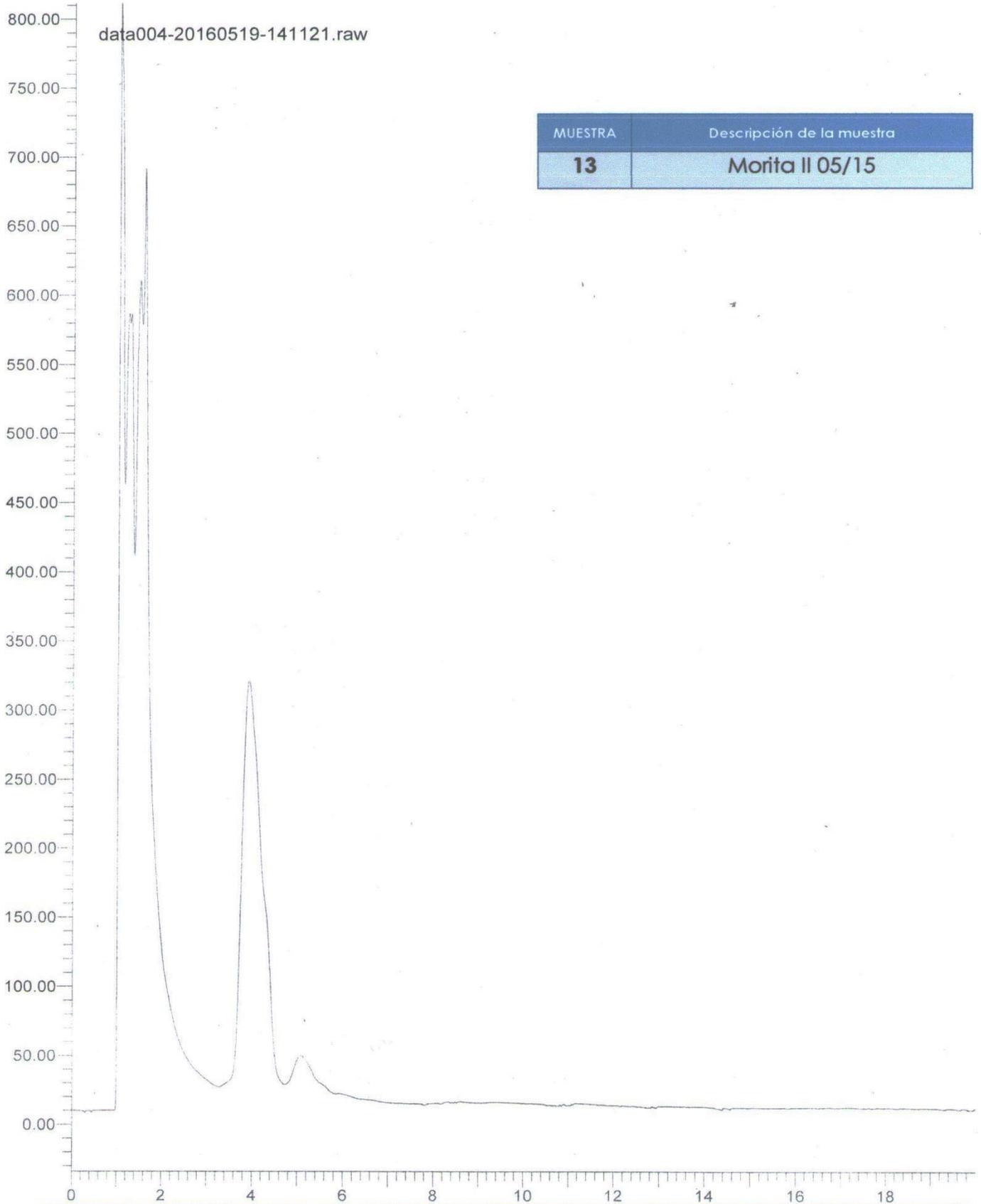
data003-20160519-135022.raw



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|---------------------------|
| 12 | Morita II 04/15 |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 12 | Morita II 04/15 | 14 | 55 | 1.98 | 349 | 11.3 |

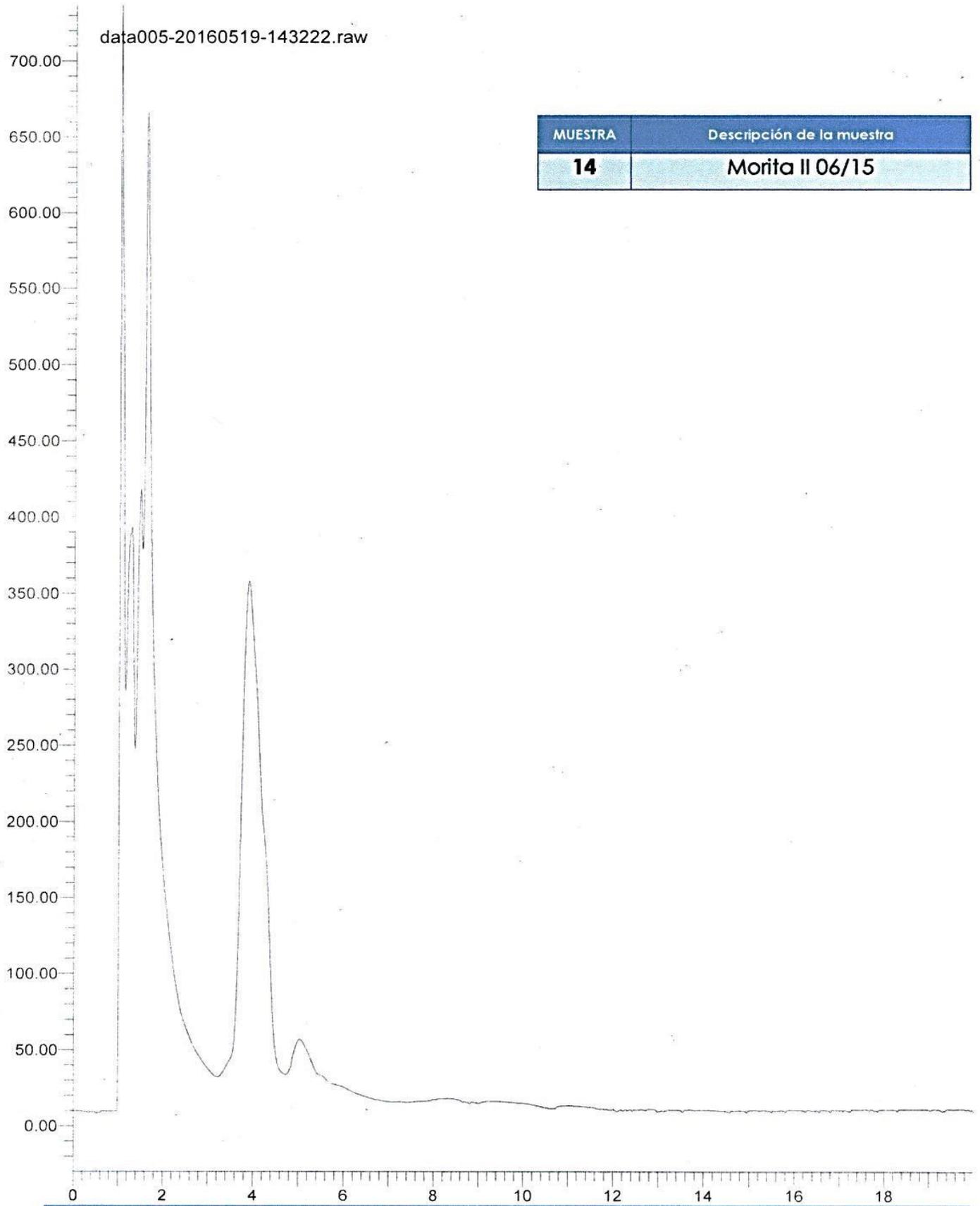
data004-20160519-141121.raw



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|---------------------------|
| 13 | Morita II 05/15 |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 13 | Morita II 05/15 | 15 | 50 | 1.93 | 321 | 11.1 |

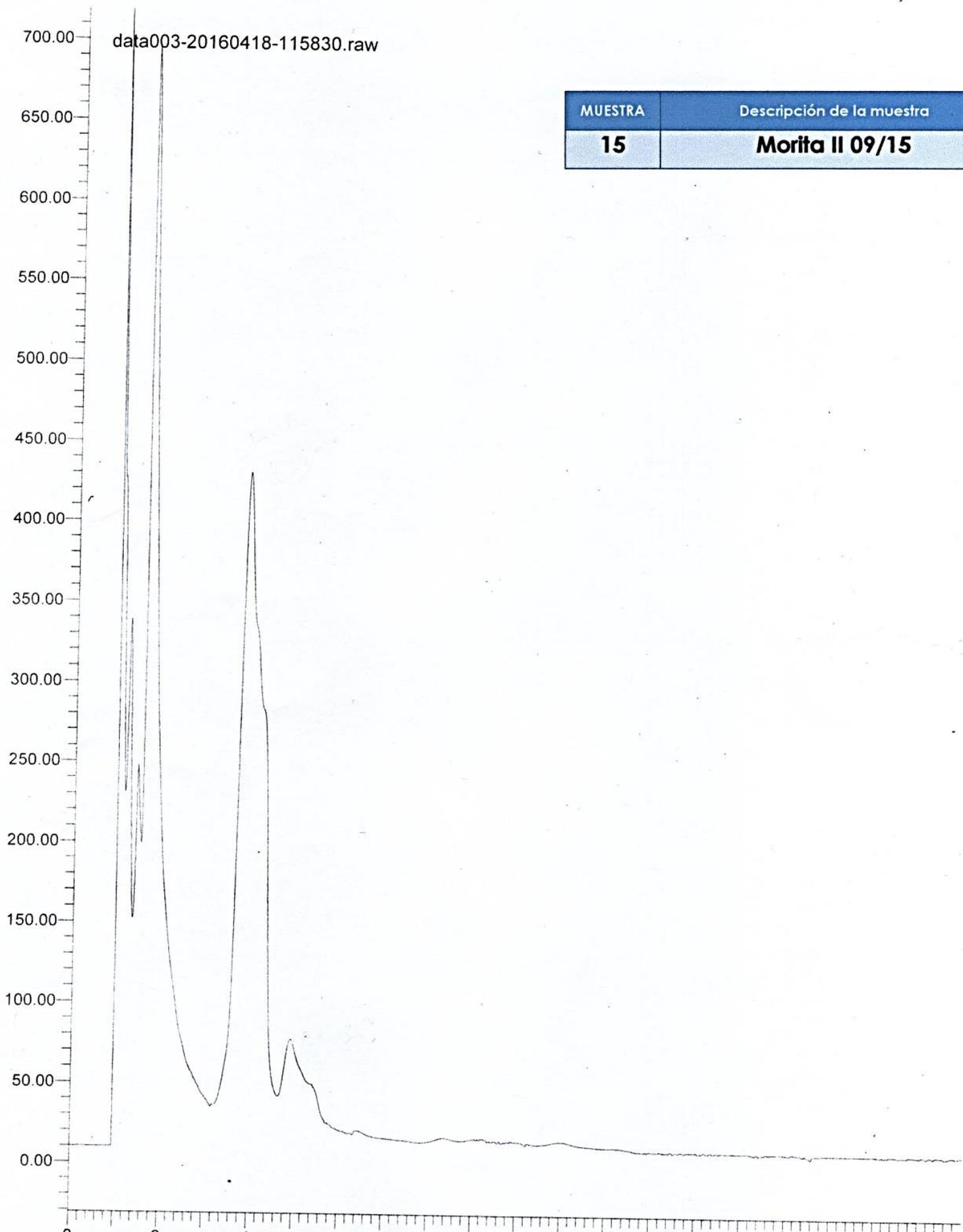
data005-20160519-143222.raw



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|---------------------------|
| 14 | Morita II 06/15 |

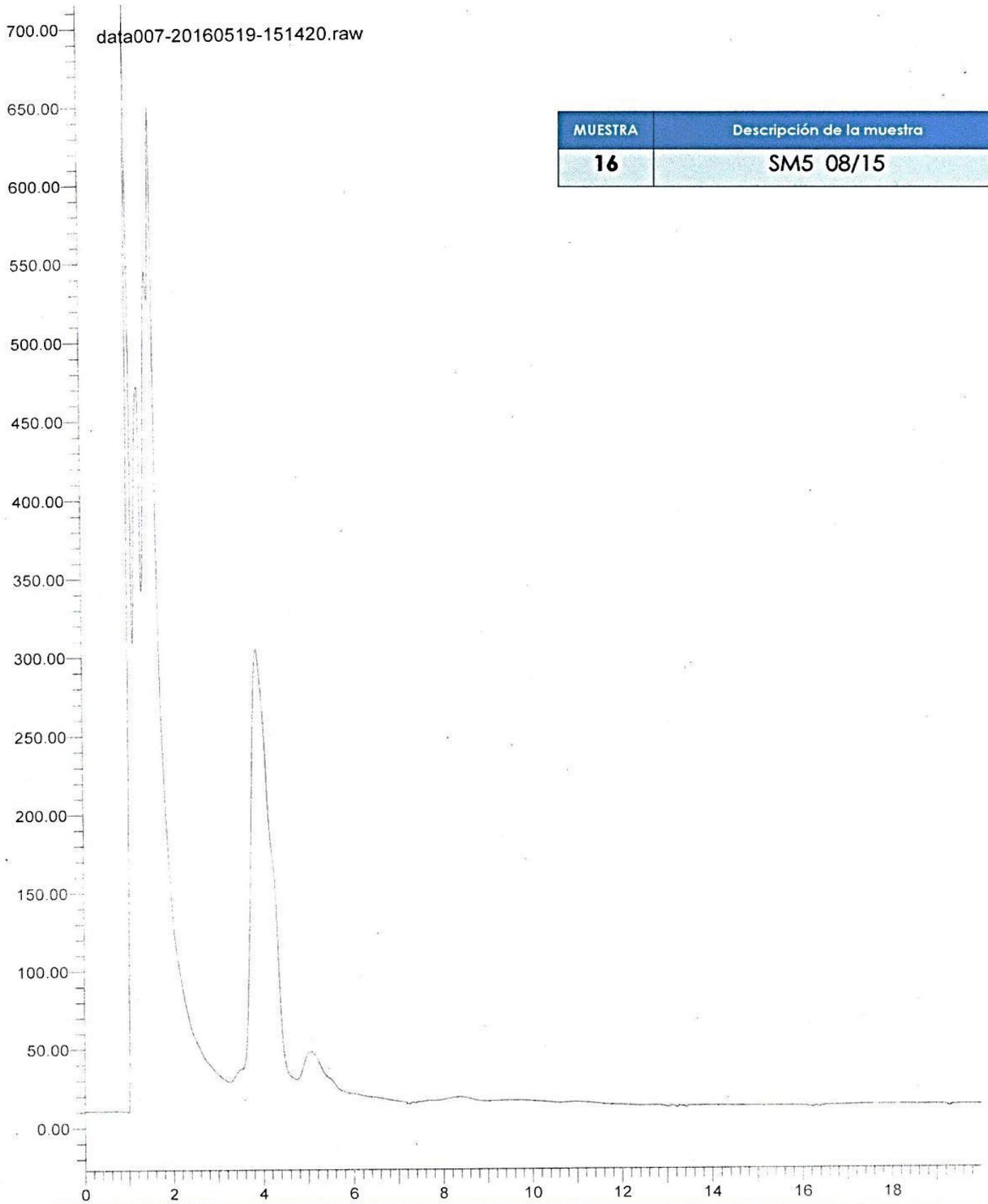
| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 14 | Morita II 06/15 | 12 | 60 | 1.85 | 360 | 10 |

data003-20160418-115830.raw



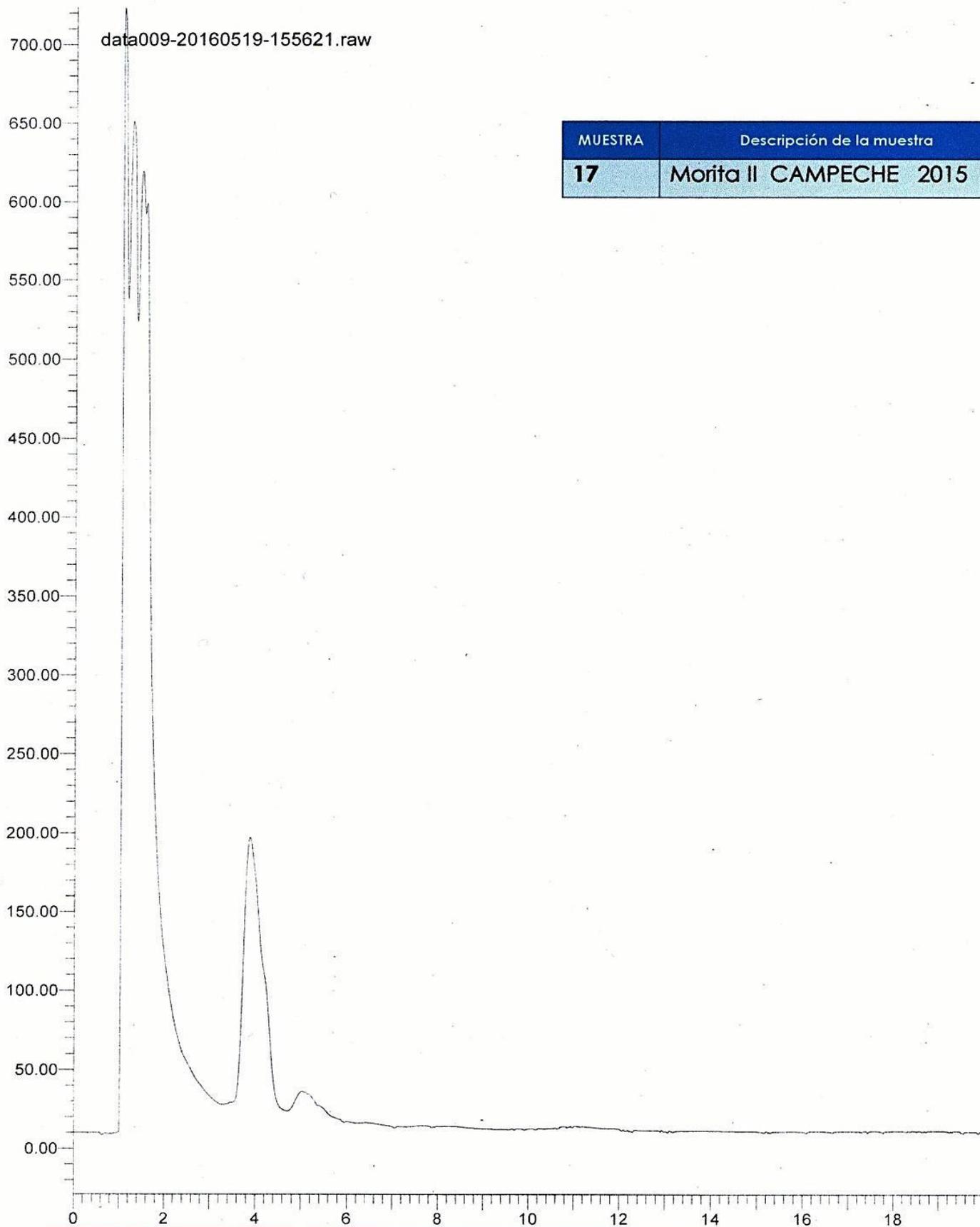
| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|---------------------------|
| 15 | Morita II 09/15 |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 15 | Morita II 09/15 | 12 | 70 | **2.16 | 430 | **1.35 |



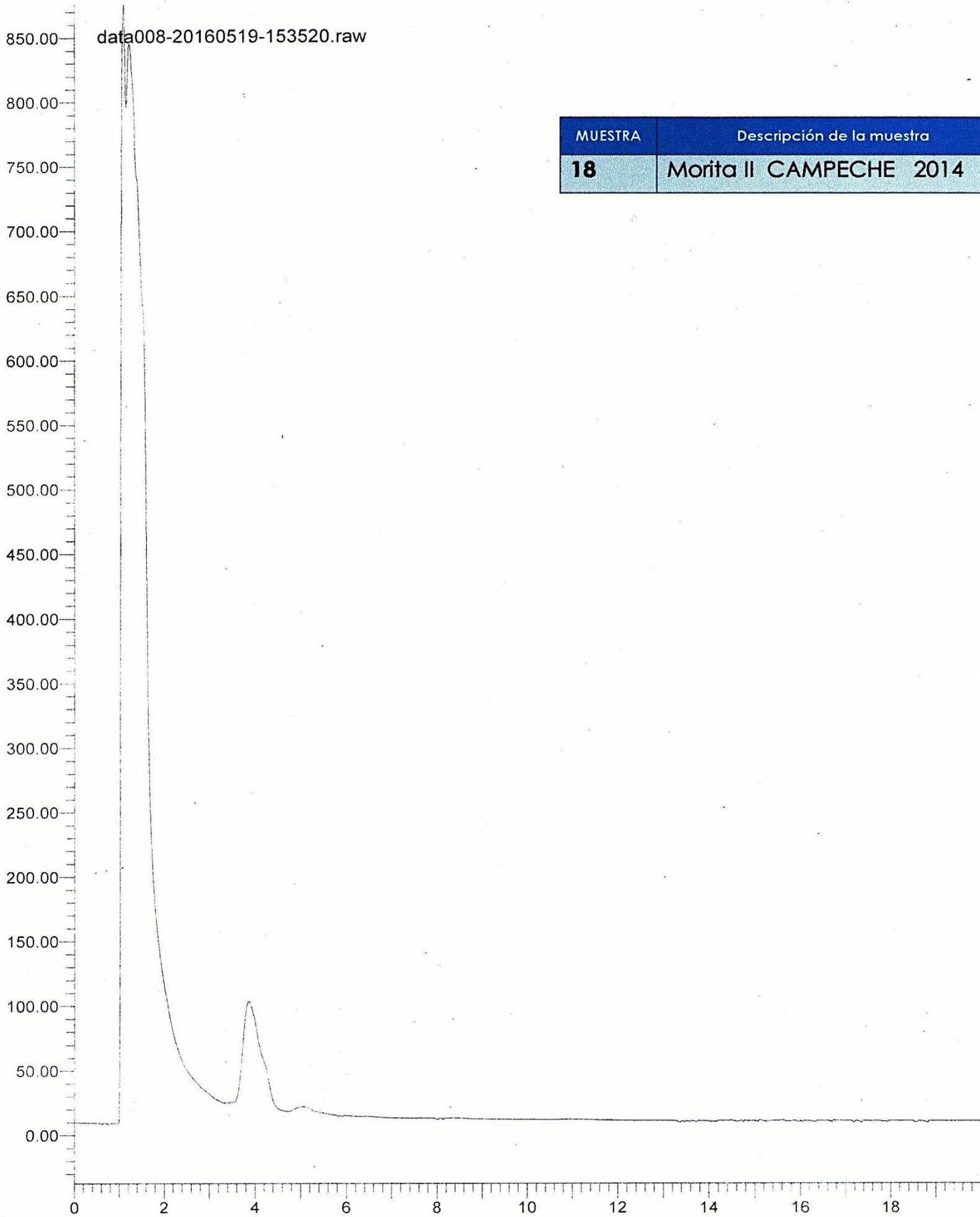
| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|---------------------------|
| 16 | SM5 08/15 |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 16 | SM5 08/15 | 15 | 49 | 1.89 | 302 | 10.5 |



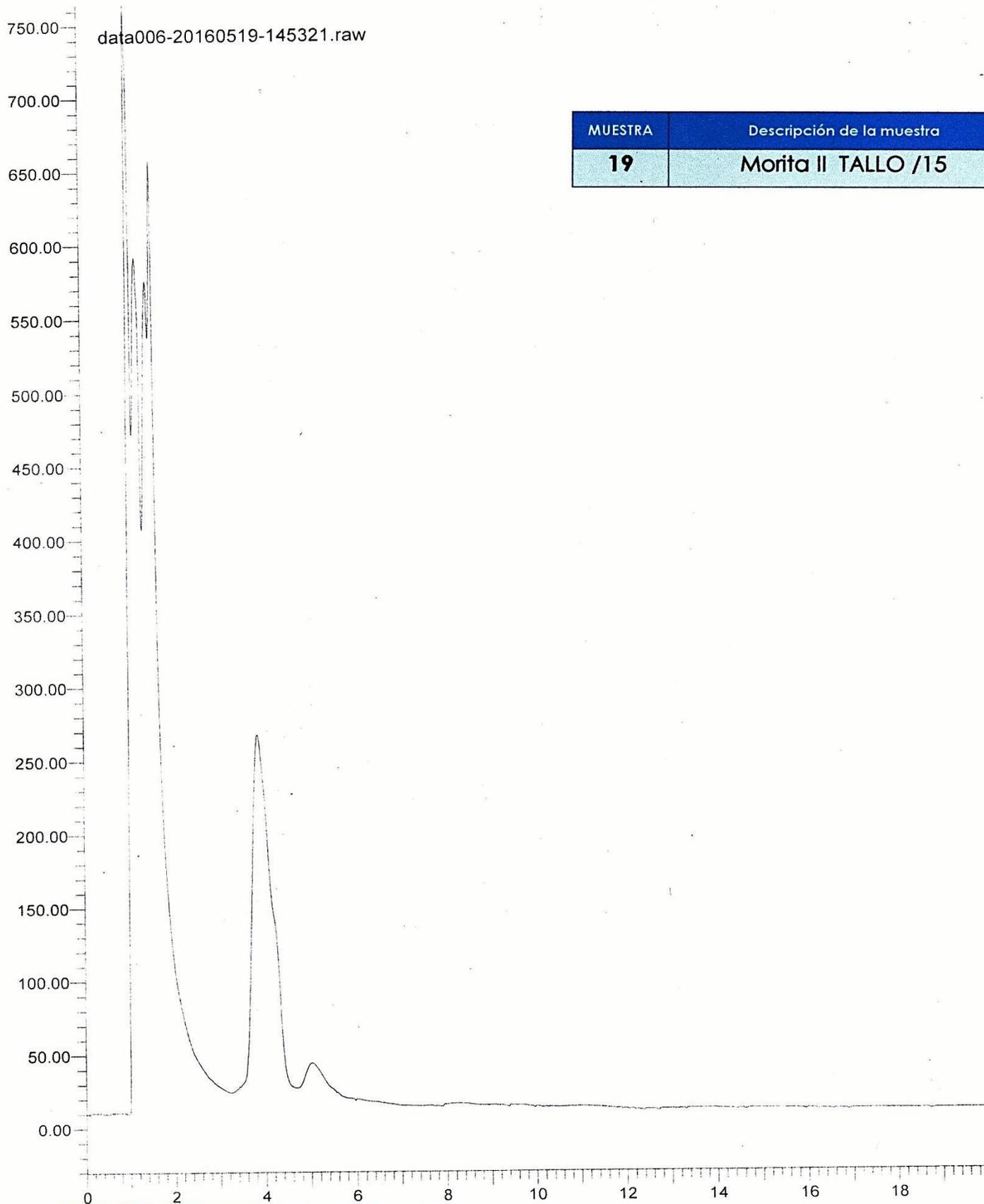
| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|--------------------------------|
| 17 | Morita II CAMPECHE 2015 |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 17 | Morita II CAMPECHE 2015 | 20 | 32 | 1.65 | 195 | 9.03 |



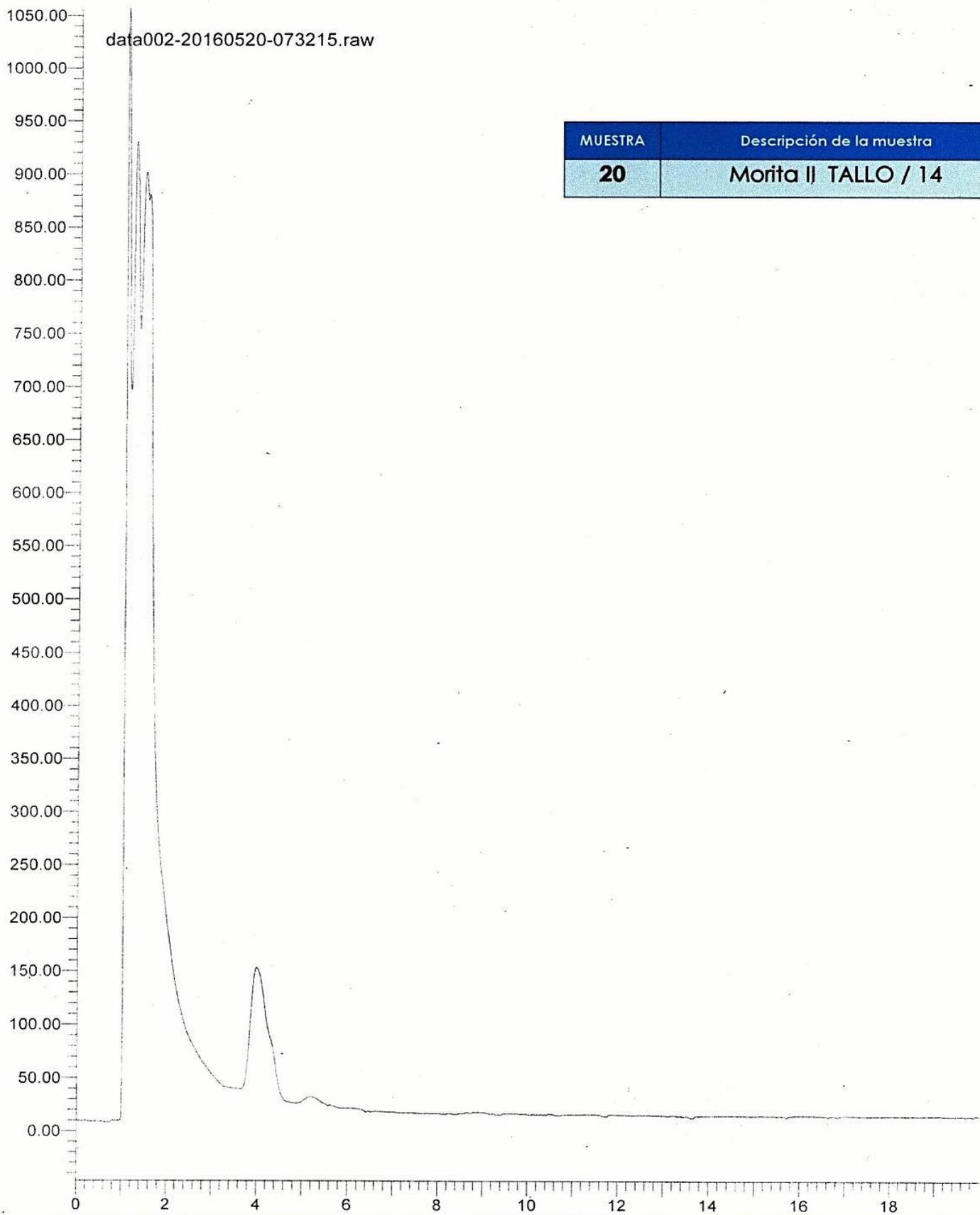
| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|--------------------------------|
| 18 | Morita II CAMPECHE 2014 |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|--------------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 18 | Morita II CAMPECHE 2014 | 21 | 20 | 1.08 | 100 | 4.86 |



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|----------------------------|
| 19 | Morita II TALLO /15 |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|----------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 19 | Morita II TALLO /15 | 16 | 43 | 1.77 | 265 | 9.81 |

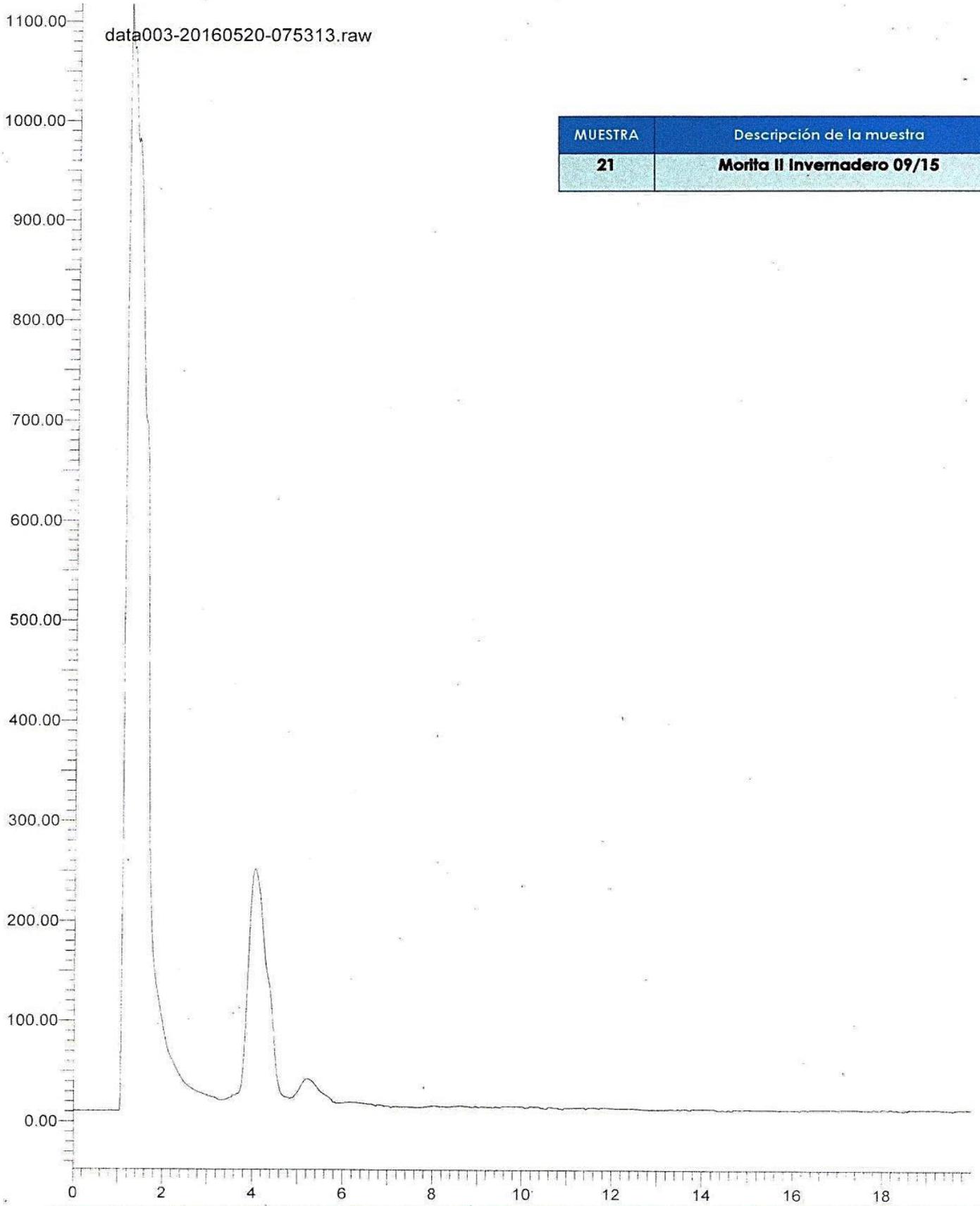


data002-20160520-073215.raw

| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|-----------------------------|
| 20 | Morita II TALLO / 14 |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 20 | Morita II TALLO / 14 | 13.3 | 30 | 1.28 | 150 | 4.62 |

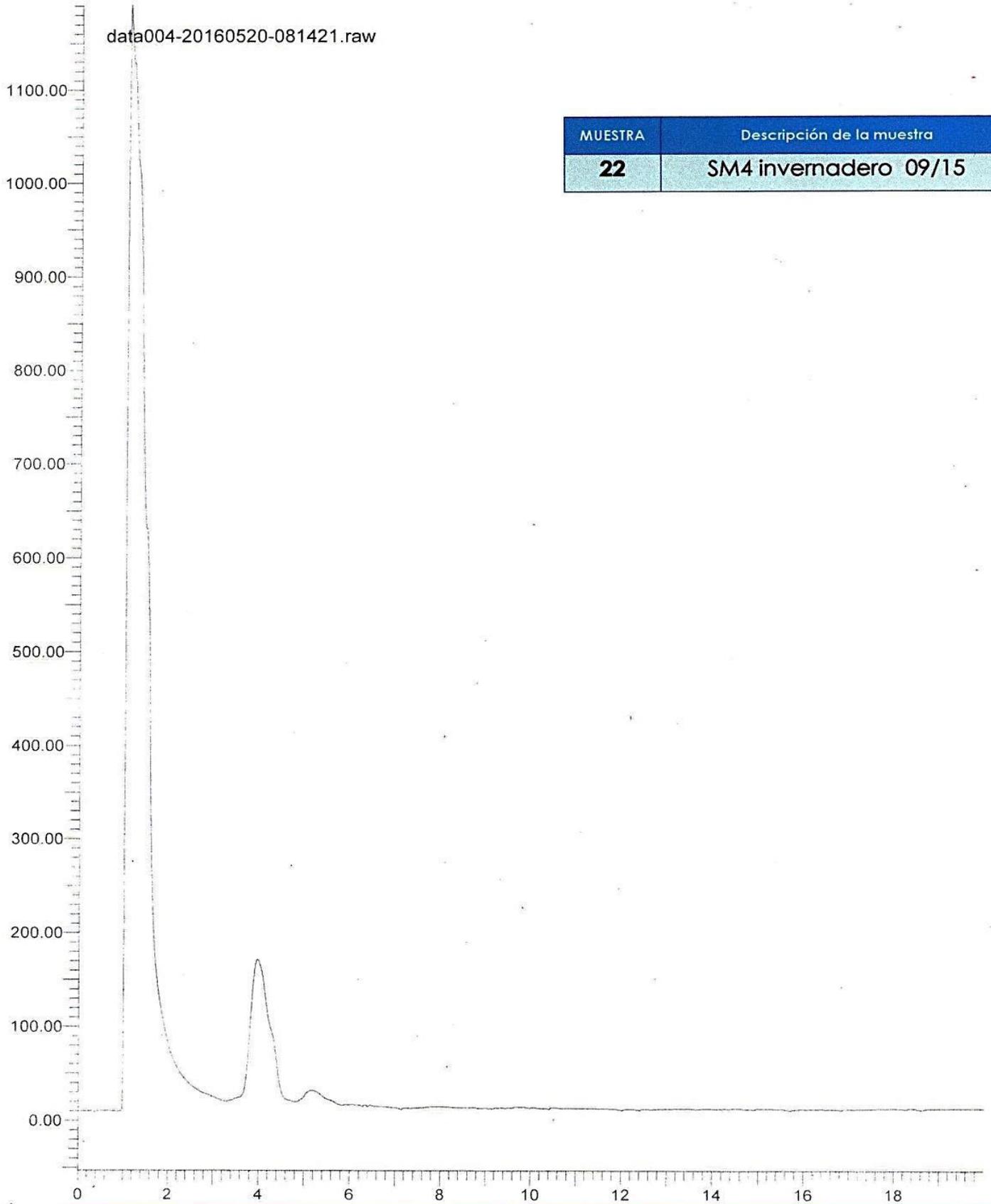
data003-20160520-075313.raw



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|------------------------------------|
| 21 | Morita II Invernadero 09/15 |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 21 | Morita II Invernadero 09/15 | 21.1 | 39 | **2.12 | 250 | **12.2 |

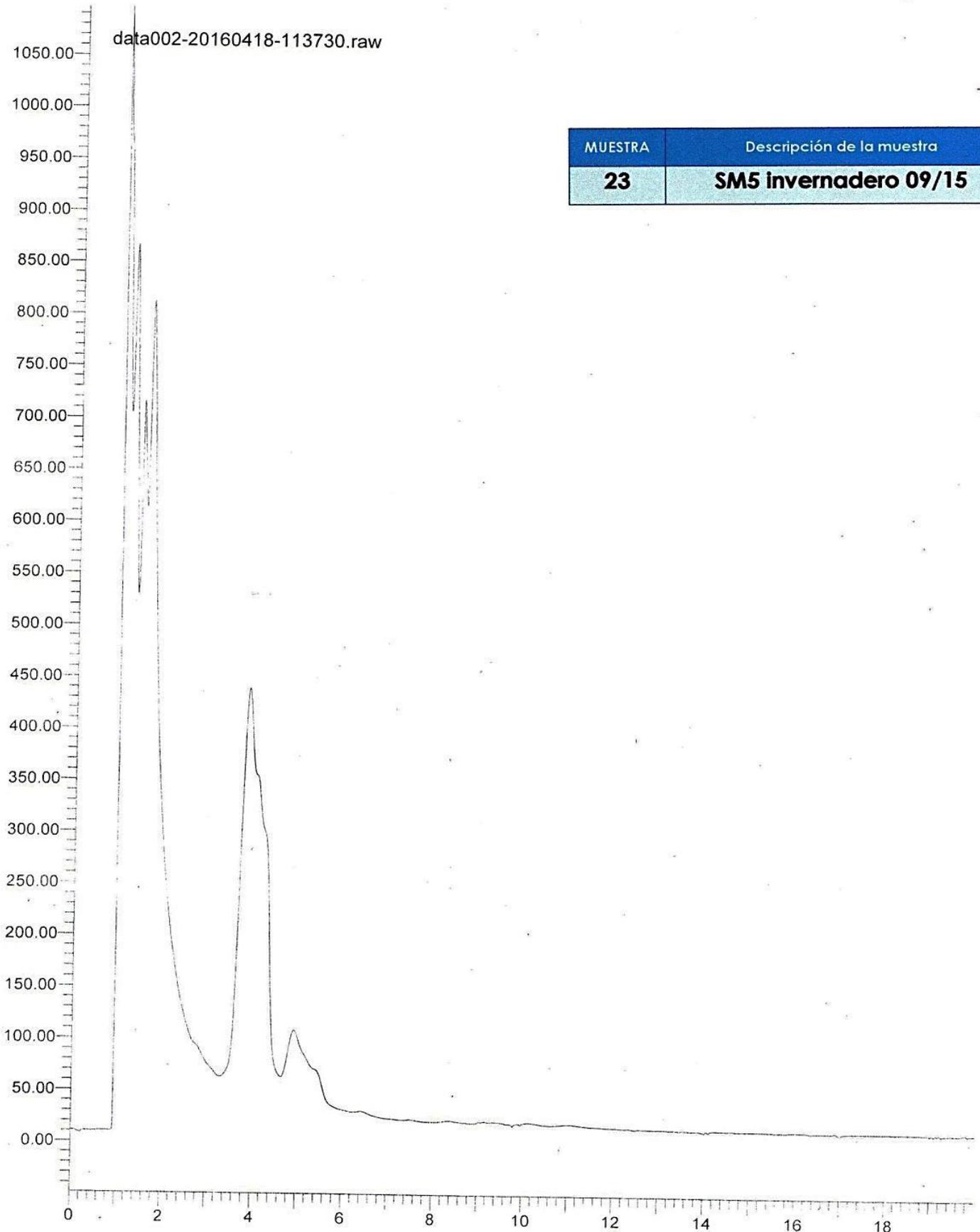
data004-20160520-081421.raw



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|---------------------------|
| 22 | SM4 invernadero 09/15 |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 22 | SM4 invernadero | 26 | 30 | 2.01 | 165 | 9.93 |

data002-20160418-113730.raw



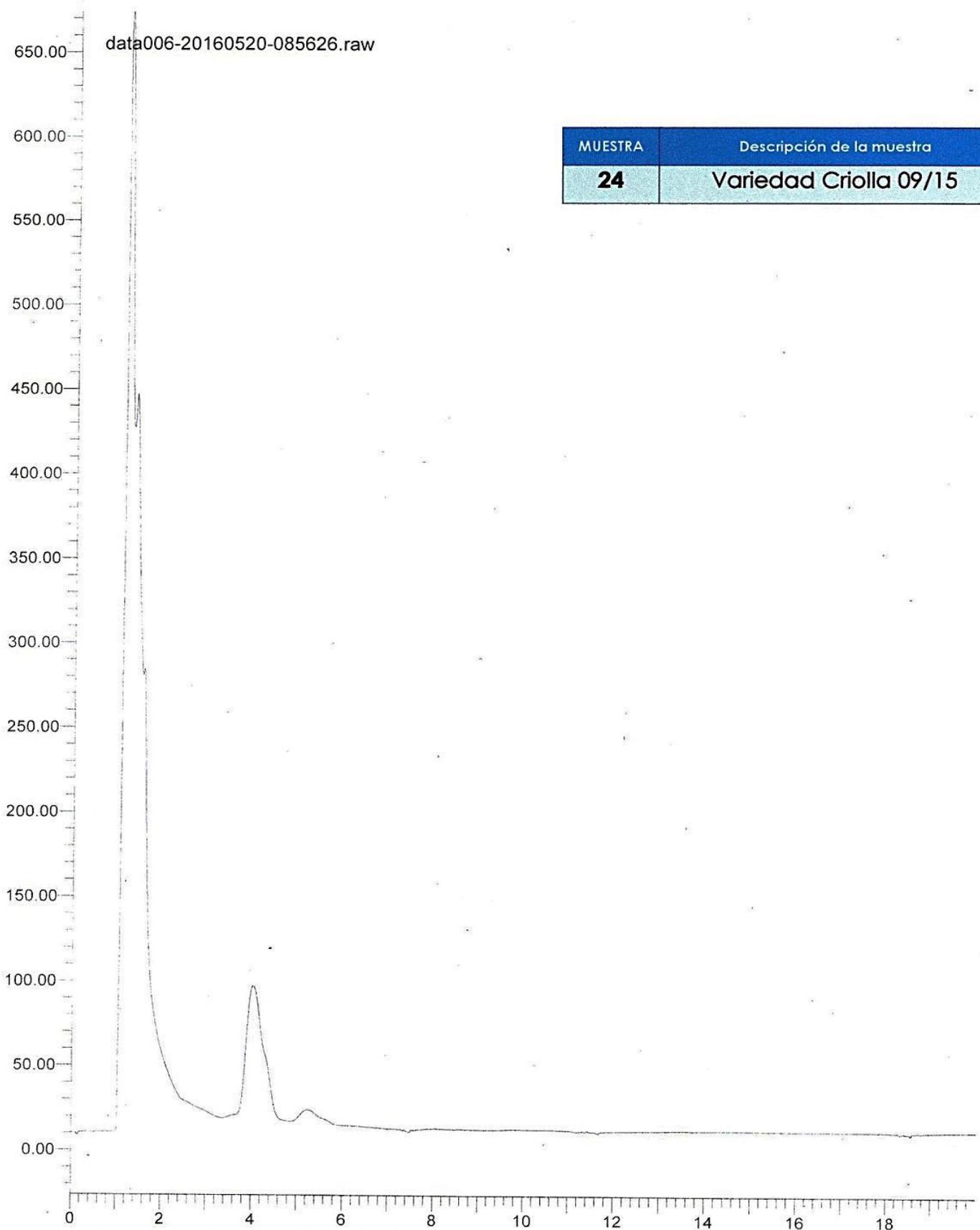
| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|------------------------------|
| 23 | SM5 invernadero 09/15 |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|------------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 23 | SM5 invernadero 09/15 | 11 | 110 | **3.12 | 440 | **11.2 |

18-04-16

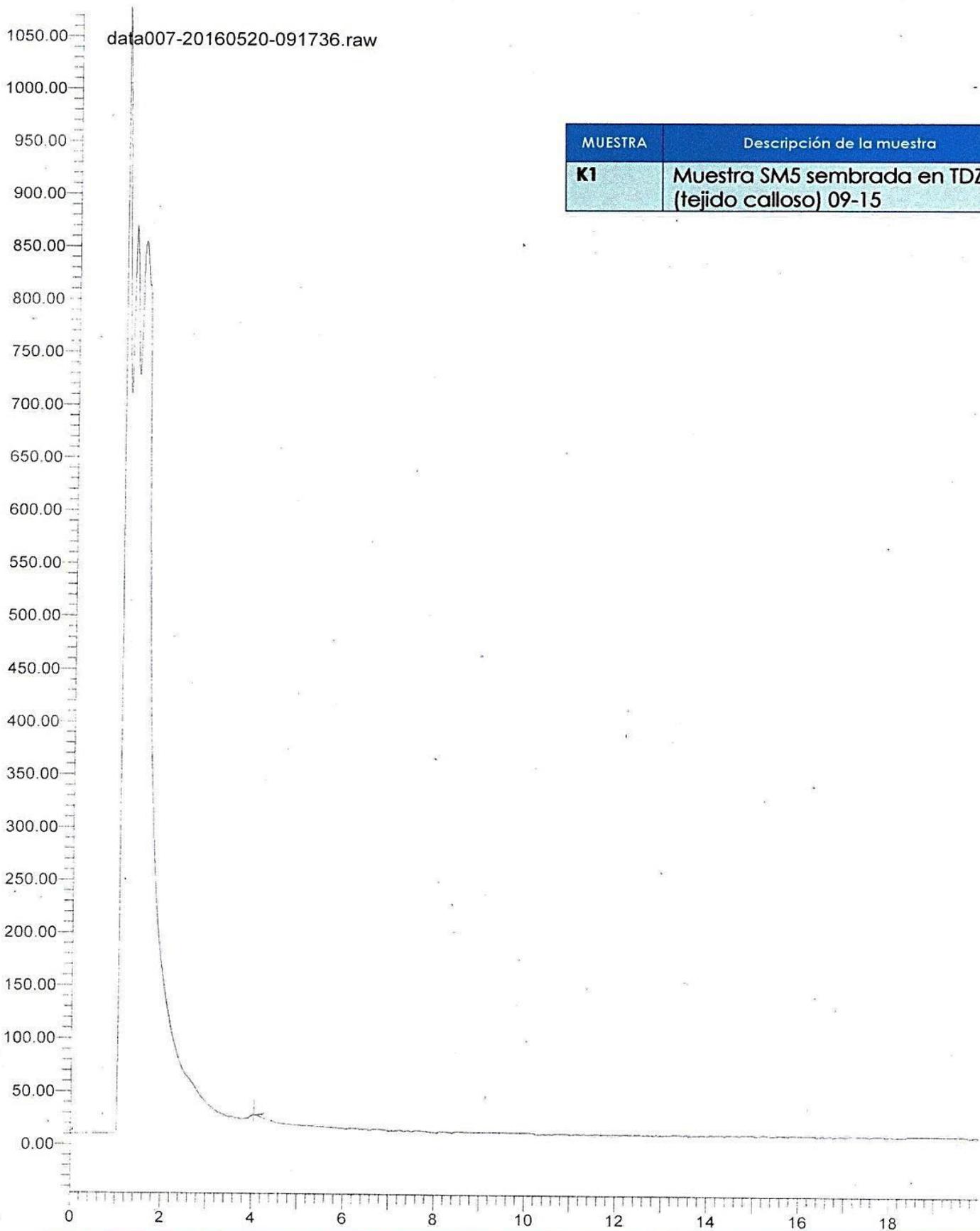
Muestra M Bernardo 1g - Hexano - Butano

data006-20160520-085626.raw



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|---------------------------|
| 24 | Variedad Criolla 09/15 |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 24 | Variedad Criolla 09/15 | 21 | 20 | 1.03 | 100 | 4.86 |

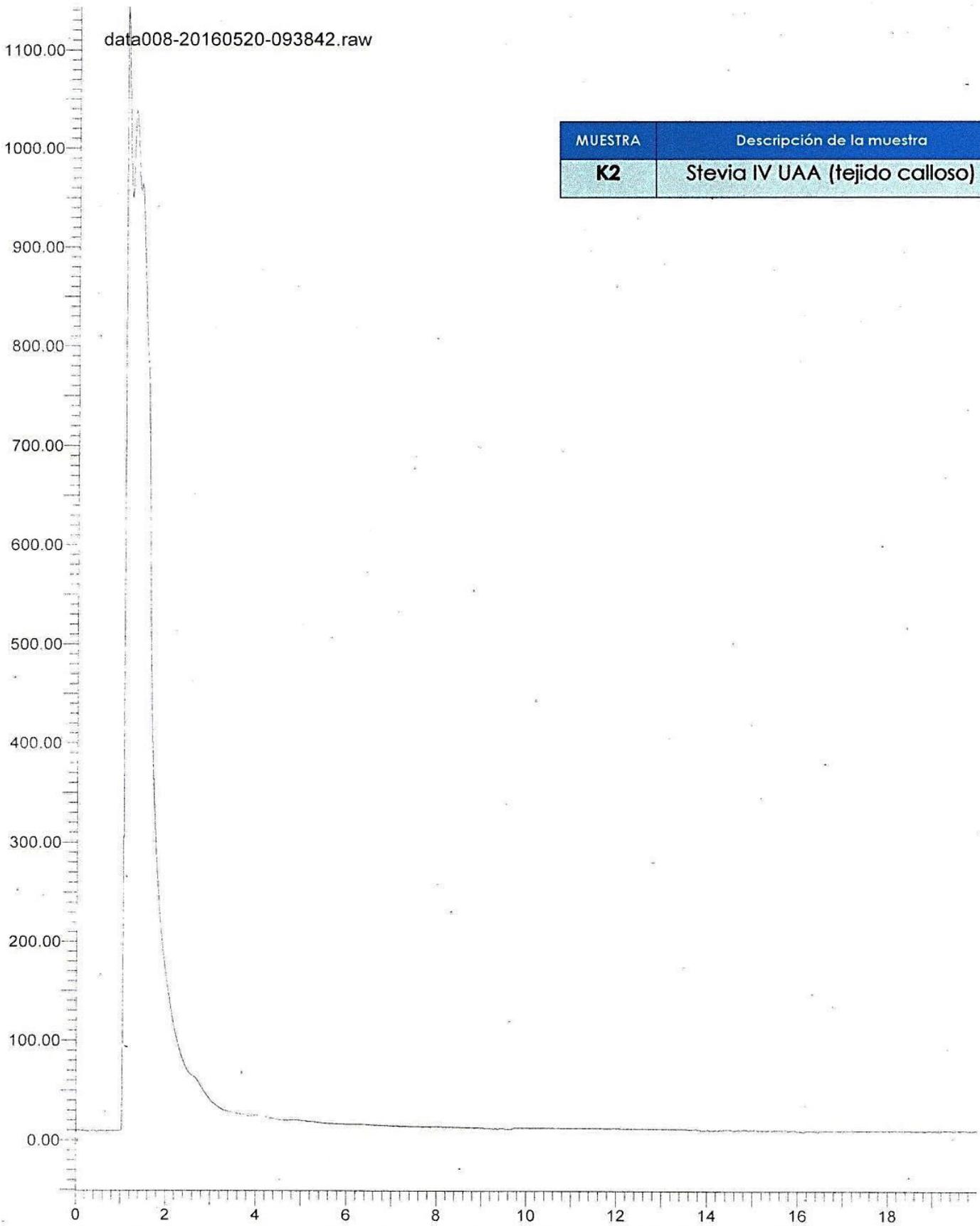


data007-20160520-091736.raw

| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|--|
| K1 | Muestra SM5 sembrada en TDZ (tejido calloso) 09-15 |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|--|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| K1 | Muestra SM5 sembrada en TDZ (tejido calloso) 09-15 | 19.1 | inexistente | 0% | 30 | **0.07 |

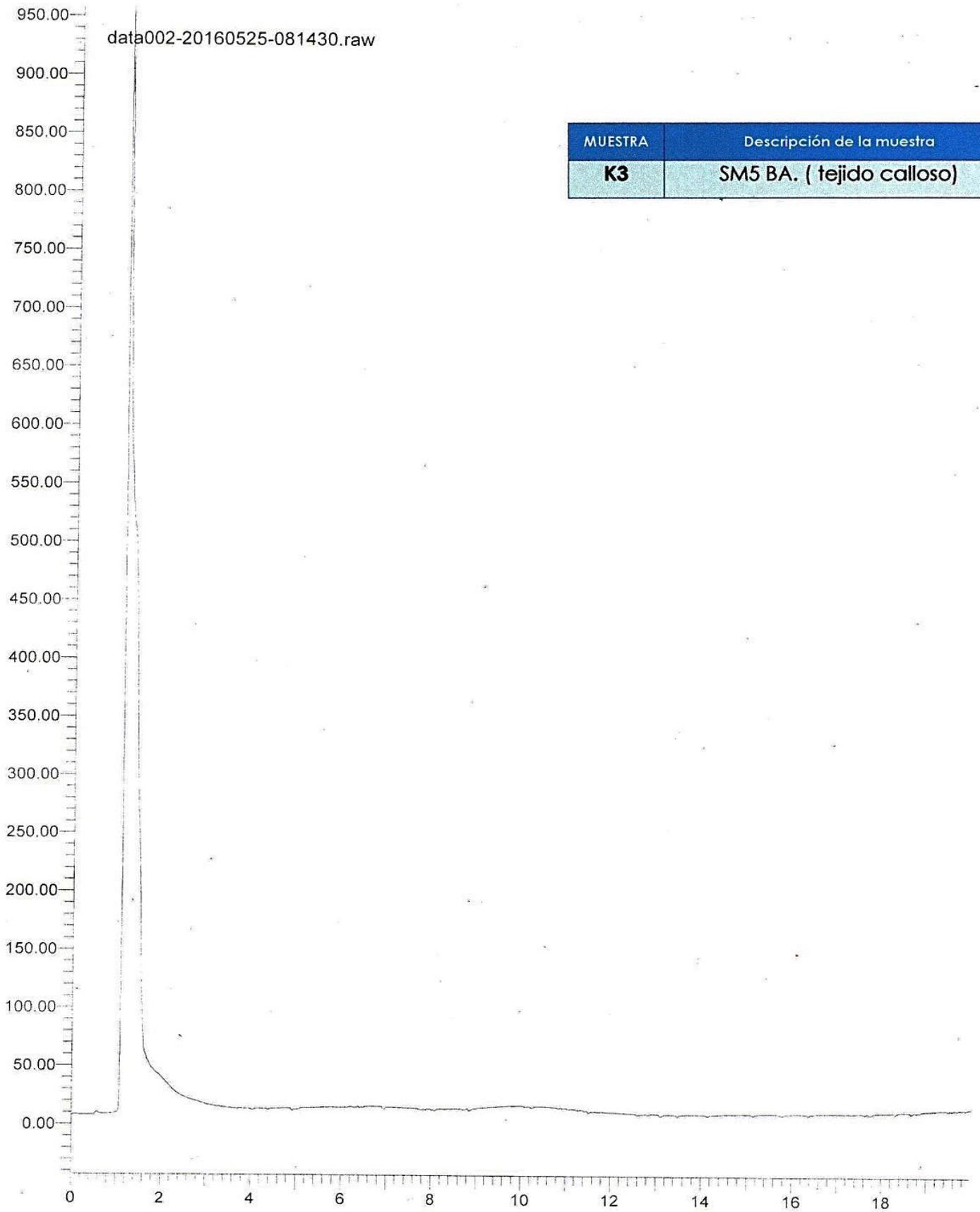
data008-20160520-093842.raw



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|---------------------------------------|
| K2 | Stevia IV UAA (tejido calloso) |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| K2 | Stevia IV UAA (tejido calloso) | 18.4 | inexistente | 0% | 20 | 0.05 |

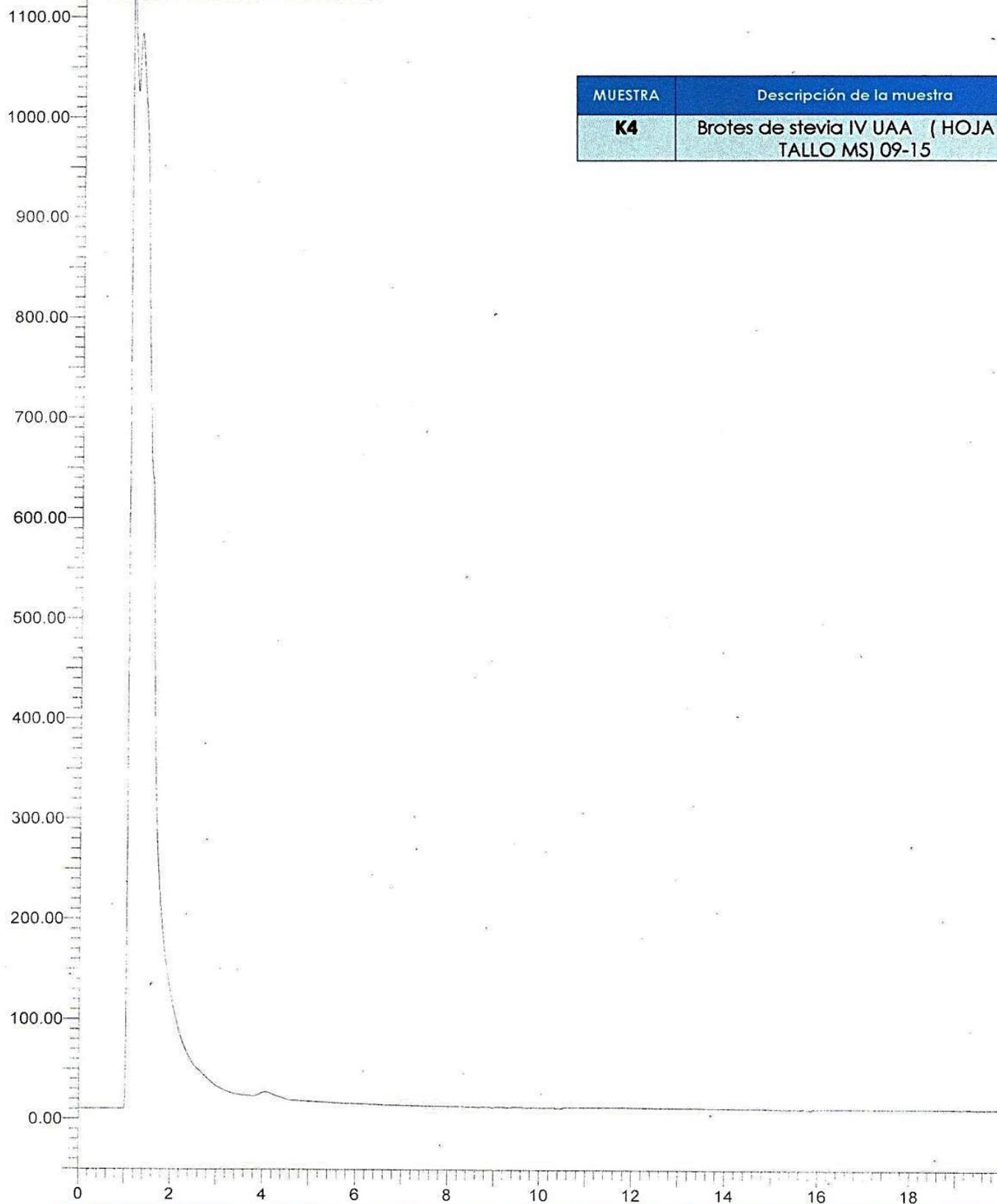
data002-20160525-081430.raw



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|---------------------------------|
| K3 | SM5 BA. (tejido calloso) |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| K3 | SM5 BA. (tejido calloso) | 22.2 | inexistente | 0% | 0 | 0 |

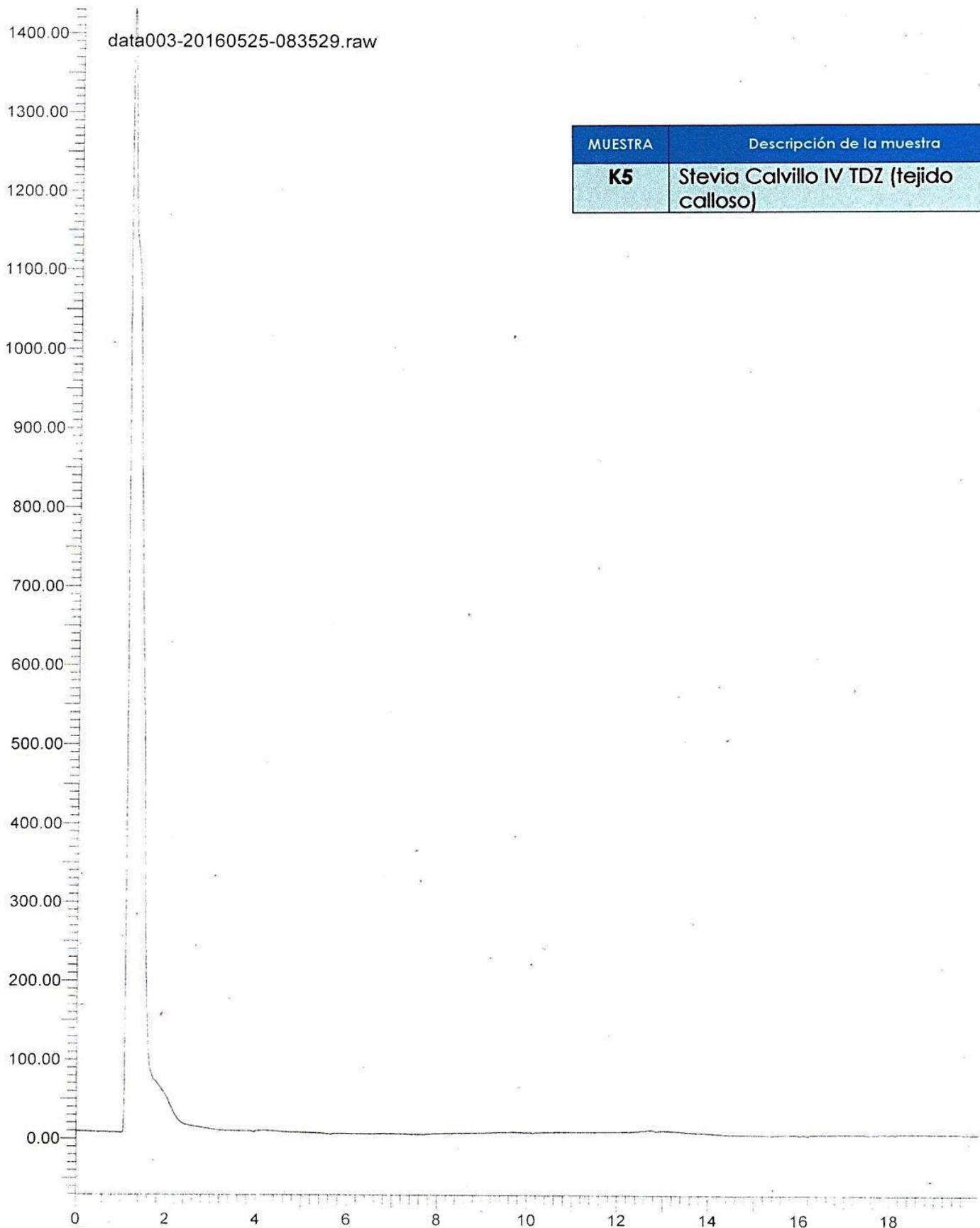
data001-20160520-100705.raw



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|---|
| K4 | Brotos de stevia IV UAA (HOJA Y TALLO MS) 09-15 |

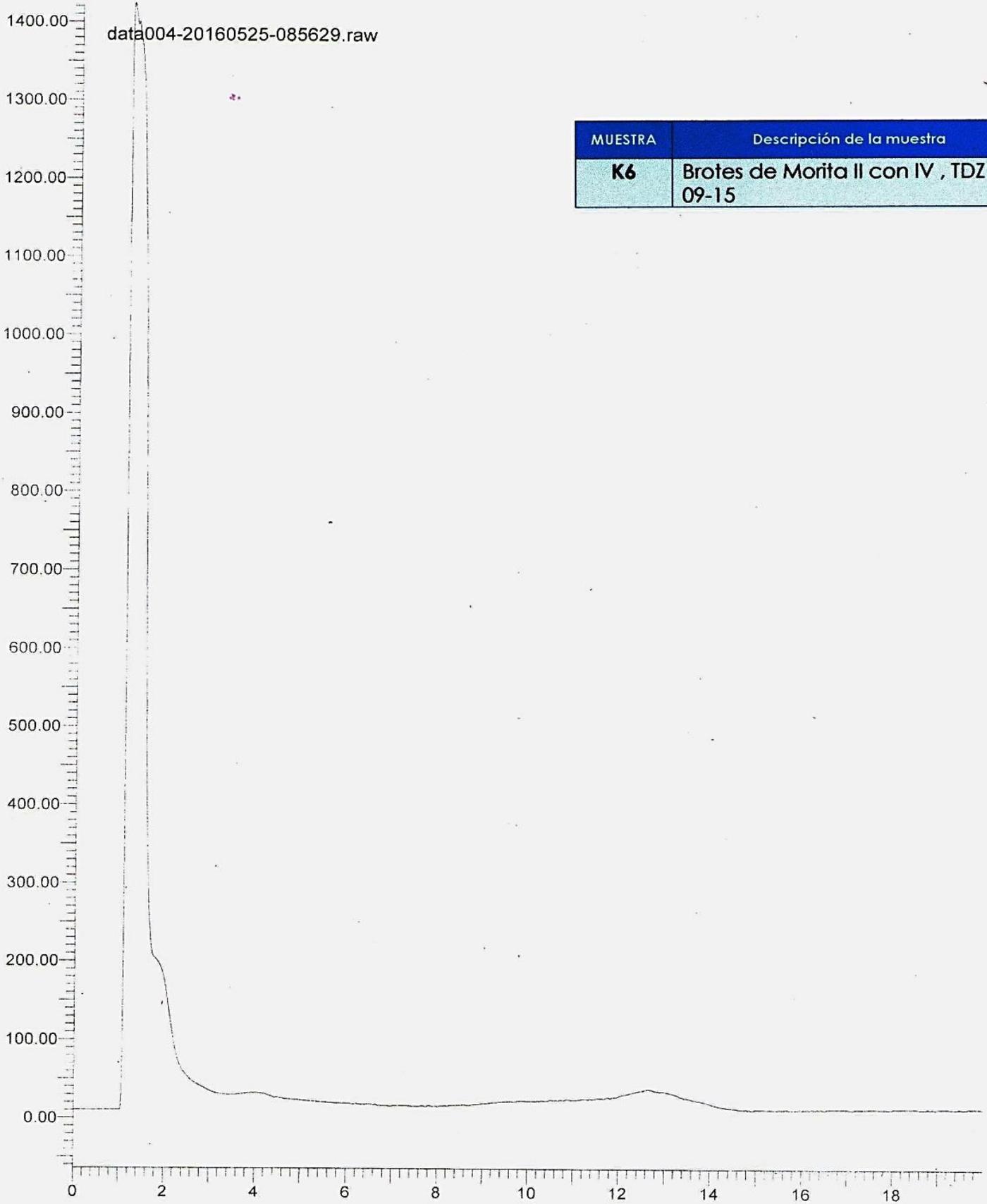
| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|---|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| K4 | Brotos de stevia IV UAA (HOJA Y TALLO MS) 09-15 | 20.3 | inexistente | 0% | 30 | **0.07 |

data003-20160525-083529.raw



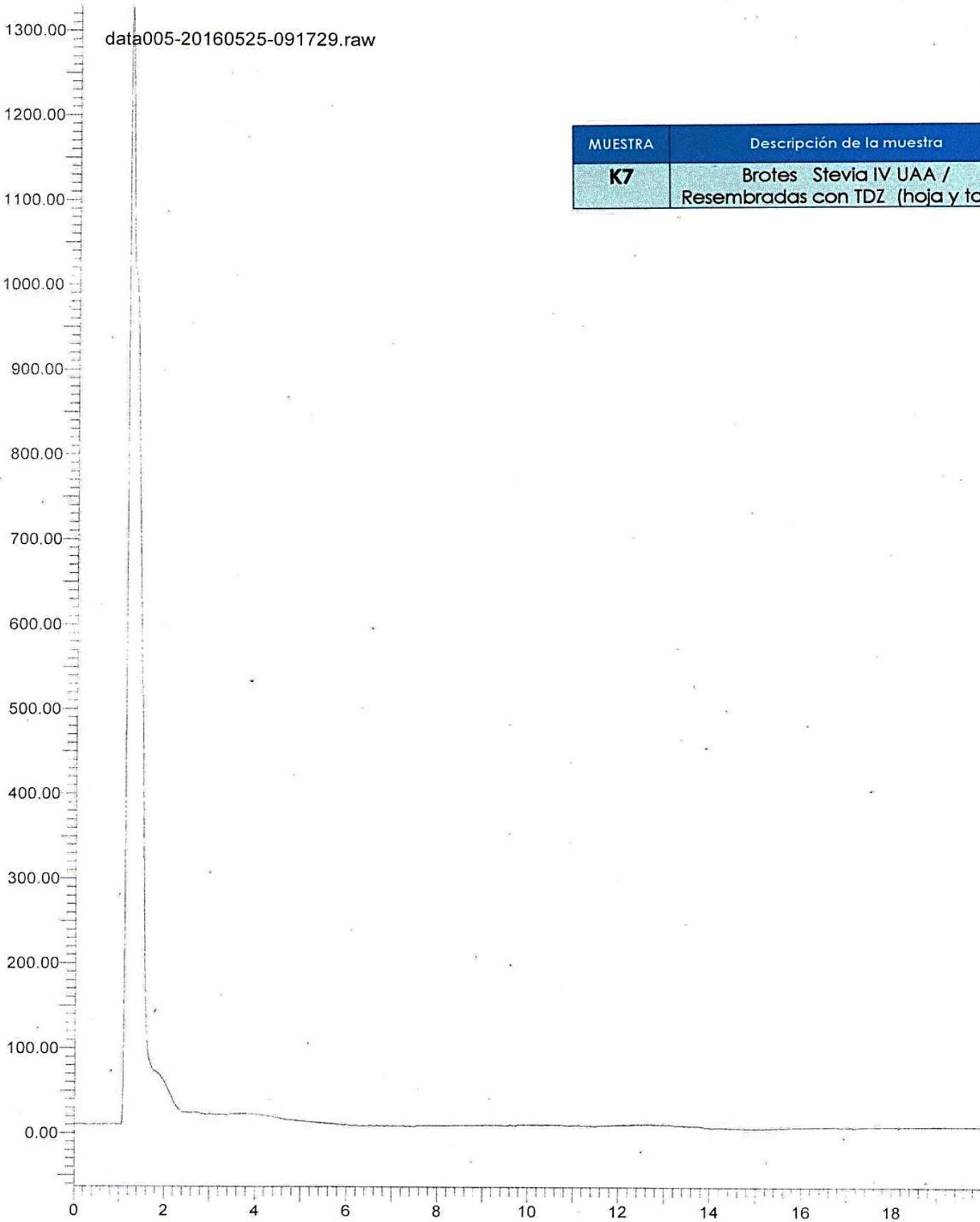
| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|---|
| K5 | Stevia Calvillo IV TDZ (tejido calloso) |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|---|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| K5 | Stevia Calvillo IV TDZ (tejido calloso) | 23.3 | inexistente | 0% | 0 | 0 |



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|--|
| K6 | Brotos de Morita II con IV , TDZ 09-15 |

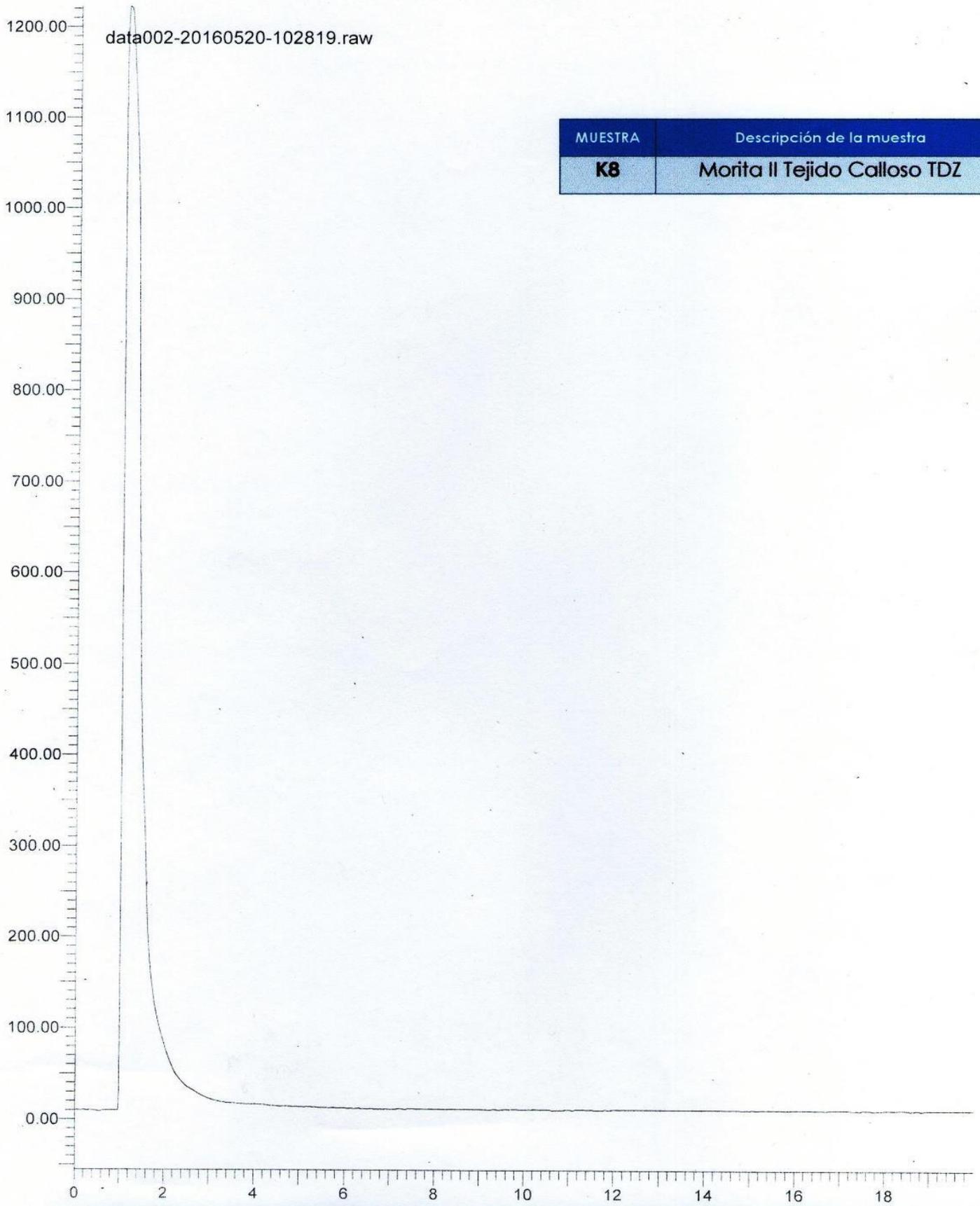
| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|--|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| K6 | Brotos de Morita II con IV , TDZ 09-15 | 25 | inexistente | 0% | 32 | **0.07 |



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|---|
| K7 | Brotos Stevia IV UAA / Resembradas con TDZ (hoja y tallo) |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|---|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| K7 | Brotos Stevia IV UAA / Resembradas con TDZ (hoja y tallo) | 14.3 | inexistente | 0% | 20 | 0.05 |

data002-20160520-102819.raw



| MUESTRA | Descripción de la muestra |
|-----------|-------------------------------------|
| K8 | Morita II Tejido Calloso TDZ |

| MUESTRA | Descripción de la muestra | ml totales de muestra recuperada | MV reportados en HPLC | Concentración STV (%) | MV reportados en HPLC Reb A | Concentración Reb A (%) |
|-----------|-------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|
| K8 | Morita II Tejido Calloso TDZ | 18 | inexistente | 0% | 0 | 0 |