

## **NUEVAS APORTACIONES EN EL CAMPO DE LOS EDULCORANTES PARA PIENSOS: EXTRACTO DE STEVIA REBAUDIANA**

EXCMO. SR. DR. D. PERE COSTA BATLLORI

*Académico Numerario de la RACVE*

8 de Julio de 2013

### **CONSIDERACIONES PERSONALES**

Recordando mi actividad como académico debo confesar que no he sido un asiduo asistente. Son las desventajas de la distancia a pesar del AVE. Pero deseo revivir, salvando la conferencia de ingreso por no tener un carácter eminentemente técnico, mis aportaciones a las actividades científicas de la entidad que han sido «El futuro de los aditivos en alimentación animal. Ácidos orgánicos de cadena corta y aceites esenciales como promotores del crecimiento» en las Jornadas conmemorativas del XXV Aniversario (año 2000), «Antioxidantes naturales en la alimentación animal» que constituyó la conferencia inaugural del curso 2003-2004 y «Edulcorantes en alimentación animal. Últimas tendencias» en una sesión cronológicamente anterior (1995) pero que he colocado en último lugar por razones obvias de similitud temática con mi intervención en el día de hoy.

En esta última señalaba el interés de los edulcorantes en determinados piensos, sus características ideales y el uso inicial de la sacarosa. Continuaba con unas referencias a la sacarina, taumatina, aspartame y acesulfame, con las debidas indicaciones sobre la legislación de la Unión Europea, para dedicar mi intervención a la neohesperidina dihidrochalcona que hacia escaso tiempo había conseguido la correspondiente autorización para su empleo.

Solo hacer un inciso en el sentido de que con el empleo de la neohesperidina se abría la posibilidad de avanzar en la complementariedad y potenciación de los edulcorantes mediante la formulación conjunta de los caracterizados por tener un perfil de edulcoración corto o con sabor metálico residual y los de perfil prolongado y persistente.

Antes de entrar en el tema de hoy cabe recordar la diferencia entre el número de edulcorantes permitidos en la alimentación humana (acesulfame, aspartamo, ácido ciclámico, sacarina, taumatina, neohesperidina) y el escaso número de los autorizados para alimentación animal (sacarina, neohesperidina, *Stevia rebaudiana* con autorización en trámite), aunque naturalmente no vamos a entrar en el tema.

También deseo explicar mi reiterado interés en los productos naturales sobre los que han versado anteriores intervenciones en esta Academia y con ello nadie extrañará que mi actual despedida sea una referencia a edulcorantes naturales y concretamente a la *Stevia rebaudiana*.

## CONSIDERACIONES GENERALES

Las plantas del género *Stevia* pertenecen a la familia de las Astéreas, con un elevado número de especies descritas. Son originarias de suelos arenosos de América del Sur (Brasil, Paraguay), Centroamérica, México y ciertas zonas de EE.UU. (Arizona, Nuevo México, Texas). La primera mención de las mismas se debe al español Petrus Jacobus Stevus (1500-1556). Originariamente los autóctonos conocían la llamada «kaájeé» o planta dulce a la que el suizo Mario Bertoni (1857-1929) denominó «*Eupatorium bertoniana*». Posteriormente el científico guaraní Ovidio Rebaudi (1860-1931) publicó un completo estudio de la misma y le dio el nombre de *Stevia rebaudiana* con el que se la conoce.

Hoy su cultivo se ha extendido prácticamente en toda América, China, Japón, África y Europa meridional.

Las hojas de stevia tienen un sabor dulce, 30-45 veces superior a la sacarosa. Las hojas son la parte de la planta con mayor concentración de edulcorantes. Este hecho fue considerado durante años como una curiosidad botánica. Inicialmente se plantearon ensayos para el uso de la planta entera en alimentación animal, en zonas donde crecía libremente.

En este aspecto los trabajos de mayor interés se llevaron a cabo en un estudio conjunto de la universidad de Llorín (Nigeria), Universidad Católica de Lovaina (Bélgica) y Universidad de Lomé (Togo) y en otro, más enfocado a sus micronutrientes, desarrollado por la Universidad de Córdoba (Colombia)

En 1931 Bridel y Lavieille aíslan los glucósidos causantes del sabor dulce, los steviósidos o steviol (steviósido y rebaudiósido que constituyen el 90-95% del extracto junto con el rubusósido, steviobiósido y otros en menor presencia. El steviol alcanza un grado de edulcoración entre 250 y 300 veces más dulce que la sacarosa y su utilidad inmediata se centró en su inocuidad para diabéticos, su interés para dietas hipocalóricas, la decreciente popularidad de los edulcorantes artificiales y el aumento del interés para los productos naturales.

En cuanto a la producción global de stevia disponemos de los datos de Silvia Andrés referidos a 2006 que aunque no actualizados dan idea del interés del producto.

<i>Productor</i>	<i>Tm. de cristal</i>	<i>Kg. en hojas</i>	<i>Superficie en Ha.</i>
China	2700	27.000.000	10800
Paraguay	200	2.000.000	800
Bolivia	25	250.000	100
Brasil	12,5	125.000	50
Argentina	52,5	525.000	210

## LEGISLACIÓN

Su uso en EE.UU. estuvo prohibido hasta 1995 en que se aprobó su venta aunque solo en tiendas naturistas. En 2008 la FDA autorizó el steviol extraído de la stevia como edulcorante natural en alimentos y bebidas. Coca-Cola y Cargill obtuvieron 24 patentes de *Rebiana*, en forma de derivados de la stevia. En Europa no está permitida la comercialización de la planta y parece va por el buen camino la regulación del uso del extracto.

En cuanto a su uso en alimentación animal y en el momento de redactar esta información el extracto de *Stevia rebaudiana* se halla en el Anexo I del *Register of Feed Additive*, conforme al Reglamento (CE) nº 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiem-

bre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal (L 268/29, 18.10.203), dentro de la categoría 2, grupo funcional b), subclasificación como producto natural botánicamente definido y pendiente de su revaluación mediante reglamento específico desde 07.11.05 como aromatizante.

Existe preocupación en los medios ecologistas por el empleo de stevia como OGM. Con ello se pretende conseguir más producción (existe falta de tierra cultivable a nivel mundial) y fijar más homogeneidad en sus características de composición.

El producto fue rechazado inicialmente por el hecho de que la población india guaraní usaba la stevia para el control de la fertilidad en las mujeres con el uso de infusiones concentradas y se temían efectos negativos que produjeran infertilidad. También se temió presentara genotoxicidad. J. Kuc (Purdue, 1968) inició la discusión señalando una reducción de la fertilidad en ratas de hasta un 79% a la que siguieron, en el mismo sentido, los estudios de Melis en ratas macho (Universidad de Sao Paulo, 1999) pero usando muy altas dosis. Hoy está reconocida la ausencia de efectos no solo sobre la reproducción sino también como cancerígeno o mutagénico.

## GLUCÓSIDOS DE STEVIOL

No nos adentramos en la composición nutricional de la planta, limitándonos a citar que aporta un 16% de proteína bruta, 2.6% de grasa bruta, 6.8% de fibra bruta y que el 65.8% de la grasa bruta está constituida por ácidos grasos insaturados. Si se desea se pueden hallar más datos en la bibliografía.

Las moléculas responsables del poder edulcorante de la stevia son los glucósidos de diterpeno, sintetizados a partir del mevalonato a través de la misma ruta que el ácido giberélico.

Los dos glucósidos fundamentales son el steviósido (110-270 veces más dulce que el azúcar) y el rebaudiósido (180-400 veces más dulce que el azúcar).

Ambos se presentan en forma de polvo cristalino blanco, siendo un producto natural al 100%, acalórico, carente de sabor metálico y con aspectos y efectos favorables para la salud humana en los que ahora no entramos. Insistimos y lo reiteraremos más adelante en que no es cancerígeno ni mutagénico.

La síntesis de los glucósidos de diterpeno ha sido bien estudiada así como las enzimas que intervienen en la misma pero dado el carácter práctico de esta exposición remitimos al interesado a la bibliografía correspondiente.

## INFORME DE LA EFSA

Para centrar el tema resulta imprescindible referirse a las opiniones de la EFSA (EFSA, 2010, 2011) y del que es preciso presentar un breve resumen. Es necesario hacer constar que se refiere exclusivamente a la alimentación humana.

Los glucósidos de staviol, steviósido y rabaudiósido, constituyen una mezcla que debe no ser inferior al 95% de los mismos. Aparte pueden estar presentes pequeñas cantidades de rabaudiósido A, B, C, D, E y F, steviolbíosido, rubusósido y dulcósido.

La EFSA ha fijado finalmente sus características cualitativas y cuantitativas solo con ligeras variaciones en relación a estudios previos que hemos referenciado y por ello las señalamos por su importancia futura.

El producto es de color blanco o ligeramente amarillento, sin olor o con aroma característica y con un poder edulcorante alrededor de 200-300 veces superior al de la sucrosa. Seguidamente se presentan las denominaciones de dichos glucósidos, números de CAS, fórmulas

<i>Denominación</i>	<i>Nº CAS</i>	<i>Formula</i>	<i>Peso molecular</i>	<i>Factor de conversión</i>
Steviol	471-80-7	$C_{20}H_{30}O_3$	318.45	1.00
Steviosido	57817-89-7	$C_{38}H_{60}O_{18}$	804.87	0.40
Rabaudiosido A	58543-16-1	$C_{44}H_{70}O_{23}$	967.01	0.33
Rabaudiosido C	63550-99-2	$C_{44}H_{70}O_{22}$	951.01	0.34
Dulcosido A	64432-06-0	$C_{38}H_{60}O_{17}$	788.87	0.40
Rubusosido	63849-39-4	$C_{32}H_{50}O_{13}$	642.73	0.50
Steviolbíosido	41093-60-1	$C_{32}H_{50}O_{13}$	642.73	0.50
Rebaudiosido B	58543-17-2	$C_{38}H_{60}O_{18}$	804.87	0.40
Rebaudiosido D	63279-13-0	$C_{50}H_{80}O_{28}$	1129.15	0.29
Rebaudiosido E	63279-14-1	$C_{44}H_{70}O_{23}$	967.01	0.33
Rebaudiosido F	438045-89-7	$C_{43}H_{68}O_{22}$	936.99	0.34

moleculares, pesos moleculares y factores de conversión para el cálculo del steviol-equivalente.

Las formulas estructurales de dichos glucósidos se encuentran en la evaluación de JECFA (Benford *et al.*, 2006).

También se dispone de las especificaciones químicas señaladas por JECFA (Joint FAO-WHO Expert Committee on Food Additives) en su 69 meeting y aceptadas en el Reglamento UE junto con el método de análisis correspondiente (Benford *et al.*, 2006). Para no alargar excesivamente la intervención exponemos el siguiente resumen del Reglamento (UE) n° 231/2012 de la Comisión de 9 de marzo de 2012 por el que se establecen especificaciones para los aditivos alimentarios que figuran en los anexos II y III del Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo (DOUE n° 83; 22.3.2012).

JECFA (Benford *et al.*, 2006) indica que el aditivo puede contener otras sustancias vegetales o residuales del procesamiento pero que pueden considerarse como insignificantes.

El proceso de obtención de los glucósidos se inicia con una extracción acuosa de la planta, su purificación mediante intercambio iónico y re-cristalización con metanol o etanol.

El producto es estable, especialmente a pH entre 4 y 6 y temperaturas entre 5 y 25°, siendo además fotoestable. Como producto de

<i>Parámetro</i>	<i>Especificaciones</i>
Análisis	No menos de 95% de glucósidos de steviol en sustancia seca
Solubilidad	Soluble en agua
Steviosido y rebaudiosido A	La mayor concentración corresponde a steviosido y rebaudiosido A
pH	4.5 a 7.0 (1 parte en 100 de solvente)
Cenizas	No más de 1%
Perdida por desecación	No más de 6% (105°C, 2 h.)
Solventes residuales	No más de 200 mg/kg de metanol y no más de 5000 mg/kg de etanol
Arsénico	No más de 1 mg/kg
Plomo	No más de 1 mg/kg

degradación se forma el isómero isosteviol. La concentración de steviol se reduce en una solución acuosa a 100° durante 48 h pero no sufre pérdidas de actividad mantenido durante 4 meses a 4°, 3 meses a temperatura ambiente o 1 mes a 37°. Otros ensayos señalan su estabilidad a 120° durante 1 hora descomponiéndose a partir de los 140°. No se han observado interacciones con otros edulcorantes.

Se proponen los niveles máximos de uso comparándolos con los de aspartamo en el cuadro propuesto por EFSA (2010, 2011). Se refieren a la especie humana con una larga lista de alimentos destinados al hombre y en la que se puede comprobar los bajos niveles de uso recomendado para los glucósidos de steviol en relación a su poder edulcorante. Este cuadro se puede consultar en el documento de EFSA (2011) ya que por su extensión es imposible proyectarlo como deseáramos.

Posteriormente el Reglamento (UE) n° 1131/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a los glucósidos de Esteviol (DOUE n° 295, 12.11.2011) que se refiere a dichas condiciones de utilización para especie humana, con las restricciones pertinentes para las diversas categorías de alimentos. Como en el caso anterior y como consecuencia de su extensión no nos es posible proyectarlo. Actualmente el steviol está permitido en alimentos y bebidas para humanos en Corea, Japón, Argentina, Paraguay, Brasil, China, Rusia, Indonesia, México, Senegal, Tailandia e Israel siendo considerado como GRAS por la FDA desde 2008.

El SFC (Scientific Committee on Food) evaluó el steviósido como no aceptable toxicológicamente desde 1985, pero revisó el tema entre 2000 y 2009 y estableció una IDA de 4 mg/kg pc/día y la AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) aseguró que el producto purificado no presentaba riesgos para el consumidor.

Se ha estudiado *in vitro* el metabolismo del steviósido mediante enzimas digestivos y acción de la microflora cecal, las enzimas no digieren el steviol y la flora cecal (rata y humanos) lo metaboliza a steviol-16,17 alfa epóxido.

En estudios en ratas se comprueba que casi todo el steviol es absorbido después de su administración intracecal. En cerdos, el steviósido es transformado a steviol por las bacterias del colon pero no

se detecta en sangre. En el hombre se excreta por vía renal combinado con el ácido glucorónico.

La administración de concentraciones de 100.000 mg de steviol/kg de dieta a ratas Wistar durante 4 semanas y a concentraciones de 0, 12.500, 25.000 y 50.000 mg/kg de dieta durante 90 días no dieron lugar a mortalidad, síntomas clínicos de toxicidad, cambios clínicos ni hematológicos ni hallazgos patológicos, pero si se presentaron efectos sobre el peso, la ingesta y el índice de conversión.

No se han producido signos de genotoxicidad sobre bacterias, células de mamífero, hámster, linfocitos humanos, ratas, y ratones.

Tampoco se han producido efectos sobre los procesos reproductivos en ratas, conejos, y hámster.

Se dispone de numerosos ensayos efectuados al respecto por la EFSA (2010):

- Toxicidad oral aguda: 5 ensayos.
- Toxicidad en animales de laboratorio con indicación de la NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) aun que no cumplen las especificaciones de JEFCA pero tienen interés práctico: 5 ensayos.
- Toxicidad en animales de laboratorio con indicación de la NOEL que cumplen las especificaciones de JEFCA (Benford *et al.*, 2006): 11 ensayos.
- Estudios sobre genotoxicidad: 75 ensayos.

Con ellos se demuestra la ausencia de problemas relacionados con el empleo de los derivados de la stevia en el hombre y pueden hallarse en la opinión de EFSA (2010). Dichos estudios, que por su extensión tampoco es posible resumir ni proyectar pueden ser de decisivo interés para conseguir la definitiva aprobación del producto.

Pero también cabe referirse a los efectos farmacológicos del steviol y recordar los siguientes ensayos realizados al respecto.

Los glucósidos de steviol pueden, en estudios *in vitro* sobre células pancreáticas aisladas, controlar la secreción de insulina. En animales se ha comprobado dan lugar a una reducción de la glucosa en sangre y ratas obesas aunque este efecto es de limitada relevancia para su empleo terapéutico.



Se ha evaluado *in vitro* que el steviósido inhibe la vasoconstricción causada por la vasopresina en presencia de calcio pero son estudios de limitada relevancia. En animales si se ha observado un efecto antihipertensivo en ratas adultas y también en perros.

En relación a la función renal hay que citar en estudios *in vitro* que interfiere el transporte de aniones en los túbulos renales y en ratas se han observado efectos adversos.

La bibliografía detalla gran número de estudios en humanos de escaso interés para nuestro objetivo pero que sin duda se tendrán en cuenta a efectos de la tarea regulatoria. Citaremos los más importantes:

- Mejora de la secreción de insulina cuando el páncreas no responde a la estimulación de la glucosa si bien los ensayos no son concluyentes.
- En relación a los efectos cardiovasculares/reales se señala un suave a moderado descenso de la hipertensión.
- Existe ensayo que señala da lugar a un significativo descenso del colesterol total.
- En estudios sobre la posible alergenicidad del steviol se señala un posible efecto inmuno-estimulador de los steviosidos.
- Los test para determinar su carcinogenicidad han resultado negativos.

Interesa resaltar que el informe de la EFSA (2010) concluye que los glucósidos de steviol no son carcinogénicos ni genotóxicos, que la NOAEL establecida es del 2.5% de steviósido en la dieta, que es igual a 967 mg de steviósido/kg pc/día, cantidad que se corresponde a 388 mg de steviol equivalente.

La ADI expresada en steviol equivalente se ha fijado en 4 mg/kg pc/día.

## **LA STEVIA COMO EDULCORANTE EN ALIMENTACIÓN ANIMAL**

En la bibliografía consultada solo hemos hallado un ensayo realizado en España, en la Universitat de Lleida, realizado en corderos y en el que se testaban piensos nutricionalmente isoequivalentes con los siguientes aditivos: mezcla de ajo en polvo, canela molida y stevia

molida (A), mezcla de canela molida y stevia (B), mezcla de orégano molido y stevia (C), mezcla de ajo en polvo, canela molida y orégano molido (D) y pienso control (T)

Hubo un mayor consumo de pienso con las mezclas B y C, aunque sin diferencias significativas en los caracteres productivos, no siendo posible llegar a conclusiones debido a las posibles interferencias con los demás aditivos utilizados.

Siriwathananukul y colaboradores de la Universidad Prince of Songkhla (Tailandia) y Munro y col. (2000) afirman que el potencial edulcorante de la stevia en lechones es limitado o es percibido adecuadamente por los lechones.

## **CONSIDERACIONES COMERCIALES**

En el transcurso de esta exposición no nos hemos referido al tema de las sinergias de la stevia con otros edulcorantes. Es una realidad de habrá que demostrar y que tendrá amplia repercusión en alimentación animal.

Pero es necesario referirnos al precio excesivamente elevado que tendrá en el mercado el glucósido con una pureza del 95% normalizado.

La stevia que se usa ahora en piensos suele tener alrededor del 70% más económica pero se ignora si se aprobara.

El producto que se deberá aprobar es el REB-A (E-960) a dosis bajas y considerado aroma.

La idoneidad del nuevo edulcorante deberá buscarse en su acción coadyuvante, a dosis reducidas, con los edulcorantes clásicos y posiblemente no interesará, tanto por sus resultados como por su coste, su empleo como edulcorante único.

Para conocer mejor la situación mundial de este aditivo es necesario poner de manifiesto que, en alimentación humana, su máximo empleo se localiza en Japón donde alcanza un consumo equivalente al 40% de los edulcorantes utilizados.

Esta situación es totalmente distinta en EE.UU. donde las dificultades presentadas para su autorización, posiblemente ligadas al poder

la de industria azucarera y especialmente al del mercado de los edulcorantes sintéticos, dio lugar a una inicial aprobación como suplemento dietético y no como aditivo alimentario, a diferencia de Japón en donde la legislación sobre el uso de edulcorantes sintéticos es más restrictiva.

Pero es incuestionable que los productos de la stevia son sumamente atractivos tanto para la alimentación humana como animal, si bien en este último caso, y debido a su actual precio principalmente, deberá limitarse su empleo, como ya hemos indicado, como coadyuvante de un edulcorante sintético (sacarina).

También hay que apuntar en este último capítulo que no todas las plantas de stevia tienen la misma concentración de steviósido y que, por otra parte, la reglamentación europea exige concentraciones del 95% en el extracto a comercializar.

La stevia de los países sudamericanos tiene una concentración adecuada de steviósidos pero la procedente de China es de una concentración inferior, si bien ello no impide que China sea el principal proveedor de Japón.

En la actualidad la demanda supera a la producción, lo que explica su coste elevado y el mercado mundial está expectante buscando nuevas áreas geográficas para su cultivo y la creación de nuevas industrias para su extracción.

Y parece indudable que su consumo ira en aumento toda vez que la diabetes es una enfermedad cada día mes frecuente en los países desarrollados y la stevia jugará un papel importante en su prevención y en la dietética de los enfermos.

En cuanto a alimentación animal el problema residirá en su coste y también en la obtención de producto que cumpla las exigencias de la EFTA toda vez que el extracto de stevia que se ofrece al mercado no suele pasar del 50-70% de concentración de steviosidos.

## **BIBLIOGRAFIA**

Benford, D.J. DiNovi, M., Schlatter, J. (2006). Steviol Glycosides. *En Safety evaluation of certain food additives*. Prepared by the Sixty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO. *Food Additives Series: 54*, 117-141.

EFSA (European Food Safety Authority) (2010). Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). *EFSA Journal* 8(4), p. 1537.

EFSA (European Food Safety Authority) (2011). Revised exposure assessment for steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *EFSA Journal* 9(1), p. 1972.

Munro, P.J., Lirette, A., Anderson, D.M., Ju, H.Y. (2000). Effects of a new sweetener, Stevia, on performance of newly weaned pigs. *Canadian Journal of Animal Science* 80(3), 529-531.