



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

---

---

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA**

**Cuantificación de esteviósido y rebaudiósido A en *Stevia rebaudiana* cultivada en sustratos orgánicos**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN INVESTIGACION Y DESARROLLO DE  
PLANTAS MEDICINALES**

PRESENTA:

**Biol. CHRISTIAN ANDREA DOMÍNGUEZ BENÍTEZ**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. PORFIRIO JUAREZ LOPEZ**

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO 2020

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada N° CVU 880955 del 01 de febrero del 2018 hasta el 31 de agosto del 2019, para estudios de Maestría.

A mi tutor de tesis el Dr. Porfirio Juárez López, quien me acepto en su grupo de trabajo y me apoyo en el desarrollo de todo el proyecto, por soportarme en todo el trascurso de la maestría y por brindarme su amistad.

Al Dr. Alexander Taketa Cardoso, quien me brindó su apoyo en la parte técnica del proyecto, así como su gran labor para que esta Maestría fuera un éxito.

Al Dr. Dante Vladimir Galindo Gracia, por aceptarme dentro de su proyecto de *Stevia rebaudiana*, por la asesoría que me brindo respecto a los cultivos.

Al Dr. Irán Alia Tejacal, por el gran apoyo dentro de su laboratorio, y todos los consejos que recibí para que este proyecto pudiera cumplir con sus objetivos.

A la Maestra Eliane, por su apoyo y disponibilidad, dentro y fuera de las instalaciones de la universidad.

A la M.I Ariadna Zenil Rodríguez por la asesoría y apoyo técnico en el uso del equipo HPLC Waters y el uso del HPTLC CAMAG

## DEDICATORIA

A mis Padres, Yolanda Irma Benítez Delgado y Antelmo Domínguez Jiménez, por todo su esfuerzo y dedicación que me han brindado siempre.

A mi Marido, Tomas Javier Serrato Salas, por estar siempre en los momentos más difíciles y estresantes de ese proyecto, por sus consejos y su amor.

A mis Hermanos, Mayra, Martha y Vicente, por hacer que los malos momentos pasen más rápido, y por estar siempre molestándome para salir adelante.

A mis Hijos (Sobrinos), Denilson, Kukene, Diyenara, Keran, Grettell y Abraham, por hacer mi vida más feliz, con sus travesuras y ese inmenso amor que me tienen.

A mis Bebes, Cebolla, Quesito, Cebollín, Panquesito, Piloncillo, Aceituna y Zanahorio, aunque la mayoría ya no esté a mi lado siempre me brindaron su amor incondicional y sus grandes travesuras.

A mis Amigas, Monserrat, Ruby, Rosita, Lluvia, Andrea, Judith, Gabriela, Ricardo, Alfredo, y todas esas personitas que siempre han estado apoyándome, fuera y dentro de la universidad.

A mis compañeros de Maestría, Mario, Itzel, Patricia, Sofia, Sylvia, Leo por su gran amistad y apoyo que me brindaron en esta aventura que iniciamos y culminamos juntos.

Pero quiero dedicarle todo mi esfuerzo y trabajo a una persona muy especial, que, aunque ya no esté conmigo, yo sé que siempre estará orgullosa de mí, apoyándome desde el cielo, mi mejor amiga Gloria Domínguez Patiño.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS .....	6
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
RESUMEN .....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
Compuestos edulcorantes de la estevia .....	10
Técnicas de extracción y análisis de esteviolglucósidos de estevia .....	15
Separación y análisis de compuestos por cromatografía .....	16
Cromatografía en capa fina.....	17
Análisis de esteviolglucósidos por medio de cromatografía en capa fina .....	18
Cromatografía líquida de alta resolución HPLC .....	19
Características en el uso de HPLC para análisis de esteviolglucósidos .....	19
Alternativas para la producción de estevia.....	20
ANTECEDENTES .....	22
JUSTIFICACIÓN .....	26
OBJETIVO.....	26
HIPÓTESIS .....	26
MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
Ubicación .....	27
Material vegetal.....	27
Tratamientos .....	27
Manejo precosecha.....	28
Peso de hojas frescas.....	28
Peso de hojas secas .....	29
Cuantificación de esteviósido y rebaudiósido A .....	29
Análisis estadístico.....	33
RESULTADOS Y DISCUSION.....	34
Peso fresco y seco en hojas de <i>S. rebaudiana</i> .....	34
Análisis semicuantitativo en cromatografía en capa fina.....	35
Análisis de esteviósido y rebaudiósido A, utilizando el programa ImageJ .....	36
Análisis cuantitativo por medio de HPLC .....	38
Concentración de esteviósido .....	39
Concentración de rebaudiósido A .....	40

CONCLUSIONES.....	42
LITERATURA CITADA.....	43
APENDICE I.....	46

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica <i>Stevia</i> (Fuente: Integrated Taxonomic Information System). .....	9
Cuadro 2. Estructura, fórmula y el peso molecular de los derivados de glucósidos de esteviol (Aranda <i>et al.</i> , 2004).....	12
Cuadro 3. Glucósidos en las hojas de estevia.....	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Stevia rebaudiana</i> (Madan <i>et al.</i> , 2010). .....	9
Figura 2. Estructura química de la aglicona de los glucósidos de esteviol (Aranda <i>et al.</i> , 2014). .....	11
Figura 5. Invernadero tipo túnel, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias .....	27
Figura 6. Plantas cosechadas de estevia.....	28
Figura 7. Hojas secas de estevia antes de ser molidas. ....	29
Figura 8. a) Hojas de estevia molidas, b) muestras de polvo de hojas de estevia procesadas con etanol. ....	30
Figura 9. Peso de hojas frescas y secas de estevia, en sustratos: 1 = tierra de hoja, 2 = tierra de hoja con lombricomposta, 3 = tierra de hoja con perlita, 4 = tierra de hoja con fibra de coco. Cada punto representa la media de 6 repeticiones, las letras representan la diferencia significativa según la prueba de medias (Tukey = 0.05). ....	35
Figura 10. Cromatograma obtenido en función de 4 sustratos orgánicos, con tres repeticiones, 1= esteviósido, 2= rebaudiósido A, 3,4,5= tierra de hoja, 6,7,8= tierra de hoja con lombricomposta, 9,10,11= tierra de hoja con perlita, 12,13,14= tierra de hoja con fibra de coco, 15= esteviósido, 16= rebaudiósido. ....	35
Figura 11. Cromatograma obtenido en función de las mejores muestras de los 4 sustratos orgánicos, 1= esteviósido, 2= rebaudiósido A, 3= tierra de hoja, 4= tierra de hoja con lombricomposta, 5= tierra de hoja con perlita, 6= tierra de hoja con fibra de coco.....	36
Figura 12. Análisis de la intensidad de banda según sus pixeles. a) Esteviósido y b) rebaudiósido A. ....	37
Figura 13. Intensidades de la banda del esteviósido y rebaudiósido A en función de cuatro sustratos. 1= tierra de hoja, 2: tierra de hoja con lombricomposta, 3= tierra de hoja con perlita, 4= tierra de hoja con fibra de coco. ....	38
Figura 14. Cromatograma del estándar esteviósido con concentración de 20 µg/mL. ....	39
Figura 15. Cromatograma del estándar rebaudiósido A con concentración de 20 µg/mL. ....	39
Figura 16. Concentración de esteviósido y rebaudiósido A en <i>Stevia rebaudiana</i> , cultivada en sustratos. 1 = tierra de hoja, 2 = tierra de hoja con lombricomposta, 3 = tierra de hoja con perlita, 4 = tierra de hoja con fibra de coco. Cada barra representa la media de 6 repeticiones, con error estándar y las letras representan la diferencia significativa según la prueba de medias (Tukey= 0.05). ....	40

## RESUMEN

En la actualidad existe un interés creciente en el estudio de plantas medicinales, una de ellas es la estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), la cual se utiliza como edulcorante natural ya que produce glucósidos diterpenoides (esteviósidos), compuestos que pueden ser utilizados como edulcorantes dietéticos. El objetivo fue cuantificar los esteviósidos y rebaudiosidos A presentes en *Stevia rebaudiana* cultivada en diferentes sustratos: tierra de hoja, tierra de hoja con lombricomposta, tierra de hoja con perlita y tierra de hoja con fibra de coco. La solución nutritiva que se aplicó en los sustratos fue la de Steiner a 50 %. Se evaluó peso fresco y seco de hojas (g por planta), concentración de esteviósido y rebaudiósido A con técnicas semicuantitativas (cromatografía de capa fina) y cuantitativas (HPLC). La mezcla de tierra de hoja con lombricomposta, favoreció la concentración de esteviósido (9.5 %) y rebaudiósido A (71.5 %). Esta combinación de sustratos se considera adecuada para la producción orgánica de este cultivo, ya que se obtuvo el mayor peso fresco y seco de hojas (154.8 y 39.6 g por planta, respectivamente).

Palabras clave: glucósidos, edulcorante natural, lombricomposta, cromatografía de capa fina, HPLC.

## INTRODUCCIÓN

*Stevia rebaudiana* (Figura 1), es una planta herbácea perenne de la familia *Asteraceae* (Cuadro 1). Posee hojas lanceoladas de aproximadamente 5cm de longitud y 2cm de ancho y con disposición alternada. En estado silvestre, la altura de las plantas varía entre 40 y 80cm, pero cultivadas pueden medir hasta 1 m de altura. La planta se adapta fácilmente a cualquier región tropical y subtropical con altitud desde el nivel del mar hasta 1,200 m. (Douglas, 2002). Es originaria del noroeste de Paraguay y del sureste de Brasil (Brandle, 1998).



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

Cuadro 1. Clasificación taxonómica *Stevia* (Fuente: Integrated Taxonomic Information System).

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>División</b>	<b>Tracheophyta</b>
<b>Clase</b>	<b>Magnoliopsida</b>
<b>Orden</b>	<b>Asterales</b>
<b>Familia</b>	<b>Asteraceae</b>
<b>Género y especie</b>	<b><i>Stevia rebaudiana</i></b>

Existen 154 miembros del género *Stevia* que contienen varios compuestos edulcorantes, sin embargo, *Stevia rebaudiana* es la más dulce de todas (Goyal *et al.*, 2009; Douglas, 2002).

La estevia 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 atrajo la atención comercial de las industrias farmacéuticas como sustituto de azúcar refinada y como suplemento alimenticio, para disminuir la obesidad (Saikat *et al.*, 2015).

Esta planta contiene como moléculas responsables del sabor dulce, esteviósidos y rebaudiósidos que son una serie de glucósidos, 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. Asimismo, existen reportes sobre su actividad antiácida, cardiotónica, actividad anticaries y propiedades como coadyuvante al tratamiento contra el rotavirus (Brandle, 1998).

La estevia tiene efectos antihiperlipidémicos e insulinoatrópicos que ayudan al tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 y como estimulante en la secreción de insulina actuando en las células del páncreas (Jeppesen *et al.*, 2002); estas propiedades atribuidas al consumo de la planta han favorecido su uso como alternativa del azúcar común. 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, hojas enteras frescas 15 veces más (Douglas, 2002; Jentzer *et al.*, 2015).

### **Compuestos edulcorantes de la estevia**

Las moléculas edulcorantes aisladas a partir de hojas de esta planta, pueden llegar a ser hasta 300 veces más dulces que la sacarosa, principalmente esteviósidos, rebaudiósidos A, C, y D, y dulcosidos A (Jiménez *et al.*, 2010).

El contenido de edulcorantes naturales en las hojas de *Stevia* es de aproximadamente 4-20% con base a peso seco. Estos componentes son glucósidos diterpenoides y existen más de 20 tipos.

El esteviósido y el 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 (Lemus *et al.*, 2012).

Estos compuestos son glucósidos derivados del diterpeno esteviol (entero-13-hidroxi-16-en-19-oicoácido) que se forma 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 2), que pueden ser glicosilados para formar diversos compuestos derivados conocidos como glucósidos de esteviol (Cuadro 2) (Aranda *et al.*, 2014).

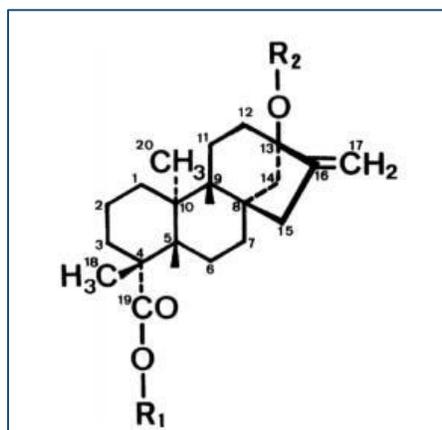


Figura 2. Estructura química de la aglicona de los glucósidos de esteviol (Aranda *et al.*, 2014).

Cuadro 2. Estructura, formula y peso molecular de los derivados de glucósidos de esteviol (Aranda et al., 2004).

COMPONENTE	R1	R2	Peso Molecular
Steviósido	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc (2—1)	804.88
Rebaudiósido A	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc (2—1) $\beta$ -Glc (3—1)	967.01
Rebaudiósido B	H	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc (2—1) $\beta$ -Glc (3—1)	804.87
Rebaudiósido C	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc- $\alpha$ - Rha (2—1) $\beta$ -Glc (3—1)	951.03
Rebaudiósido D	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc (2—1)	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc (2—1) $\beta$ -Glc (3—1)	1129.17
Rebaudiósido E	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc (2—1)	966.43
Rebaudiósido F	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Xyl (2—1) $\beta$ -Glc (3—1)	936.98
Dulcósido A	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\alpha$ -Rha (2—1)	788.87
Rubosósido	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc	642.7316
Steviolbiosido		$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc (2—1)	642.73

En las variedades cultivadas, los principales compuestos glucósidos de esteviol que se presentan son cuatro: esteviósidos, rebaudiósido A, rebaudiósido C y rebaudiósidos dulcósidos, y en pequeñas cantidades, rebaudiósidos D (<0.4%) junto con rebaudiósidos C (1%-2%), dulcósido A (0.4%-0.7%), esteviósidos rubusósidos, rebaudiósidos 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 blanco cristalino, considerado un producto 100% natural, no tóxico, ni mutagénico, cuyo consumo no aporta calorías. Las hojas pueden utilizarse en su estado natural y aún en cantidades pequeñas aportan 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 (Jarra *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

concientización 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 por 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 glucosa o de su peso, están implicados en la aparición de ciertos efectos secundarios adversos, los cuales no se han reportado en personas que utilizan estevia 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).

La estevia constituye una alternativa prometedora, mientras que los edulcorantes sintéticos están siendo cuestionados por los efectos de su consumo a corto y largo plazo. Es interesante observar como el consumo de esta planta, ya sea como hierba o como un producto industrializado 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 en agricultura, ganadería, farmacéutica y cosmetología, por lo que es de preverse que el cultivo de estevia es una práctica innovadora rentable, pues presenta condiciones prometedoras en los mercados nacionales e internacionales (Jarma *et al.*, 2010).

Japón fue el país asiático pionero en popularizar el uso de los esteviósidos como edulcorantes en alimentos y medicamentos. Desde entonces, el cultivo de estevia se ha extendido a países de Asia como China, Malasia, Singapur, Corea del Sur, Taiwán y Tailandia. Se estima que la demanda de hojas secas de *S. rebaudiana* podría llegar a ser de 202,500 toneladas al año.

En México, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) estableció 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. Por otra parte, los suelos areno arcillosos, francos y franco-arenosos con regular proporción de humus, son idóneos (Figura 3), así como con adaptación a suelos no salinos con buen drenaje y pH de entre 6.5a 7.5 (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 estevia en México principalmente son los que se ubican en el Pacífico como Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Figura 4); 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 (Ramírez *et al.*, 2011).

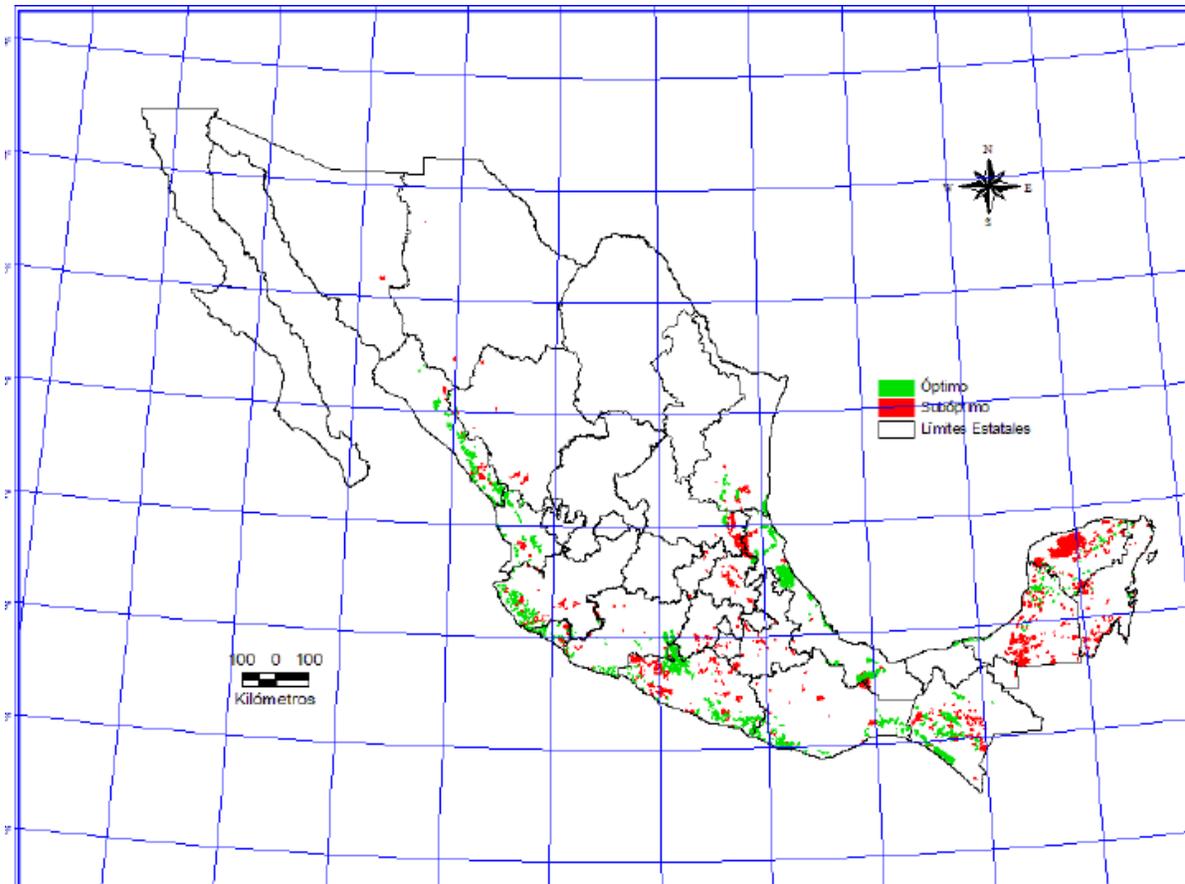


Figura 4. Distribución de las áreas potenciales para el cultivo de *S. rebaudiana* en la República Mexicana (Ramírez *et al.*, 2011).

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).

### **Técnicas de extracción y análisis de esteviolglucósidos de estevia**

La industria alimenticia tradicionalmente utiliza azúcar como agente edulcorante; sin embargo, la creciente demanda de otros edulcorantes como respuesta a las recomendaciones de la disminución de sacarosa y preferencias del consumidor

deben 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 ante cambios de pH (Afandi *et al.*, 2013).

Los compuestos dulces (glucósidos de esteviol) propios de las hojas de estevia, 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 obtienen mediante esta técnica están constituidos casi por esteviosidos en estado puro (Afandi *et al.*, 2013). 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 estevia para optimizar el rendimiento de ambos compuestos.

Se han reportado diferentes técnicas de análisis para la determinación de los glucósidos de esteviol en estevia. Estos incluyen, extracción por Soxhlet, electroforesis capilar, LC/MS, 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 confiables es el HPLC y por lo tanto en 2010, el comité de Expertos FAO/OMS de la 73<sup>a</sup> reunión sobre Aditivos Alimenticios (JECFA) recomienda un método de HPLC para la determinación de glucósidos de esteviol (JECFA, 2010).

### **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, se pueden distinguir dos grandes tipos de técnicas de cromatografía: a) Cromatografía en columna b) Cromatografía en placa (Valcárcel y Gómez, 1994).

### **Cromatografía en capa fina**

El avance esencial de cromatografía de capa fina, 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 en Alemania inventó la cromatografía en capa fina llamada de alto rendimiento (HPTLC) en placas de gel de sílice de 10 por 10 cm, estos 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 migran y, si las condiciones están dispuestas 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), generalmente se aplican diferentes muestras 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).

#### **Análisis de esteviolglucósidos por medio de cromatografía en capa fina**

Para la identificación y análisis semicuantitativo de los compuestos esteviósido y rebaudiósido A, de la planta estevia, 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 evidencian y distinguen bandas, que al compararse con las bandas de los estándares 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).

## **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 con base en 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 utilizada más ampliamente ya que tiene una aplicación enorme en el análisis de sustancias de interés para la industria alimenticia, farmacéutica, en campos de la ciencia de la biotecnología, de la agricultura, ganadería, química, biología, ramo automotriz, de obra civil, entre otros (Gomis, 2008).

## **Características en el uso de HPLC para análisis de esteviolglucósidos**

La cromatografía líquida de alta resolución o high performance liquid chromatography (HPLC) consiste en una determinación 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 estevia 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. El 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 disminuye 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 planas representan diferentes métodos de separación, cada uno con sus propias virtudes y defectos (Gomis, 2008).

### **Alternativas para la producción de estevia**

En el cultivo de estevia existen materiales silvestres principalmente provenientes de Paraguay y Brasil; cuando las plantaciones se realizan provenientes de estos materiales, se tienen plantas que presentan diferencias morfológicas y fenotípicas, 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 (Oviedo *et al.*, 2015).

La producción orgánica es una alternativa en la obtención de cultivos libres de agroquímicos, inocuos y con alto valor nutricional, por lo que representa una demanda actual por parte de los consumidores. La nutrición mineral presenta ventajas en los rendimientos de cultivos, pero a un alto costo y contaminación de suelo y agua.

Romero *et. al* (2012) indican que el uso excesivo de agroquímicos en la agricultura es una preocupación a nivel mundial, debido al alto grado de contaminantes, por lo que para reducir el impacto negativo de los agroquímicos en el medio ambiente y en la inocuidad de los diferentes cultivos, se recomiendan sistemas de producción orgánica o combinada con la convencional que disminuyan el uso de fertilizantes y químicos. Entre los abonos orgánicos de origen animal o vegetal, la vermicomposta, los biofertilizantes y los ácidos fúlvicos son buenas opciones para complementar la nutrición de los cultivos y así reducir significativamente el uso de fertilizantes sintéticos y los costos de producción (Armenta *et al.*, 2010).

La lombricomposta contiene sustancias activas que actúan como reguladores de crecimiento, elevan la capacidad de intercambio catiónico, tiene alto contenido de ácidos húmicos, aumenta la capacidad de retención de humedad y la porosidad, la cual facilita la aireación y drenaje del suelo, además de contener una elevada carga enzimática y bacteriana que incrementa la solubilidad de los elementos nutritivos, liberándolos en forma paulatina, facilita su asimilación por las raíces e impide que éstos sean lixiviados con el agua de riego manteniéndolos disponibles por más tiempo en el suelo y favorece el desarrollo de las plantas (McGinnis *et al.*, 2004; Hashemimajd *et al.*, 2004).

## ANTECEDENTES

- Rojas (1999), señala que la *Stevia* es una planta natural de clima tropical el cual posee un edulcorante natural y saludable, "esteviósido", presente hasta en un 10% extraído de la planta, se caracteriza por su sabor extremadamente dulce, 200 a 300 veces más que la azúcar de caña, pero no provee calorías. Hay indicaciones de que este azúcar completamente saludable ha sido usado por las tribus nativas del Paraguay desde 1887 para endulzar la bebida conocida como "mate". Durante siglos, los guaraníes de Paraguay y Brasil usaron el ka'ahe'ẽ como edulcorante natural. El naturalista suizo Moisés Bertoni fue el primero en describirla científicamente en el Alto Paraná. Posteriormente, el químico paraguayo Ovidio Rebaudi descubrió en 1900 un glucósido en esta especie vegetal, de allí su nombre: *Stevia rebaudiana* Bertoni.
- López y Peña (2005), indican que esta planta es originaria de Paraguay, descubierta en 1887, fue descrita y clasificada en 1899 por el botánico suizo M. S. Bertoni. Los indios guaraníes ya la utilizaban desde tiempos precolombinos, endulzando sus comidas y bebidas, la llamaron "kaa-hee", que significa "hierba dulce". Existen más de 300 variedades de *Stevia* en la selva paraguayo – brasileña, pero la *Stevia rebaudiana* Bertoni es la única con propiedades endulzantes gracias a su principio activo, denominado "esteviósido" reconocido en 1921 por la unión internacional de química. Entre los glucósidos, se encuentra en mayor proporción el esteviósido generalmente entre 5 a 10% del peso de la hoja y en menor medida, de 2 a 3% rebaudiósidos A, B, C, D, E, dulcósido A y B y esteviolbíosido. De esta manera, se puede apreciar que el producto industrial extraído de la estevia es en realidad una combinación de varios glucósidos, cuyas cantidades varían en función a la variedad de los climas y de los terrenos, pero es el esteviósido (C<sub>38</sub>H<sub>60</sub>O<sub>18</sub>) el principal y más abundante componente. La estevia en su forma natural es 10 a 15 veces más dulce que el azúcar común de mesa, los extractos en su forma líquida tienen un poder endulzante aproximadamente 70 veces mayor que la sacarosa,

mientras que los extractos refinados, llamados esteviósidos (polvo blanco conteniendo 85 – 95% de esteviósido) son 200 a 300 veces más dulce que la sacarosa. Con respecto a la toxicidad de la estevia, los investigadores establecieron que la dosis por vía oral que se requiere para la mortalidad es de 15g/kg de peso corporal, es decir, que un adulto que pesa 60 kg debe consumir 900 g de esteviósidos, lo que equivale a consumir aproximadamente a 225 kg de azúcar de caña. Se puede deducir con amplia seguridad que difícilmente un humano va a consumir una cantidad similar para llegar a la toxicidad. La estevia es apta para diabéticos, es hipotensora (recomendada para personas con tensión alta, pues la reduce), sirve para el cuidado facial, para problemas de acidez del estómago, es adecuada para bajar el nivel de acidez de la sangre y de la orina, ayuda a bajar de peso por que no tiene calorías y no produce ninguno de los daños causados por el azúcar y los demás edulcorantes artificiales. Es soluble en agua fría o caliente, sin nutrientes, sin calorías, es estable a los 200°C, no fermenta, no crea placa dental y no tiene efectos tóxicos.

- Zanon (2000), define a la planta como un arbusto perenne, que alcanza los 90 cm de altura. Las hojas, lanceoladas o elípticas y dentadas, son alternas, simples, de color verde oscuro brillante y superficie rugosa, a veces algo vellosas, de hasta 5 cm de largo por 2 de ancho. Los tallos son pubescentes y rectos, ramificándose sólo después del primer ciclo vegetativo, con tendencia a inclinarse. Las raíces son mayormente superficiales, aunque una sección engrosada se hunde a mayor profundidad; son fibrosas, filiformes y perennes, y son la única parte de la planta en la que no se presentan los esteviósidos, las flores se hallan dispuestas en capítulos pequeños, terminales o axilares y agrupadas en panículas corimbosas. El fruto es un aquenio delgado y plumoso, los rendimientos en esteviósidos y rebaudiósidos entre los distintos cultivos son variables, que pueden alcanzar proporciones de 5:1. La estevia peruana, hoy en día, es la de mejor calidad y la de mayor rentabilidad con hasta cuatro cosechas anuales.

- Payzant *et al.* (1999) indica que las hojas contienen básicamente esteviósido y rebaudiósido A, siendo este último más dulce y con menor sabor residual amargo que el esteviósido, pero se encuentra en menor concentración; el rebaudiósido E es tan dulce como el esteviósido y el rebaudiósido D es tan dulce como el rebaudiósido A.
- Brandle (2001), menciona que el propósito de estos glicósidos en la estevia todavía no está claro, por su alta concentración en la hoja y la conservación dentro de la especie indicaría que, en cierto tiempo, su presencia fue una ventaja significativa; algunos investigadores aseguran que actuaban para rechazar ciertos insectos y especulan otros que es un medio para controlar los niveles de ácido giberálico.
- Brandle (2001), indica que la estevia alcanza una madurez fisiológica en un periodo vegetativo de 3 meses y empieza a mostrar indicios de madurez organoléptica, donde las hojas presentan un mayor dulzor. Una vez que la estevia entra en la etapa de floración las concentraciones de glicósidos iniciales disminuye. Por esto, es recomendable cosechar hojas antes de la floración, a fin de optimizar la extracción.
- Salvador-Reyes *et al.* (2014), en un artículo de revisión, concluyó que la estevia es una alternativa al azúcar y con beneficios a la salud, por lo cual menciona que la *Stevia*, es considerada el mejor sustituto del azúcar debido a que es hasta 300 veces más dulce y no contiene calorías, presenta en su composición un alto contenido de glucósidos de esteviol (esteviósido y rebaudiósido A), los que le confieren un sabor dulce intenso y propiedades terapéuticas contra la diabetes, la hipertensión y la obesidad; además, ayuda al control del peso, la saciedad y el hambre. Por su contenido en compuestos fenólicos, la *Stevia* actúa también como un excelente antioxidante y

anticancerígeno; asimismo, se ha demostrado que posee propiedades antibacterianas, anticonceptivas y diuréticas.

Cuadro 2. Glucósidos en las hojas de estevia.

Glucósidos	Contenido en % de las hojas en peso seco		
	Gardana <i>et al.</i> (2003)	Goyal <i>et al.</i> (2010)	Kinghorn y Soejarto (1985)
Esteviosido	5.8 ± 1.3	9.1	5-10
Rebaudiósido A	1.8 ± 0.2	3.8	2-4
Rebaudiósido C	1.3 ± 0.40	0.6	1-2
Dulcósido	ND	0.3	0.4-0.7

- Villalva *et al.* (2018), determinaron la concentración de esteviósido y rebaudiósido A en hojas de *Stevia rebaudiana* var. Eirete. Estos autores estudiaron el rendimiento con la aplicación de diferentes dosis de nitrógeno durante cuatro meses y como sustrato usaron una mezcla de suelo–tezontle (60:40%) y como fuente de nitrógeno gallinaza y lombricomposta en tres dosis: 1, 2, y 4 g N por planta.

El mayor rendimiento se presentó en el tratamiento donde se aplicó 4 g N por planta de lombricomposta, se obtuvieron 9 brotes y 19 g de hoja de estevia por planta, respecto al tratamiento con gallinaza en la misma dosis donde se presentaron 3 brotes y 12 g de hoja seca por planta. La mayor concentración de esteviósido y rebaudiósido A se dio en los tratamientos con lombricomposta con 1 y 2 g N por planta (11.1 y 12.1%, respectivamente). Los autores concluyeron que la aplicación de lombricomposta favoreció el crecimiento vegetativo de estevia, así como mayor concentración de esteviósido y rebaudiósido A.

## **JUSTIFICACIÓN**

Actualmente, la estevia (*Stevia rebaudiana*) presenta una demanda creciente de producción y consumo, debido a su valor nutracéutico, pero es escasa la información sobre el manejo de sustratos en la producción de estevia, sobre todo cuando se cultiva en condiciones de invernadero, por lo que, es importante conocer el efecto en el crecimiento y desarrollo de los diferentes materiales de sustratos orgánicos e inertes para determinar la mejor mezcla de sustrato que favorezca el mayor rendimiento de biomasa, así como la concentración de edulcorantes, por lo cual se analizará la producción de los principales metabolitos secundarios cultivadas en diferentes sustratos; dicho análisis y cuantificación aportará información para determinar cuál sustrato orgánico favorece la concentración de esteviósido y rebaudiósido A.

## **OBJETIVOS**

- Cuantificar la concentración de esteviósido y rebaudiósido A en estevia.
- Evaluar el crecimiento de la estevia en diferentes sustratos.

## **HIPÓTESIS**

- La mezcla de tierra de hoja y lombricomposta favorecerá la concentración esteviósido y rebaudiósido A en estevia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación

El trabajo experimental se realizó en el Campo Experimenta de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, localizado en Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México; a 18° 58' 51" LN, 99° 13' 55" LO y altitud de 1,866 m, se utilizó un invernadero tipo túnel con cubierta plástica de color blanquecino y con malla antiáfidos en las paredes laterales-



Figura 3. Invernadero tipo túnel, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias

### Material vegetal

Se utilizaron plántulas de *Stevia* variedad 'Morita II', las cuales se trasplantaron individualmente en bolsas de polietileno con capacidad de 8 L, con diferentes sustratos orgánicos e inertes, el 10 de abril de 2018.

### Tratamientos

Las mezclas de sustratos utilizadas fueron las siguientes: tierra de hoja, TH (100 %); tierra de hoja con lombricomposta, TH + L (70:30); tierra de hoja con perlita, TH + P (70:30); y tierra de hoja con fibra de coco, TH + FC (70:30).

Se realizó un análisis químico a la composta, en el cual se determinó la concentración de macronutrientes: N, P, K, Ca, Mg; y el elemento benéfico Na, de acuerdo a la norma oficial Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2000).

### **Manejo precosecha**

El suministro de macronutrientes fue con la solución nutritiva universal de Steiner (1984) al 50 %. Previo al establecimiento del cultivo se realizó un análisis químico de agua, para conocer su calidad y las aportaciones de elementos para balancear la fórmula de nutrición. Los fertilizantes empleados fueron: nitrato de calcio, nitrato de potasio, sulfato de potasio, fosfato monopotásico y sulfato de magnesio. Se ajustó el pH a 5.5 en cada riego, y se adicionaron micronutrientes Ultrasol Micro Rexene SQM (Fe: 7.5 %, B: 1.35 %, Cu: 2.3 %, Mn: 8 %, Mo: 0.04 %, y Zn: 4.5 %) para complementar la nutrición a una dosis de 200 mg L<sup>-1</sup>. Después de establecida la plántula, se realizó una poda dejando dos entrenudos por planta, práctica común para desarrollar brotes axilares.

### **Peso de hojas frescas**

Las plantas se cosecharon a los 90 días después del trasplante. Las plantas cosechadas se lavaron con agua destilada para eliminar sustrato y polvo, se separaron las hojas del tallo, se pesaron después del corte con una balanza digital con aproximación de 0.0001 g.



Figura 4. Plantas cosechadas de estevia.

### **Peso de hojas secas**

Las hojas frescas se guardaron en bolsas de papel y se colocaron en un horno de secado a 40° C, durante una semana. Se pesaron con la misma báscula descrita para la variable peso fresco de hojas.



Figura 5. Hojas secas de estevia antes de ser molidas.

### **Cuantificación de esteviósido y rebaudiósido A**

#### **a) Extracción de compuestos de estevia**

Para el análisis semicuantitativo, la primera etapa consistió en la extracción de los compuestos de la planta; para ello se utilizó muestras de hojas de *S. rebaudiana* secas, las cuales fueron trituradas en un molino Hamilton Beach, hasta tener un polvo fino, posteriormente se pesaron 500mg. de la 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 colocaron en el sonicador durante 15 min. 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.

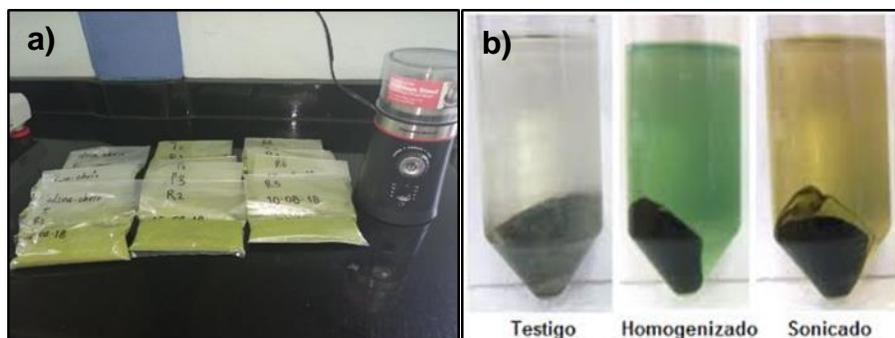


Figura 6.a) Hojas de estevia molidas, b) muestras de polvo de hojas de estevia procesadas con etanol.

### **b) Análisis semicuantitativo por cromatografía de capa fina**

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 utilizó el software visiónCATS HPTLC:

Para la aplicación de las muestras se utilizó el inyector Linomat 5, en una placa de 20 x 10 cm, con una fase estacionaria de silica gel G-60, con un espesor de 0.25 nm. La cantidad de muestra inyectada fue de 3  $\mu$ l y se colocaron en el siguiente orden: esteviosido, TH (100 %), TH+ L (70-30 %), TH+ P (70-30 %), TH+ FC (70-30 %), rebaudiósido A.

Posteriormente, se dejó secar la placa durante 3-5 min, y se colocó durante 1.5 min dentro de una cámara de desarrollo automático (ADC 2), se utilizó como fase móvil una mezcla de solventes: acetona: acetato de etilo: agua, en proporción de 5:4:1 para cada placa utilizada, y posteriormente se dejó secar 3-5 min.

Para la detección de los compuestos se utilizó el sistema profesional de imágenes TLC Visualizer 2, ya que con su cámara CCD digital de última generación, presenta la visualización de un cromatograma completo con todas las muestras y estándares en paralelo. Se registraron imágenes en diferentes longitudes de onda de luz: bajo iluminación de luz blanca, bajo luz UV de longitud de onda larga (360), y corta (254).

El dispositivo de pulverización automatizado (Derivatizador), se utilizó para la transferencia de reactivos a la placa, ya que su función es el rociado de microgotas para una distribución homogénea de diferentes sustancias, en este caso fue una mezcla de compuestos cromógenos:

- Anisaldehído 0.5 ml
- Ácido acético 10 ml
- Etanol 85 ml
- Ácido sulfúrico 5ml

La placa se roció con 20 mL de la solución mencionada con una bomba de vacío y una jeringa. Posteriormente, se colocó la placa en el calentador de placas de TLC 3, a 100 °C durante 3-5 min aproximadamente. Una vez seca la placa se procedió nuevamente a capturar imágenes en el TCL Visualizer 2 con las mismas longitudes de onda de luz.

Por último, se determinaron los RF (rate factor), la relación entre las distancias recorridas por el compuesto dado y el frente de la fase móvil, desde el origen de los cromatogramas realizados, para realizar dicho cálculo se utilizó un programa el software visiónCATS dando los resultados en cm.

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.

### **Análisis de esteviósido y rebaudiósido A, utilizando el programa ImageJ**

Para realizar una cuantificación de las concentraciones de glucósidos en las cromatografías en capa fina, la placa revelada se escaneó (300 dpi) para su posterior análisis por densitocolorimetría utilizando el programa ImageJ 1.45(NIH; Rasband, 2011). Se obtuvieron los cromatogramas para las muestras aplicadas

en cada carril y el área bajo la curva por medio de una integración de cada pico utilizando la herramienta Gel Analyzer del programa, que seleccionó áreas para el análisis dibujando un cuadro color azul alrededor de las muestras de interés. El software recibió la imagen digitalizada y realizó un análisis trazando automáticamente una marca alrededor de las muestras que indican el pixelaje de cada banda, mediante una cuantificación de la concentración de la sustancia de interés de acuerdo a la intensidad de la banda percibida por la computadora, para posteriormente presentar gráficos respecto al área y volumen (Figura 11) como lo describen Ferrera y Rasband (2011).

### **c) Análisis cuantitativo por HPLC**

Para la cuantificación de la producción total de los compuestos esteviósido y rebaudiósido A se utilizó el mismo proceso de extracción de componentes de *Stevia* que el realizado en la cromatografía en capa fina. Las muestras, así como los estándares se colocaron en viales para ser inyectados y analizados en el equipo para HPLC Perkin Elmer serie 200, con una columna amino (longitud: 250 mm; diámetro interior: 4.6 mm, tamaño de partícula: 5 micras) DETECTOR-UV-VIS con arreglo de diodos a longitud de onda de 210 nm con flujo de 1 mL/min. El volumen de inyección de cada muestra fue de 20  $\mu$ l.

Para la construcción de una curva de calibración se preparó una solución madre (10 mL) de estevia patrón de concentración 1.9 mM. Luego se tomaron volúmenes en forma creciente y se fueron añadiendo a tubos falcón de 5mg/1mL, 2.5mg/1mL, 1.25mg/1mL, 0.75mg/1mL, 0.50 mg/1mL, que luego se aforaron con el solvente. Se tomó directamente de estas soluciones patrones para analizar en el HPLC. Cada determinación se llevó a cabo por triplicado. Con estos datos se construyó la curva de calibración, mediante la representación gráfica área de pico frente a concentración. El límite de detección (LOD) fue definido como la concentración del estándar que corresponde a tres veces la relación señal/ruido (S/N=3) y el límite de cuantificación (LOQ) fue definió a la concentración del estándar que correspondió a diez veces la relación señal/ruido (S/N=10). Para la determinación

de estos parámetros de calibración se aplicó el software Alamín (Campana et al., 1997). La linealidad del método cromatográficos fue evaluada y analizada para *Stevia* en un intervalo de concentración de LOQ a LOQ x30.

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de las variables (peso hojas secas y frescas, concentración de esteviósido y rebaudiósido A), se sometieron a análisis de varianza con el programa Graph Pad Prisma 6, y prueba de medias (Tukey,  $P \leq 0.05$ ) con el programa SAS.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### **Peso fresco y seco en hojas de *S. rebaudiana***

Se encontraron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en peso de hojas frescas y secas por efecto del tipo de sustrato utilizado (Figura 9). El mayor peso de hojas frescas fue de 154.8 g por planta, mientras que en peso de hojas secas fue de 39.6 g, los cuales se obtuvieron con la mezcla de tierra de hoja y lombricomposta (70:30) en comparación con los resultados de los sustratos que no tuvieron lombricomposta.

La lombricomposta empleada en el presente estudio contiene, en mg kg<sup>-1</sup>: N, 1029.0; P, 1115.7, K, 899.8; Ca, 33.1; Mg, 522.0 y Na, 227.2. Los mejores resultados obtenidos en el peso de biomasa fresca y seca se atribuyen a que la lombricomposta aportó nutrimentos adicionales a los que se suministraron los el 50 % de la solución nutritiva de Steiner que mejoraron el crecimiento de las plantas, y por lo tanto, el peso de biomasa fresca y seca aérea. Al respecto, Villalba-Martínez *et al.* (2018), quienes al evaluar el rendimiento de *Stevia rebaudiana* cv. Eirete a los 73 días después del trasplante, encontraron que el mayor peso de biomasa aérea fresca (de 200 a 212 g por planta) y biomasa aérea seca (67 a 74 g por planta) se obtuvieron con la mezcla suelo con lombricomposta. Esta misma tendencia, fue reportada por Romero-Figueroa *et al.* (2017), al evaluar el crecimiento de un genotipo silvestre de México de *Stevia tomentosa* a los 82 días después de la emergencia. Estos autores encontraron que los mayores valores de peso seco de hojas se obtuvieron con la mezcla de fibra de coco y vermicomposta en proporciones 0:100 (1.59 g por planta) y 25:75 (1.32 g por planta).

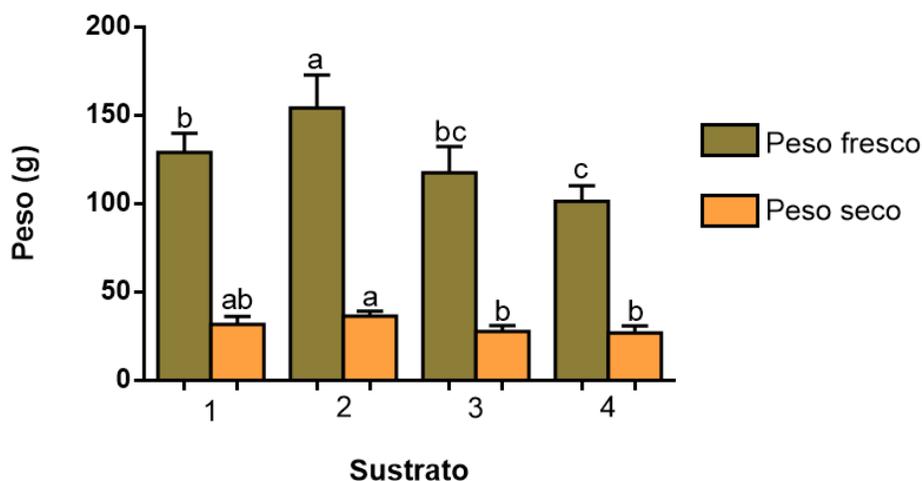


Figura 7. Peso de hojas frescas y secas de estevia, en sustratos: 1 = tierra de hoja, 2 = tierra de hoja con lombricomposta, 3 = tierra de hoja con perlita, 4 = tierra de hoja con fibra de coco. Cada punto representa la media de 6 repeticiones, las letras representan la diferencia significativa según la prueba de medias (Tukey = 0.05).

### Análisis semicuantitativo en cromatografía en capa fina

Al realizar la cromatografía de capa fina (TLC) al extracto crudo se evidenciaron diez (10) bandas, lo que indica la presencia de diversos compuestos en el extracto resultante de la extracción. De las cuales 2 de estas coincidieron con los RF correspondientes a los estándares utilizados (esteviósido y rebaudiósido A). Según la intensidad de las bandas, se deduce que las muestras del tratamiento 2 contienen mayor cantidad de esteviósidos y rebaudiósidos A.

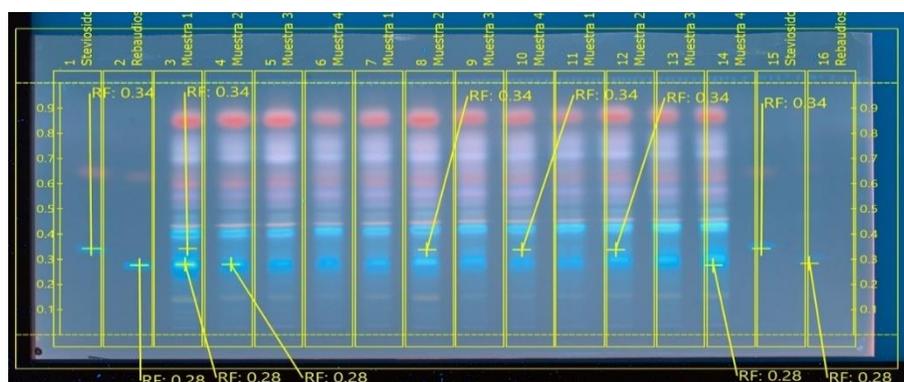


Figura 8. Cromatograma obtenido en función de 4 sustratos orgánicos, con tres repeticiones, 1= esteviósido, 2= rebaudiósido A, 3, 4, 5= tierra de hoja, 6, 7, 8= tierra de hoja con lombricomposta, 9, 10, 11= tierra de hoja con perlita, 12, 13, 14= tierra de hoja con fibra de coco, 15= esteviósido, 16= rebaudiósido.

Con la selección de los mejores resultados de nuestras muestras analizadas en el anterior cromatograma, se puede observar una mayor intensidad en la banda numero 4 la cual está representando el tratamiento de la mezcla de tierra de hoja con lombricomposta, esto comparándolos con los demás tratamientos, en las siguientes figuras se muestran dos cromatogramas con diferentes tipos de luz.

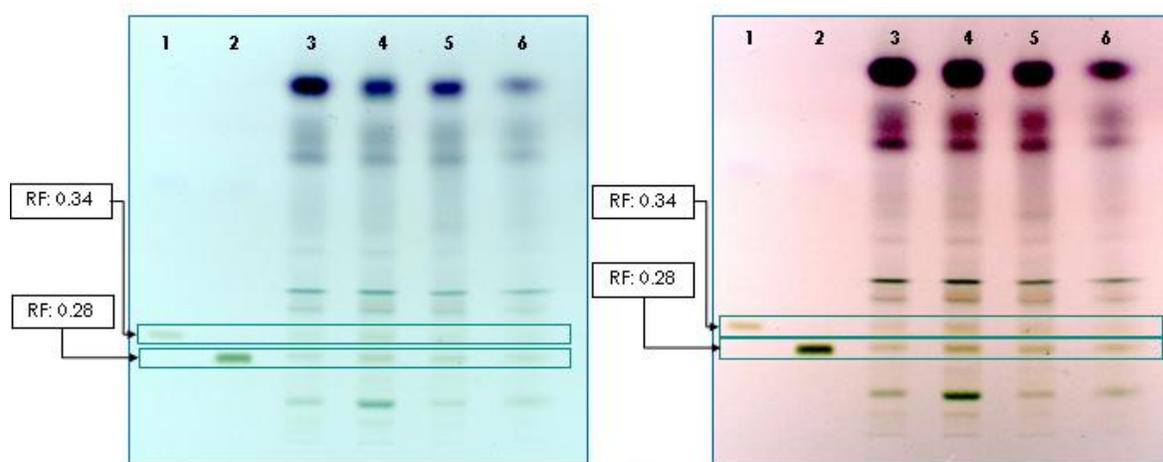


Figura 9. Cromatograma obtenido en función de las mejores muestras de los 4 sustratos orgánicos, 1= esteviósido, 2= rebaudiósido A, 3= tierra de hoja, 4= tierra de hoja con lombricomposta, 5= tierra de hoja con perlita, 6= tierra de hoja con fibra de coco.

### **Análisis de esteviósido y rebaudiósido A, utilizando el programa ImageJ**

El programa ImageJ utilizado para hacer el análisis de concentración relativa, presentó en su mayoría, bandas intensas que representan mayor concentración de los compuestos de interés. El programa analizó el área total de la banda 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.

El programa dio como resultado que las muestras correspondientes al sustrato de tierra de hoja con lombricomposta tienen concentraciones superiores de rebaudiósido A, respecto a esteviósido y comprobó la diferencia de concentraciones entre las demás muestras.

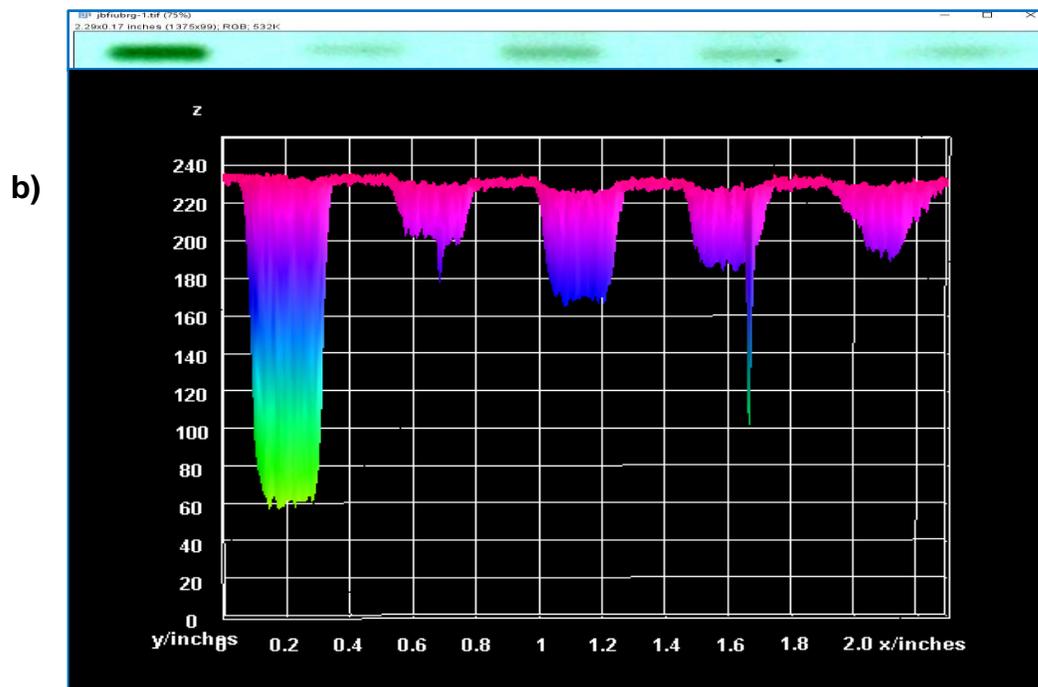
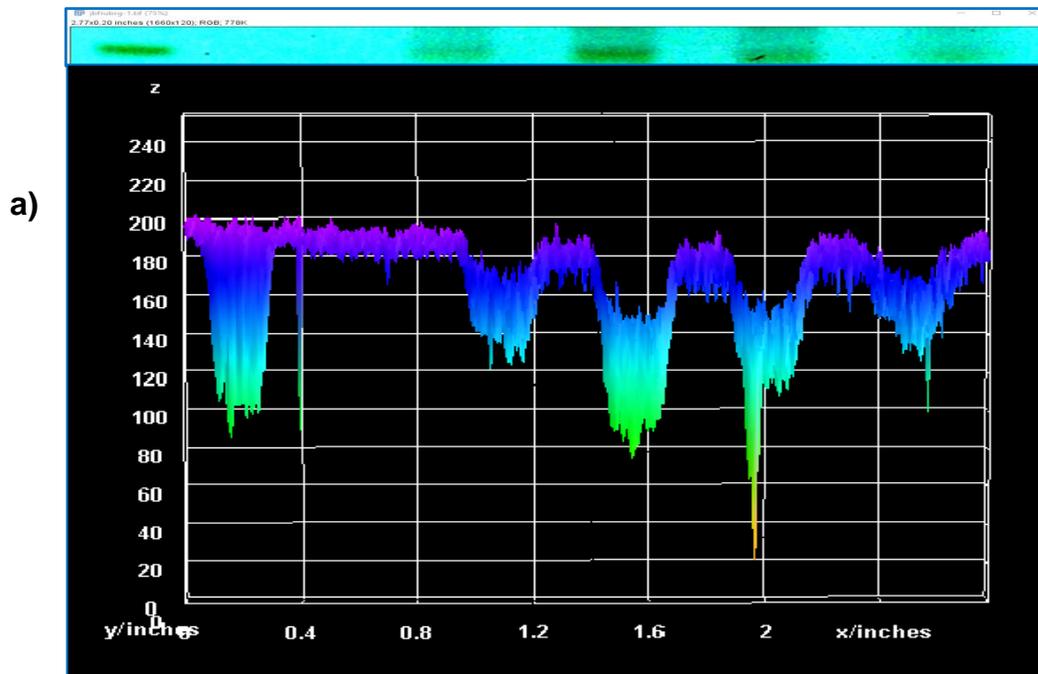


Figura 10. Análisis de la intensidad de banda según sus pixeles. a) Esteviósido y b) rebaudiósido A.

La semi-cuantificación de la intensidad de las bandas dio como resultado la cromatografía en capa fina (Figura 13), en la cual se observó una mayor concentración de rebaudiósido A, a comparación del esteviósido, contrario a lo ya publicado por López y Peña (2005), donde menciona que entre los glucósidos, que se encuentran en la estevia, el de mayor proporción es el esteviósido generalmente entre 5 a 10% del peso de la hoja y en menor medida, del orden de 2 a 3% rebaudiósidos A, B, C, D, E, dulcósido A y B y esteviolbíosido.

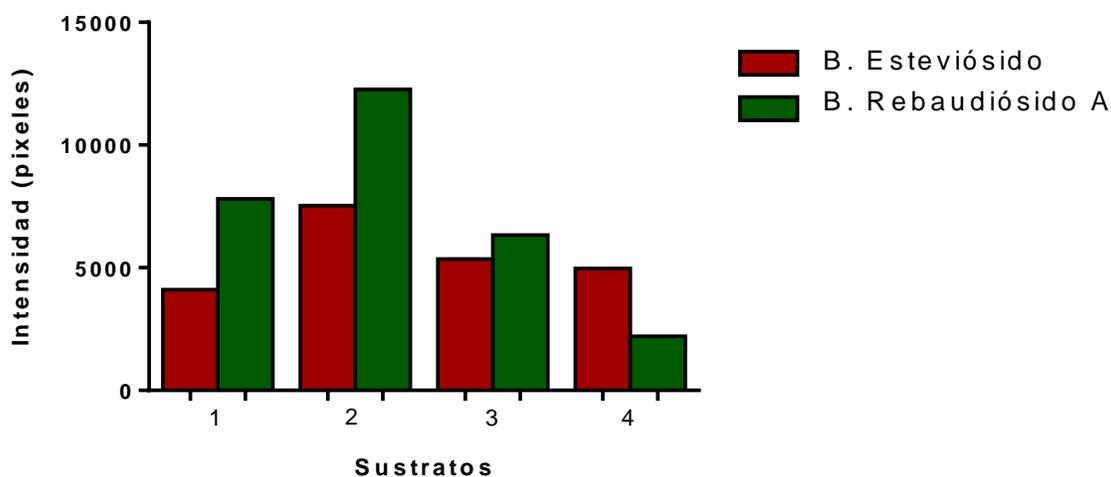


Figura 11. Intensidades de la banda del esteviósido y rebaudiósido A en función de cuatro sustratos. 1= tierra de hoja, 2: tierra de hoja con lombricomposta, 3= tierra de hoja con perlita, 4= tierra de hoja con fibra de coco.

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

### **Análisis cuantitativo por medio de HPLC**

En los cromatogramas de las Figuras 14 y 15 se observó un pico a los 6.9 y 9.8 minutos, correspondiente a los estándares de esteviósido y rebaudiósido A, respectivamente; en la fase móvil 80% de agua y 20 % acetonitrilo.

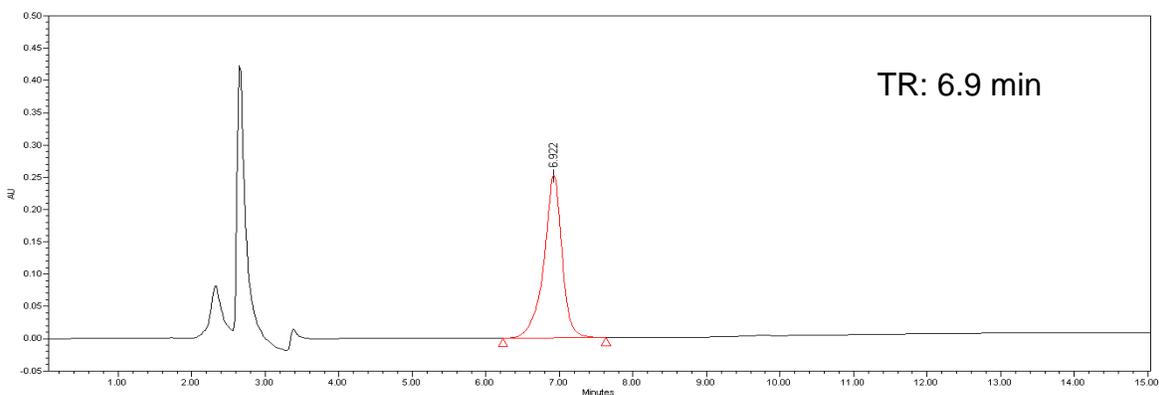


Figura 12. Cromatograma del estándar esteviósido con concentración de 20 µg/mL.

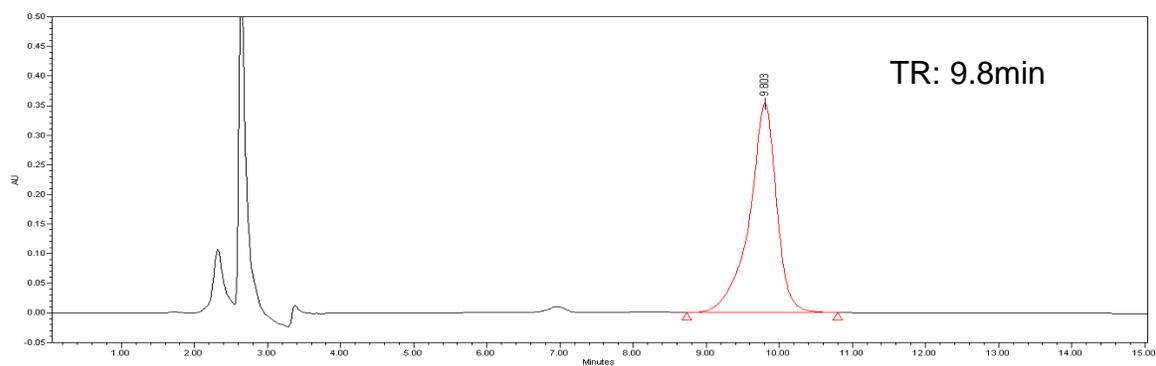


Figura 13. Cromatograma del estándar rebaudiósido A con concentración de 20 µg/mL.

### Concentración de esteviósido

Se encontraron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en concentración de esteviósido por efecto del tipo de sustrato utilizado (Figura 16). La mayor concentración fue de 9.5 %, la cual se obtuvo con la mezcla de tierra de hoja y lombricomposta (70:30) en comparación de los demás tratamientos. Se infiere que estos resultados se deben a que la lombricomposta aportó nutrientes que mejoraron la concentración del esteviósido en plantas de estevia, tal como ha sido reportado por Villalba-Martínez *et al.* (2018), quienes al evaluar lombricomposta incorporada la suelo en plantas de estevia cv. Eirete reportaron valores de esteviósido entre 6.5 y 7.6 %.

En general, los resultados obtenidos en el presente estudio son superiores a los de Yücesan *et al.* (2016), quienes en el genotipo CB14 de estevia encontraron valores de 1.74 a 5.39 % de esteviósido.

### Concentración de rebaudiósido A

Se encontraron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) en concentración de rebaudiósido A por efecto del tipo de sustrato utilizado (Figura 16). Al igual que en el esteviósido, la mayor concentración de rebaudiósido se encontró en el sustrato de mezcla de tierra de hoja y lombricomposta (70:30), la cual fue de 71.8 %. Estos valores son superiores los resultados obtenidos en el presente estudio son superiores a los reportados por Yücesan *et al.* (2016), quienes encontraron valores de 2.96 a 11.70 % en el genotipo CB14 de estevia. También son superiores a los de Uçar *et al.* (2018), quienes encontraron concentraciones de rebaudiósido A de 4.53 a 5.74 % en hojas de estevia, a los reportados por Karimi *et al.* (2015) quienes en hojas de estevia encontraron de 2.1 a 2.4 % de rebaudiósido A.

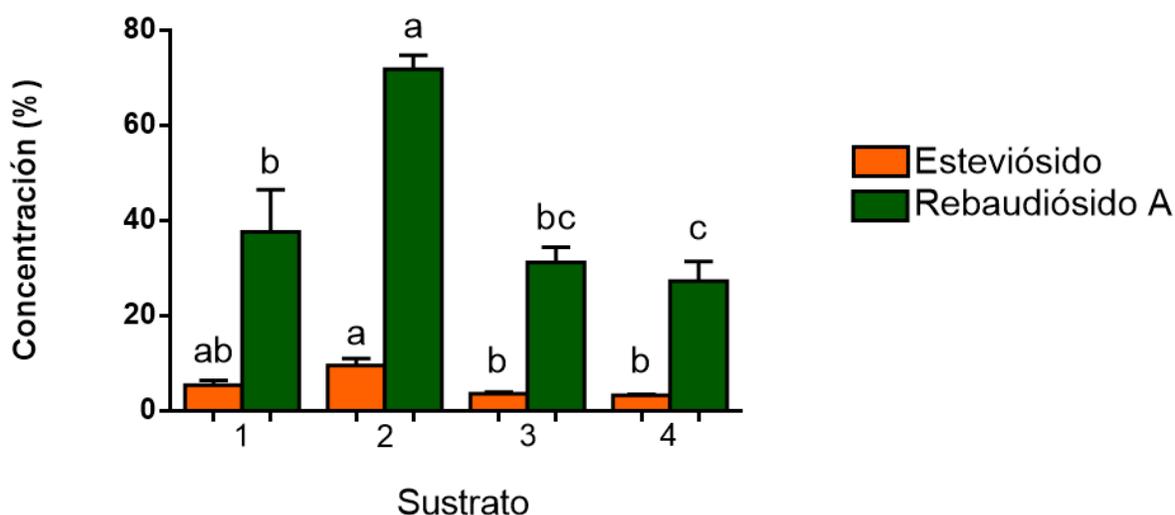


Figura 14. Concentración de esteviósido y rebaudiósido A en *Stevia rebaudiana*, cultivada en sustratos. 1 = tierra de hoja, 2 = tierra de hoja con lombricomposta, 3 = tierra de hoja con perlita, 4 = tierra de hoja con fibra de coco. Cada barra representa la media de 6 repeticiones, con error estándar y las letras representan la diferencia significativa según la prueba de medias (Tukey= 0.05).

Cabe mencionar que, en la mayoría de los estudios de glucósidos de estevia, las concentraciones de esteviósido son mayores a las de rebaudiósido A, sin embargo, en el presente estudio se encontraron mayores concentraciones de rebaudiósido A en comparación a la concentración de esteviósido. Además de los tratamientos, estas diferencias pueden atribuirse al genotipo evaluado, así como a las condiciones ambientales donde se desarrolló el cultivo.

Es probable que los altos niveles de rebaudiósido A que se encontraron en el presente estudio se deben a que el cultivar Morita II ha sido mejorado para contener mayor proporción de rebaudiósido A en comparación al esteviósido, por lo cual el rebaudiósido A puede estar en concentraciones de alrededor de 60 % (Ohta *et al.*, 2010). Estos mismos autores reportaron concentraciones de rebaudiósido A (61.6 %), esteviósido (9.2 %) y rebaudiósido C (7.5 %).

## **CONCLUSIONES**

La mezcla de tierra de hoja con lombricomposta, favoreció la concentración de esteviósido (9.5 %) y rebaudiósido A (71.5 %).

Esta combinación de sustratos se considera adecuada para la producción orgánica de este cultivo, ya que se obtuvo el mayor peso fresco y seco de hojas (154.8 y 39.6 g por planta, respectivamente).

## LITERATURA CITADA

- 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.
- Amber, V. (2007). Digitally Enhanced Thin-Layer Chromatography. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, *J. CHEM. Educ*, 84(5):842.
- Anbazzhagan, 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.
- 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.
- 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.
- Ávalos, A., Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca. Serie Fisiología Vegetal*. 2:3:119-145.
- Brandle J. (1998). *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Can j plant sci*. 78:4:527-536.
- Chaturvedula, S., Upreti, M. (2011). Diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Molecules*. 16: 3552-3562.
- Christou, P., Savin, R., Pierce, B., Misztal, I., Whitelaw, B. (2013). Sustainable food production. Springer-Verlag New York. 1:3:
- Diario Oficial de la Federación (DOF). (2000). Diario Oficial de la Federación NOM-021-SEMARNAT-2000 Norma oficial mexicana, especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis (p. 85)
- 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
- Douglas., A. (2002). *Stevia*: The Genus *Stevia* Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles. Londres: Taylor and Francis. 1:1-23
- Duran, S., Cordón, K. y Rodríguez, M. (2013). Edulcorantes no nutritivos, riesgos, apetito y ganancia de peso. *Revista chilena de nutrición*. 40: 309-314
- EFSA (2010) Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre<sup>1</sup> EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA)<sup>2</sup>, 3

European Food Safety Authority. Gomis, V. Técnicas instrumentales en el análisis industrial. (2008) - [rua.ua.es](http://rua.ua.es)

González, C., Tapia, M., Pérez, E., Dornier, M., Morel, G. (2014) Caracterización de Cultivares de *Stevia rebaudiana* Bertoni de diferentes procedencias. *Bioagro*.26:2:79-88.

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

Goyal, K., Samsheer, A., Goyal, K. (2009). *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio-sweetener: A review. *International journal of food sciences and nutrition*. 61:1-10.

Gutiérrez, JP., Rivera-Dommarco, J., Shamah-Levy, T., Villalpando-Hernández, S., Franco, A., Cuevas-Nasu, L., Romero-Martínez, M., Hernández-Ávila, M (2013). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Instituto Nacional de Salud Pública (MX).

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.

Hashimoto Y, Moriyasu M. Determination of sweet components in *Stevia rebaudiana* by high performance liquid chromatography ultraviolet detection. *Shoyakugaku Zasshi* 1978; 32 (2): 209-11.

ITIS, (Integrated Taxonomic Information System) <http://www.itis.gov/>

Jarma, A., Espitia, M., Fischer, G. (2010). Síntesis de Esteviósidos en *Stevia (Stevia rebaudiana BERT)*. *Acta biol.Colomb*. 15:1: 289 – 294.

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.

JECFA (2010) SteviolGlycosides, FAO JECFA Monographs. FAO, Rome

Jensen, W. (2007). The origin of the Soxhlet extractor. *Journal of Chemical Education*. 84:12

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.

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.

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 (kaâheê) cultivada comercialmente. Estudio preliminar. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 8:1:47-53.

Karimia, M., Ahmadi, A., Hashemib, J., Abbasia, A., Tavarinic, S., Pompeianod, A., Guglielminettic, L., & Angelinic, L. (2015). Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana. Plant Biosystems.

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.  
Popovic, N., Sherma, J. (2014). Comparative study of the quantification of thin-layer chromatograms of a model dye using three types of comercial densitometers and image analysis with ImageJ. Trends in Cromatography, 9: p. 21-28.

Singh SD, Rao GP. Stevia: The herbal sugar of 21st century Sugar Tech. 2005; 7 (1):17-24.

Shibata H, Sonoke S, Ochiai H, Nishihashi H, Yamada M. Glucosylation of Steviol and Steviol-Glucosides in Extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Physiol. 1991; 95(1): 152–6.

Uçar, E., Turgut, K., Özyiğit, Y., Özek, T & Özek, G. (2018). The effect of different nitrogen levels on yield and quality of stevia (*Stevia rebaudiana* bert). JOURNAL OF PlantNutrition.

Villalba, C; López, R; Trinidad, A; Quevedo, A; Muratalla, A. (2018). Glucósidos en respuesta a dos fuentes de nutrición en *Stevia rebaudiana* Bertoni. Terra Latinoamericana, 36 (4): 98-105.

Yücesan, B; Büyükgöçmen, R; Mohammed, A; Sameeullah, M; Altuğ, C; Gürel, S; Gürel, E. An efficient regeneration system and steviol glycoside análisis of *Stevia rebaudiana* Bertoni, a source of natural high-intensity sweetener. Received: 24 December 2015 /Accepted: 10 May 2016 / Editor: Masaru Nakano. The Society for In Vitro Biology 2016.

## APENDICE I

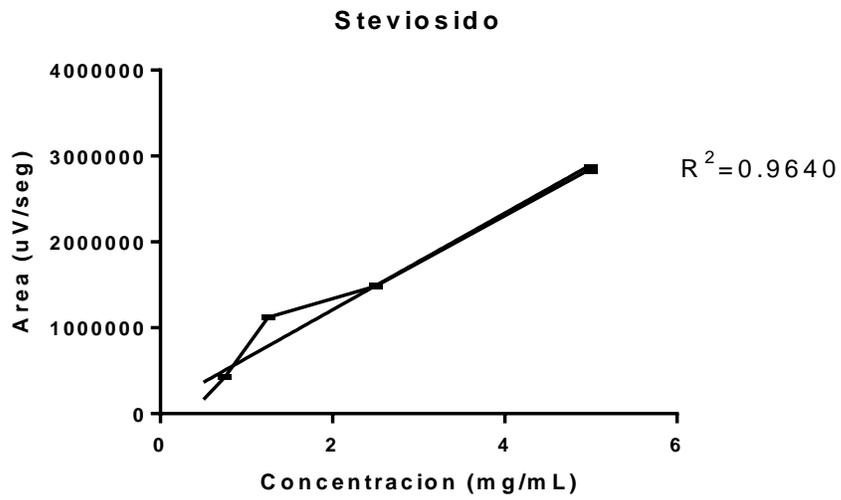


Figura A1. Curva de calibración del Esteviósido

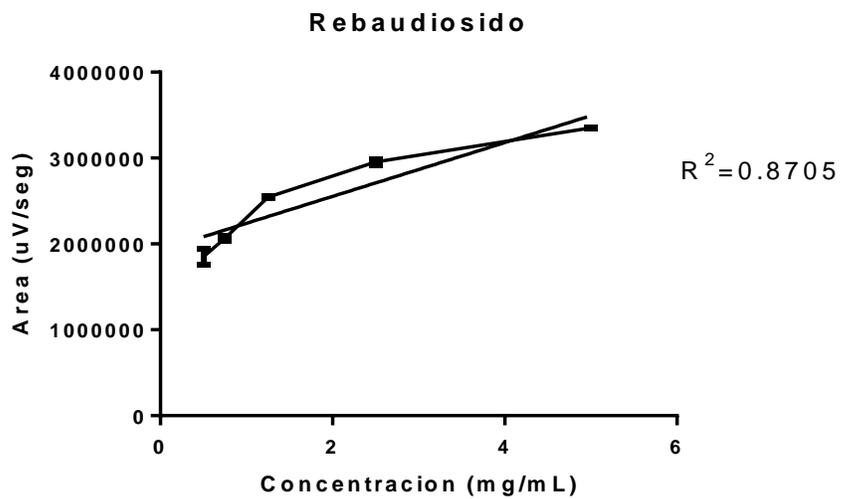


Figura A2. Curva de calibración del Rebaudiósido A

Ecuación de la recta:

$$Y = mx + c$$

Despejamos X:

$$y/m - c = x$$

Esteviósido:

$$X = (\text{Área}) - 83766$$

$$562935$$

Rebaudiósido A:

$$X = (\text{Área}) - 1.927e + 006$$

$$323299$$



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**CEIB**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN BIOTECNOLOGÍA

Centro de Investigación en Biotecnología

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Cuernavaca, Mor., a 15 de enero de 2020.

Programa:  
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Cuantificación de esteviósido y rebaudiósido A en *Stevia rebaudiana* cultivada en sustratos orgánicos**

Alumno que presenta tesis a revisión: **Christian Andrea Domínguez Benítez**

Comité de revisión de tesis:  
**Dr. Porfirio Juárez López (Tutor)**  
**Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa**  
**Dr. Irán Alía Tejacal**  
**M. en C. Eliane Madaí Rendón Vallejo**  
**Dr. Dante Vladimir Galindo García**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**CEIB**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN BIOTECNOLOGÍA

Centro de Investigación en Biotecnología

*Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales*

Cuernavaca, Mor., a 15 de enero de 2020.

Programa:  
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Cuantificación de esteviósido y rebaudiósido A en *Stevia rebaudiana* cultivada en sustratos orgánicos**

Alumno que presenta tesis a revisión: **Christian Andrea Domínguez Benítez**

Comité de revisión de tesis:  
**Dr. Porfirio Juárez López (Tutor)**  
**Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa**  
**Dr. Irán Alia Tejacal**  
**M. en C. Eliane Madaí Rendón Vallejo**  
**Dr. Dante Vladimir Galindo García**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

M. en C. Eliane Madaí Rendón Vallejo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**CEIB**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN BIOTECNOLOGÍA

Centro de Investigación en Biotecnología

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Cuernavaca, Mor., a 15 de enero de 2020.

Programa:  
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Cuantificación de esteviósido y rebaudiósido A en *Stevia rebaudiana* cultivada en sustratos orgánicos**

Alumno que presenta tesis a revisión: **Christian Andrea Domínguez Benítez**

Comité de revisión de tesis:  
**Dr. Porfirio Juárez López (Tutor)**  
**Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa**  
**Dr. Irán Alia Tejacal**  
**M. en C. Eliane Madaí Rendón Vallejo**  
**Dr. Dante Vladimir Galindo García**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dr. Porfirio Juárez López



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**CEIB**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN BIOTECNOLOGÍA

Centro de Investigación en Biotecnología

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Cuernavaca, Mor., a 15 de enero de 2020.

Programa:  
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Cuantificación de esteviósido y rebaudiósido A en *Stevia rebaudiana* cultivada en sustratos orgánicos**

Alumno que presenta tesis a revisión: **Christian Andrea Domínguez Benítez**

Comité de revisión de tesis:  
**Dr. Porfirio Juárez López (Tutor)**  
**Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa**  
**Dr. Irán Alía Tejacal**  
**M. en C. Eliane Madai Rendón Vallejo**  
**Dr. Dante Vladimir Galindo García**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dr. Irán Alía Tejacal



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**CEIB**  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN  
EN BIOTECNOLOGÍA

Centro de Investigación en Biotecnología

Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Cuernavaca, Mor., a 15 de enero de 2020.

Programa:  
Maestría en Investigación y Desarrollo de Plantas Medicinales

Título de la tesis: **Cuantificación de esteviósido y rebaudiósido A en *Stevia rebaudiana* cultivada en sustratos orgánicos**

Alumno que presenta tesis a revisión: **Christian Andrea Dominguez Benítez**

Comité de revisión de tesis:  
**Dr. Porfirio Juárez López (Tutor)**  
**Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa**  
**Dr. Irán Alia Tejacal**  
**M. en C. Eliane Madaí Rendón Vallejo**  
**Dr. Dante Vladimir Galindo García**

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado. Por lo tanto, emito mi **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

Dr. Dante Vladimir Galindo García