

A. SANTINI¹, L. FERRARA²,
D. NAVIGLIO¹, A. ARAGÓN³,
A. RITIENI¹

La Stevia: un dolcificante non calorico di origine naturale

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 10, N. 1, 3-10, 2008

TITLE

Stevia: non calorific natural sweetener

KEY WORDS

Stevia, steviolosides, LC, MS, non-caloric sweeteners

PAROLE CHIAVE

Stevia, steviolosidi, LC, MS, dolcificanti non calorici

¹Dipartimento di Scienza degli Alimenti - Facoltà di Agraria, Università di Napoli Federico II, Portici (Napoli)

²Dipartimento di Chimica Farmaceutica e Tossicologica - Facoltà di Farmacia, Università di Napoli Federico II, Napoli

³Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales - Universidad de La Plata, Buenos Aires, Argentina

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof. Lydia Ferrara

Dipartimento di Chimica Farmaceutica e

Tossicologica - Facoltà di Farmacia -

Università di Napoli "Federico II"

Via Domenico Montesano 49 - 80131 Napoli

E-mail: lyferrara@unina.it

Summary

Stevia rebaudiana Bertoni is a herbaceous perennial shrub native to the highlands of Paraguay and sections of Argentina and Brazil that are situated along the 25th Degree Line, South Latitude. It is widely diffused now in many parts of the world. Stevia leaves have been used for centuries by the Guarani Tribe of Paraguay, the Mestizos, and by other natives, that refer to Stevia as Caá-hê-é. They have used the herb to sweeten their bitter beverages (matè for example) since pre-Columbian times. Its use is nowadays approved in many countries, e.g. Brasil, Argentina, China, Japan. Stevia Rebaudiana contains six diterpenic glycosides that exhibit an intense sweet taste, the most important being the Stevioloside and Rebaudioside A, both about three hundred and four hundred times sweeter than saccharose, respectively. Minor components identified are Rebaudioside C, Dulcoside A, Rebaudioside E and Rebaudioside D. This work describes a new extraction procedure and the characterization of the Steviolosides from leaves of the Stevia Rebaudiana and its possible use as non-caloric natural sweetener in food preparations.

Riassunto

La *Stevia rebaudiana* Bertoni è un piccolo arbusto perenne nativo del Paraguay e presente anche in Argentina e Brasile, che appartiene alla famiglia dei crisantemi; originariamente sviluppata soltanto nelle regioni settentrionali dell'America Latina, si è diffusa in tutto il mondo e le sue foglie sono state usate per secoli come dolcificante naturale dagli Indiani Guarani del Paraguay. Il suo impiego è oggi approvato in molti Paesi, tra i quali Brasile, Argentina, Paraguay, Cina, Giappone. La *Stevia rebaudiana* contiene sei glucosidi diterpenici che posseggono un intenso gusto dolce, il più importante dal punto di vista quantitativo è lo Stevioloside, il cui potere dolcificante è circa trecento volte maggiore del saccarosio, seguito dal Rebaudioside A, circa quattrocento volte più dolce del saccarosio. I costituenti minori sono il Rebaudioside C, il Dulcoside A e, in tracce, il Rebaudioside E e il Rebaudioside D. In questo lavoro viene descritta una nuova procedura di estrazione ed il possibile impiego di Steviolosidi in matrici alimentari in diverse condizioni.

Introduzione

La *Stevia rebaudiana* Bertoni è un arbusto perenne che appartiene alla famiglia delle Compositae, ed è nativa del Paraguay e del Brasile; presenta foglie, lanceolate, lunghe 5 cm e larghe 2 cm, e viene piantata di traverso, affrontandosi. L'altezza media della pianta varia da 40 a 80 cm, ma può raggiungere anche l'altezza di 1 m. Il peso secco di una pianta adulta si aggira su circa 70 g di cui quello relativo alle sole foglie varia dai 15 ai 35 g per pianta. Originariamente la Stevia si è sviluppata soltanto nelle regioni settentrionali dell'America Latina, ma ben presto la sua coltivazione si è diffusa in tutto il mondo. Le piante di Stevia possono svilupparsi su terreni relativamente scarsi di nutrienti ed il loro adattamento alle più diverse condizioni climatiche è bene descritto. La *Stevia rebaudiana* contiene 6 glicosidi diterpenici che conferiscono un intenso gusto dolce agli alimenti o bevande a cui è addizionata. Il più importante dal punto di vista quantitativo è lo Stevioside, il cui potere dolcificante è circa 300 volte maggiore del saccarosio, seguito dal Rebaudioside A, circa 400 volte più dolce del saccarosio. I costituenti minori sono considerati il Rebaudioside C, il Dulcoside A oltre al Rebaudioside E e al Rebaudioside D, presenti solo in tracce. Le proporzioni comunemente osservate (p/p) dei 4 glicosidi princi-

pali sono: Stevioside 5-10%, Rebaudioside A 2-4%, Rebaudioside C 1-2% e Dulcoside A 0,5-1%. La loro dolcezza varia da 40 a 250 volte più di quella del saccarosio. Il contenuto di Stevioside nelle foglie di *Stevia Reubadiana Bertoni*, durante il periodo di coltivazione non è correlato alla temperatura ambientale media e non sembra nemmeno dipendere dal tipo di propagazione mentre è fortemente influenzato dalle precipitazioni atmosferiche medie, mentre la maggiore quantità di Stevioside per biomassa è presente nella prima settimana di settembre (1).

In figura 1 viene riportata la struttura chimica dei principali glicosidi presenti nelle foglie di *Stevia Reubadiana Bertoni*; questi glicosidi derivano dall'acido kaureonico. Lo Steviololo, un derivato idrossilato di

quest'acido, è il precursore nella biosintesi dei composti ad azione dolcificante presenti nella Stevia. Lo Stevioside è il glucoside maggiormente studiato ed è stato isolato per la prima volta da Bridel e Lavielle nel 1931 (2), ma la struttura chimica dell'aglicone venne determinata da Mossetig et al. solo nel 1963 (3). Questo composto, utilizzato come dolcificante non calorico in molti paesi anche dall'industria alimentare è termicamente stabile e possiede un indice di dolcezza elevato. La tabella 1 riporta il potere dolcificante della Stevia e di molecole ad azione dolce riferite al saccarosio scelto come riferimento. In questo lavoro viene presa in considerazione la stabilità degli estratti di Stevia e la non degradabilità dei suoi componenti quando vengono sottoposti a stress

Figura 1 - Struttura chimica dello stevioside e dei principali glicosidi della Stevia

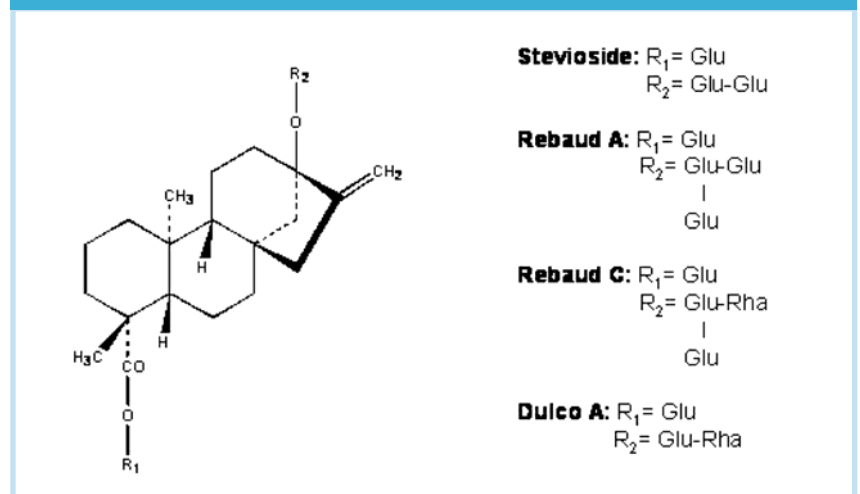


Tabella 1 - Potere dolcificante di differenti dolcificanti energetici e intensivi

Sostanza	Potere dolcificante (rispetto al saccarosio)
Stevia	70-400
Saccarosio	1
Lattosio	0.2-0.4
Lactitolo	0.3-0.4
Sorbitolo	0.5-0.6
Mannitolo	0.5-0.6
Isomaltosio	0.5-0.6
Glucosio	0.7-0.8
Maltitolo	0.8-0.9
Xilitolo	0.8-1.0
Fruttosio	1.0-1.8
Ciclamato	30-80
Aspartame	130-250
Saccarina	300-500
Sucralosio	400-600
Alitame	1800-2000
Taumatina	2000-2500
Neoesperidina DC	2000-3000

termici, onde valutarne l'impiego come dolcificante non calorico nella preparazione di prodotti alimentari.

Parte sperimentale

Metodiche estrattive ed analisi

Il metodo proposto in questo lavoro si è rivelato veloce e quantitativo per l'estrazione e caratterizzazione

degli Steviosidi contenuti in foglie di *Stevia Rebaudiana Bertoni*. Come riferimento per verificare il contenuto di steviosidi nei campioni vegetali analizzati sono stati caratterizzati prodotti commerciali dolcificanti a base di Stevia forniti dal Laboratorio PGN S.A. (Argentina) sotto forma di estratto di Stevia liquida e in granuli ad una concentrazione di 48 µg/mL.

L'estrazione dei glicosidi dalle foglie di Stevia è stata effettuata impiegando il metodo proposto da Vanek et al. (4), opportunamente modificato: 5 g di foglie sono state omogeneizzate in un Blender della Warning Commercial per 2 min e poste in una beuta. Successivamente sono stati aggiunti 25 ml di acqua alla temperatura di 100°C ed il tutto omogeneizzato con Ultraturax per 3 min. La soluzione, filtrata su carta, è stata successivamente centrifugata per 5 min a 4000 rpm alla temperatura di 4°C. Il surnatante è stato poi purificato utilizzando una colonna da 3 ml Strata C₁₈-E (55 µm, 70 Å) 500 mg/3ml (Phenomenex) precedentemente attivata con 3 ml di metanolo e 10 ml di acqua. La colonna è stata caricata con 10 ml di campione ed è stata successivamente lavata con 10 ml di acqua; l'eluizione si è ottenuta utilizzando 3 ml di metanolo. Il filtrato così ottenuto era pronto per l'analisi LC/MS che ha consentito di identificare gli steviosidi presenti.

Per l'analisi HPLC è stato impiegato un sistema Perkin Elmer costituito da due micropompe series 200 utilizzando come eluente a gradiente lineare un sistema costituito da: A: acqua - 0.1% acido formico, B: acetonitrile, indicato in tabella 2. È stata adoperata una colonna Luna C₁₈ 5 µm, 250x4.6 mm, (Phenomenex, USA), con un flusso da 1 ml/min, termostata a 30°C. Per l'acquisizione dei dati è stato usato uno spettrometro di massa API 100 a singolo quadrupolo della Perkin Elmer (Toronto, Canada) nella modalità degli ioni positivi nel range da 300 a 1300 uma, con un valore di 5000 V per la sorgente ionica e 30 V per il potenziale di frammentazione. L'analisi LC/MS ha consentito di individuare 9 differenti steviosidi, con un'elevata concentrazione dei composti A, B, C maggiormente glicosilati, in accordo con quanto riportato in letteratura (5, 6). Gli spettri ottenuti sono riportati in figura 2 (A) e (B) mentre in tabella 3 sono mostrati i tempi ed i valori *m/z* ottenuti mediante spettrometria di massa. Il composto A con *m/z* 967 potrebbe corrispondere allo Steviololo legato a 4 molecole di glucosio oppure al Rebaudioside E con la perdita di 1 glucosio; il composto B con *m/z* 805 rappresenta il Rebaudioside C (dulcoside B o A); il composto C *m/z* 951,8 rappresenta il Rebaudioside C (dulcoside B o A); il composto E con *m/z* 643 corrisponde allo

Figura 2 - A) e (B). Spettri di massa degli steviosidi presenti nell'estratto di Stevia

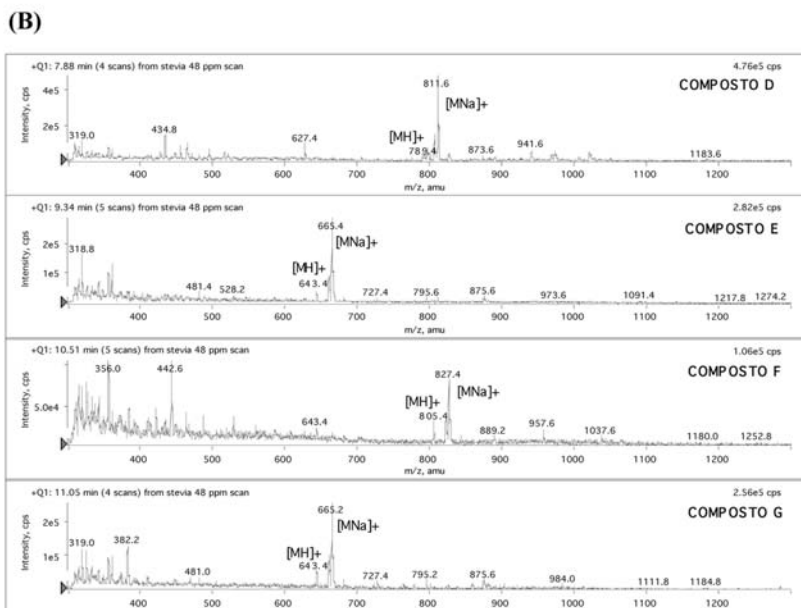
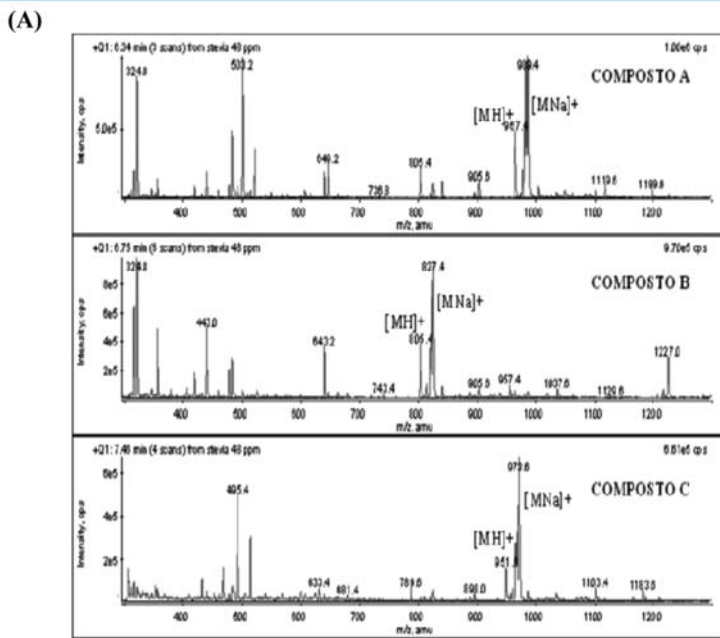


Tabella 2 - Gradiente di solventi usati per l'analisi LC/MS; A: acqua - 0.1% acido formico, B: acetonitrile

Tempo (min)	Eluente A (%)	Eluente B (%)
0	65	35
15	50	50
18	10	90
20	65	35

Steviolbioside; il composto F con m/z 805 coincide con lo Stevioside A o B; il composto G con m/z 643 corrisponde allo Steviolbioside.

Trattamenti tecnologici su matrici alimentari contenenti Stevia

Allo scopo di verificare la stabilità e persistenza degli steviosidi, sono state eseguite delle prove su campioni di estratto di Stevia in acqua, in succo d'arancia e costituiti da biscotti dolcificati con estratto di Stevia.

Trattamenti termici

Allo scopo di verificare la stabilità degli steviosidi a trattamenti termici diversi, sono state preparate soluzioni acquose di Stevia liquida diluite nel rapporto 1/100 e sono state sottoposte a varie prove. In particolare, le soluzioni sono state portate a bassa temperatura

Tabella 3 - Steviosidi presenti nell'estratto di Stevia

Nome	tr	m/z	Composto
Steviole + 4 Glu oppure Rebaudioside E - 1 Glu	6,34	[MH] ⁺ 967; [MNa] ⁺ 989	A
Rebaudioside A o B	6,59	[MH] ⁺ 805; [MNa] ⁺ 827	B
Rebaudioside C o Dulcoside B o A	7,42	[MH] ⁺ 951,8; [MNa] ⁺ 973,6	C
Rebaudioside C - 1 Glu	7,84	[MH] ⁺ 789,4; [MNa] ⁺ 811,6	D
Steviolbioside	9,34	[MH] ⁺ 643; [MNa] ⁺ 665	E
Stevioside A o B	10,42	[MH] ⁺ 805; [MNa] ⁺ 827	F
Steviolbioside	11,09	[MH] ⁺ 643; [MNa] ⁺ 665	G

(T=-38°C), riscaldate (T=120°C), e trattate con microonde (900 W, T=1 min). Come riferimento è stata impiegata la soluzione in acqua tal quale a temperatura ambiente. Per evidenziare la presenza degli steviosidi i campioni sono stati fatti passare su colonnine C₁₈ e analizzati mediante spettrometria di massa. I risultati ottenuti hanno consentito di osservare che, dopo il trattamento termico a 120°C e il trattamento con le microonde, il contenuto di steviosidi rimane invariato rispetto alla quantità iniziale (69 ppm). Tale osservazione viene confermata da quanto osservato nel campione di Stevia liquida sciolta in acqua e portata alla temperatura di -38°C nel quale il contenuto degli steviosidi resta costante rispetto a quello iniziale (72 ppm).

Sterilizzazione

Sono stati preparati 4 campioni costituiti da 50 ml di succo di arancia contenenti 1.5 ml e 1.0 ml di estratto di Stevia ad una concentrazione pari a 52 ppm. Per effettuare un confronto sono stati preparati anche campioni contenenti le stesse quantità di Stevia, ma costituiti da sola acqua. I campioni sono stati centrifugati a 4000 giri al minuto per 5 min alla temperatura di 4°C, filtrati su carta e mescolati mediante agitazione vortex per 5 min. La sterilizzazione in autoclave è stata effettuata alla temperatura di 120°C per 20 min. Dopo la sterilizzazione i campioni sono stati purificati su colonnine C₁₈ e esaminati mediante spettrometria di massa per verificare la presenza degli steviosidi dopo il trattamento

termico. In tutti i campioni analizzati non è stata osservata variazione nel contenuto di steviosidi consentendo di osservare che questo tipo di trattamento termico non produce alcuna una degradazione degli steviosidi.

Pastorizzazione

La pastorizzazione è stata effettuata su campioni di 500 ml costituiti da matrici alimentari liquide: acqua e succo d'arancia contenenti 5.0 ml di Stevia in soluzione acquosa ad una concentrazione di 52 ppm. I campioni liquidi sono stati sottoposti a una pastorizzazione blanda per 30 min a T=85°C per simulare la preparazione di succhi di frutta casalinghi e sono quindi stati purificati su colonnine C₁₈ e analizzati con LC/MS. Dal confronto della frazione metanolica di Stevia sciolta in succo al tempo t=0 con la frazione metanolica dopo il trattamento a 85°C non si nota alcuna variazione nella concentrazione del contenuto di steviosidi pari a 52 ppm nel campione prima del trattamento di pastorizzazione e pari a 51 ppm dopo la pastorizzazione.

Cottura in forno

Come matrice alimentare solida per verificare la stabilità degli steviosidi al trattamento termico, sono stati scelti biscotti di pasta frolla. Parte dei biscotti sono stati preparati so-

stituendo lo zucchero (saccarosio) con una pari quantità di estratto di Stevia liquida, in particolare sono stati usati 50 g di saccarosio e 50 ml di una soluzione acquosa ad una concentrazione pari a 43 ppm di Stevia. Successivamente i biscotti sono stati infornati per un tempo di 30 min e ad una temperatura di 150 e 200°C.

Dopo la cottura, sui biscotti è stata effettuata l'estrazione degli zuccheri con il metodo proposto da Fernández-Artigas et al. (7), e successivamente l'estratto è stato purificato su colonnine C₁₈ e tutte le frazioni raccolte sono state analizzate con LC/MS. Nei biscotti cotti a 150°C la concentrazione di steviosidi osservata è risultata pari a 43 ppm, mentre in quelli cotti a 200°C è risultata pari a 42 ppm, confermando che la quantità di steviosidi presenti rimane praticamente invariata.

Risultati e conclusioni

Il comportamento degli steviosidi responsabili del sapore dolce è stato valutato rispetto a trattamenti tecnologici su soluzioni acquose (succo di arancia), e in preparazioni da forno (biscotti). La valutazione della stabilità e persistenza degli steviosidi, è stata verificata mediante trattamenti termici: bassa temperatura, elevata temperatura, trattamento con microonde. I risultati ottenuti consentono di affermare che la persistenza dei glicosidi (steviosidi) ri-

mane costante ed è elevata anche dopo un trattamento termico spinto, come nel caso della cottura a 200°C. Trattamenti termici blandi (pastorizzazione) e spinti (sterilizzazione) su soluzioni diluite contenenti Stevia e succo di arancia dolcificato con Stevia hanno consentito di osservare inoltre che il contenuto degli steviosidi rimane costante. Queste osservazioni suggeriscono come la Stevia possa essere considerata un valido dolcificante non calorico di origine naturale e che è possibile impiegare estratti di Stevia, liquida o in polvere, come dolcificante bulk in preparazioni alimentari. Se si considera inoltre che la coltivazione della pianta è facilmente adattabile a condizioni climatiche diverse, e che l'estrazione dei principi dolcificanti in essa contenuti non presenta particolari difficoltà, l'impiego di Stevia come dolcificante in matrici alimentari, anche da sottoporre a trattamento termico spinto, appare estremamente interessante. Studi recenti hanno inoltre messo in evidenza che lo Stevioside e in generale gli steviosidi contenuti nella pianta di Stevia, non presentano alcuna tossicità né attività mutagena, ma hanno al contrario alcune peculiarità terapeutiche, tra le quali la stimolazione della secrezione di insulina nel pancreas, caratteristica importante nel trattamento del diabete e altri disturbi del metabolismo dei carboidrati (8). Studi effettuati per valuta-

re la tossicità acuta (9), hanno determinato per lo Stevioside una LD₅₀ pari a 8.2 g/kg ed è stato anche osservato che lo Stevioside possiede proprietà antivirali e produce effetti terapeutici positivi nel trattamento di pazienti affetti da patologie neurologiche, anemiche, reumatologiche e dermatologiche (10, 11). La somministrazione a soggetti ipertesi di stevioside al 96% di purezza alla dose di 250 mg tre volte al giorno per 1 anno (12) già dopo 3 mesi ha indicato una significativa diminuzione della pressione sia sistolica che diastolica, e tale effetto è stato persistente per l'intero anno senza alcun effetto negativo per cui, data l'efficacia e la perfetta tolleranza dello stevioside, esso può essere considerato una terapia sostitutiva o di complemento per i pazienti ipertesi. Nel 1995 la FDA ha riconosciuto alla Stevia l'impiego come integratore alimentare per i suoi benefici effetti terapeutici, lasciando in sospeso l'approvazione come additivo alimentare per insufficiente sperimentazione sulla stabilità dei suoi componenti.

Nell'Unione Europea l'utilizzo non è consentito mentre il suo impiego è oggi approvato in alcuni paesi quali Brasile, Argentina, Giappone, Cina e Paraguay.

Bibliografia

1. Tateo F, Sanchez M, Escobar L, et al. Stevioside content os Stevia Rebaudia-

- na (Bertoni) grown in east Paraguay. *Int J Food Science* 1999; 11 (3): 265-9.
2. Bridel M, Lavieille R. The sweet principle of the leaves of Kaa-he-e (Stevia Rebaudiana Bertoni). *Bulletin de la Societe de Chimie Biologique* 1931; 13: 635-55.
 3. Mossetig E, Beglinger U, Dolder F, et al. The absolute configuration of steviol and isosteviol. *J American Chem Soc* 1963; 85 (15): 2305-9.
 4. Vanek T, Nevopim A, Valicek P. Determination of Stevioside in plant material and fruit teas. *J Food Composition and Analysis* 2001; 14 (4): 383-8.
 5. Geuns JMC. Safety evaluation of Stevia and stevioside. In: Atta-ur-Rahaman (Ed), *Studies in Natural Products Chemistry, Vol.27: Bioactive Natural Products (Part H)*, Elsevier, Amsterdam 2002; 27: 299-319.
 6. Kedik SA, Fedorov SV, Yanul' NA, et al. Chromatographic determination of stevioside in raw plant material. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2003; 37 (10): 529-32.
 7. Fernandez-Artigas P, Guerra-Hernandez E, Garcia-Villanova B. Changes in sugar profile during infant cereal manufacture. *Food Chemistry* 2001; 74 (4): 499-505.
 8. Jeppesen PB, Gregersen S, Poulsen CR, et al. Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K⁺-channel activity. *Metabolism* 2000; 9 (2): 208-14.
 9. Lee SJ, Lee KR, Park JR, et al. A study on the safety of the stevioside as a new sweetening source. *Han'guk Sikp'um Kwahakhoechi* 1979; (4): 224-31.
 10. Dozono F. 1993. US patent No. 5262161; <http://www.chemweb.com/databases/patents>.
 11. Takahashi K, Matsuda M, Ohashi K, et al. Analysis of anti-rotavirus of extract from Stevia Rebaudiana. *Antivir Res* 2001; 49 (1): 15-24.
 12. Chan P, Tomlinson B, Chen YJ, et al. A double-blind placebo controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension *Br J Clin Pharmacol* 2000; 215-20.